

『 $\beta$ -アラニンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる  
染色体異常試験』

PROJECT No. H-00354

平成 13 年 3 月 30 日

群馬県吾妻郡吾妻町大字大戸 3303-58

株式会社 実医研

## ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

### 1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)		β-アラニン				
別 名						
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)		<div>H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH</div> <div>C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>8</sub></div>				
試験に供した新規 化学物質の純度		98.2%	試験に供した新規 化学物質の Lot No.			
不純物の名称及び濃度						
C A S 番 号		107-95-9	蒸 気 圧			
分 子 量		89.09	分 配 係 数			
融 点		197℃	常温における性状	斜方結晶		
沸 点						
安 定 性						
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	55.5g/dL (25℃)溶解	安定	DMSO		
	エタノール			その他 ( )		

### 2. 細胞の種類

細胞名	CHL/IU	入手先	国立医薬品食品衛生研究所 (旧名：国立衛生試験所)	
種	チャイニーズ・ハムスター	入手年月日	1991年10月31日	
培養液	Eagle MEM	製造元	Gibco	
血清の種類と添加量	仔ウシ血清 10%	製造元 (Lot No.)	Gibco(1023609)	
細胞周期	約 15h	凍結条件	液体窒素 (−196℃)	
継代数	8 継代 (細胞増殖抑制試験) 9 継代 (染色体異常試験) 18 継代 (確認試験)	培養条件	容器	25cm <sup>2</sup> 細胞培養用フラスコ
染色体数 (モード)	25 本		温度	37℃
			CO <sub>2</sub> 濃度	5%
備考				

### 3.S9 mix

#### (1) S9 の入手方法等

自製・購入の別	1.自製      ②.購入（製造年月日：キッコーマン株式会社）
製造年月日	2000 年 9 月 29 日
購入の場合の Lot No.	RAA-433
保存温度	-80℃以下（設定温度；-85℃）

#### (2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD 系	名 称	PB および 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週 令	7 週	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	PB    0.03g/kg   1 回
体 重	205~245g		PB    0.06g/kg   3 回
			5,6-BF 0.08g/kg   1 回

#### (3) S9mix の組成

成 分	S9mix 1mL 中の量	成 分	S9mix 1mL 中の量
S9	0.3 mL	NADP	4 μmol
MgCl <sub>2</sub>	5 μmol	HEPES 緩衝液*	4 μmol
KCl	33 μmol	その他 ( )	—
グルコース-6-リン酸	5 μmol	—	—

#### (4) S9mix の処理条件

\* PH 7.2

	①.プレート法	2.細胞浮遊法	3.その他 ( )
S9 量（最終濃度）		5%	
S9 蛋白量（最終濃度）		1.36mg/mL	
処 理 時 間		6h	
回 復 時 間		18h	
備 考		—	

### 4.被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	生理食塩液	扶桑薬品工業株式会社	99D13C	局方	—
溶媒選択の理由	水に 55.5g/dL 溶解し、かつ、安定であるとされていることから生理食塩液を選択した。				
被験物質溶液の性状	溶解      懸濁      その他 ( )				
被験物質が難溶性の場合における懸濁の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	0 時間 00 分（用時調製）      室温				
純度換算の有無	有      無				

## 5.短時間処理法における試験

### (1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化によらない場合	代謝活性化による場合
試験実施期間		2000年12月9日から 2000年12月14日	2000年12月9日から 2000年12月14日
培養器	形状	細胞培養用シャーレ	細胞培養用シャーレ
	大きさ	φ 35mm	φ 35mm
	培養液量	2 mL/培養器	2 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播種細胞数	約 $1 \times 10^4$ 個/mL	約 $1 \times 10^4$ 個/mL
	前培養日数	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.2 mL/培養器	0.2 mL/培養器
	S9 mix の添加量	—	0.37 mL/培養器
	S9 の最終濃度	—	5 %
	S9 蛋白の最終濃度	—	2.99 mg/培養器
	処理時間	6 h	6 h
	回復時間	18 h	18 h
細胞増殖抑制 測定法		10%ホルマリン水溶液で固定 0.1%クリスタル・バイオレットで染色 モノセレーターで計測	
備考		—	

### (2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化によらない場合 (6-18h)		代謝活性化による場合 (6-18h)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.001	94	0.001	89
0.004	88	0.004	84
0.011	86	0.011	83
0.033	88	0.033	83
0.099	83	0.099	82
0.297	86	0.297	81
0.891	79	0.891	76

## (3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		代謝活性化によらない場合	代謝活性化による場合
		2000 年 12 月 15 日から 2000 年 12 月 21 日	2000 年 12 月 15 日から 2000 年 12 月 21 日
培 養 器	形 状	細胞培養用シャーレ	細胞培養用シャーレ
	大 き さ	φ 60mm	φ 60mm
	培 養 液 量	5 mL/培養器	5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	約 $1 \times 10^4$ 個/mL	約 $1 \times 10^4$ 個/mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.5 mL/培養器	0.5 mL/培養器
	S9 mix の添加量	—	0.92 mL/培養器
	S9 の最終濃度	—	5 %
	S9 蛋白の最終濃度	—	7.48 mg/培養器
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備 考		—	—

## (4) 染色体異常試験結果（別表 1 による）

## (5) 確認試験試験の条件

試験実施期間		代謝活性化によらない場合	代謝活性化による場合
		—	2001 年 1 月 29 日から 2001 年 2 月 5 日
培 養 器	形 状	—	細胞培養用シャーレ
	大 き さ	—	φ 60mm
	培 養 液 量	—	5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	—	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	—	約 $1 \times 10^4$ 個/mL
	前 培 養 日 数	—	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	—	0.5 mL/培養器
	S9 mix の添加量	—	0.92 mL/培養器
	S9 の最終濃度	—	5 %
	S9 蛋白の最終濃度	—	7.48 mg/培養器
	処 理 時 間	—	6 h
	回 復 時 間	—	18 h
備 考		—	—

## (6) 確認試験結果（別表 3 による）

## 6.連続処理法による試験

### (1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		2000年12月9日から 2000年12月14日	2000年12月9日から 2000年12月14日
培 養 器	形 状	細胞培養用シャーレ	細胞培養用シャーレ
	大 き さ	φ 35mm	φ 35mm
	培 養 液 量	2 mL/培養器	2 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	約 $1 \times 10^4$ 個/mL	約 $1 \times 10^4$ 個/mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.2 mL/培養器	0.2 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
細胞増殖抑制 測定法	10%ホルマリン水溶液で固定 0.1%クリスタル・バイオレットで染色 モノセレーターで計測		
備 考	—————		

### (2) 細胞増殖抑制試験結果

24h 処理による場合		48h 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
0.001	105	0.001	98
0.004	95	0.004	100
0.011	89	0.011	101
0.033	89	0.033	101
0.099	90	0.099	97
0.297	90	0.297	100
0.891	88	0.891	100

### (3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		2000年12月15日から 2000年12月21日	2000年12月15日から 2000年12月21日
培 養 器	形 状	細胞培養用シャーレ	細胞培養用シャーレ
	大 き さ	φ 60mm	φ 60mm
	培 養 液 量	5 mL/培養器	5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	約 $1 \times 10^4$ 個/mL	約 $1 \times 10^4$ 個/mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.5 mL/培養器	0.5 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
細胞増殖抑制 測定法	10%ホルマリン水溶液で固定 0.1%クリスタル・バイオレットで染色 モノセレーターで計測		
備 考	—————		

### (4) 染色体異常試験結果 (別表2による)

## 7.結果の判定及び参考事項

### (1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと)		陽性		陰性	
判定の理由					
被験物質群では、短時間処理法、連続処理法のいずれの培養系列においても、切断、交換等の構造異常を有する細胞の出現頻度は0～1.0%、数的異常を有する細胞の出現頻度は0～0.5%であり、陰性対照群と比較して差はなかった。また、ギャップの出現数に関しても1用量につき0～2個であり、陰性対照群とほぼ同程度であった。					
一方、各陽性対照群では、それぞれ染色体の構造異常を有する細胞の顕著な増加が認められた。すなわち、構造異常の出現率はS9無添加および添加培養系列では各々19.5 および 40.0%であった。また、24 および 48 時間培養系列では、各々36.5 および 57.5%であった。数的異常の出現率については、いずれの培養系列も0～0.5%であった。					
以上の結果より、当該試験条件下におけるβ-アラニンの染色体異常誘発作用は陰性と判断された。結果の評価に統計学的手法は用いない。					
その他、試験の信頼性に影響を及ぼした要因はない。					
D <sub>20</sub> 値	構造異常	短時間処理法	- S9mix	- h 処理	_____ mg/mL
			+ S9mix	- h 処理	_____ mg/mL
		連続処理法	_____	- h 処理	_____ mg/mL
			_____	- h 処理	_____ mg/mL
	数的異常	短時間処理法	- S9mix	- h 処理	_____ mg/mL
			+ S9mix	- h 処理	_____ mg/mL
		連続処理法	_____	- h 処理	_____ mg/mL
			_____	- h 処理	_____ mg/mL

## (2) 参考事項

50%細胞増殖抑制濃度を求めるために0.001、0.004、0.011、0.033、0.099、0.297 および0.891mg/mLの濃度で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、50%細胞増殖抑制濃度は全ての培養系列について0.891mg/mL以上であった。このことから、染色体異常試験の最高用量を全ての培養系列について10mmol/Lである0.891mg/mLに設定し、以下公比2で0.446、0.223mg/mLのそれぞれ計3用量とした。

染色体異常試験の0.223、0.446 および0.891mg/mLで測定した細胞増殖率はS9無添加および添加培養系列の場合はそれぞれ99、92、90%および94、91、88%であり24 および48時間培養系列の場合はそれぞれ95、94、91%および99、99、94%であった。

染色体異常試験の結果、全培養系列において、構造異常あるいは数的異常（倍数体）を有する細胞の出現頻度は陰性対照群と比較して差は認められなかったことから、結果を陰性と判定した。結果が陰性であった場合には短時間処理法のS9添加培養系列について確認試験を実施しなければならないことから回復時間を18時間から24時間に延長した確認試験を実施した。その結果、染色体異常試験とほぼ同様な結果が得られ、被験物質による染色体異常誘発性は細胞周期の遅延に左右されないことが確認された。

各陽性対照群では、構造異常を有する細胞の出現頻度が顕著に増加し、陰性および陽性各対照群では、共にバックグランドデータ（添付資料1）の近似値であったことから、当該試験が適正な条件下で実施されたことが確認された。

## 8.その他

試験実施施設	名称	株式会社 実医研 榛名試験所
	所在地	
試験責任者	職氏名	
	経験年数	
試験期間		
試験番号		H-00354



別表1 染色体異常試験の結果(短時間処理法)

被験物質の名称: β-アラニン

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 0	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (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 (%)
6-18	-	陰性対照 (生理食塩液)	100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	2	0	0	0	0	2 ( 1.0 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	-	0.223	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1 ( 0.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	-	0.446	100	0	0	0	0	0	0	0	92	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	-	0.891	100	0	1	0	0	0	1	0	90	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1 ( 0.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	5	12	0	0	0	16	2		100	0	0	0
			100	7	14	0	3	0	23	2		100	0	0	0
			200	12	26	0	3	0	39 ( 19.5 )	4		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	陰性対照 (生理食塩液)	100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	1	0	2 ( 1.0 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	0.223	100	0	0	0	0	0	0	1	94	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	1		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	0.446	100	0	0	0	0	0	0	0	91	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	0.891	100	0	0	0	0	0	0	1	88	100	0	0	0
			100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	陽性対照 (B[a]P) 0.02	100	11	38	0	4	0	43	3		100	0	0	0
			100	12	27	1	5	0	37	4		100	0	0	0
			200	23	65	1	9	0	80 ( 40.0 )	7		200	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する。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入する。
3. 陰性、陽性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入する。

4. 各群のプレートごとのデーターを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。

陰性対照: 生理食塩液      陽性対照: Mitomycin C (MMC), Benzo [a] Pyrene (B[a]P)

PROJECT No. H-00354

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

別表2 染色体異常試験の結果(連続処理法)

被験物質の名称:  $\beta$ -アラニン

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 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度 %)			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	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	陰性対照 (生理食塩液)	100	1	0	0	0	0	1	1	100	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
		200	1	1	0	0	0	2 ( 1.0 )	1		200	0	0	0 ( 0.0 )
24	0.223	100	0	0	0	0	0	0	1	95	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	2		200	0	0	0 ( 0.0 )
24	0.446	100	1	0	0	0	0	1	0	94	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	0		200	1	0	1 ( 0.5 )
24	0.891	100	0	1	0	0	0	1	0	91	100	0	0	0
		100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
		200	0	1	0	1	0	2 ( 1.0 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
24	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	13	29	0	4	0	41	1		100	0	0	0
		100	10	22	1	3	0	33	1		100	1	0	1
		200	23	51	1	7	0	74 ( 37.0 )	2		200	1	0	1 ( 0.5 )
48	陰性対照 (生理食塩液)	100	0	0	0	0	0	0	1	100	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	1		100	1	0	1
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	2		200	1	0	1 ( 0.5 )
48	0.223	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	1		200	0	0	0 ( 0.0 )
48	0.446	100	0	0	0	0	0	0	1	99	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
		200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
48	0.891	100	0	0	0	0	0	0	0	94	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	1		200	0	0	0 ( 0.0 )
48	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	24	44	2	6	2	60	3		100	1	0	1
		100	24	42	0	4	1	55	4		100	0	0	0
		200	48	86	2	10	3	115 ( 57.5 )	7		200	1	0	1 ( 0.5 )

## 〔備考〕

1. 被験物質の用量は、低い方から順に記入する。
2. 陰性、陽性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入する。

3. 各群のプレートごとのデータを一及び二行目に記入し、その合計を三行目に記入する。

陰性対照：生理食塩液      陽性対照：Mitomycin C (MMC)

PROJECT No. H-00354

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

別表3 染色体異常試験の結果(短時間処理法, 確認試験)

被験物質の名称:  $\beta$ -アラニン

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 0	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度 %)			
			観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	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 (%)
6-18	+	陰性対照 (生理食塩液)	100	0	0	0	0	0	0	1	100	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	0.223	100	1	0	0	0	0	1	0	99	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	0.446	100	0	0	0	0	0	0	1	89	100	0	0	0
			100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	0.891	100	0	0	0	0	0	0	0	86	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	陽性対照 (B[a]P) 0.02	100	18	34	0	5	0	47	6		100	1	0	1
			100	12	27	1	4	0	39	7		100	0	0	0
			200	30	61	1	9	0	86 ( 43.0 )	13		200	1	0	1 ( 0.5 )

## [備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入する。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入する。
3. 陰性、陽性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入する。

4. 各群のプレートごとのデータを一及び二行目に記入し、その合計を三行目に記入する。

陰性対照：生理食塩液      陽性対照：Mitomycin C (MMC)

PROJECT No. H-00354

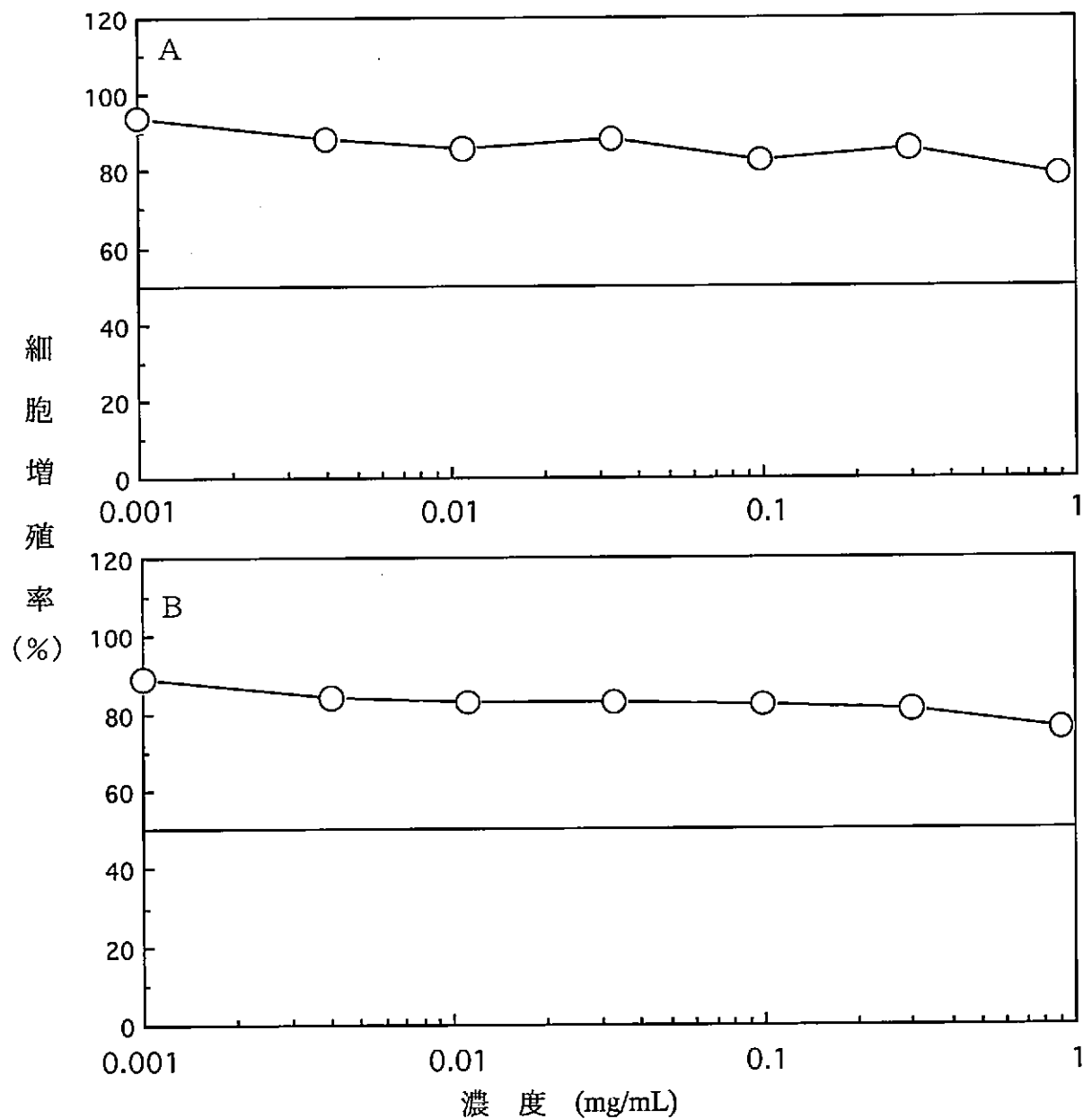


図 1-1.  $\beta$ -アラニンがCHL/IU細胞の増殖に及ぼす影響 (短時間処理法)

A : 代謝活性化によらない場合 (-S9)  
 B : 代謝活性化による場合 (+S9)

PROJECT No. H-00354

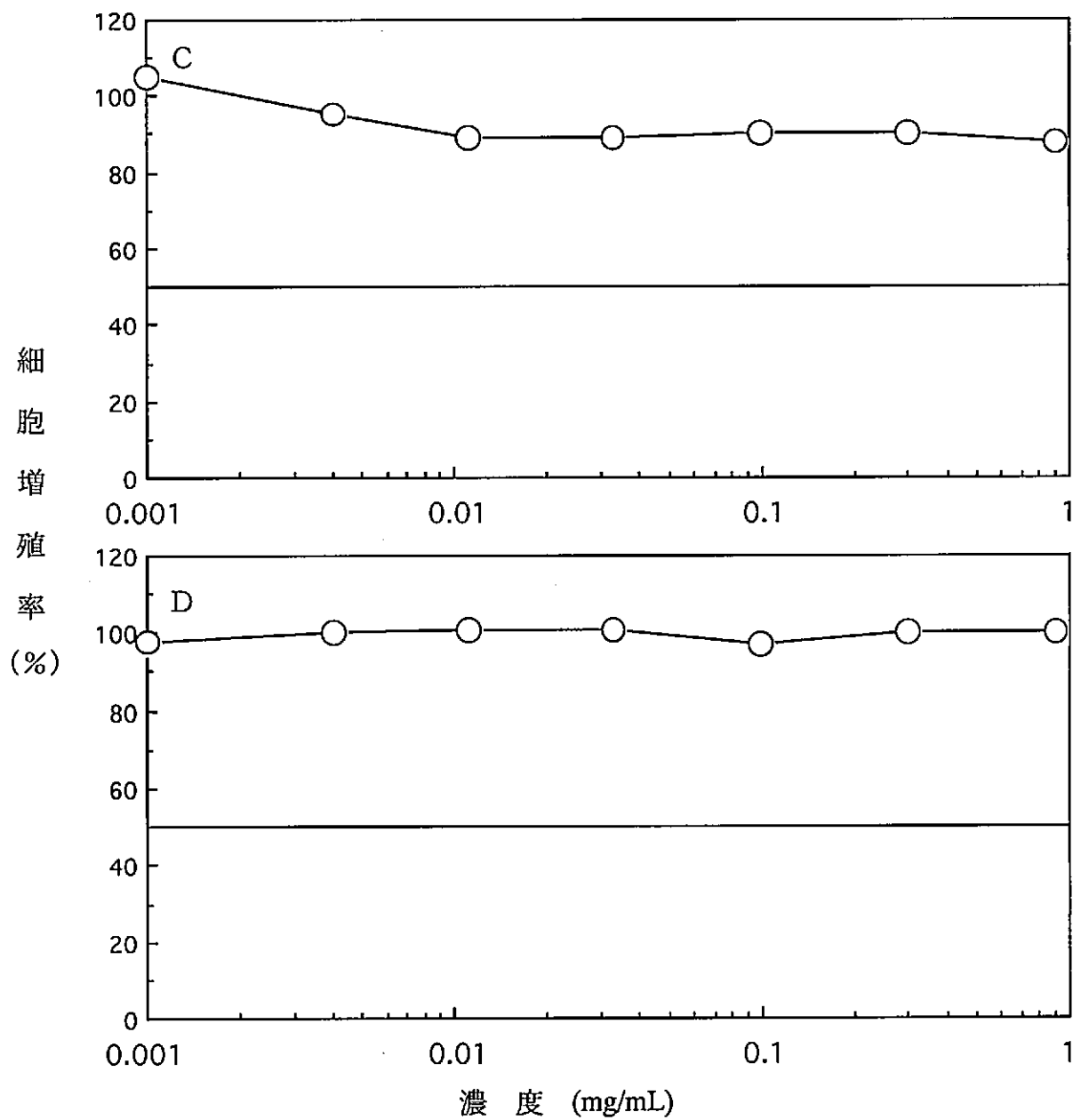


図 1-2.  $\beta$ -アラニンがCHL/IU細胞の増殖に及ぼす影響 (連続処理法)

C : 24 h 処理

D : 48 h 処理

PROJECT No. H-00354

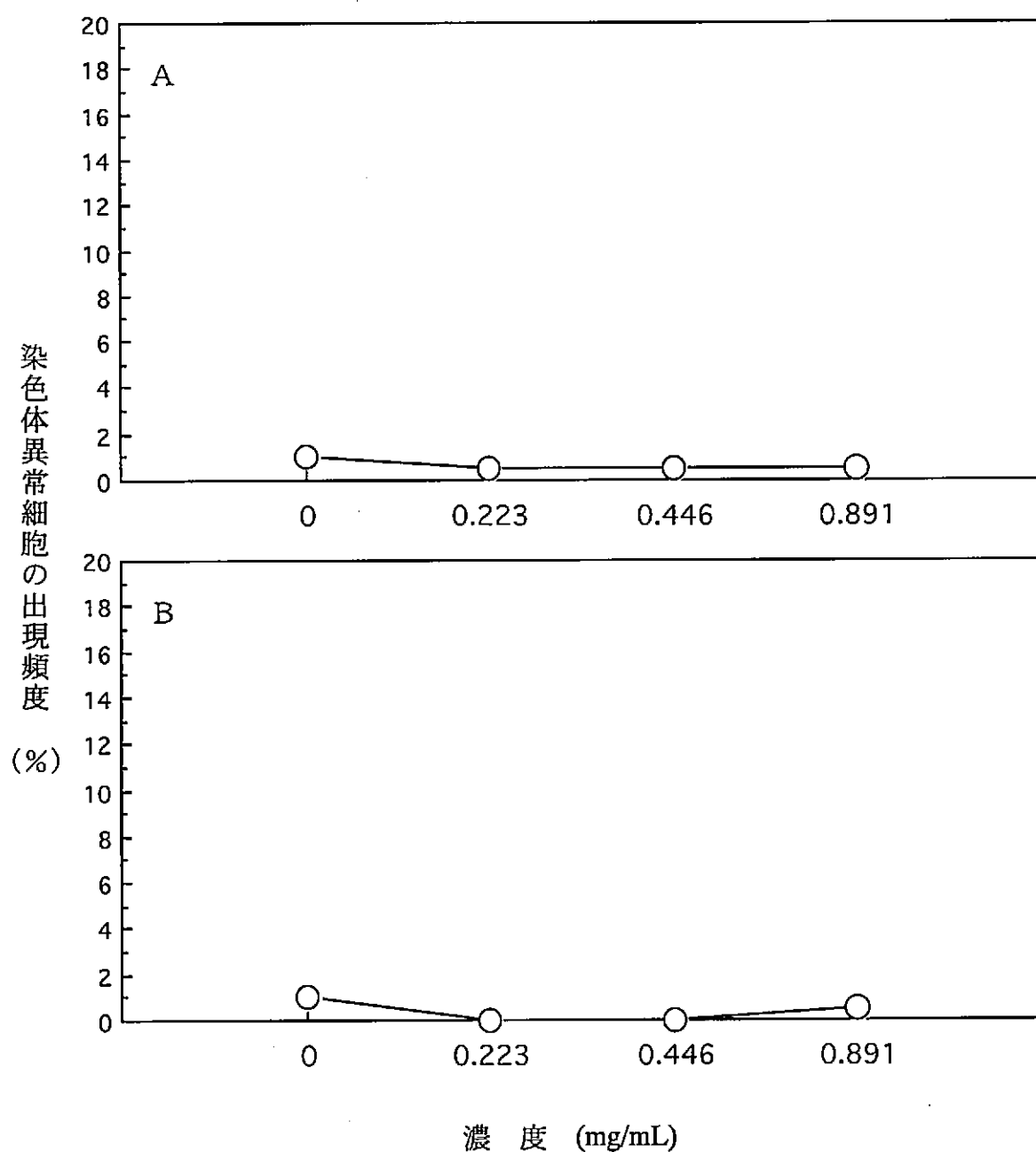


図 2-1.  $\beta$ -アラニンの染色体異常誘発性、用量-反応曲線  
(短時間処理法, 染色体異常試験)

A: 代謝活性化によらない場合 (-S9)

B: 代謝活性化による場合 (+S9)

PROJECT No. H-00354

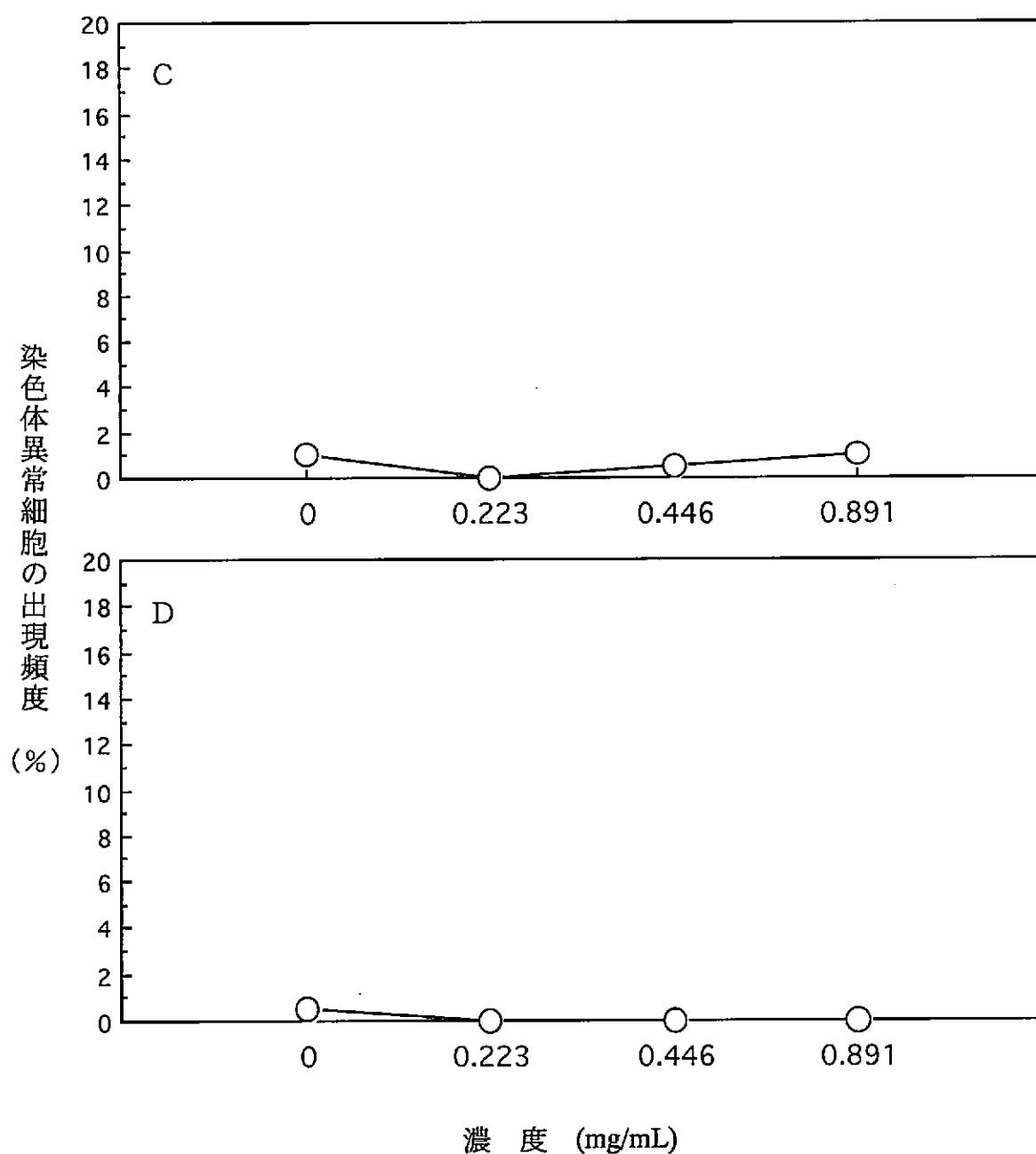


図 2-2.  $\beta$ -アラニンの染色体異常誘発性、用量-反応曲線  
(連続処理法, 染色体異常試験)

C : 24 h 処理  
D : 48 h 処理

PROJECT No. H-00354

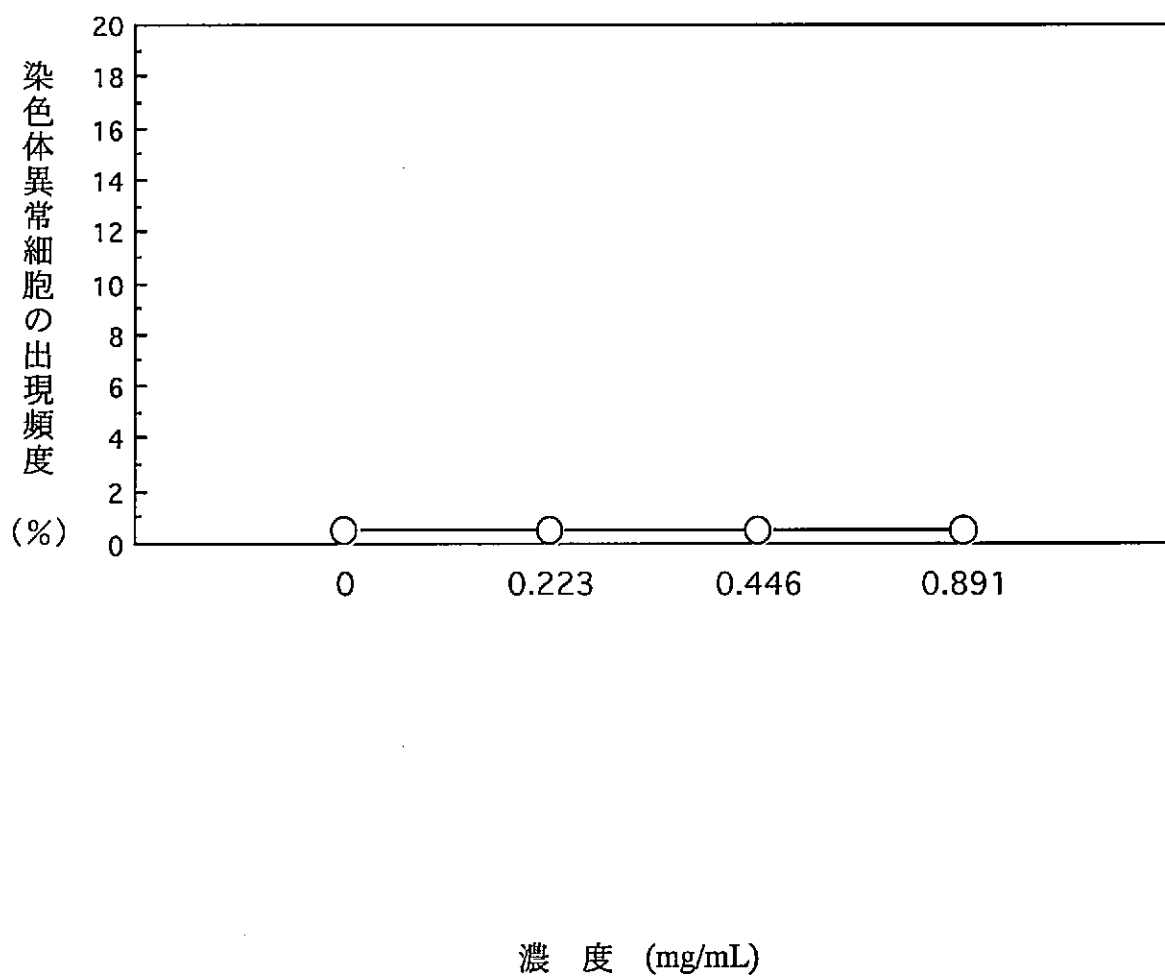


図 3.  $\beta$ -アラニンの染色体異常誘発性、用量-反応曲線  
(短時間処理法、確認試験)

代謝活性化による場合 (+ S 9)

PROJECT No. H-00354



## 添付資料 1

背景データ (Mean±S.D.)

S9mix	処理時間	処 理	観察細胞数	倍数体	構造異常細胞の出現頻度 (%)							合 計
					ギャップ g	染色体型 ctb	染色体型 cte	染色体型 csb	染色体型 cse	その他	- g	+ g
-	6-18	陰性対照										
		Saline	1400	0.1 ± 0.36	0.4 ± 0.63	0.4 ± 0.50	0.2 ± 0.43	0.1 ± 0.27	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.6 ± 0.50	1.0 ± 0.39
		陽性対照										
		MMC	3600	0.3 ± 0.44	1.7 ± 1.10	5.8 ± 1.94	14.2 ± 2.97	0.2 ± 0.40	1.6 ± 0.93	0.0 ± 0.00	19.5 ± 2.80	20.7 ± 2.94
+	6-18	陰性対照										
		Saline	1400	0.1 ± 0.27	0.3 ± 0.47	0.3 ± 0.47	0.1 ± 0.27	0.1 ± 0.36	0.1 ± 0.27	0.0 ± 0.00	0.6 ± 0.51	0.9 ± 0.36
		陽性対照										
		B [a] P	3600	0.3 ± 0.50	3.4 ± 1.98	13.7 ± 2.88	32.4 ± 4.98	0.5 ± 0.51	4.0 ± 1.38	0.0 ± 0.00	43.6 ± 3.67	44.9 ± 3.52
-	24	陰性対照										
		Saline	1400	0.3 ± 0.47	0.4 ± 0.50	0.4 ± 0.50	0.1 ± 0.36	0.1 ± 0.27	0.1 ± 0.27	0.0 ± 0.00	0.6 ± 0.50	1.0 ± 0.39
		陽性対照										
		MMC	3000	0.7 ± 0.48	4.2 ± 1.68	15.1 ± 3.35	30.7 ± 3.85	0.3 ± 0.47	3.1 ± 1.06	0.1 ± 0.25	42.1 ± 3.28	43.3 ± 3.25
-	48	陰性対照										
		Saline	1400	0.4 ± 0.50	0.4 ± 0.65	0.2 ± 0.43	0.1 ± 0.27	0.1 ± 0.27	0.1 ± 0.27	0.0 ± 0.00	0.4 ± 0.51	0.9 ± 0.53
		陽性対照										
		MMC	3200	0.9 ± 0.30	4.8 ± 1.93	26.5 ± 3.53	47.9 ± 4.75	0.8 ± 0.45	4.0 ± 1.08	1.5 ± 0.67	62.8 ± 3.97	63.2 ± 3.76

MMC : Mitomycin C, B [a]P : Benzo [a] pyrene

収集期間 : 1999年8月1日～2001年1月31日

PROJECT No. H-00354

### GENETIC TOXICITY IN VITRO (NON-BACTERIAL IN VITRO TEST)

TEST SUBSTANCE

- **Remarks (source):**

Stored at 4°C in dark until use. Stability during the period of use was confirmed by HPLC.

## METHOD

- Method/guideline: OECD #473
- Type of test: Chromosomal aberration test
- GLP: Yes
- Year (study performed): December 6, 2000 ~ February 16, 2001
- Species/Strain: CHL/TU
- Metabolic activation:

**Induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone.**

- S9: 0, 0.223, 0.446, 0.891  $\mu$ g/mL (short term treatment)  
 +S9: 0, 0.223, 0.446, 0.891  $\mu$ g/mL (short term treatment)  
 24 hr: 0, 0.223, 0.446, 0.891  $\mu$ g/mL (continuous treatment)  
 48 hr: 0, 0.223, 0.446, 0.891  $\mu$ g/mL (continuous treatment)

- **Statistical methods:** No statistical method was followed.

## Remarks field for Test Conditions

## Procedure

In the case of confirmation test, the cells were treated for 6 hrs with S9 and cultivated with fresh medium for 24 hrs

**Frequency of dosing: One time**

Plates/dose: 2

**Negative control:**

The solvent, physiological saline was used

**Positive controls:**

Mitomycin C was used in continuous treatment for 24 hrs and 48 hrs and also in short term treatment without S9.

B(a)P was used in short term treatment with S9.

**Description of confirmation study:**

A confirmation test was carried out in short-term treatment with S9 with the recovery period of 24 hr instead of 18 hr to assess whether the test substance in the presence of S9 increased the chromosomally aberrant cells by changing the cell proliferation time.

Number of metaphases analyzed: 100 metaphases/plate or specimen

**Criteria for evaluating results:**

The test substance was judged positive (+) when the incidence of cells with chromosomally aberration increased dose-dependently as compared with those of concurrent negative controls or a reproducible increase in the incidence of cells with chromosomally aberration at one or more concentrations and the others were judged negative (-).

**RESULTS****• Cytotoxic concentration:**

Toxicity was not noted up to 0.891  $\mu$ g/mL (10 mmol/L) in short term treatment without S9 and with S9 and also in continuous treatment without S9 for 24 hrs and 48 hrs.

**• Genotoxic effects:**

- Short term treatment without metabolic activation (-S9)
- Short term treatment with metabolic activation (+S9)
- Continuous treatment for 24 hrs and 48 hrs

**• Statistical analysis:**

Statistical analysis was not done.

**CONCLUSION**

Chromosomal aberration in CHL/IU cells is negative either in short term treatment without metabolic activation (-S9) and with metabolic activation (+S9) or in continuous treatment for 24 hrs and 48 hrs.

**DATA QUALITY****• Reliabilities:** Valid without restriction

Remarks field for Data Reliability

Well-conducted study, carried out by Nippon Experimental Medical Research Institute Co. Ltd.,  
Gunma, Japan.

#### REFERENCES

None

#### GENERAL REMARKS

On the basis of cell growth inhibition (cytotoxicity) test the test substance is considered as relatively non-cytotoxic. So, three analyzable doses were selected and tested considering the dose of  $0.891 \mu\text{g/mL}$  ( $10 \text{ mmol/L}$ ) as highest for chromosomal aberration test.