# 最終報告書

試験名:2-二トロ-p-アニシ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-1301

試験施設 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室 〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

> 株式会社ボゾリサーチセンター 〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

### 1. 目次

| 1. | 目次  |        | 2 |
|----|-----|--------|---|
| 2. | 試験  | 実施概要   | 5 |
|    | 2.1 | 試験計画書  |   |
|    | 2.2 | 試験目的   | 5 |
|    | 2.3 | 試験委託者  | 5 |
|    | 2.4 | 試験受託者  | 5 |
|    | 2.5 | 試験実施施設 | 5 |
|    | 2.6 | 被験物質   |   |
|    |     |        |   |

| 1. | 要約    |   | 9  |
|----|-------|---|----|
| 5. | 緒言    | .,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,, | 10 |
| 5. | 試験    | 材料及び方法                                  | 11 |
|    | 6.1   | 被験物質及び溶媒                                | 11 |
|    | 6.1.1 | 被験物質                                    | 11 |
|    | 6.1.2 | 溶媒                                      | 11 |
|    | 6.2   | 被験液の調製                                  | 12 |
|    | 6.2.1 | 調製方法                                    | 12 |
|    | 6.2.2 | 調製頻度                                    | 12 |
|    | 6.2.3 | 安定性                                     | 12 |
|    | 6.3   | 対照物質                                    | 12 |
|    | 6.3.1 | 溶媒対照                                    | 12 |
|    | 6.3.2 | 陽性対照                                    | 12 |
|    | 6.4   | 使用細胞株                                   | 13 |
|    | 6.4.1 | 細胞株                                     | 13 |
|    | 6.4.2 | 細胞の選択理由                                 |    |
|    | 6.4.3 | 培養条件                                    |    |
|    | 6.4.4 | 細胞の性状検査                                 |    |
|    | 6.5   | S9 mix 及び培養液                            |    |
|    | 6.5.1 | S9 mix                                  |    |
|    | 6.5.2 | 培養液                                     |    |
|    |       |   |    |

|    | 6.6   | 試験方法                                       |    |
|----|-------|--|----|
|    | 6.6.1 | 識別方法                                       | 16 |
|    | 6.6.2 | 用量の設定                                      | 16 |
|    | 6.6.3 | 細胞増殖抑制試験                                   |    |
|    | 6.6.4 | 染色体異常試験                                    |    |
|    | 6.6.5 | 標本の観察                                      |    |
|    | 6.6.6 | 490 ANDERSTMEN ADDRESS BERKET DESK STOCKEN |    |
|    | 6.6.7 | 判定基準                                       |    |
| 7. | 試験    | 結果   |    |
|    | 7.1   | 細胞增殖抑制試験                                   |    |
|    | 7.1.1 | 短時間処理法                                     | 21 |
|    | 7.1.2 | 連続処理法                                      | 21 |
|    | 7.2   | 染色体異常試験                                    | 22 |
|    | 7.2.1 | 短時間処理法                                     | 22 |
| 8. | 考察    |  |    |
| 9. | 参考    | 文献   | 24 |

# Figures and Tables

| Fig. 1-1 | Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese |
|----------|--|
|          | hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine                 |
|          | [Short-term treatment: +S9 mix]                                |
| Fig. 1-2 | Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese |
|          | hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine                 |
|          | [Short-term treatment: -S9 mix]                                |
| Fig. 1-3 | Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese |
|          | hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine                 |
|          | [Continuous treatment: 24 hr]                                  |

| Fig. 1-4  | Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine |
|-----------|---|
|           | [Continuous treatment: 48 hr]   |
| Fig. 2-1  | Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese   |
|           | hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine  |
|           | [Short-term treatment: +S9 mix]   |
| Fig. 2-2  | Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese   |
| O,        | hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine  |
|           | [Short-term treatment: -S9 mix]   |
|           |   |
| Table 1-1 | Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured  |
|           | Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine  |
|           | [Short-term treatment: +S9 mix]   |
| Table 1-2 | Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured  |
|           | Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine  |
|           | [Short-term treatment: -S9 mix]   |
| Table 1-3 | Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured  |
|           | Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine  |
|           | [Continuous treatment: 24 hr]   |
| Table 1-4 | Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured  |
|           | Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine  |
|           | [Continuous treatment: 48 hr]   |
| Table 2-1 | Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured   |
|           | Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine  |
|           | [Short-term treatment: +S9 mix]   |
| Table 2-2 | Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured   |
|           | Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine  |
|           | [Short-term treatment: -S9 mix]   |
| Table 3-1 | Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells   |
|           | treated with 2-nitro-p-anisidine  |
|           | [Short-term treatment: +S9 mix]   |
| Table 3-2 | Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells   |
|           | treated with 2-nitro-p-anisidine  |
|           | [Short-term treatment: -S9 mix]   |
|           |   |

### 2. 試験実施概要

### 2.1 試験計画書

試験番号:M-1301試験表題:2-ニトロ-p-アニシジンのほ乳類培養細胞を用いる

染色体異常試験

#### 2.2 試験目的

ほ乳類の培養細胞 (CHL/IU 細胞株) を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の 有無を明らかにした。

### 2.3 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 東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

### 2.4 試験受託者

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

### 2.5 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

### 2.6 被験物質

製造者 : 昭和化工株式会社

名称 : 2-ニトロ-p-アニシジン、2-nitro-p-anisidine

受領日 2007年11月14日 1

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

### 4. 要約

2-ニトロ-p-アニシ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・ ハムスター培養細胞 (CHL/IU) を用いて染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 1700 μg/mLとして、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 1700 μg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 106 μg/mL、48 時間処理では 213 μg/mLで 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、短時間処理法の非代謝活性化では 1700 μg/mLにおいても 50%を超える細胞増殖抑制は認められなかった。被験物質の 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 1605.6 μg/mL、非代謝活性化では 1700 μg/mL以上、連続処理法の 24 時間処理では 77.8 μg/mL、48 時間処理では 110.9 μg/mLと算出された。これより、染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化では 1700 μg/mL を最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 4 試験用量を設定した。なお、連続処理法の 24 時間処理では 425 μg/mLを、48 時間処理では 213 μg/mLをそれぞれ最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 5 試験用量を設定したが、短時間処理法において明らかな陽性の結果が得られたことから、連続処理法は実施しなかった。

染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化では、1700、850、425 及び 213 μg/mL の染色体構造異常の指標であるギャップを含まない総異常細胞の出現頻度(TA 値)は、それぞれ 43.0、43.0、46.0 及び 26.5%を示し、全用量において、陽性の判定基準である 10%以上を示したため陽性と判定した。短時間処理法の非代謝活性化では、1700、850、425 及び 213 μg/mL の染色体構造異常の指標であるギャップを含まない総異常細胞の出現頻度(TA 値)は、それぞれ 2.0、1.5、0.5 及び 1.5%を示し、全用量において、陰性の判定基準である 5%未満を示したため陰性と判定した。

なお、染色体数的異常(倍数体)については、短時間処理法の代謝活性化及び非代 謝活性化の全用量において、陰性の判定基準である 5%未満を示したため陰性と判定 した。

一方、陽性対照群では、短時間処理法の代謝活性化では背景値よりもやや低かった ものの染色体構造異常の著しい誘発が認められ、非代謝活性化では背景値の範囲内に ある染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。また、陰性対照群における染色体の 構造異常及び倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、更に試験施設の背景値 と同様であった。従って試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、2-ニトロ-p-アニシジンは、本試験条件下において染色体構造異常 誘発能を有するが、染色体数的異常(倍数体)誘発能は有さないものと判定した。

### 5. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、2-ニトロ-p-アニシ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。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

### 6. 試験材料及び方法

### 6.1 被験物質及び溶媒

### 6.1.1 被験物質

製造者:

名称 : 2-ニトロ-p-アニシジン、2-nitro-p-anisidine

CAS 番号 : 96-96-8

構造式又は示性式

C7H8N2O3

純度: 99.91%入手量: 400 g性状: 黄色粉末分子量: 168.15

ロット番号:

安定性 : 試験終了後に東京化成工業株式会社分析センターにお

いて特性を測定し、その結果を入手して安定性を確認

した。

保存方法 : 冷蔵 (1~10°C) (保存期間中の実測温度:4~6°C)、

遮光、密栓

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

残余物の取り扱い: 被験物質の残余物は、東京化成工業においてすべて廃

棄した。

6.1.2 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 :

被験物質情報によれば、水に対する溶解度は低いとのことであったため、供試前の溶解性検討試験を実施した。本被験物質の最高用量は1700 µg/mL(10mM 相当)と推定されたことから、被験液の最高濃度を170 mg/mL とし、染色体異常試験において汎用されるDMSOへの溶解性を検討した。その結果、溶解性が確保出来たことから、DMSOを溶媒として選択した。

### 6.2 被験液の調製

### 6.2.1 調製方法

### 1) 細胞增殖抑制試験

被験物質 0.3400 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 170 mg/mL溶液 (プレートに 0.050 mL添加した際の最終濃度: 1700 μg/mL) を調製した。次いで、170 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、85.0、42.5、21.3、10.6、5.31、2.66 及び 1.33 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 0.3400 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 170 mg/mL 溶液(プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度: 1700  $\mu$ g/mL)を調製した。次いで、170 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL:溶媒 1 mL)で順次 3 段階希釈し、85.0、42.5 及び 21.3 mg/mL の 4 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 170 から 21.3 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。

#### 6.2.2 調製頻度

用時に調製した。

### 6.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的 及び触知にて観察し、被験液が安定性であることを確認した。

#### 6.3 対照物質

### 6.3.1 溶媒対照

溶媒として用いた DMSO を陰性対照物質とした。

### 6.3.2 陽性対照

1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシン C を用いた。

名称 : 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)

保存方法 : 冷蔵、遮光

保存場所 : 御殿場研究所遺伝毒性試験室 発癌性物質冷蔵保存庫

名称 : マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)

ロット番号 : 500AFJ

製造元 : 協和醗酵工業株式会社

力価 : 2mg (力価)/瓶 保存方法 : 室温、遮光

保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質室温保存庫

### 2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化では、CP 0.0140 g を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 K7B93)を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度: 14 μg/mL) を調製した。短時間処理法の非代謝活性化では、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 K7B93)を注射筒で 2 mL 加えて溶解した(1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL: 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 μg/mL)。

### 3) 陽性対照物質の選択理由

前記の毒性試験法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。

### 6.4 使用細胞株

#### 6.4.1 細胞株

チャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞(CHL/IU)を用いた。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手(2004年11月2日)し、継代数の少ないものを、ジメチルスルホキシドを10 vol%添加した培養液で、液体窒素中で保存し、これを融解し継代培養したものを使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では15継代、染色体異常試験では短時間処理法で9継代であった。また、元株細胞はマイコプラズマ陰性であることを入手時の情報で確認した。

#### 6.4.2 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

く、バックグラウンドデータが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

### 6.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO<sub>2</sub>濃度 5%、温度 37℃、高湿度条件下で培養した。継代は 1~4 日ごとに行った。

### 6.4.4 細胞の性状検査

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 2007年5月14日~2007年5月31日及び 2007年12月22日~2007年12月28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。

### 6.5 S9 mix 及び培養液

### 6.5.1 S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より購入した S9 と、自家調製を行ったコファクターを用時に混合して S9 mix を調製した。本試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件及び使用期限とコファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りである。

1) S9

名称 : S9

ロット番号 : 07110208

製造日 : 2007年11月2日

種・系統 : ラット·SD系

性 : 雄 : 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 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 : 2008年5月1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

ロット番号 : 070929

製造日 : 2007年9月29日

保存方法: 冷凍(超低温フリーザー)

使用期限 : 2008年3月28日(製造後6箇月)

保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

3) S9 mix の組成

S9 2 mL

補酵素 4.7 mL 20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2) 1.34 mL

50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液0.67 mL330mmol/L 塩化カリウム水溶液0.67 mL50mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液0.67 mL

40mmol/L 酸化型ニコチンアミド-アデニン

ジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液 0.67 mL

精製水 0.67 mL

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、精製水に溶解、pH 調整、ろ過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

### 6.5.2 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No. 11095-080 及び 11095-072) に、Invitrogen Corporation より購入し非働化 (56°C, 30 分) した牛血清 (BS) を 10 vol%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 : 571834

製造元 : Invitrogen Corporation

保存方法 : 冷凍 (-80℃ 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 : 300142、281601

製造元 : Invitrogen Corporation

保存方法 : 冷蔵

保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 冷蔵庫

### 6.6 試験方法 1-5)

試験は以下のステージ順に実施した。染色体異常試験の短時間処理法で陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

| 1. 細胞增殖抑制試験 | 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  |

### 6.6.1 識別方法

### 1) 細胞增殖抑制試験

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  $[01]\sim[99]$  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。

### 6.6.2 用量の設定

#### 1) 細胞增殖抑制試験

最高用量を 1700 μg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 850、425、213、106、53.1、26.6 及び 13.3 μg/mL の計 8 用量を設定した。

### 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 1700 μg/mL で、連続処理法の 24 時間処理では 106 μg/mL で、48 時間処理では 213 μg/mL で、それぞれ 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められた。また、短時間処理法の非代謝活性化では、最高用量の 1700 μg/mL においても 50%を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。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 1605.6 μg/mL、非代謝活性化では 1700 μg/mL 以上、連続処理法の 24 時間処理では 77.8 μg/mL、48 時間処理では 110.9 μg/mL であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「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」及び「50%以上の細胞増殖抑制が認められない場合は、5mg/mL 又は 10mM(いずれか低い方)を最高用量とする。」との規定から、短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化では 1700 μg/mLを最高用量として、以下、公比 2 で希釈した計 4 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。なお、連続処理法の 24 時間処理では 425 μg/mL を、48 時間処理では 213 μg/mL をそれぞれ最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 5 試験用量を設定したが、短時間処理法において明らかな陽性の結

果が得られたことから、連続処理法は実施しなかった。

### 6.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。

- 1) 短時間処理法
- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群及び被験物質用量群を設けた。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<sup>4</sup>個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、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、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、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい 培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 培養終了後、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計(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で観察し確認した(培養終了時の結果は、参考データとした)。
- 2) 連続処理法
- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。 シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート (直径 60 mm) を用いた。プレート は各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10<sup>4</sup>個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、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細胞の培養状態を確認した。次いで、短時間処理 法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間 処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度(概略値)を求めた。

### 6.6.4 染色体異常試験

- 1) 短時間処理法
- (1) 代謝活性化及び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<sup>4</sup> 個の細胞(培養液 5.0 mL) を播種した。培養 3 日後に、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 µg/mL)を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 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、溶媒 0.050 mLを加えた。陽性対照群については、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 µg/mL)を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差 顕微鏡下で細胞の培養状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新 しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 各群 2 枚のプレート (枝番号-1 及び-2) について、染色体観察用標本作製のため 培養終了の約 2 時間前にコルセミド (デメコルシン溶液、10 μg/mL、和光純薬工業株式会社)を 0.100 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液(Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.)で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール:酢酸=3:1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。
- (5) 残る各群 2 枚のプレート(枝番号-3 及び-4) は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位 相差顕微鏡で観察し確認した(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を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。
- 2) 連続処理法

短時間処理法で陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

### 6.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とする。

### 6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更に以下のように定義・分類した。

### 1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップと

は染色体又は染色分体の同軸上に断片がある(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。

染色分体型切断(ctb): 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの、及び

非染色部位が染色分体の同軸上にあっても、その長さ

が染色分体の幅以上に離れているもの。

染色分体型交換(cte): 四放射状交換など。

染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認め

られないもの、及び非染色部位が染色体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているも

の。

染色体型交換(cse): 二動原体染色体、環状染色体など。

その他(other) : 断片化(frg)他。

### 2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数(二倍体)と異なり倍化した場合 を数的異常と定義した。

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

#### 667 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 <sup>1)</sup>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(%)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 (一) |
| 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。

### 7. 試験結果

### 7.1 細胞增殖抑制試験

### 7.1.1 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

### 1) 50%細胞增殖抑制濃度

代謝活性化では 1700 µg/mL で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、非代謝活性 化では50%を超える細胞増殖抑制が認められず、被験物質の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 1605.6 µg/mL、非代謝活性化では 1700 µg/mL 以上と算出された。

### 2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 26.6 μg/mL以上で色調変化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 425 μg/mL以上で析出が認められた。

### 3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察すると、代謝活性化及び 非代謝活性化ともに 13.3μg/mL以上の濃度で細胞の形態変化が認められた。肉眼によ る被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 425 μg/mL以上で 析出が認められた。

### 7.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1-3 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

### 1) 50%細胞增殖抑制濃度

24 時間処理では 106  $\mu$ g/mL で、48 時間処理では 213  $\mu$ g/mL で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は 24 時間処理では 77.8  $\mu$ g/mL、48 時間処理では 110.9  $\mu$ g/mL と算出された。

### 2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理では 26.6 μg/mL 以上で、48 時間 処理ではすべての用量で色調変化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察で は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 425 μg/mL 以上で析出が認められた。

#### 3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察すると、24 時間処理では 26.6 µg/mL 以上の濃度で、48 時間処理では 106 µg/mL 以上の濃度で細胞の形態変化が 認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理と もに 425 µg/mL 以上で析出が認められた。

### 7.2 染色体異常試験

### 7.2.1 短時間処理法

短時間処理法の代謝活性化の結果を Fig. 2-1、Table 2-1 及び 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 2-2、Table 2-2 及び 3-2 に示した。

### 1) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての 用量で色調変化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及 び非代謝活性化ともに 425 μg/mL以上で析出が認められた。

### 2) 被験物質処理終了時の観察

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すると、代謝活性化及び 非代謝活性化ともに 425 μg/mL以上の濃度で細胞の形態変化が認められた。肉眼によ る被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 425 μg/mL以上で 析出が認められた。

### 3) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では、1700  $\mu$ g/mL で 43.0%、850  $\mu$ g/mL で 43.0%、425  $\mu$ g/mL で 46.0%、213  $\mu$ g/mL で 26.5%と陽性の判定基準である 10%以上を、非代謝活性化では、1700  $\mu$ g/mL で 2.0%、850  $\mu$ g/mL で 1.5%、425  $\mu$ g/mL で 0.5%、213  $\mu$ g/mL で 1.5%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。

各処理法ともに陰性対照群における染色体構造異常の出現率は、陰性の判定基準内及び試験施設の背景値(Attached Data 3)内にあった。また、陽性対照群における染色体構造異常の出現率は、非代謝活性化では陽性の判定基準内及び試験施設の背景値(Attached Data 3)内にあった。これに対して、代謝活性化では、染色体構造異常の出現率が、試験施設の背景値(Attached Data 3)よりもやや低かったが、陽性の判定基準内にある高い出現率が認められたことから問題はなく、試験は適切に実施されたと考えられた。

### 4) 染色体数的異常

倍数体の出現率は、代謝活性化では、1700  $\mu$ g/mL で 0%、850  $\mu$ g/mL で 0%、425  $\mu$ g/mL で 0%及び 213  $\mu$ g/mL で 0%と陰性の判定基準である 5%未満を、非代謝活性化では、1700  $\mu$ g/mL で 0.5%、850  $\mu$ g/mL で 0%、425  $\mu$ g/mL で 0%及び 213  $\mu$ g/mL で 0%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。

各処理法ともに陰性対照群における倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、 また試験施設の背景値(Attached Data 3)と同様であったことから試験は適切に実施 されたと考えられた。

### 8. 考察

染色体異常試験の短時間処理法の結果、代謝活性化では、最高用量以下の 4 用量において染色体構造異常の総出現率 (TA)が、陽性の判定基準を超える高い値を示した。用量依存性については、850 μg/mL以上で TA 値の downturn が認められたものの、以下の2 用量では用量の増加に伴う TA の増加が認められたことから、陽性と判定した。染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の 20%に何らかの異常が見られる用量である D20 値 <sup>1)</sup>は 0.17 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換(cte)を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値 <sup>1)</sup>は 100 であった。総合的には、染色体構造異常については、短時間処理法の代謝活性化において、染色体構造異常の総出現率(TA)が用量依存性を伴って陽性の判定基準を超えたため、陽性と判定した。一方、非代謝活性化では、全用量において TA 値は陰性の判定基準内にあったことから、陰性と判定した。

染色体数的異常(倍数体)については、短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性 化ともに全用量において倍数体の出現率は陰性の判定基準内にあったことから、陰性 と判定した。

なお、本被験物質の類縁化合物の 2-anisidine (CAS Registry No.90-04-0)<sup>6)</sup>、3-anisidine (CAS Registry No.536-90-3)<sup>6)</sup>、4-anisidine (CAS Registry No.104-94-9)<sup>6)</sup>、o-nitroanisole (CAS Registry No.91-23-6)<sup>7)</sup>、p-nitroanisole (CAS Registry No.100-17-4)<sup>7)</sup>及び5-nitro-o-anisidine (CAS Registry No.99-59-2)<sup>8)</sup>は、いずれも細菌を用いる復帰突然変異試験の代謝活性化において陽性と報告されている。一方、4-nitroanthranilic acid (CAS Registry No.619-17-0)<sup>9)</sup>は細菌を用いる復帰突然変異試験の非代謝活性化で陽性と、培養細胞を用いる小核試験及びほ乳類培養細胞を用いる突然変異試験において陰性と、畑-nitroanisole (CAS Registry No.555-03-3)<sup>10)</sup>は細菌を用いる復帰突然変異試験の代謝活性化において陰性と報告されている。

陰性対照群における染色体構造異常を有する細胞及び倍数性細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照群の細胞では、短時間処理法の代謝活性化で CP によって処理された場合、背景値よりもやや低い TA 値を示したものの染色体構造異常の著しい誘発が認められ、短時間処理法の非代謝活性化では MMC によって処理された場合、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、2 枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、2-ニトロ-p-アニシジンは、本試験条件下において染色体構造異常 誘発能を有するが、染色体数的異常(倍数体)誘発能は有さないものと判定した。

### 9. 参考文献

- 1) 石館 基監修 (1987): <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル·アイ·シー、東京
- 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
- 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): 哺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
- Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T and Mortelmans K (1992): V. Results from the testing of 311 chemicals, Environ Mol Mutagen, 19, 2-141
- Kawai A, Goto S, Matsumoto Y and Matushita H (1987) Mutagenicity of aliphatic and aromatic nitro compounds. Industrial materials and related compounds, 29, 34-54
- 8) Chiu CW, Lee LH, Wang CY and Bryan GT (1978) Mutagenicity of some commercially available nitro compounds for Salmonella typhimurium, Mutation Res, 58, 11-22
- Progerss Report Submitted to the National Cancer Institute by Mason Research Institute NIH-71-E-2144, 73, Worcester, MA. USA
- Couch DB, Abernethy DJ and Allen PF (1987) The effect of biotransformation of 2,4-dinitrotoluene on its mutagenic potential, 2, 415-418

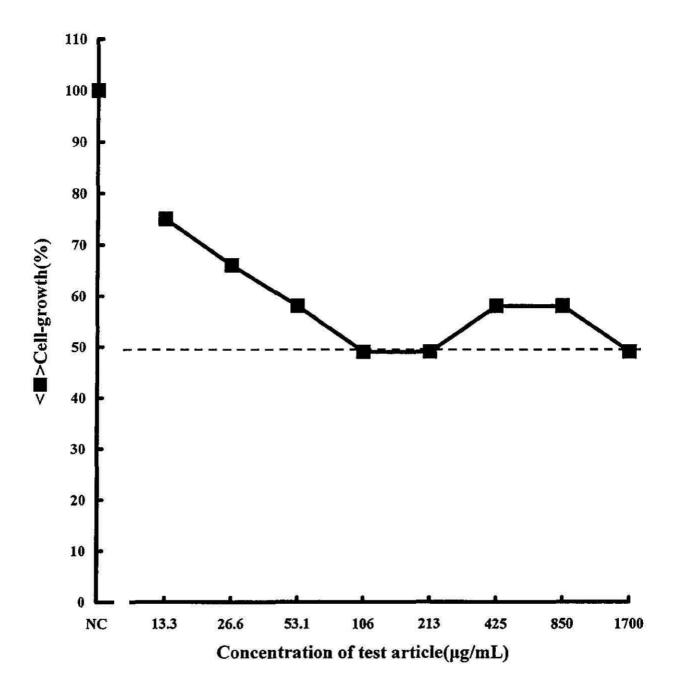


Fig. 1-1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine

[Short-term treatment:+S9 mix]

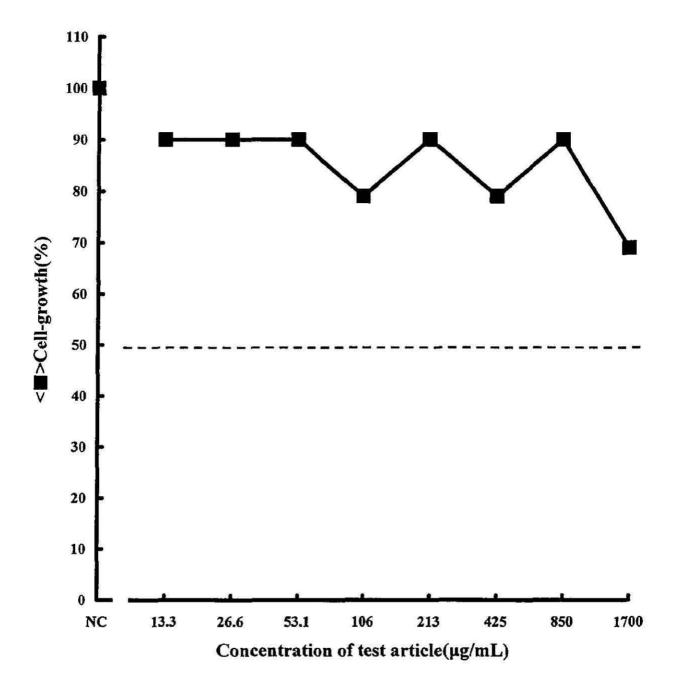


Fig. 1-2

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine

[Short-term treatment:-S9 mix]

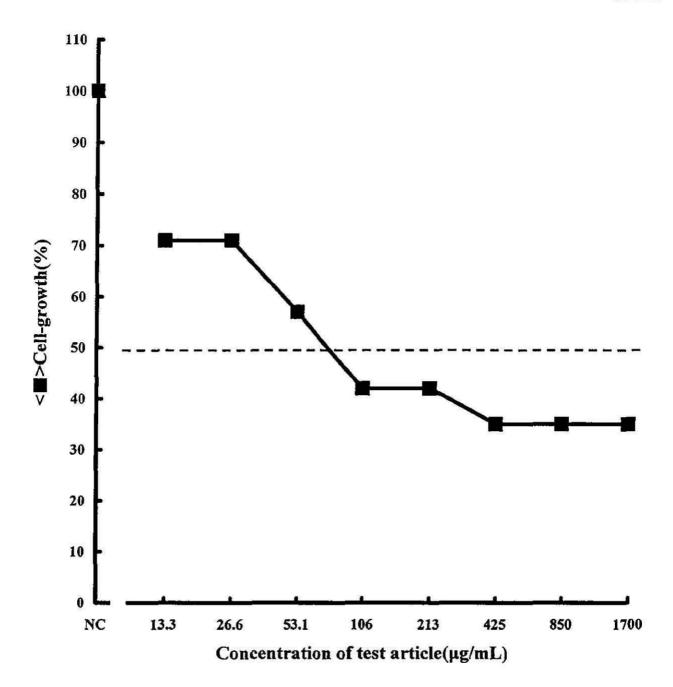


Fig. 1-3

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine

[Continuous treatment: 24hr]

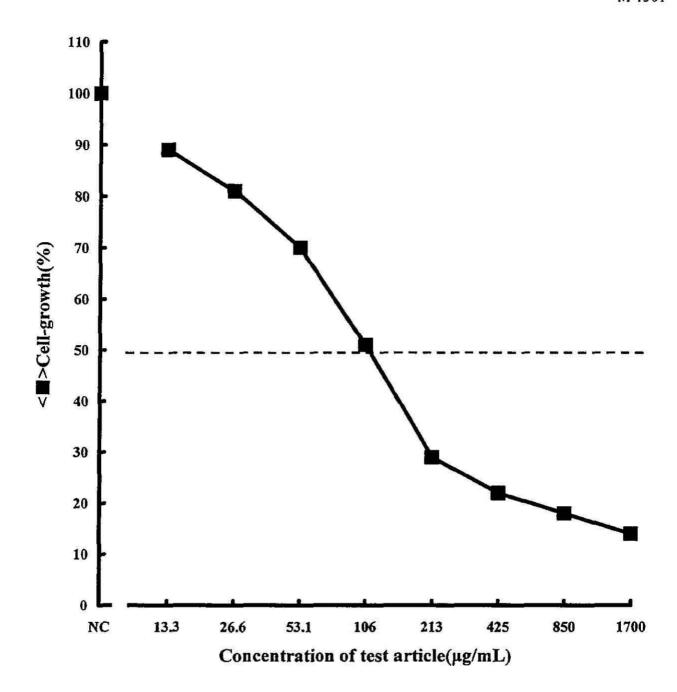


Fig. 1-4

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine
[Continuous treatment: 48hr]

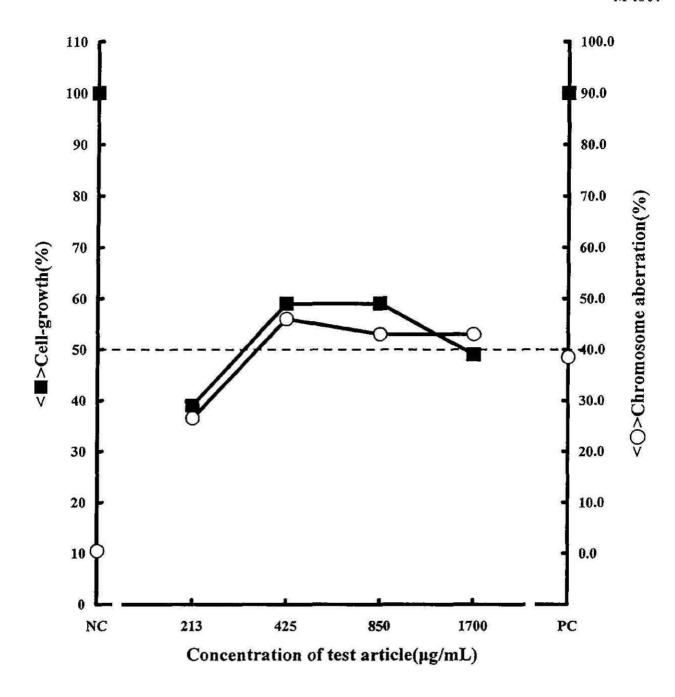


Fig. 2-1
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine

[Short-term treatment:+S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

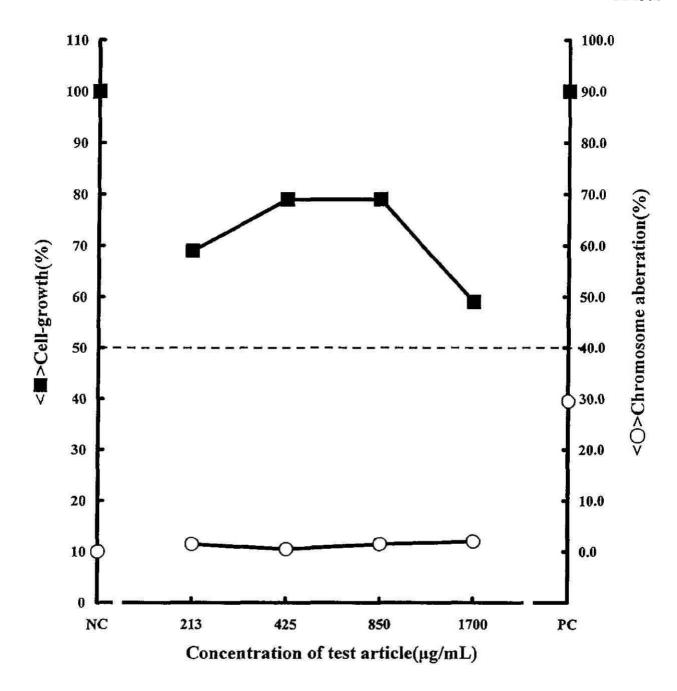


Fig. 2-2
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine

[Short-term treatment:-S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-panisidine

[Short-term treatment: +S9 mix]

|      | 5      | 200.000      |            | Single State of the State of th | Cell-gro     | wth inhibition t    | est                  |                     |                          |
|------|--------|--------------|------------|--|--------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|
| Stud | y type | Trea         | tment and  | Cell-gr  | owth ratio   | 2.0                 | Observa              | ntion <sup>c)</sup> |                          |
| S9   | time   | Cond         | centration | Plate  | Mean (%)b)   | Condition of        | Color of             |                     | s/Crystals <sup>f)</sup> |
| mix  | (hr)   | (þ           | ιg/mL)     | 1 and 2  | IVICAII (70) | cells <sup>d)</sup> | medium <sup>e)</sup> | 1)                  | 2)                       |
|      |        | 0            | (NC)       | 100 <sup>a)</sup>  | 100          |                     |                      | 4                   |                          |
| 16   |        |              | 12.2       | 66   | 76           | +                   | -                    | i=                  | 200 To 10                |
|      |        |              | 13.3       | 83   | 75           | +                   | <b>L</b>             |                     | -                        |
|      | N.     |              | 26.6       | 66   | 66           | +                   | light orange         | y: -                | nr. d. T.                |
|      | 1      |              |            | 66   | - 00         | +                   | light orange         | -                   |                          |
| i)   | Tr.    |              | 53.1       | 49   | 58           | +                   | light orange         |                     |                          |
| Ï    |        |              | 33.1       | 66   | 50           | +                   | light orange         | -                   |                          |
| +    | 6-18   | Test article | 106        | 49   | 49           | +,,                 | orange               |                     | -                        |
| 1    | 0,0    | arti         | 100        | 49   |              | +                   | orange               |                     | -                        |
|      |        | st           | 213        | 49   | 49           | +                   | orange               | (#)                 | -                        |
| 1    |        | ٿِ ا         | 213        | 49   | .,           | +                   | orange               | 1.8/                |                          |
|      |        |              | 425        | 66   | 58           |                     | orange               | +                   | +                        |
| į    |        |              |            | 49   | 30           | ++                  | orange               | 4                   | +                        |
|      |        |              | 850        | 49   | 58           | ++                  | orange               | +                   | +                        |
|      |        |              | 66         |  |              |                     | orange               | 4                   | +                        |
| 1    | 1      |              | 1,700      | 49 49  | ++           | orange              | +                    | +                   |                          |
|      |        |              | .,         | 49   |              | ++                  | orange               | +                   | . +                      |

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment.
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
  - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
  - ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
  - + : Presence of precipitates

Table 1-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-panisidine

[Short-term treatment:-S9 mix]

|      | -      | 235 X     |              |                   | يفاف الأدن الادراب | wth inhibition t  | The second second    |                    |                          |               |   |   |        |    |   |
|------|--------|-----------|--------------|-------------------|--------------------|---|----------------------|--------------------|--------------------------|---------------|---|---|--------|----|---|
| Stud | y type | Treat     | ment and     | Cell-gr           | owth ratio         | 75<br>70 - 70 - 77 77 78<br>80 - 77 78 78<br>80 - 77 78 78 78 78 78 78 78 78 78 78 78 78 | Observa              | tion <sup>c)</sup> | MORESTON S               |               |   |   |        |    |   |
| S9   | time   | Cond      | entration    | Plate             | Man (0( )b)        | Condition of  | Color of             |                    | s/Crystals <sup>f)</sup> |               |   |   |        |    |   |
| mix  | (hr)   | (µ        | g/mL)        | 1 and 2           | Mean (%)b)         | cells <sup>d)</sup>   | medium <sup>e)</sup> | 1)                 | 2)                       |               |   |   |        |    |   |
| 10   |        | 0         | (NC)         | 100 <sup>a)</sup> | 100                |   | -                    |                    |                          |               |   |   |        |    |   |
|      | *>     |           | 13.3         | 100               | 90                 | +   | •                    | ur o Te ancor      | -                        |               |   |   |        |    |   |
|      | .,     |           |              | 13.5              | 79                 | 90  | +                    | -                  | ( <del>=</del>           | -             |   |   |        |    |   |
|      |        |           |              | 26.6              | 100                | 90  | +                    | light orange       |                          |               |   |   |        |    |   |
|      | 1      |           | 20.0         | 79                | 30                 | +   | light orange         | 1824               | 1                        |               |   |   |        |    |   |
| à f  |        |           | 53.1         | 100               | 90                 | +   | light orange         |                    |                          |               |   |   |        |    |   |
|      |        |           | 33.1         | 79                | 20                 | +   | light orange         |                    | 54 - May 254 - 25        |               |   |   |        |    |   |
| _    | 6-18   | cle       | 106          | 79                | 79                 | +   | orange               |                    | -                        |               |   |   |        |    |   |
|      | 0-10   | Test arti | Test article | arti              | arti               | artic   | artic                | artic              | 100                      | 79            |   | + | orange | (A | - |
| 1    |        |           |              | 213               | 100                | 90  | ++                   | orange             | •                        |               |   |   |        |    |   |
| Î    | 39     |           |              | မို               | 213                | 79  |                      | ++                 | orange                   | 20 HOSE-CONTE | - |   |        |    |   |
|      |        |           | 425          | 79                | 79                 | ++  | orange               | +                  | +                        |               |   |   |        |    |   |
| 1    |        |           | - 123        | 79                |                    | ++  | orange               | +                  | +                        |               |   |   |        |    |   |
|      |        |           | 850 -        | 79                | 90                 | ++  | orange               | +                  | +                        |               |   |   |        |    |   |
| Ì    |        |           |              | 100               |                    | ++  | orange               | +                  | +                        |               |   |   |        |    |   |
| 1    |        | 1 [       | 1,700        | 59                | 69                 | ++  | orange               | +                  | +                        |               |   |   |        |    |   |
|      |        |           | 1,700        | 79                |                    | ++  | orange               | +                  | +                        |               |   |   |        |    |   |

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment.
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
  - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
  - ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
  - + : Presence of precipitates

Table 1-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-panisidine

[Continuous treatment: 24hr]

| Stud     | y type | Treat              | ment and     | Cell-gr   | owth ratio             |                     | Observa              | tion <sup>c)</sup> |                         |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|----------|--------|--------------------|--------------|-----------|------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|-------------------------|------------------|--------------|--------------|-------|-------|-----|----|-----|---|--------|-------------|--|
| S9       | time   | C-14-34C-15/2-0-40 | entration    | Plate     |                        | Condition of        | Color of             |                    | s/Crystals <sup>0</sup> |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
| mix      | (hr)   | (μ                 | g/mL)        | l and 2   | Меап (%) <sup>b)</sup> | cells <sup>d)</sup> | medium <sup>e)</sup> | 1)                 | 2)                      |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        | Λ                  | (NC)         | 100 a)    | 100                    | ā.                  | •                    | -                  |                         |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        | 5                  | (NC)         | 100       | 100                    | ×                   | -                    | •                  | -                       |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        |                    | 13.3         | 71        | 71                     |                     | =                    | =                  | -                       |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        |                    | i i          |           | 13.5                   | 71                  | 71                   | -                  | -                       | -                | -            |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        |                    | 26.6         | 71        | 71                     | +                   | light orange         |                    |                         |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        | Test article       |              |           |                        |                     | 20.0                 | 71                 | /1                      | +                | light orange | Y <b>=</b> 0 | 180   |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        |                    | 53.1         | 57        | 57                     | +                   | light orange         |                    | 25<br>25                |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        |                    | Test article |           |                        |                     | 33.1                 | 57                 | 57                      | +                | light orange | -            | 140   |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          | 24-0   |                    |              | 106       | 42                     | 42                  | +                    | orange             |                         |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
| est.     | 24.0   |                    |              | Test arti | arti                   | arti                | ı <del>T</del> i     | artic              | artic                   | artic            | artic        | artic        | artic | artic | 100 | 42 | -12 | + | orange | 100045 1 PT |  |
|          | 1      |                    |              |           | 213                    | 42                  | 42                   | ++                 | orange                  | ( <del>4</del> ) | -            |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        |                    |              |           | 213                    | 42                  | -72                  | ++                 | orange                  | _                | -0           |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        |                    | 425          | 42        | 35                     | ++                  | orange               | +                  | +                       |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        |                    |              | 723       | 28                     | , 55                | ++                   | orange             | +                       | +                |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        |                    | 850          | 28        | 35                     | ++                  | orange               | +                  | +                       |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        | Ŝ                  | 050          | 42        | - 55                   | ++                  | orange               | +                  | +                       |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
|          |        |                    | 1,700 28 35  | 35        | ++                     | orange              | +                    | +                  |                         |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |
| Jan 1998 |        |                    | 1,700        | 42        | 33                     | ++                  | orange               | +                  | +                       |                  |              |              |       |       |     |    |     |   |        |             |  |

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed 1) immediately after addition of the test solutions and 2) at the end of treatment.
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
  - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
  - ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
  - + : Presence of precipitates

Table 1-4
Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-panisidine

[Continuous treatment: 48hr]

| Cell-grov Study type Treatment and Cell-growth ratio |      |              |            |               | owth ratio | . Observation <sup>c)</sup> |                      |             |                         |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
|--|------|--------------|------------|---------------|------------|-----------------------------|----------------------|-------------|-------------------------|-------|-------|-------|--------|----|---------------------------|---|--------|--|--|
| S9   | time | 10           | entration  | Plate         | ы          | Condition of                | Color of             | Precipitate | s/Crystals <sup>f</sup> |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
| mix  | (hr) | (μ           | ıg/mL)     | 1 and 2       | Mean (%)b) | cells <sup>d)</sup>         | medium <sup>e)</sup> | 1)          | 2)                      |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
| 7  |      | 0            | (NC)       | 100 a)<br>107 | 100        | -                           | -                    |             | -                       |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
|  |      |              | 13.3       | 92            | 90         | -                           | light orange         | -           |                         |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
|  |      |              | 13.3       | 92            | 89         | =                           | light orange         |             | -                       |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
|  |      |              | 26.6       | 84            | 81         |                             | light orange         |             | -                       |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
|  |      |              | 20.0       | 84            | 81         | -                           | light orange         |             |                         |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
|  |      |              | 53.1       | 76            | 70         | -                           | orange               | -           | -                       |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
|  |      |              |            |               | 33.1       | 69                          | 70                   | -           | orange                  |       | į.    |       |        |    |                           |   |        |  |  |
| _  | 48-0 | cle          | 106        | 53            | 51         | + .                         | orange               | -           | -                       |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
| - 1  | 40 0 | Test article | est arti   | est arti      | est arti   | est arti                    | est arti             | st arti     | artic                   | artic | artic | artic | 100    | 53 | 31                        | + | orange |  |  |
|  | 4    |              |            |               |            |                             |                      |             | 213                     | 30    | 29    | 4     | orange | -  | Description of the second |   |        |  |  |
|  |      |              | 213        | 30            | 27         | +                           | orange               | ₩.          |                         |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
| ĺ  |      |              | 425        | 23 22         | ++         | orange                      | +                    |             |                         |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
|  | a de |              | 147        | 23            |            |                             | orange               | +           | +                       |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
|  |      | Į [          |            | 15            | 18         | ++                          | orange               | +           | +                       |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
| f  | j    |              | 050        | 23            | 10         |                             | orange               | +           | +                       |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
| ķ  |      |              | 1,700 — 15 | 14            | ++         | orange                      | +                    | +           |                         |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |
|  | 3352 |              | 1,700      | 15            | **         | _++                         | orange               | +           | +                       |       |       |       |        |    |                           |   |        |  |  |

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment.
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
  - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
  - ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
  - + : Presence of precipitates

Table 2-1
Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine

[Short-term treatment:+S9 mix]

|      | 73     |               |                         | - 34     | Chromos                | ome aberration t    | est                  |                     | MARIO AUARU              |
|------|--------|---------------|-------------------------|----------|------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|
| Stud | y type |               |                         | Cell-gr  | owth ratio             | 8                   | Observ               | ation <sup>c)</sup> |                          |
| S9   | time   |               | tment and<br>centration | Plate    | Mean (%) <sup>b)</sup> | Condition of        | Color of             | Precipitate         | s/Crystals <sup>f)</sup> |
| mix  | (hr)   | (µ            | ıg/mL)                  | 1 and 2  | Mean (%)               | cells <sup>d)</sup> | medium <sup>e)</sup> | 1)                  | 2)                       |
|      |        | 0             | (NC)                    | . 100 a) | 100                    | -                   |                      |                     |                          |
|      |        | 0             | (110)                   | 100      | 100                    | -                   |                      |                     | (44)                     |
|      |        |               | 213                     | 39       | 39                     | •                   | orange               | 4                   |                          |
|      |        |               | 213                     | 39       | 33                     | -                   | orange               | -                   | 000                      |
|      |        | Test article  | 425                     | 59       | 59                     | +                   | orange               | +                   | +                        |
| +    | 6-18   |               | 443                     | 59       | 39                     | +                   | orange               | +                   | +                        |
| 100  | 0-10   |               | 850                     | 59       | 59                     | +++                 | orange               | +                   | +                        |
| 0    | 1      | Te            | 830                     | 59       |                        | +++                 | orange               | +                   | +                        |
|      |        | 1,700 - 59 49 | ++                      | orange   | +                      | +                   |                      |                     |                          |
| 4    |        |               |                         | 49       | ++                     | orange              | +                    | +                   |                          |
|      |        |               | PC                      | 100      | 100                    | <b>3</b>            | =                    | =                   | -                        |
|      | C/O    |               | 10                      | 100      | 100                    | ■P cases to         | Price of the second  |                     |                          |

NC: Negative Control(DMSO)

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

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup> immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup> at the end of treatment.
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
  - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
  - ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
  - +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
  - + : Presence of precipitates

Table 2-2

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-panisidine

[Short-term treatment:-S9 mix]

|      |        | -            |                      |                   | Chromos                | ome aberration t          | test                 |                                    | green redirect to |  |  |  |  |  |  |  |
|------|--------|--------------|----------------------|-------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|------------------------------------|-------------------|--|--|--|--|--|--|--|
| Stud | y type |              |                      | Cell-gr           | owth ratio             | Observation <sup>c)</sup> |                      |                                    |                   |  |  |  |  |  |  |  |
| S9   | time   | 26000 2000   | tment and centration | Plate             | Mean (%) <sup>b)</sup> | Condition of              | Color of             | Precipitates/Crystals <sup>0</sup> |                   |  |  |  |  |  |  |  |
| mix  | (hr)   | (1           | ιg/mL)               | 1 and 2           | Mean (%)               | cells <sup>d)</sup>       | medium <sup>e)</sup> | I)                                 | 2)                |  |  |  |  |  |  |  |
|      |        | n            | (NC)                 | 100 a)            | 100                    | -                         | 190                  | *                                  | -                 |  |  |  |  |  |  |  |
|      |        | U            | (110)                | 100               | 100                    | -                         | ( <del>*</del> )     | ¥                                  | -                 |  |  |  |  |  |  |  |
|      |        |              | 213                  | 59                | 69                     | -                         | orange               |                                    | i -               |  |  |  |  |  |  |  |
| .10  |        |              | 213                  | 79                | 02                     | -                         | orange               | -                                  | •                 |  |  |  |  |  |  |  |
|      |        | <u>e</u>     | 425                  | 79                | 79                     | ++                        | orange               | +                                  |                   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | 6-18   | ij           | 423                  | 79                | 13                     | ++                        | orange               | +                                  | +                 |  |  |  |  |  |  |  |
| . 2  | 0-10   | Test article | 850                  | 79                | 79                     | +++                       | orange               | +                                  | +                 |  |  |  |  |  |  |  |
| 4    |        | Te           | 650                  | 79                | 13                     | +++                       | orange               | +                                  | T +               |  |  |  |  |  |  |  |
| 1/2  |        | 9            | 1,700                | . <u>59</u><br>59 | 59                     | ++                        | orange               | +                                  | +                 |  |  |  |  |  |  |  |
|      |        |              | 1,700                | 59                | J9                     | ++                        | orange               | +                                  | +                 |  |  |  |  |  |  |  |
|      | 8      |              | PC                   | 100               | 100                    | -                         | i=                   |                                    |                   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | 90     |              | 10                   | 100               | 100                    | -                         |                      | (=                                 | -                 |  |  |  |  |  |  |  |

NC: Negative Control(DMSO)

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

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup> immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup> at the end of treatment.
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
  - ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
  - +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
  - + : Presence of precipitates

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine [Short-term treatment:+S9 mix]

| S9  | <b>~</b> · · · (1.) | Conc.                  | Cells                 | Polyploid         | T. I         | Number of aberration |               |   |                  |   |                  |   |               |   |               |     | π.            | <b></b>                 | * .                     | 63.1    |              |
|-----|---------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|--------------|----------------------|---------------|---|------------------|---|------------------|---|---------------|---|---------------|-----|---------------|-------------------------|-------------------------|---------|--------------|
| nix | Time(h)             | $(\mu  \mathrm{g/mL})$ | observed              | cells (%)         | Judge.       |                      | g             | ) | ctb              |   | cte              | ( | csb           |   | cse           | otł | ner           | (%)                     | A was a second          | Judge.  | Slide<br>No. |
| Ŷ   | 7                   | NC                     | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0<br>(0)<br>(0) | _            | (                    | 0<br>0)<br>0) | ( | 1<br>0)<br>1)    | ( | 0<br>0)<br>0)    | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 0<br>0)<br>0) | (   | 0)<br>0)      | 0.5<br>(0)<br>(1)       | 0.5<br>(0)<br>(1)       | 731<br> | 08-1<br>14-1 |
|     |                     | 213                    | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0<br>(0)<br>(0) |              | (                    | 0<br>0)<br>0) | ( | 14<br>9)<br>5)   | ( | 43<br>23)<br>20) | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 1<br>0)<br>1) | (   | 1<br>0)<br>1) | 26. 5<br>(29 )<br>(24 ) | 26. 5<br>(29 )<br>(24 ) | +       | 44-1<br>58-1 |
| +   | 6-18                | 425                    | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0<br>(0)<br>(0) |              | (                    | 0<br>0)<br>0) | ( | 19<br>5)<br>14)  | ( | 84<br>40)<br>44) | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 0<br>0)<br>0) | (   | 0<br>0)<br>0) | 46. 0<br>(43 )<br>(49 ) | 46. 0<br>(43 )<br>(49 ) | +       | 74-1<br>46-1 |
|     |                     | 850                    | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0<br>(0)<br>(0) | -            | (                    | 0<br>0)<br>0) | ( | 22<br>10)<br>12) | ( | 80<br>41)<br>39) | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 0<br>0)<br>0) | (   | 0<br>0)<br>0) | 43. 0<br>(45 )<br>(41 ) | 43. 0<br>(45 )<br>(41 ) | +       | 88-1<br>29-1 |
|     |                     | 1700                   | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0               | <del>-</del> | (                    | 0<br>0)<br>0) | ( | 22<br>10)<br>12) | ( | 78<br>37)<br>41) | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 0<br>0)<br>0) | (   | 0<br>0)<br>0) | 43. 0<br>(40 )<br>(46 ) | 43. 0<br>(40 )<br>(46 ) | +       | 78-1<br>06-1 |
|     |                     | PC                     | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0<br>(0)<br>(0) | _            | (                    | 0<br>0)<br>0) | ( | 16<br>8)<br>8)   | ( | 67<br>37)<br>30) | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 1<br>0)<br>1) | (   | 0<br>0)<br>0) | 38. 5<br>(42 )<br>(35 ) | 38. 5<br>(42 )<br>(35 ) | +       | 17-1<br>42-1 |

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 µ g/mL)

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-anisidine [Short-term treatment:-S9 mix]

| S9  | T (1)   | Conc.                | Cells                 | Polyploid cells (%) | T .             |   | Number of aberration |    |                |   |                  |   |               |   |               |    |               | ~.                      |                         |               |              |
|-----|---------|----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|---|----------------------|----|----------------|---|------------------|---|---------------|---|---------------|----|---------------|-------------------------|-------------------------|---------------|--------------|
| mix | Time(h) | $(\mu\mathrm{g/mL})$ | observed              |                     | Judge.          | - | g                    | () | ctb            |   | cte              | C | sb            |   | cse           | ot | her           | TA<br>(%)               | TAG<br>(%)              | Judge.        | Slide<br>No. |
| 21  |         | NC                   | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0<br>(0)<br>(0)   | 1 <del></del>   | ( | 0<br>0)<br>0)        | (  | 0<br>0)<br>0)  | ( | 0<br>0)<br>0)    | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 0<br>0)<br>0) | (  | 0<br>0)<br>0) | 0.0<br>(0)<br>(0)       | 0.0<br>(0)<br>(0)       | ; <del></del> | 64-1<br>95-1 |
|     |         | 213                  | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0<br>(0)<br>(0)   | 9 <del></del> 8 | ( | 0<br>0)<br>0)        | (  | 0<br>0)<br>0)  | ( | 3<br>1)<br>2)    | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 0<br>0)<br>0) | (  | 0<br>0)<br>0) | 1.5<br>(1)<br>(2)       | 1.5<br>(1)<br>(2)       | 2-0           | 32-1<br>75-1 |
| -   | 6-18    | 425                  | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0<br>(0)<br>(0)   |                 | ( | 0<br>0)<br>0)        | (  | 0<br>0)<br>0)  | ( | 1<br>0)<br>1)    | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 0<br>0)<br>0) | (  | 0<br>0)<br>0) | 0.5<br>(0)<br>(1)       | 0.5<br>(0)<br>(I)       | 3 <u></u> 3   | 56-1<br>60-1 |
|     |         | 850                  | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0<br>(0)<br>(0)   | -               | ( | 0<br>0)<br>0)        | (  | 2<br>1)<br>1)  | ( | 1<br>1)<br>0)    | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 0<br>0)<br>0) | (  | 0<br>0)<br>0) | 1.5<br>(2)<br>(1)       | 1.5<br>(2)<br>(1)       |               | 30-1<br>04-1 |
|     |         | 1700                 | 200<br>(100)<br>(100) | 0.5<br>(1)<br>(0)   | -               | ( | 0<br>0)<br>0)        | (  | 2<br>1)<br>1)  | ( | 1<br>1)<br>0)    | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 1<br>0)<br>1) | (  | 0<br>0)<br>0) | 2.0<br>(2)<br>(2)       | 2. 0<br>( 2 )<br>( 2 )  | -             | 23-1<br>59-1 |
|     |         | PC                   | 200<br>(100)<br>(100) | 0.0<br>(0)<br>(0)   | _               | ( | 0<br>0)<br>0)        | (  | 14<br>6)<br>8) | ( | 47<br>21)<br>26) | ( | 0<br>0)<br>0) | ( | 0<br>0)<br>0) | (  | 0<br>0)<br>0) | 29. 5<br>(26 )<br>(33 ) | 29. 5<br>(26 )<br>(33 ) | 1             | 09-1<br>52-1 |

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,  $0.075 \mu \text{ g/mL}$ )