

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ  
[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンの  
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験報告書

試験番号 7411

2010年 3月15日

## 目 次

[項目]	[ページ]
表題	i
試験目的	i
試験ガイドライン対応	i
GLP対応	i
試験委託者	i
試験施設の名称および所在地	i
試験日程	ii
業務分担	ii
試資料の保管	iii
試験責任者の署名、捺印および日付	iii
運営管理者および試験責任者陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi

表題：

2'-アミノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ [イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験目的

2'-アミノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ [イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オン(被験物質番号：1241)の染色体異常誘発性の有無をチャイニーズハムスター培養細胞を用いて検索した。

試験ガイドライン対応

試験は、平成15年11月21日付け、薬食発第1121002号厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・13製局第2号経済産業省製造産業局長、環境企発第 031121002号環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」および OECD ガイドライン[OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, TG No. 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, 1997]に準拠して実施した。

GLP対応

試験は、平成15年11月21日付け、薬食発第1121003号厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・17製局第3号経済産業省製造産業局長、環境企発第031121004号環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」およびOECDのGLP(OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997)に準拠して実施した。

試験委託者

経済産業省 製造産業局 化学物質管理課  
東京都千代田区霞ヶ関1-3-1

試験施設の名称および所在地

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター  
神奈川県秦野市平沢2445番地  
電話 0463-82-3911  
FAX 0463-82-3860

## 試験日程

被験物質の同一性、特性	2009年11月 4日
被験物質の安定性(実験開始前)	2009年11月 4日
試験開始日	2009年11月17日
試験実施(実験)期間	
短時間処理法	
細胞増殖抑制試験	
実験期間	2009年12月 7日～ 12月14日
染色体異常予備試験	
実験期間	2009年12月 7日～ 12月14日
検鏡期間	2009年12月14日～ 12月15日
染色体異常試験(本試験)	
実験期間	2009年12月18日～ 12月24日
検鏡期間	2009年12月24日～ 2010年 1月 7日
染色体異常試験(確認試験)	
実験期間	2010年 1月22日～ 1月27日
検鏡期間	2010年 2月15日～ 2月16日
連続処理法	
細胞増殖抑制試験	
実験期間	2009年12月 4日～ 12月10日
染色体異常予備試験	
実験期間	2009年12月 4日～ 12月 9日
検鏡期間	2009年12月11日～ 12月14日
染色体異常試験(本試験)	
実験期間	2010年 1月15日～ 1月21日
検鏡期間	2010年 1月21日～ 1月22日
被験物質の安定性(実験終了後)	2010年 2月18日
試験終了日	2010年 3月15日

## 業務分担

運営管理者	職 氏 名	副所長	
試験責任者	職 氏 名	病理検査部 培養細胞試験室長	
	経験年数	29年 11ヶ 月	
試験担当者	職 氏 名	病理検査部	

#### 試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、被験物質、その他本試験に係わる試資料は、日本バイオアッセイ研究センターの標準操作手順書に従って、試資料保管施設に保管する。なお、被験物質は、1g程度を保管し、残量は廃棄する。

保管期間は、試験終了後10年間とする。なお、この期間にあっても被験物質については品質が評価に耐え得る期間とする。

試験責任者の署名、捺印および日付

試験責任者

2010年3月15日

陳 述 書

試験番号：7411

試験名 : 2'-アミノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ [イソ  
ベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンのほ乳類培養細胞を用いる  
染色体異常試験

記

上記試験は、平成15年11月21日付け、薬食発第1121003号厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・17製局第3号経済産業省製造産業局長、環企発第031121004号環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」およびOECDのGLP (OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997) に準拠して実施され、この報告資料はその試験結果に基づいてまとめられたものに相違ありません。

中央労働災害防止協会

日本バイオアッセイ研究センター

運営管理者

2010年3月15日

試験責任者

2010年3月15日

## 信頼性保証証明書

標 題 (表題) 2'-アミノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ  
[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オン  
のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 7411

被験物質の名称 2'-アミノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ  
[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オン

本試験は、平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環境企発第 031121002 号、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」及び OECD 化学品テストガイドライン 473 (染色体異常試験 1997 年 7 月 21 日採択) に基づき、実施された。

最終報告書には、試験で使用方法及び手順が正確に記載されており、報告結果は、試験の生データを正確に反映していることを認める。

なお、監査・査察の実施日及び報告日は以下のとおりである。

対 象	監査・査察実施日	運営管理者及び試験責任者への報告日
試験計画書	2009 年 11 月 17 日	2009 年 11 月 17 日
試験の実施	2009 年 12 月 18, 21, 22, 24 日, 2010 年 1 月 7 日 2010 年 1 月 15, 18, 19, 21 日 2010 年 1 月 22, 25, 26, 27 日	2010 年 1 月 19 日 2010 年 1 月 22 日 2010 年 1 月 28 日
被験物質の管理	2010 年 3 月 4 日	2010 年 3 月 4 日
データの取り扱い管理	2010 年 3 月 2~4 日	
最終報告書	2010 年 3 月 2~4 日 2010 年 3 月 15 日	
		2010 年 3 月 15 日

2010 年 3 月 15 日

信頼性保証責任者

所 属 中央労働災害防止協会  
日本バイオアッセイ研究センター  
職 名 信頼性保証主管

氏 名

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験報告書

試験番号 7 4 1 1

本 文



## 本文目次

[項目]	[ページ]
1. 要約	1
2. 試験材料	
2-1. 被験物質	2
2-2. 被験物質溶液	3
2-3. 陽性対照	4
2-4. 陰性対照	5
2-5. 使用した細胞	5
2-6. 代謝活性化	5
3. 試験方法	
3-1. 採用した試験方法	7
3-2. 試験構成	7
3-3. 短時間処理法による試験	7
3-4. 連続処理法による試験	8
3-5. 細胞増殖率の測定	9
3-6. 染色体標本の作製	9
3-7. 染色体の観察	9
4. 試験成績および考察	
4-1. 短時間処理法による試験	11
4-2. 連続処理法による試験	12
5. 結果の判定	13
6. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす 疑いのある事態および試験計画書に従わなかったこと	13
7. 参考文献	13
試験結果表      1～7	14
試験結果図      1～7	21

## 1. 要約

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ [イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンの染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター培養細胞 (CHL/IU) を用いて検索した。

短時間処理法において、本試験は-S9処理および+S9処理ともに、1.4、2.7、4.1、5.4 mg/mlの4段階の用量で実施した。試験の結果、-S9処理において、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。+S9処理においても、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

連続処理法において、本試験の24時間処理は、0.34、0.68、1.4、2.7、5.4mg/mlの5段階、48時間処理は、0.17、0.34、0.68、1.4、2.7mg/mlの5段階の用量で実施した。試験の結果、24時間処理において、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。48時間処理においても、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

短時間処理法による本試験および連続処理法による本試験で陰性と判断したため、短時間処理法の+S9処理の確認試験を実施した。確認試験は、2.7、4.1、5.4mg/mlの3段階の用量で実施した。試験の結果、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

以上の結果より、本被験物質のCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は、陰性と判定した。

## 2. 試験材料

## 2-1. 被験物質(被験物質番号: 1241)

## 2-1-1. 被験物質の性質

化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	2'-アミノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチル スピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-(9H)キサンテン]-3-オン		
別名	6'-[エチル(4-メチルフェニル)アミノ]-3'-メチル-2'-(フェニルアミノ)-スピロ[イソベンゾ フラン-1(3H), 9'-(9H)キサンテン]-3-オン. ETAC		
CAS 番号	59129-79-2		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)			
分子量	539		
試験に供した化学物質の 純度(%)	99.0%		
試験に供した化学物質の ロット番号	[REDACTED]		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸気圧	—		
対水溶解度	—		
1-オクタノール/水分分配係数	—		
融点	205 °C以上		
沸点	—		
常温における性状	微着色粉末、臭気無し		
安定性	水: 酸により発色の可能性あり 光: 光に対し著しい分解性は認められないが、遮光保存が望ましい 熱: 安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	不溶	—
	DMSO	67.5mg/ml以下 (33.8mg/mlで溶解) *	—
供試元	[REDACTED]		

\* 当センターの試験による。

## 2-1-2. 被験物質の特性・同一性および安定性

### 1) 特性・同一性

被験物質の同一性は、被験物質入手後、試験実施前に赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計(Shimadzu FTIR-8200PC)を用いて測定し、文献値と比較することにより確認した。

## 2) 安定性

被験物質の安定性は、実験(用量設定試験)開始前および実験(確認試験)終了後に赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計(Shimadzu FTIR-8200PC)を用いて測定し、それぞれのデータと比較した結果、試験実施期間中、安定であったことを確認した。

### 2-1-3. 保管および取り扱い

被験物質は、被験物質保管区域に室温、遮光にて保管した。被験物質の取り扱いは、黄色灯下で行った。

## 2-2. 被驗物質溶液

### 2-2-1. 被験物質溶液の調製

被験物質を秤量し、培養液を加えて超音波処理をした懸濁液を最高調製懸濁液とした。これを培養液で段階希釈して各被験物質懸濁液を調製した。調製作業は、黄色灯下で行った。

使用溶媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グ レ ード	純 度 ( % )
	培養液	2-5-3に記載した		—	—
溶 媒 選 択 の 理 由	被験物質は水に対して不溶であり、DMSOに対しては33.8mg/mlで溶解した(1/100量添加で最終濃度約0.338mg/ml)。しかしこの濃度で培養液に添加すると、大きな粒子の析出が生じた。一方、被験物質を直接、培養液に添加すると5.4mg/mlの濃度で均一に懸濁した。従って、培養液に直接懸濁する方法を選択した。				
被験物質溶液の性状	懸濁				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	被験物質を秤量し、培養液を加えた後に、超音波処理により均一に懸濁した。				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	短時間処理法による試験 細胞増殖抑制試験および染色体異常予備試験10分25℃ 染色体異常試験(本試験)10分25℃ 染色体異常試験(確認試験)10分25℃ 連続処理法による試験 細胞増殖抑制試験および染色体異常予備試験10分25℃ 染色体異常試験(本試験)10分25℃				
純 度 換 算 の 有 無	有 <span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 2px;">無</span>				

## 2-2-2. 被験物質溶液の処理

細胞への処理は、シャーレの培養液を抜き、ただちに被験物質懸濁液を添加することにより行った。処理作業は、黄色灯下で行った。

## 被験物質懸濁液の処理量

	懸濁液	S9 mix
短時間処理 (-S9)	3.0ml	—
短時間処理 (+S9)	2.5ml *	0.5ml
連続処理	5.0ml	—

\* 設定濃度の1.2倍濃度の被験物質懸濁液とした。

## 2-3. 陽性対照

## 2-3-1. 陽性対照物質

物 質 名		製 造 元	Lot No.	グレード	純 度	溶媒名
陽性対照	マイトマイシンCC (MMC)	和光純薬工業 (株)	KSJ6180	生化学用	998 μ g/mg (力価)	超純水
	ベンゾ [a] ピレン (B[a]P)	和光純薬工業 (株)	ELE2013	特級	99.8%	DMSO
陽性対照	超純水	自家製	—	(ミリ-Q水)	—	
物質溶媒	DMSO	和光純薬工業 (株)	KWP4671	インテリピューア	100.0%	

## 2-3-2. 陽性対照物質の選択理由

MMC、B[a]PともにCHL/IU細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されており<sup>1)</sup>、日本バイオアッセイ研究センターにおける背景データも豊富なため。

## 2-3-3. 陽性対照物質溶液の調製、保存について

MMC、B[a]Pともに、所定の濃度溶液を調製、分注し、凍結保存(-30℃)したものを1本ずつ使用した。

## 2-3-4. 陽性対照物質および用量

## 短時間処理法

-S9処理：マイトマイシンC(MMC) 用量 0.0001mg/ml

+S9処理：ベンゾ[a]ピレン(B[a]P) 用量 0.01mg/ml

## 連続処理法

24、48時間処理：マイトマイシンC(MMC) 用量 0.00004mg/ml

## 2-4. 陰性対照

陰性対照として、培養液のみを処理した。

## 2-5. 使用した細胞

## 2-5-1. 細胞

CHL/IU(チャイニーズハムスター新生仔肺由来の株細胞)のクローン11(国立衛生試験所[現国立医薬品食品衛生研究所]より1985年11月14日入手)を使用した。

## 2-5-2. 選定理由

この系は、染色体異常試験において化学物質に対する感受性が高いことが知られていて、データも豊富なため<sup>1)</sup>。

## 2-5-3. 細胞の特徴

## 1) 培養条件

培養液 10%非働化仔牛血清(SAFC Biosciences社、Lot No. 8B0525)を含むイーグルMEM(日水製薬株)

条件 5%CO<sub>2</sub>、37℃で培養し、2～4日毎に継代した。

## 2) 増殖

プレート上で単層状に増殖

倍加時間 約15時間

## 3) 染色体

染色体数モード 25本

## 4) 保存

ジメチルスルホキシド(DMSO、和光純薬工業株式会社、インフィニティピュア)を培養液に10%になるように加え、液体窒素中(-196℃)で保存したものを融解、培養して試験に使用した。

## 2-5-4. 継代数

国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)より継代数16を入手し、試験には総継代数23～35(当センターでの継代数は7～19)で使用した。

## 2-6. 代謝活性化

## 2-6-1. S9の入手方法等

自製・購入の別	購 入(製造元 キッコーマン株式会社)
製 造 年 月 日	2009年 9月 4日 製造
購入の場合のLot No.	RAA-601
保 存 温 度	-80℃

## 2-6-2. S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・ Sprague-Dawley	名称	フェノバルビタール(PB) 5,6-ベンゾフラボン(BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間 及び 投与量	1日目：PB 30mg/kg体重 2日目：PB 60mg/kg体重 3日目：PB 60mg/kg体重 BF 80mg/kg体重 4日目：PB 60mg/kg体重 5日目 S9調製
体重	215－252 g		

## 2-6-3. S9 mixの組成

成分	S9 mix 1ml中の量	成分	S9 mix 1ml中の量
S9	0.3 ml	NADP	4 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ mol	Na-リン酸緩衝液	—
KCl	33 $\mu$ mol	その他(HEPES)	4 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol	—	—

注) キッコーマン株式会社製の「染色体異常試験用凍結S-9Mix(Lot No. CAM-601)」を用いた。

## 2-6-4. S9 mixの処理条件

① プレート法	2. 浮遊細胞法	3. その他( )
S9量(最終濃度)	5 %	
S9蛋白量(最終濃度)	1.4 mg/ml	
処理時間	6 h	
回復時間	20 h	
備考	—	

### 3. 試験方法

#### 3-1. 採用した試験方法

試験は、平成15年11月21日付け、薬食発第1121002号厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・13製局第2号経済産業省製造産業局長、環境企発第 031121002号環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」および OECD ガイドライン [OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, TG No.473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, 1997]に準拠して実施した。

#### 3-2. 試験構成

試験は、短時間処理法による試験および連続処理法による試験により構成した。短時間処理法による試験および連続処理法による試験において陰性と判断したため、短時間処理法(+S9処理)の確認試験を実施した。

#### 3-3. 短時間処理法による試験

短時間処理法による試験は、代謝活性化系を用いて(+S9処理：代謝活性化法による場合)、および用いない(-S9処理：代謝活性化法によらない場合)で実施した。

##### 3-3-1. 細胞増殖抑制試験および染色体異常予備試験(用量設定試験)

試験は、各用量3枚のシャーレを処理して、2枚を細胞増殖抑制試験に、1枚を染色体異常予備試験に用いた。最高用量を5.4mg/ml(約10mM)として、公比2で8段階の用量で実施した。細胞増殖抑制試験の対照として、陰性対照を設けた。染色体異常予備試験の対照として、陰性対照および陽性対照を設けた。なお、染色体標本作製前に細胞を観察(位相差顕微鏡、100倍)した結果、細胞毒性が認められなかった 0.17 mg/ml以下の用量については、染色体標本を作製しなかった。

##### 実験方法

60mmシャーレに20000個(4000個/ml×5ml)の細胞を播種し、3日間培養後に培養液を抜き、被験物質懸濁液(-S9処理：被験物質懸濁液 3.0ml、+S9処理：被験物質懸濁液 2.5mlおよび S9mix 0.5 ml)を添加した。6時間作用させた後にリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で一回洗浄し、新しい培養液3.5mlを添加し、20時間培養後に細胞固定・染色又は染色体標本の作製を行った。



### 3-3-2. 染色体異常試験(本試験)

各用量4枚のシャーレを処理し、2枚を染色体標本作製、2枚を細胞増殖率測定に用いた。試験は、細胞増殖抑制試験および染色体異常予備試験の結果に基づいて、-S9処理、+S9処理ともに、5.4mg/mlを最高用量として、4.1、2.7、1.4mg/mlの4段階の用量で実施した。実験方法は、3-3-1と同じ方法で実施した。染色体標本は処理した全てのシャーレについて作製し、染色体観察を行った。試験の対照として、陰性対照および陽性対照を設けた。

### 3-3-3. 染色体異常試験(確認試験)

試験は、代謝活性化系を用いる場合のみ実施した。各用量4枚のシャーレを処理し、2枚を染色体標本作製、2枚を細胞増殖率測定に用いた。試験は、5.4mg/mlを最高用量として、4.1、2.7mg/mlの3段階の用量で実施した。実験方法は、3-3-1と同じ方法とした。染色体標本は処理した全てのシャーレについて作製し、染色体観察を行った。試験の対照として、陰性対照および陽性対照を設けた。

## 3-4. 連続処理法による試験

連続処理法は、24時間および48時間処理として代謝活性化系を用いないで行った。

### 3-4-1. 細胞増殖抑制試験および染色体異常予備試験(用量設定試験)

試験は、各用量3枚のシャーレを処理して、2枚を細胞増殖抑制試験に、1枚を染色体異常予備試験に用いた。最高用量は5.4mg/ml(約10mM)として、公比2で8段階の用量で実施した。細胞増殖抑制試験の対照として、陰性対照を設けた。染色体異常予備試験の対照として、陰性対照および陽性対照を設けた。なお、染色体標本作製前に細胞を観察(位相差顕微鏡、100倍)した結果、細胞毒性が認められなかった0.17mg/ml以下の用量については、染色体標本作製しなかった。

#### 実験方法

60mmシャーレに20000個(4000個/ml×5ml)の細胞を播種し、3日間培養後に培養液を抜き、被験物質懸濁液(5.0ml)を添加し、24時間および48時間培養後に細胞固定・染色又は染色体標本の作製を行った。

### 3-4-2. 染色体異常試験(本試験)

各用量4枚のシャーレを処理して、2枚を染色体標本作製、2枚を細胞増殖率測定に用いた。試験は、細胞増殖抑制試験および染色体異常予備試験の結果に基づいて、24時間処理は、5.4mg/mlを最高用量として、2.7、1.4、0.68、0.34mg/mlの5段階、48時間処理は、2.7mg/mlを最高用量として、1.4、0.68、0.34、0.17mg/mlの5段階の用量で実施した。実験方法は、3-4-1と同じ方法で実施した。染色体標本は処理した全てのシャーレについて作製し、染色体観察を行った。試験の対照として、陰性対照および陽性対照を設けた。

### 3-5. 細胞増殖率の測定

細胞増殖率の測定用のシャーレは、PBSで洗浄後エタノールで固定(5分)し、0.1%クリスタルバイオレットで10分間染色し、水で洗浄後に乾燥した。細胞増殖率は、細胞密度計(オリンパス・モノセレーター)を用いて測定した。その際、陰性対照をコントロール(100%)、細胞の生育していないシャーレをブランク(0%)として算出した。

### 3-6. 染色体標本の作製

染色体標本の作製2時間前にコルセミドを最終用量 $0.2\mu\text{g/ml}$  となるように添加した。2時間後培養液を遠沈管に移し、トリプシン溶液を用いて細胞を剥がし、遠沈管に加えた。遠沈管を遠心(1000rpm、5分)し、培養液を除去し、75mM KCl溶液4mlを徐々に添加し、37°Cで20分間低張処理を行った。冷却した固定液(エタノール 3 : 酢酸 1) 0.5mlを徐々に添加して遠心した。上清を除去し、冷却した固定液4mlを徐々に添加して固定した後、遠心した。この操作を3回繰り返した後、適当な密度の細胞浮遊液を作製した。清浄なスライドガラスを並べ、細胞浮遊液を滴下した。これを乾燥後、2.5%ギムザ液(pH6.8)で12分間染色し、水洗後乾燥させた。

### 3-7. 染色体の観察

染色体構造異常については、各培養器当たり100個の分裂中期細胞を観察した。数的異常については、各培養器当たり100細胞以上の分裂中期細胞を観察した(構造異常細胞の観察と並行して行い、構造異常対象細胞が100個に達するまで観察した)。異常の誘発率は、染色体に異常を持つ細胞の出現率で表した。観察は、コード化した標本を用いブラインド法で行った。

#### 3-7-1. 異常の分類

##### a) 構造異常

切断	(染色分体型)
交換	(染色分体型)
切断	(染色体型)
交換	(染色体型)
その他	(断片化など、ただし細粉化は含まない)

##### b) ギャップ (染色分体型・染色体型)

##### c) 数的異常

倍数体	
その他	(核内倍加等)

## 3-7-2. 観察基準

CHL/IU細胞が株細胞であることおよびその染色体の特徴を考慮して観察基準を下記とした<sup>1,2)</sup>。構造異常の観察対象は、染色体数が $25 \pm 2$ 本の細胞とした。

## a) 構造異常

## 1) 切断

断片が染色分体の縦軸からずれているもの。同一線上にあっても、その幅が染色分体の太さを越えるもの(ただし、細長い染色体では、この基準としない)。染色体型の切断については、動原体を持たない染色体があるため正確に判定できるもののみスコアした。

## 2) 交換

1本又は複数の染色体の2ヶ所以上で生じた切断が互いに結合したもの。染色体型については、環状、二動原体等明確に判断できるもののみとした。

## 3) その他

断片化：交換型を含まず、多くの染色体にギャップ、切断があるもの。

## b) ギャップ

非染色部分が染色分体の縦軸上にあり、その幅が染色分体より狭く、非染色部分の形状が明確なもの。

## c) 数的異常

## 1) 倍数体

3倍体(37本)以上のもの。異数性については検索しなかった。

## 2) その他

核内倍加等。

## 3-7-3. 判定

祖父尼らの判定基準<sup>1)</sup>および当センターでのバックグラウンドデータより構造異常、数的異常(倍数体、核内倍加を含む)とも、各用量での判定に下記の基準を設けた。構造異常には、ギャップのみを持つ細胞は含めなかった。なお、試験結果の統計処理は行わなかった。

染色体異常出現率	判定
5%未満	—
5%以上 ～ 10%未満	±
10%以上	+

#### 4. 試験成績および考察

##### 4-1. 短時間処理法による試験

###### 4-1-1. 細胞増殖抑制試験

短時間処理法の試験結果を表1および図1に示した。-S9処理、+S9処理ともに、最高用量の5.4mg/mlまで、顕著な細胞増殖率の低下は認められなかった。

###### 4-1-2. 染色体異常予備試験

染色体異常試験(予備試験)の試験結果を表2に示した。-S9処理では、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。また、+S9処理でも、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

本試験の用量設定は、この結果および細胞増殖抑制試験の結果を考慮して、-S9処理、+S9処理ともに、5.4mg/mlを最高用量として、4.1、2.7、1.4mg/mlの4段階とした。

###### 4-1-3. 染色体異常試験(本試験)

染色体異常試験(本試験)の結果を表3および図2,3に示した。-S9処理では、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。また、+S9処理でも、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

細胞増殖率は、-S9処理の1.4、2.7、4.1、5.4mg/mlの用量でそれぞれ、92、83、78、69%、+S9処理の1.4、2.7、4.1、5.4mg/mlの用量でそれぞれ、90、77、77、61%を示した。

###### 4-1-4. 染色体異常試験(確認試験)

短時間処理法による本試験および連続処理法による本試験で、いずれも陰性と判断したため、短時間処理法の+S9処理の確認試験を実施した。その結果を表4および図4に示した。構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

細胞増殖率は、2.7、4.1、5.4 mg/mlの用量でそれぞれ、72、66、66%を示した。

## 4-2. 連続処理法による試験

### 4-2-1. 細胞増殖抑制試験

連続処理法の試験結果を表5および図5に示した。24時間処理では、0.68、1.4、2.7、5.4mg/mlの用量でそれぞれ、68、52、42、39%の細胞増殖率を示した。48時間処理では、0.68、1.4、2.7mg/mlの用量でそれぞれ、63、44、28%の細胞増殖率を示した。24時間処理、48時間処理ともに、細胞増殖率は被験物質の用量に依存して減少しており、被験物質による増殖抑制作用が認められた。

### 4-2-2. 染色体異常予備試験

染色体異常試験(予備試験)の結果を表6に示した。24時間処理では、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。また、48時間処理でも、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。なお、48時間処理の5.4mg/mlの用量では、中期分裂細胞は観察されなかった。

本試験の用量設定は、この結果および細胞増殖抑制試験の結果を考慮して、24時間処理は、5.4mg/mlを最高用量として、2.7、1.4、0.68、0.34mg/mlの5段階、48時間処理は、2.7mg/mlを最高用量として、1.4、0.68、0.34、0.17mg/mlの5段階とした。

### 4-2-3. 染色体異常試験(本試験)

染色体異常試験(本試験)の結果を表7および図6, 7に示した。24時間処理では、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。また、48時間処理でも、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。なお、48時間処理の2.7mg/mlの用量では、観察可能な中期分裂細胞は、200細胞未満であった。

細胞増殖率は、24時間処理の0.34、0.68、1.4、2.7、5.4 mg/mlの用量でそれぞれ、86、75、66、55、41%、48時間処理の0.17、0.34、0.68、1.4、2.7mg/mlの用量でそれぞれ、92、78、58、38、36%を示した。

短時間処理法による試験および連続処理法による試験の全ての用量において、被験物質は培養液中で懸濁状態を示した。

なお、実施した全ての染色体異常試験および染色体異常予備試験の陰性対照および陽性対照の値は、当センターのバックグラウンドデータの範囲内にあり、試験が適切に行われたことを示していた。

## 5. 結果の判定

短時間処理法の-S9処理および+S9処理において、数的異常および構造異常を持つ細胞の出現率は、陰性の判定基準である5%未満を示した。また、連続処理法の24時間処理および48時間処理においても、数的異常および構造異常を持つ細胞の出現率は、陰性の判定基準である5%未満を示した。短時間処理法の+S9処理について確認試験を実施した結果、数的異常および構造異常を持つ細胞の出現率は、陰性の判定基準である5%未満を示した。なお、短時間処理法、連続処理法ともに、試験ガイドラインで要求される最高用量(10 mM : 5.4mg/ml)または細胞毒性を示す用量まで試験を実施した。

以上の結果より、本被験物質のCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

## 6. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかったこと

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態は発生しなかった。また、試験計画書に従わない事態は発生しなかった。

## 7. 参考文献

- 1) 祖父尼俊雄監修：染色体異常試験データ集、LIC、東京、1999
- 2) 日本環境変異原学会編：化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店、東京、1988

表1 細胞増殖抑制試験結果(短時間処理法)

被験物質名: 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルス  
 ピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサントレン]-3-オン

代謝活性化法によらない場合 (6 - 20 h)		代謝活性化法による場合 (6 - 20 h)	
用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.042	99	0.042	100
0.084	107	0.084	100
0.17	109	0.17	104
0.34	105	0.34	110
0.68	101	0.68	95
1.4	97	1.4	86
2.7	92	2.7	79
5.4	83	5.4	74

[備考]括弧には処理時間及び回復時間を記入した。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、用量の低い順に記録した。

細胞増殖率は2枚のシャーレの平均値を表示した。

全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。

表2 染色体異常予備試験結果(短時間処理法)

被験物質名: 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オン

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の出現頻度 (%)							ギャップの 出現頻度 (%)	染色体数的異常の出現頻度 (%)			
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞		観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞
6-20	-	陰性対照 [培養液]	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
		0.34	100	1	0	0	0	0	1	0	101	1.0	0	1.0
		0.68	100	0	0	0	0	0	0	0	102	2.0	0	2.0
		1.4	100	0	0	0	1	0	1	1	103	2.9	0	2.9
		2.7	100	0	0	0	0	0	0	0	102	2.0	0	2.0
		5.4	100	0	0	0	0	0	0	0	102	2.0	0	2.0
		陽性対照 [MMC] (0.0001)	100	8	53	0	0	0	58	0	100	0	0	0
6-20	+	陰性対照 [培養液]	100	0	1	0	0	0	1	0	101	1.0	0	1.0
		0.34	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
		0.68	100	0	0	0	0	0	0	0	102	2.0	0	2.0
		1.4	100	0	0	0	0	0	0	0	102	2.0	0	2.0
		2.7	100	0	0	0	0	0	0	0	104	3.8	0	3.8
		5.4	100	0	0	0	0	0	0	0	104	3.8	0	3.8
		陽性対照 [B[a]P] (0.01)	100	3	72	0	0	0	73	0	100	0	0	0

〔備考〕 1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入した。  
2. 全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。  
MMC：マイトマイシンC  
B[a]P：ベンゾ [ a ] ピレン



表3 染色体異常本試験結果(短時間処理法)

被験物質名: 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オン

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップの 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数
6-20	-	陰性対照 [培養液]	100	0	1	0	0	0	1	0	100	103	3	0	3
			100	0	0	0	0	0	0	0		102	2	0	2
			200	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )		205	5( 2.4)	0( 0 )	5( 2.4)
		1.4	100	0	0	0	0	0	0	0	88	104	4	0	4
			100	1	1	0	0	0	2	0	96	102	2	0	2
			200	1( 0.5)	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	2( 1.0)	0( 0 )	( 92)	206	6( 2.9)	0( 0 )	6( 2.9)
		2.7	100	0	0	0	0	0	0	0	81	103	3	0	3
			100	0	0	0	0	0	0	0	84	103	3	0	3
			200	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	( 83)	206	6( 2.9)	0( 0 )	6( 2.9)
		4.1	100	0	1	0	0	0	1	0	77	104	4	0	4
			100	0	1	0	0	0	1	0	79	102	2	0	2
			200	0( 0 )	2( 1.0)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	2( 1.0)	0( 0 )	( 78)	206	6( 2.9)	0( 0 )	6( 2.9)
		5.4	100	0	0	0	0	0	0	0	66	104	4	0	4
			100	1	2	0	0	0	3	0	71	102	2	0	2
			200	1( 0.5)	2( 1.0)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	3( 1.5)	0( 0 )	( 69)	206	6( 2.9)	0( 0 )	6( 2.9)
		陽性対照 [MMC] (0.0001)	100	5	62	0	0	0	65	0	—	101	1	0	1
			100	8	55	0	0	0	60	0	—	100	0	0	0
			200	13( 6.5)	117( 58.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	125( 62.5)	0( 0 )	—	201	1( 0.5)	0( 0 )	1( 0.5)
6-20	+	陰性対照 [培養液]	100	0	1	0	0	0	1	0	100	101	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0		101	1	0	1
			200	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )		202	2( 1.0)	0( 0 )	2( 1.0)
		1.4	100	0	0	0	0	0	0	0	91	101	1	0	1
			100	0	2	0	0	0	2	0	89	102	2	0	2
			200	0( 0 )	2( 1.0)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	2( 1.0)	0( 0 )	( 90)	203	3( 1.5)	0( 0 )	3( 1.5)
		2.7	100	0	0	0	0	0	0	0	76	103	3	0	3
			100	0	0	0	0	0	0	0	78	101	1	0	1
			200	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	( 77)	204	4( 2.0)	0( 0 )	4( 2.0)
		4.1	100	0	0	0	0	0	0	0	79	103	3	0	3
			100	0	2	0	0	0	2	0	75	103	3	0	3
			200	0( 0 )	2( 1.0)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	2( 1.0)	0( 0 )	( 77)	206	6( 2.9)	0( 0 )	6( 2.9)
		5.4	100	0	0	0	0	0	0	0	60	103	3	0	3
			100	0	0	0	0	0	0	0	62	101	1	0	1
			200	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	( 61)	204	4( 2.0)	0( 0 )	4( 2.0)
		陽性対照 [B[a]P] (0.01)	100	2	24	0	0	0	26	0	—	101	1	0	1
			100	1	34	0	0	0	34	0	—	100	0	0	0
			200	3( 1.5)	58( 29.0)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	60( 30.0)	0( 0 )	—	201	1( 0.5)	0( 0 )	1( 0.5)

〔備考〕 1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入した。  
 2. 全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。  
 3. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入し、その平均値を括弧内に記入した。  
 MMC: マイトマイシンC  
 B[a]P: ベンゾ [a] ピレン

表4 染色体異常確認試験結果(短時間処理法)

被験物質名：2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オン

処理時間(h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数（出現頻度％）							ギャップの 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数（出現頻度％）			
			観察細胞数	染色体体切断	染色体体交換	染色体体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数
6-20	+	陰性対照 [培養液]	100	0	0	0	0	0	0	0	100	101	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )		201	1( 0.5)	0( 0 )	1( 0.5)
		2.7	100	0	1	0	0	0	1	0	73	101	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	70	101	1	0	1
			200	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )	( 72)	202	2( 1.0)	0( 0 )	2( 1.0)
		4.1	100	0	1	0	0	0	1	0	70	103	3	0	3
			100	0	0	0	0	0	0	0	61	103	3	0	3
			200	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )	( 66)	206	6( 2.9)	0( 0 )	6( 2.9)
		5.4	100	0	0	0	0	0	0	0	59	101	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	73	101	1	0	1
			200	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	( 66)	202	2( 1.0)	0( 0 )	2( 1.0)
		陽性対照 [B[a]P] (0.01)	100	2	65	0	0	0	66	0	—	100	0	0	0
			100	1	65	0	0	0	65	0	—	100	0	0	0
			200	3( 1.5)	130( 65.0)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	131( 65.5)	0( 0 )	—	200	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )

〔備考〕 1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入した。  
2. 全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。  
3. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入し、その平均値を括弧内に記入した。  
B[a]P：ベンゾ [a] ピレン

表5 細胞増殖抑制試験結果(連続処理法)

被験物質名: 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルス  
ピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサントレン]-3-オン

(24-0h) 処理による場合		(48-0h) 処理による場合	
用量 (mg/ml)	細胞増殖率(%)	用量 (mg/ml)	細胞増殖率(%)
0	100	0	100
0.042	93	0.042	93
0.084	81	0.084	87
0.17	91	0.17	87
0.34	72	0.34	73
0.68	68	0.68	63
1.4	52	1.4	44
2.7	42	2.7	28
5.4	39	5.4	28

[備考]括弧には処理時間及び回復時間を記入した。

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、用量の低い順に記録した。

細胞増殖率は2枚のシャーレの平均値を表示した。

全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。

表6 染色体異常予備試験結果(連続処理法)

被験物質名: 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オン

処理時間 (h)	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の出現頻度 (%)							ギャップの 出現頻度 (%)	染色体数的異常の出現頻度 (%)			
		観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞		観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞
24-0	陰性対照 [培養液]	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
	0.34	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
	0.68	100	0	0	0	0	0	0	0	102	2.0	0	2.0
	1.4	100	0	0	0	0	0	0	0	102	2.0	0	2.0
	2.7	100	0	1	0	0	0	1	0	100	0	0	0
	5.4	100	0	1	0	0	0	1	0	102	2.0	0	2.0
	陽性対照 [MMC] (0.00004)	100	4	22	0	0	0	26	1	100	0	0	0
48-0	陰性対照 [培養液]	100	0	0	0	0	0	0	0	102	2.0	0	2.0
	0.34	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
	0.68	100	0	1	0	0	0	1	0	101	1.0	0	1.0
	1.4	100	0	0	0	0	0	0	0	102	2.0	0	2.0
	2.7	100	0	0	0	0	0	0	1	103	2.9	0	2.9
	5.4	TOX								TOX			
	陽性対照 [MMC] (0.00004)	100	4	49	0	0	0	52	0	100	0	0	0

[備考] 1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入した。

2. 全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。

TOX: 分裂中期細胞が観察されなかった。

MMC: マイトマイシンC

表7 染色体異常本試験結果(連続処理法)

被験物質名: 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オン

処理時間 (h)	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップの 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数
24-0	陰性対照 [培養液]	100	0	1	0	0	0	1	0	100	101	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		101	1	0	1
		200	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )		202	2( 1.0)	0( 0 )	2( 1.0)
	0.34	100	0	1	0	0	0	1	0	90 ( 86)	102	2	0	2
		100	0	0	0	0	0	0	0		103	3	0	3
		200	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )		205	5( 2.4)	0( 0 )	5( 2.4)
	0.68	100	0	0	0	0	0	0	0	72 ( 75)	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0		101	1	0	1
		200	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )		201	1( 0.5)	0( 0 )	1( 0.5)
	1.4	100	1	0	0	0	0	1	0	62 ( 66)	101	1	0	1
		100	0	2	0	0	0	2	0		100	0	0	0
		200	1( 0.5)	2( 1.0)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	3( 1.5)	0( 0 )		201	1( 0.5)	0( 0 )	1( 0.5)
	2.7	100	1	1	0	0	0	2	0	54 ( 55)	102	2	0	2
		100	0	0	0	0	0	0	0		103	3	0	3
		200	1( 0.5)	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	2( 1.0)	0( 0 )		205	5( 2.4)	0( 0 )	5( 2.4)
	5.4	100	0	0	0	0	0	0	0	37 ( 41)	102	2	0	2
		100	0	1	0	0	0	1	0		101	1	0	1
		200	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	1( 0.5)	0( 0 )		203	3( 1.5)	0( 0 )	3( 1.5)
	陽性対照 [MMC] (0.00004)	100	12	40	0	0	0	47	1	—	100	0	0	0
		100	14	40	0	0	0	50	1		101	1	0	1
		200	26( 13.0)	80( 40.0)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	97( 48.5)	2( 1.0)		201	1( 0.5)	0( 0 )	1( 0.5)
48-0	陰性対照 [培養液]	100	0	0	0	0	0	0	0	100	101	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		101	1	0	1
		200	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )		202	2( 1.0)	0( 0 )	2( 1.0)
	0.17	100	0	0	0	0	0	0	0	90 ( 92)	103	3	0	3
		100	0	0	0	0	0	0	0		103	3	0	3
		200	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )		206	6( 2.9)	0( 0 )	6( 2.9)
	0.34	100	0	0	0	0	0	0	0	81 ( 78)	102	2	0	2
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )		202	2( 1.0)	0( 0 )	2( 1.0)
	0.68	100	1	1	0	0	0	2	0	58 ( 58)	102	2	0	2
		100	0	1	0	0	0	1	0		102	2	0	2
		200	1( 0.5)	2( 1.0)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	3( 1.5)	0( 0 )		204	4( 2.0)	0( 0 )	4( 2.0)
	1.4	100	0	1	0	0	0	1	0	47 ( 38)	102	2	0	2
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
		200	1( 0.5)	1( 0.5)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	2( 1.0)	0( 0 )		202	2( 1.0)	0( 0 )	2( 1.0)
	2.7	83	0	1	0	0	0	1	0	37 ( 36)	83	0	0	0
		72	0	0	0	0	0	0	0		73	1	0	1
		155	0( 0 )	1( 0.6)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	1( 0.6)	0( 0 )		156	1( 0.6)	0( 0 )	1( 0.6)
	陽性対照 [MMC] (0.00004)	100	15	67	0	0	0	73	0	—	100	0	0	0
		100	9	63	0	0	0	69	0		100	0	0	0
		200	24( 12.0)	130( 65.0)	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )	142( 71.0)	0( 0 )		200	0( 0 )	0( 0 )	0( 0 )

- 【備考】 1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入した。  
 2. 全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。  
 3. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入し、その平均値を括弧内に記入した。  
 MMC：マイトマイシンC

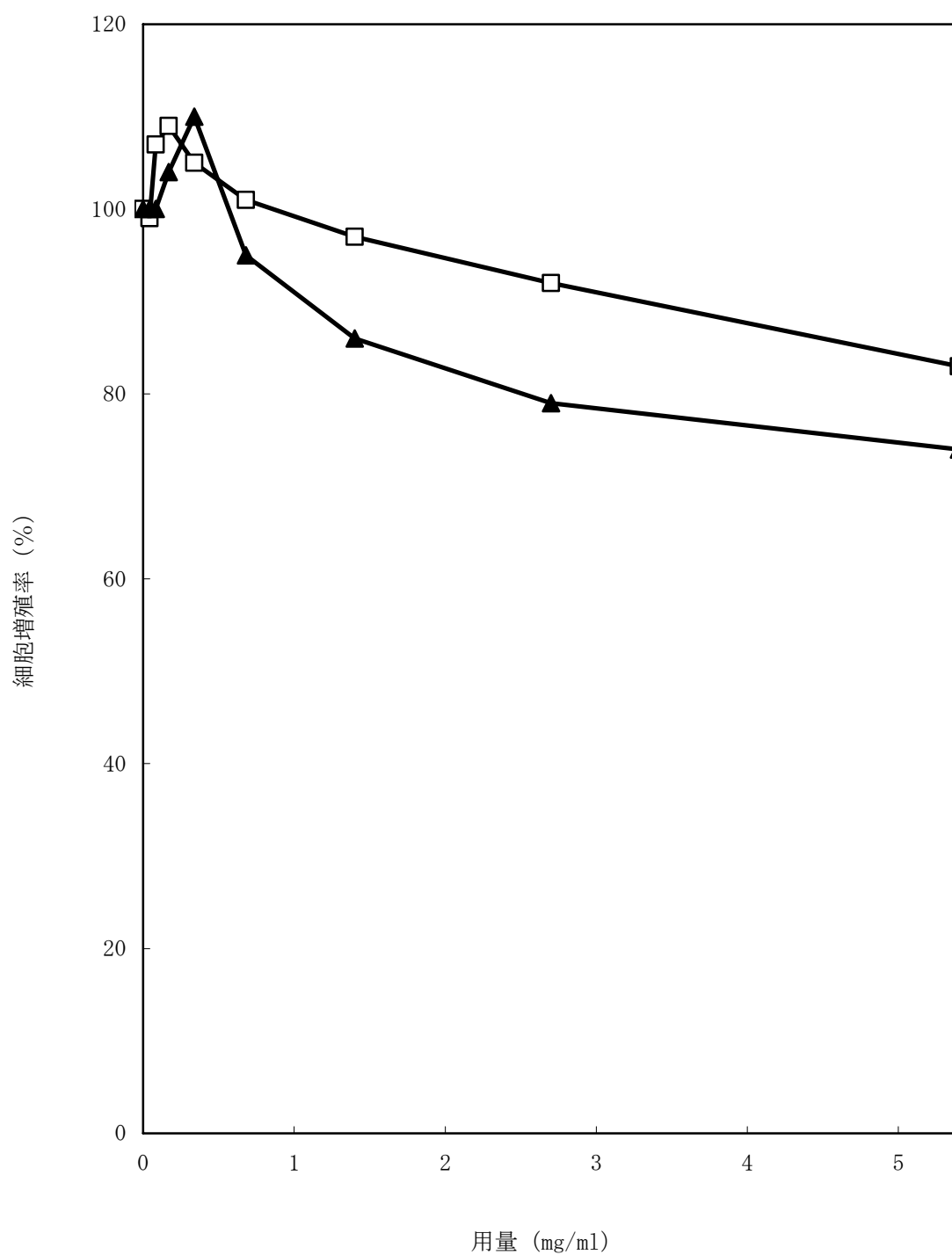
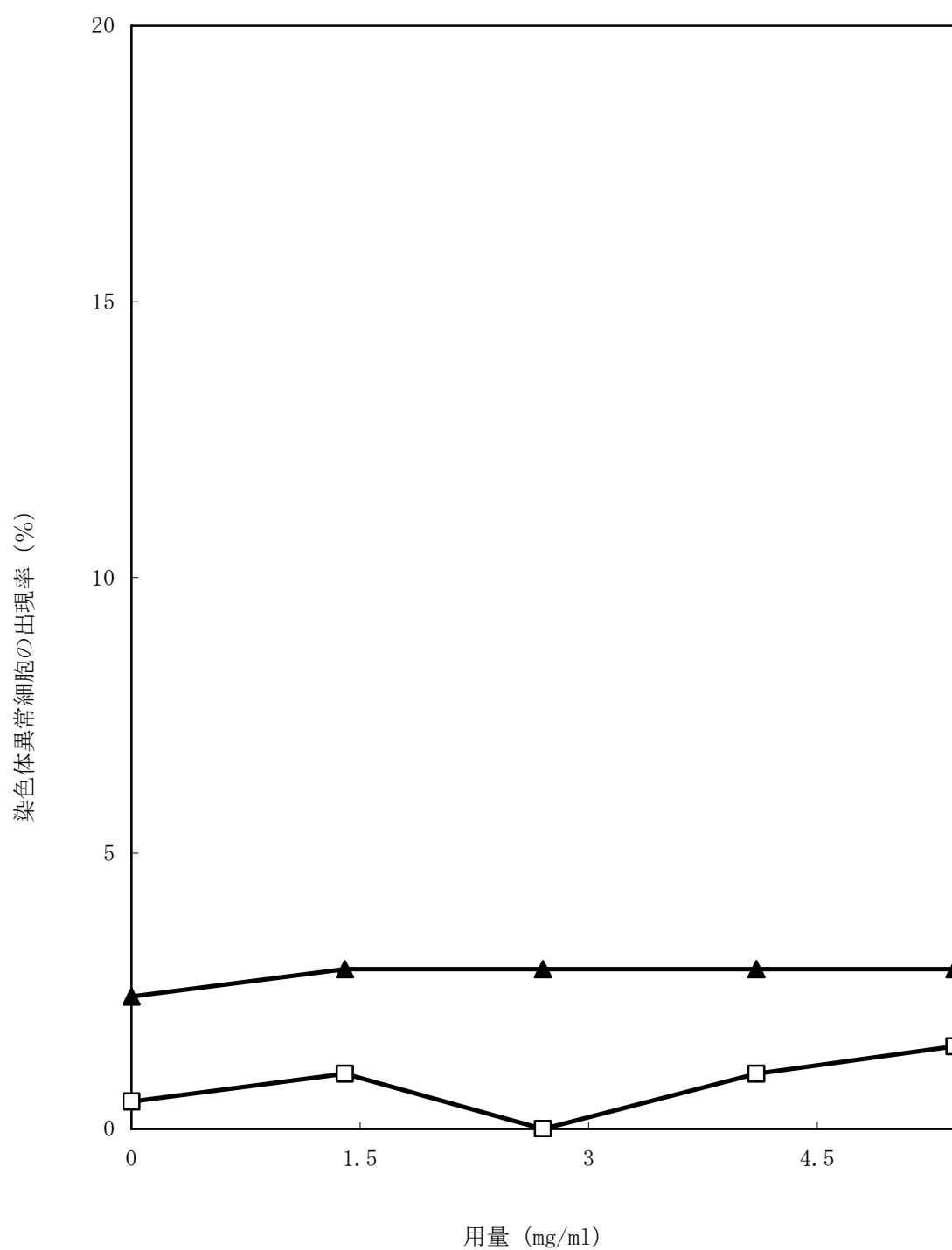


図1 細胞増殖抑制試験結果（短時間処理法）

被験物質名： 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサテン]-3-オン

—□— -S9 処理  
—▲— +S9 処理



全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。

図2 染色体異常本試験結果（短時間処理法、－S9処理）

被験物質名： 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メ  
チルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテ  
ン]-3-オン

—□— 構造異常  
—▲— 数的異常

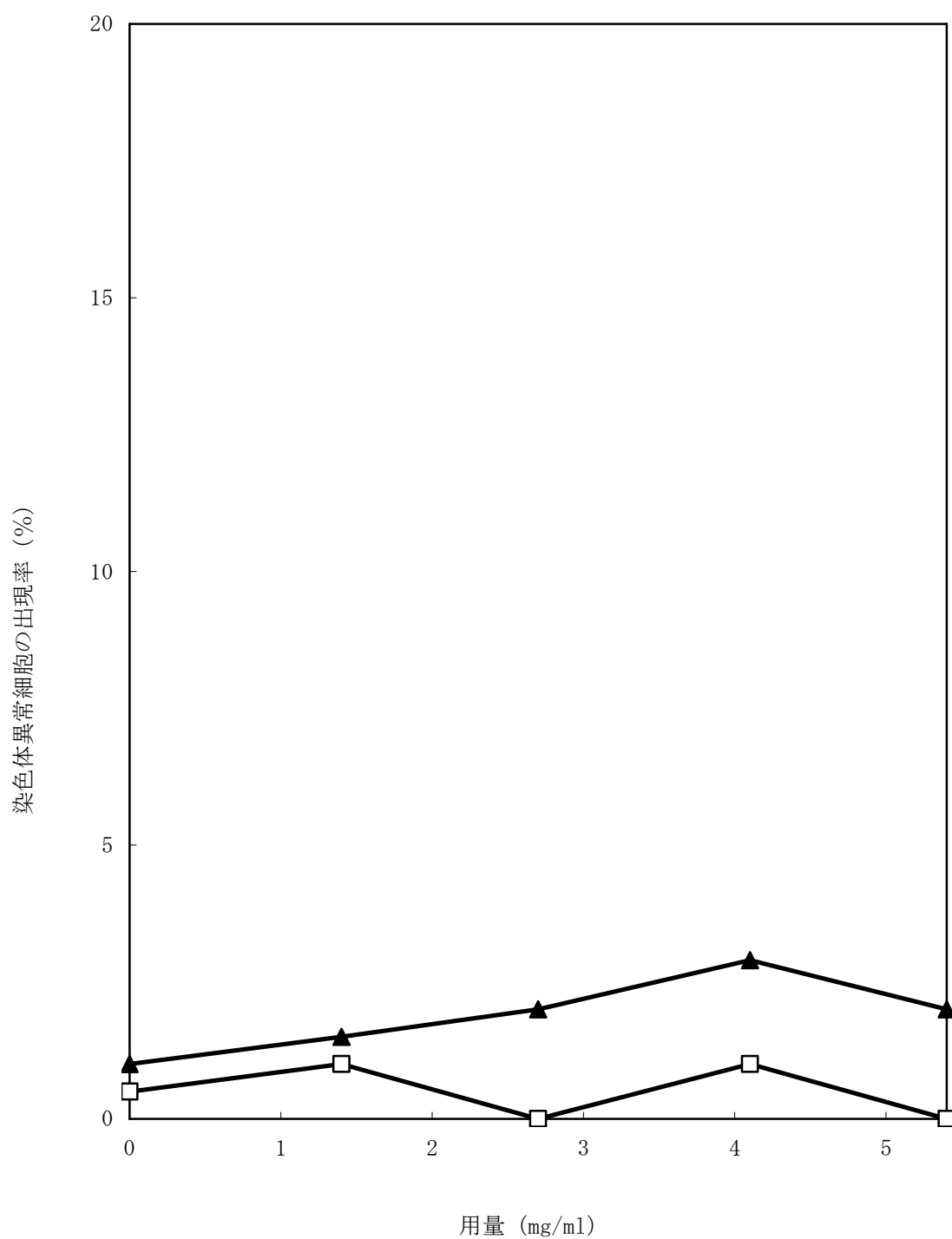
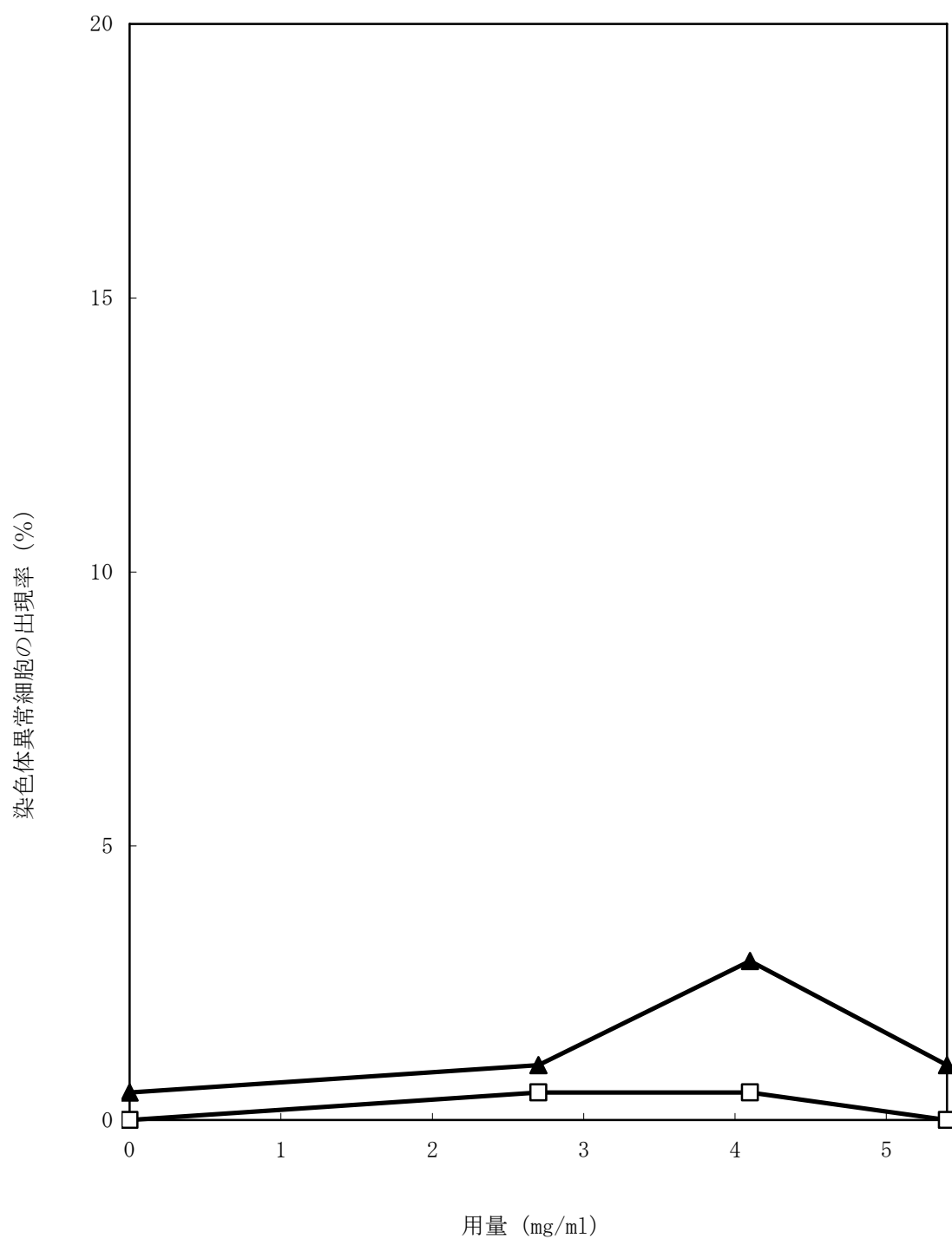


図3 染色体異常本試験結果（短時間処理法、+ S 9 処理）

被験物質名： 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メ  
チルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテ  
ン]-3-オン

—□— 構造異常  
—▲— 数的異常



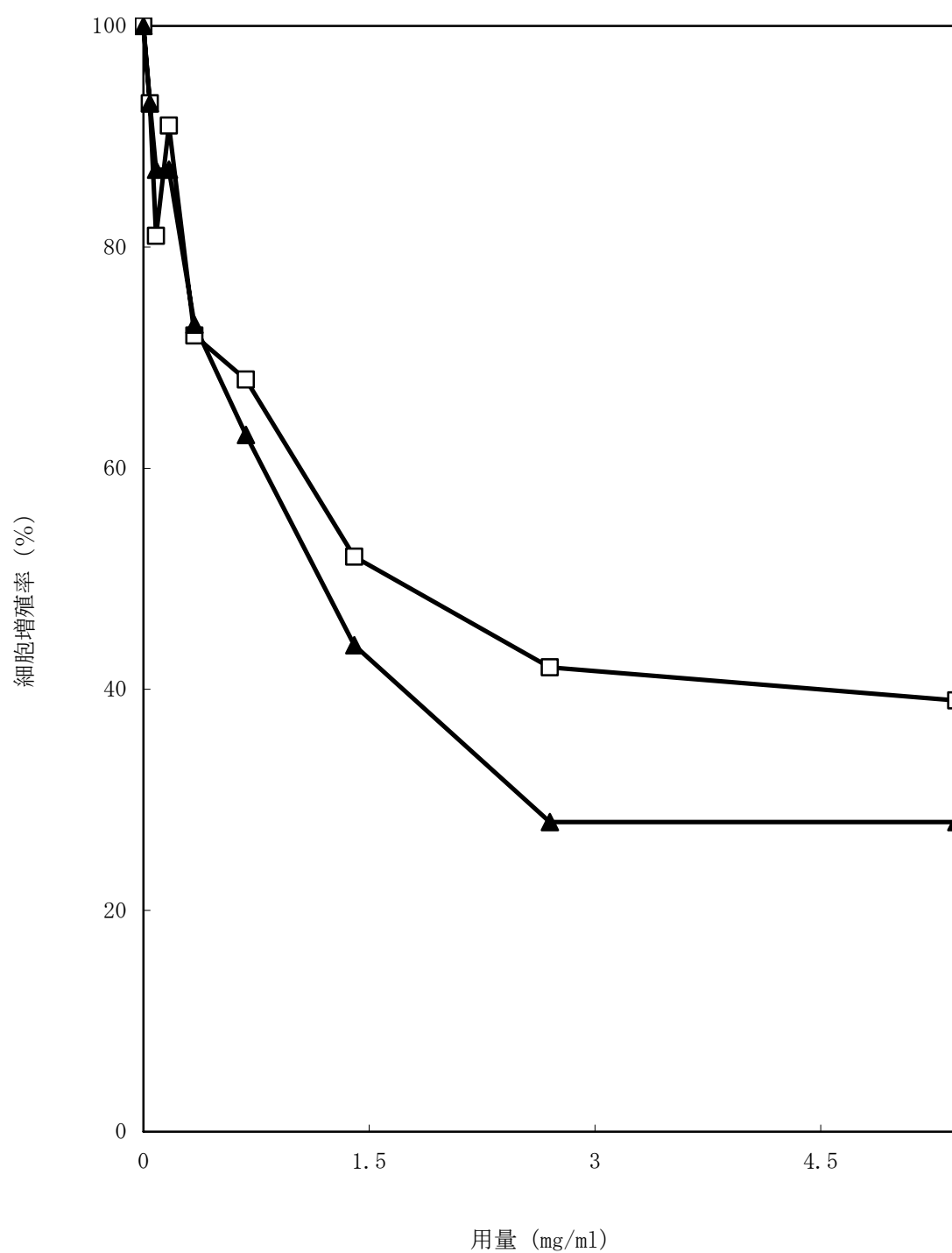


全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。

図4 染色体異常確認試験結果（短時間処理法、+ S 9 処理）

被験物質名： 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メ  
チルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサン  
テン]-3-オン

—□— 構造異常  
—▲— 数的異常

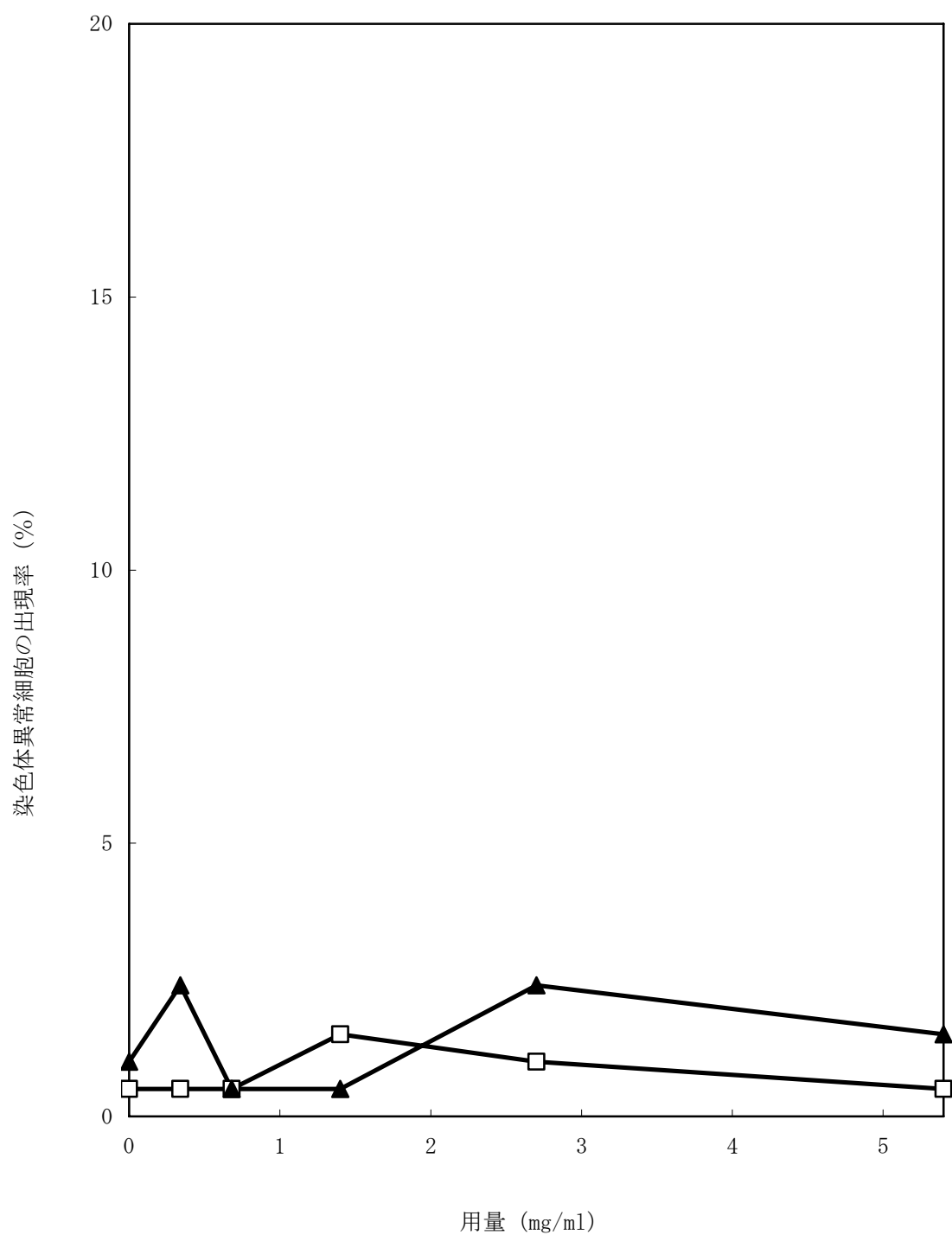


全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。

図5 細胞増殖抑制試験結果（連続処理法）

被験物質名： 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサテン]-3-オン

□ 24時間処理  
▲ 48時間処理

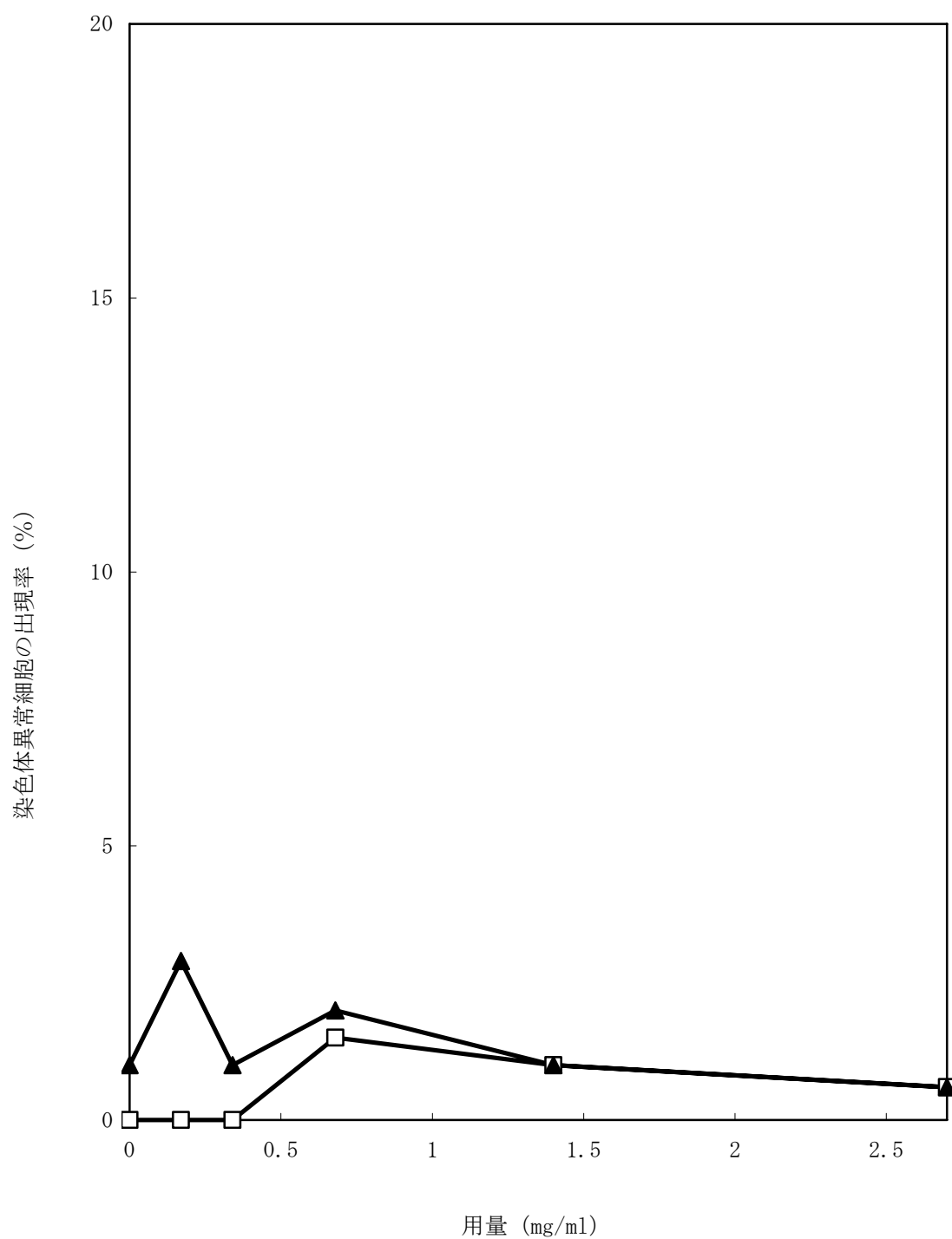


全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。

図6 染色体異常本試験結果（連続処理法、24h処理）

被験物質名： 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メ  
チルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサン  
テン]-3-オン

—□— 構造異常  
—▲— 数的異常



全ての用量で被験物質は懸濁状態を示した。

図7 染色体異常本試験結果（連続処理法、48 h 処理）

被験物質名： 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メ  
チルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサン  
テン]-3-オン

—□— 構造異常  
—▲— 数的異常