ノニルフェノールの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：2472（ 115－037 ）

財　団　法　人
食　品　農　医　薬　品　安　全　性　評　価　セ　ン　タ　ー

目　　次

1. 要　　約　1

9. 被験物質　4
10. 試験材料および方法　6
11. 試験結果　12
12. 考察および結論　14
13. 参考とした資料　15

Figures, Tables および Appendices

Figure 1　Dose-survival curves of nonylphenol [direct method]　17
Figure 2　Dose-survival curves of nonylphenol [activation method]　18
Figure 3　Incidence of structural aberrations induced by nonylphenol [direct method]　19
Figure 4　Incidence of structural aberrations induced by nonylphenol [activation method]　20

Table 1　Results of growth inhibition test on nonylphenol [direct method]　21
Table 2　Results of growth inhibition test on nonylphenol [activation method]　22
Table 3　Chromosome aberration test on CHL cells treated with nonylphenol [direct method : 24 hrs]　23
Table 4　Chromosome aberration test on CHL cells treated with nonylphenol [direct method : 48 hrs]　24
Table 5　Chromosome aberration test on CHL cells treated with nonylphenol [activation method : +S9]　25
Table 6　Chromosome aberration test on CHL cells treated with nonylphenol [activation method : -S9]　26

1．要　　約：

本試験条件下において、ノニルフェノールには、染色体異常を誘起する作用がないものと判断した。

すなわち、ノニルフェノールの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株(CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。
あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に、試験用量を設定した。直接法24時間処理で 6.25、12.5、25.0 および 50.0 μg/ml、同48時間処理で 3.13、6.25、12.5 および 25.0 μg/ml、代謝活性化法+S9処理ならびに同-S9処理で 7.50、15.0、30.0 および 60.0 μg/ml のそれぞれ４用量について顕微鏡観察を実施した。
その結果、直接法および代謝活性化法のいずれにおいても明確な染色体異常の誘発は認められなかった。
また、直接法の陽性対照物質マイトマイシンＣ（MMC）および代謝活性化法の陽性対照物質シクロホスファミド（CP）は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。

9．被　験　物　質：

1) 被験物質名　　ノニルフェノール（nonylphenol）

2) ロット番号

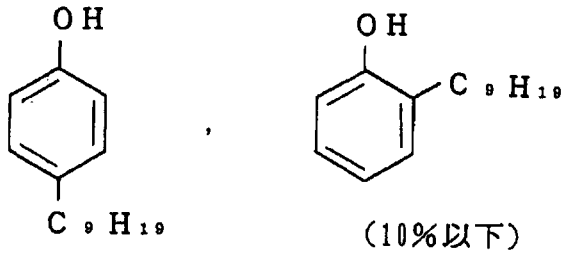
3) 純　　度　　99.0％以上

4) 提　供　先

5) 保管条件　　強酸化剤から離しておく。
床面に沿って換気。
火気、熱源より遠ざける。
直射日光が当たらないように保管する。
防湿に留意する。
空気（酸素）との接触を極力避ける。
密栓して冷暗所に保管する。
消防法の危険物（第４類）に該当するもので次のものと同一場所に貯蔵しないこと。
a. 非危険物（指定可燃物の可燃性固体類又は可燃性液体類を除く）
b. 消防法の危険物（第２類の引火性固体を除く）

6) 化　学　名　　ノニルフェノール

7) 化学構造



8) 分　子　式　　$C_{15}H_{24}O$

9) 分　子　量　　220.35

10) CAS No.　　２５１５４－５２－３

11) 物質の状態　　刺激臭のある無色～黄色の粘調液体

12) 溶　解　性	水（20℃）　0.3 g/100 ml
13) 融　　点	２℃
14) 沸　　点	295℃（101.3 KPa）
15) 蒸　気　圧	＜0.01 KPa（20℃）
16) 取り扱い上の注意	裸火禁止 第４類の危険物は、炎、火花、若しくは高温体との接近または加熱を避けるとともに、みだりに蒸気を発生させないこと。 容器を転倒させ、落下させ、衝撃を加え、または引き摺る等の乱暴な取り扱いをしてはならない。 ホースを切り離す時は受皿で液を回収する。少量でも漏れた場合はウエスで拭き取る。 ドラムの場合は開封後速やかに使用し、ドラム内に残りのある時は取り扱いの都度、窒素シール後密栓する。 バルブ、栓その他から洩れのない事を確認する。
17) 被験物質保管および残余被験物質の処理	試験終了後、約 2 gを安評センターに保管し、残りは提供先の　　に返却した。

10. 試験材料および方法：

1) 試験細胞株

増殖速度、核型の安定性および既知変異原性物質に対する感受性、再現性等を考慮した結果、本染色体異常試験においてはチャイニーズ・ハムスターの肺から分離した線維芽細胞株（CHL細胞）を用いた。

上記の細胞株は昭和５９年１１月１５日に国立衛生試験所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；MERCK 社；独国、純度99.7％以上；Lot No. 027 I126178）を添加した後、液体窒素中に保存し、残りは３～５日ごとに継代した。

なお、染色体異常試験には継代数 32 の細胞を用いた。

2) 培養液の調製

Eagle-MEM 粉末培地（LIFE TECHNOLOGIES 社、米国：L-グルタミン含有；Lot No. 76P8541）１袋を約 800 ml の精製水で溶解した後、2.2 g の炭酸水素ナトリウム（関東化学株式会社、東京都中央区；Lot No. 604E1491）を加えた。１Ｎ塩酸を用いて pH を 7.2 に調整し、その後 1000 ml に定容した。メンブランフィルター（アクロキャップ™；0.2 μm：Gelman Sciences社、米国）を用いて加圧濾過除菌した後、あらかじめ非働化（56℃、30分）しておいた仔牛血清（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 39N4920）を最終濃度 10％になるよう加えた。冷暗所に調製後の培養液を保存した。

3) 培養条件

CO_2 インキュベーター（FORMA 社、米国あるいは三洋電機特機株式会社、大阪府守口市）を用い、CO_2 濃度５％、37℃の条件で細胞を培養した。

4) Ｓ９ｍｉｘ

キッコーマン株式会社（千葉県野田市）からＳ９ｍｉｘ（Lot No. CAM-317）を購入し、使用時まで超低温フリーザー（MDF-390AT；三洋電機特機株式会社）に－80℃で凍結保存した。製造後６カ月以内のＳ９ｍｉｘを使用した。

Ｓ９のロット番号、誘導物質および誘導方法等は、添付書類によると以下のとおりである。

a. ロット番号　ＲＡＡ－３１７
b. 製　造　日　平成６年１０月２７日
c. 使用動物　ラット：Sprague-Dawley 系
d. 性／週齢　雄／７週齢
e. 体　　重　188 ～ 212 g
f. 誘導物質　Phenobarbital (PB) & 5,6-Benzoflabone (BF)
g. 投　与　量　PB: 30 mg/kg １回（１日目）、 60 mg/kg ３回（２～４日目）
　および回数　BF: 80 mg／kg １回（３日目）
h. 投与方法　腹腔内投与
i. 蛋白含量　26.9 mg／ml

また、Ｓ９ｍｉｘの組成を以下に示した。

成　分	Ｓ９ｍｉｘ １ml中の量
Ｓ９	0.3 ml
$MgCl_2$	5 μmol
ＫＣｌ	33 μmol
Ｇ－６－Ｐ	5 μmol
ＮＡＤＰ	4 μmol
ＨＥＰＥＳ緩衝液	4 μmol
精製水	残 量

5) 被験物質溶液の調製
ＤＭＳＯ（MERCK 社；Lot No. K20471078 404）に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。

6) 対照試験
a. 溶媒対照
使用溶媒の ＤＭＳＯ（Lot No. K20471078 404）を容量比 0.5％添加して試験した。

b. 陽性対照（直接法の場合）
注射用蒸留水（株式会社　大塚製薬工場、徳島県鳴門市；Lot No. K4E87）５ mlに溶解したマイトマイシンＣ（MMC：協和醗酵工業株式会社、東京都千代田区；Lot No. 968ADD）を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：株式会社　大塚製薬工場、Lot No. K4A92）を用いて希釈した後、24時間処理で 0.05 μg/ml、48時間処理で 0.025 μg/ml の用量で試験した。

c. 陽性対照（代謝活性化法の場合）

注射用蒸留水（Lot No. K4E87）5 mlに溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社、大阪府大阪市；Lot No. 4016）を生理食塩液（Lot No. K4A92）を用いて希釈した後、12.5 μg/ml の用量で試験した。

7) 細胞増殖抑制試験

a. 直接法

細胞培養用マルチプレート（12ウエル：住友ベークライト株式会社、東京都千代田区）のウエルに24時間処理の場合、培養液を用いて 6.8×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 1 mlを、48時間処理の場合、3.4×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液1 mlをそれぞれ播種した。培養３日目に溶媒（溶媒対照群）あるいは被験物質溶液を 5 μl加え、さらに24あるいは48時間培養を続けた後に細胞生存率（溶媒対照に対する比）を求めた。

b. 代謝活性化法

培養液を用いて 6.8×10^3 細胞／mlに調製した細胞浮遊液１ml を各ウエルに播種した。培養３日目に +S9処理の場合、培養液 500 μlを除きＳ９ｍｉｘ 100 μl、溶媒あるいは被験物質溶液 3 μlを加え、-S9処理では培養液 400 μlを除き、次いで溶媒あるいは被験物質溶液 3 μlのみ加え（Ｓ９ｍｉｘは添加しない）６時間培養した。培養液を除去した後、生理食塩液を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 μlを加え、さらに18時間培養を続けた後に細胞生存率を求めた。

c. 試験用量

細胞増殖抑制試験における試験用量を下表に示した。

各試験それぞれ７～９用量（公比 5/3）を設定した。あらかじめ予備的な試験を実施した結果を基に本用量を設定した。

試　験	用量数	試験用量（μg/ml）
直接法24時間処理	7	5.04 ～ 108
直接法48時間処理	7	5.04 ～ 108
代謝活性化法+S9処理	9	5.04 ～ 300
代謝活性化法-S9処理	9	5.04 ～ 300

8) 50%細胞増殖抑制濃度の算出

7) で処理を行った各プレートから培養液を除き、生理食塩液を用いて細胞を1回洗浄した。組織固定用10%中性緩衝ホルマリン液（和光純薬工業株式会社、大阪府大阪市；LotNo. E1014）を加えて約10分間細胞を固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社、東京都中央区；Lot No. 112G0031）水溶液で10分間染色した。各プレートを水洗した後、十分乾燥させた。

各ウエルに適量の色素溶出液（30%エタノール、1%酢酸水溶液）を加え、5分間程度放置した後、分光光度計（UV-201；株式会社　日立製作所、東京都千代田区）を用いて 580 nm での吸光度を測定した。各ウエルの吸光度から固定された細胞の色素量を溶媒対照の値に対する比（細胞生存率）として算出し、プロビット法あるいは対数確率紙を用いて50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

なお、算出には 5.04～108 の7点（直接法24時間処理）、14.0～38.9 の3点（同48時間処理）、5.04～300 の9点 （代謝活性化法+S9処理）および 5.04～180 の8点（同-S9処理）を用いた。

9) 染色体異常試験

a. 直接法

直径 60 mm のプレート（住友ベークライト株式会社）に24時間処理の場合、培養液を用いて 8×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml（4×10^4 細胞）を、48時間処理の場合、同様に 4×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml（2×10^4 細胞）を播種した。培養3日目に溶媒または被験物質溶液 25 μlあるいは陽性対照物質溶液 500 μlを加え、24および48時間後に染色体標本を作製した。

b. 代謝活性化法

培養液を用いて 8×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液5 ml（4×10^4 細胞）をプレートに播種した。培養3日目に培養液 2.5 ml を除きＳ９ｍｉｘ 500 μl、溶媒または被験物質溶液 15 μlあるいは陽性対照物質溶液 300 μlを加え6時間培養した。また対照として、溶媒または被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液のみを加えた群（培養液 2 ml を除去するのみでＳ９ｍｉｘは添加しない）についても同様に培養した。培養液を除去した後、生理食塩液を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 ml を加え、さらに18時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

c. 試験用量

本試験における試験用量を下表に示した。

細胞増殖抑制試験結果を基に、以下の５用量（公比２）を設定し、処理を行った。

試　験	試験用量（μg/ml）				
直接法24時間処理	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
直接法48時間処理	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
代謝活性化法+S9処理	7.50	15.0	30.0	60.0	120
代謝活性化法-S9処理	3.75	7.50	15.0	30.0	60.0

・下線を付した用量群について顕微鏡観察を実施した。

10) 標本の作製

染色体標本作製の２時間前に、最終濃度で 0.2 μg/ml、すなわち培養液１ ml当たり 20 μl のコルセミド溶液（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 13P6247）を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。培養液の全量を遠心管に移した後、0.25%トリプシン溶液（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 16K8440）を用いてプレートより細胞を剥離させ、遠心管内の培養液に加えた。遠心分離（1000 r.p.m.、５分間）により上清をのぞき、回収した細胞にあらかじめ37℃に保温しておいた 75 mM 塩化カリウム水溶液をおよそ５ ml加え、37℃で15～20分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、４℃に冷却した固定液（メタノール３容：酢酸１容）で細胞を固定した。固定液を３回新鮮なものに交換した後、細胞に固定液を適量加えて細胞浮遊液とし、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に１～２滴ずつ滴下した。スライド標本を十分乾燥させ、1/100 Mナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.2：MERCK社；Lot No. 322 S 601868）を用いて希釈したギムザ溶液で12分程度染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

11) 染色体の観察

各プレートあたり100個の分裂中期像を顕微鏡下（×600 程度）で観察し、染色体の形態的変化、すなわちギャップ（gap）、染色分体切断（ctb）、染色体切断（csb）、染色分体交換（cte）、染色体交換（cse） およびその他（oth）の構造異常に分類した。ただし、ギャップはその不連続部分（非染色性部位）が明確であり、当該染色体の分体幅と同程度以上、かつ本来の位置からずれていない場合にのみ計数した。

構造異常の観察と同時に、倍数性細胞の出現数についても記録した。

また、正常細胞（正常核型）とともに代表的な異常細胞について顕微鏡写真を撮影添付した。すべての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

12) プレート（ウエル）数および識別

細胞増殖抑制試験で用量当たり２ウエル、染色体異常試験で用量当り２枚のプレートを使用した。

油性ペンで番号等を明記することにより、各プレートを識別した。

13) 結果の解析

構造異常のギャップのみ保有する細胞を異常細胞に含めた場合（+gap）と、含めない場合（-gap）とに区別して出現頻度を算出し、最終評価に際しては +gap での出現頻度を基に判定した。また、同一細胞に２種以上の異常型が出現した場合、それぞれの型の出現数を１個と記録した。

各試験群の構造異常を有する細胞ならびに倍数性細胞の出現頻度を、下記に示す基準を用いて判断し、さらに再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

５％未満 ---------- 陰　性（－）
５％以上～10％未満 ---- 疑陽性（±）
10％以上 ---------- 陽　性（＋）

11. 試　験　結　果：

1) 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験結果を Figure 1、2 および Table 1、2 に示した。
プロビット法あるいは対数確率紙を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は以下のとおりであった。

直接法24時間処理	23.2 μg／ml
直接法48時間処理	25.9 μg／ml
代謝活性化法+S9処理	31.8 μg／ml
代謝活性化法-S9処理	29.3 μg／ml

いずれの試験系においても 64.8 μg／ml以上の用量で被験物質の析出が生じたが、固定あるいは染色過程で取り除かれた。
以上の結果を基に染色体異常試験の試験用量を設定した。直接法24時間処理で6.25～50.0μg／ml、同48時間処理で 3.13～25.0 μg／ml、代謝活性化法+S9処理で 7.50～60.0μg／ml、同-S9処理で 7.50～60.0 μg／ml のそれぞれ４用量について顕微鏡観察を実施した。

2) 染色体異常試験

a. 直接法24時間処理

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 3 および Table 3 に、各プレートの分析結果を Appendix 1 に示した。
溶媒対照における染色体構造異常を有する細胞の出現頻度は、ギャップのみ保有の細胞を含めた場合（+gap）、含めない場合（-gap）いずれも 0.5%であり、倍数性細胞の出現頻度については 0.0%であった。
ノニルフェノールを 6.25、12.5 および 25.0 μg/mlで処理した場合の染色体構造異常出現頻度は、+gapで 1.0、0.0 および 2.5%、-gapでは 0.5、0.0 および 2.0%であった。倍数性細胞の出現頻度は各群それぞれ 0.0、0.0 および 0.5%であった。
なお、最高用量の 50.0 μg/mlでは被験物質ノニルフェノールの影響により生存細胞が僅かしか観察されず、25.0 μg／ml処理においても分裂中期像が減少していた。
一方、陽性対照物質（MMC）で処理した細胞は、ギャップ（gap）、染色分体切断（ctb）あるいは染色分体交換（cte）などの異常が多数観察され、その出現頻度は+gap で 65.5%と顕著な増加を示した。

b. 直接法48時間処理

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 3 および Table 4 に、各プレートの分析結果をAppendix 2に示した。

溶媒対照での構造異常出現頻度は +gap および -gap いずれも 0.0%であり、倍数性細胞の出現頻度についても 0.0%であった。

ノニルフェノール処理群での構造異常出現頻度は 3.13, 6.25 および 12.5 μg/ml処理でそれぞれ 0.5、2.5 および 0.5% (+gap) 、-gap でも同程度であった。倍数性細胞の出現頻度は各群 1.0%以下であった。

なお、最高用量の 25.0 μg/ml処理では毒性作用により分裂中期像がほとんど観察されなかった。

陽性対照では構造異常細胞が +gap で 60.0%出現した。

c. 代謝活性化法（＋Ｓ９処理）

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 4 および Table 5 に、各プレートの分析結果を Appendix 3に示した。

溶媒対照での構造異常出現頻度は、+gap、-gap いずれも 0.0%、倍数性細胞の出現頻度については 0.5%であった。

ノニルフェノールを 7.50、15.0、30.0 および 60.0 μg/mlで処理した場合の構造異常出現頻度は、+gap で 0.0、0.5、1.5 および 4.0%、-gap においてもほぼ同様の出現頻度であった。倍数性細胞については、各群 3.0%以下の出現頻度であった。

なお、最高用量の 60.0μg/ml 処理では分裂中期像が大きく減少していた。

また、代謝活性化を必要とする陽性対照物質 CP で処理した細胞では、多数の異常が出現し、+gapで 39.5%の細胞に構造異常が認められた。

d. 代謝活性化法（－Ｓ９処理）

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 4 および Table 6 に、各プレートの分析結果を Appendix 4に示した。

溶媒対照での構造異常出現頻度は +gapで 3.5%、-gapで 1.5%であり、倍数性細胞の出現頻度は 1.0 %であった。

ノニルフェノール処理群における構造異常出現頻度は 7.50、15.0 および 30.0 μg／ml 処理でそれぞれで 2.0、0.5 および 1.0% (+gap) 、-gap においても同程度であった。また、倍数性細胞はいずれの処理群においても 1.0%以下の出現であった。

なお、最高用量の 60.0 μg/ml処理群で細胞の生存はほとんど認められなかった。

一方、 CP で処理した群では代謝活性化が行われないため、染色体異常の明確な誘発は認められなかった。

直接法48時間処理を除く各試験系の最高用量において、被験物質溶液添加時、僅かに白濁が生じたが攪拌後消失した。

12. 考察および結論：

ノニルフェノールの変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、培養細胞(CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。
細胞増殖抑制試験結果を基に直接法ならびに代謝活性化法において、細胞の増殖が抑制される濃度まで検討した。その結果、直接法および代謝活性化法のいずれの試験群においても、溶媒対照群に比較して染色体異常の明確な誘発は認められなかった。
一方、溶媒対照群あるいは陽性対照群での染色体異常出現頻度はいずれも当センターの背景データの範囲内であり、本試験が有効であることを示していた。

以上の試験結果から、本試験条件下においてノニルフェノールの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

13. 参考とした資料：

・Ishidate, M., Jr., and Odashima, S. : Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* -A screening for chemical carcinogens. Mut. Res., 48 : 337～354, 1977.

・石館　基　：　培養細胞を用いる染色体異常の検出法、組織培養、 5 : 115～122, 1979.

・Evans, H. J. : Cytological methods of detecting chemical mutagens. In A. Hollander (Ed.), Chemical Mutagens, Vol. 4 : 1～25, Plenum, New York, 1976.

・Matsuoka, A., *et al*. : Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. Mut. Res., 66 : 277～290, 1979.

・石館　基　監修：　染色体異常試験データ集、リアライズ、東京、1983.

・Evans, H. J. and O' Riordan, M. L. : Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests, Mut. Res., 31 : 135～148, 1975.

・Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. Toxicol. Appl. Pharmacol., 22, 269～275, 1972.

Exp. No. 2472 (115-037)

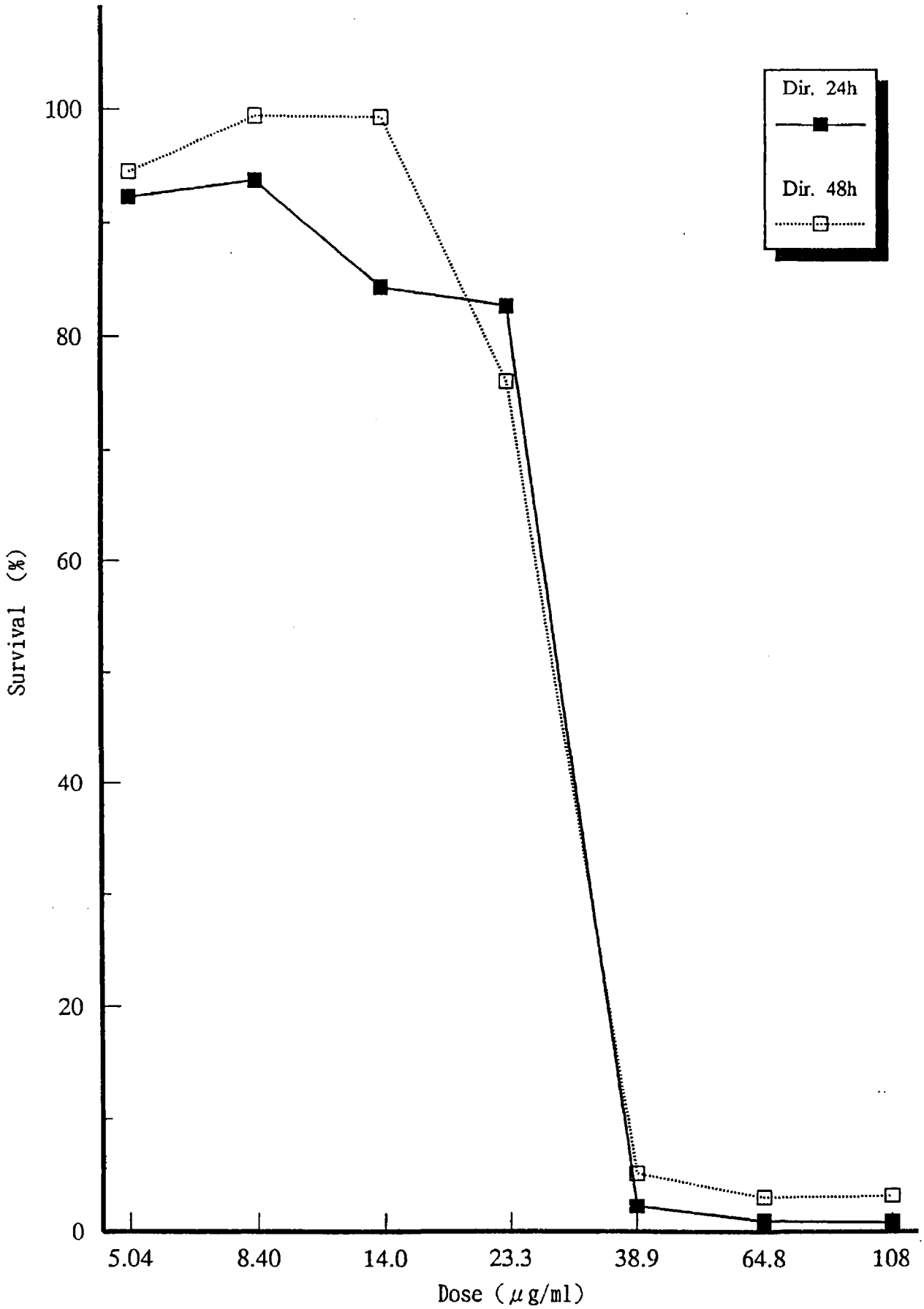


Figure 1. Dose-survival curves of nonylphenol [direct method]

Exp. No. 2472 (115-037)

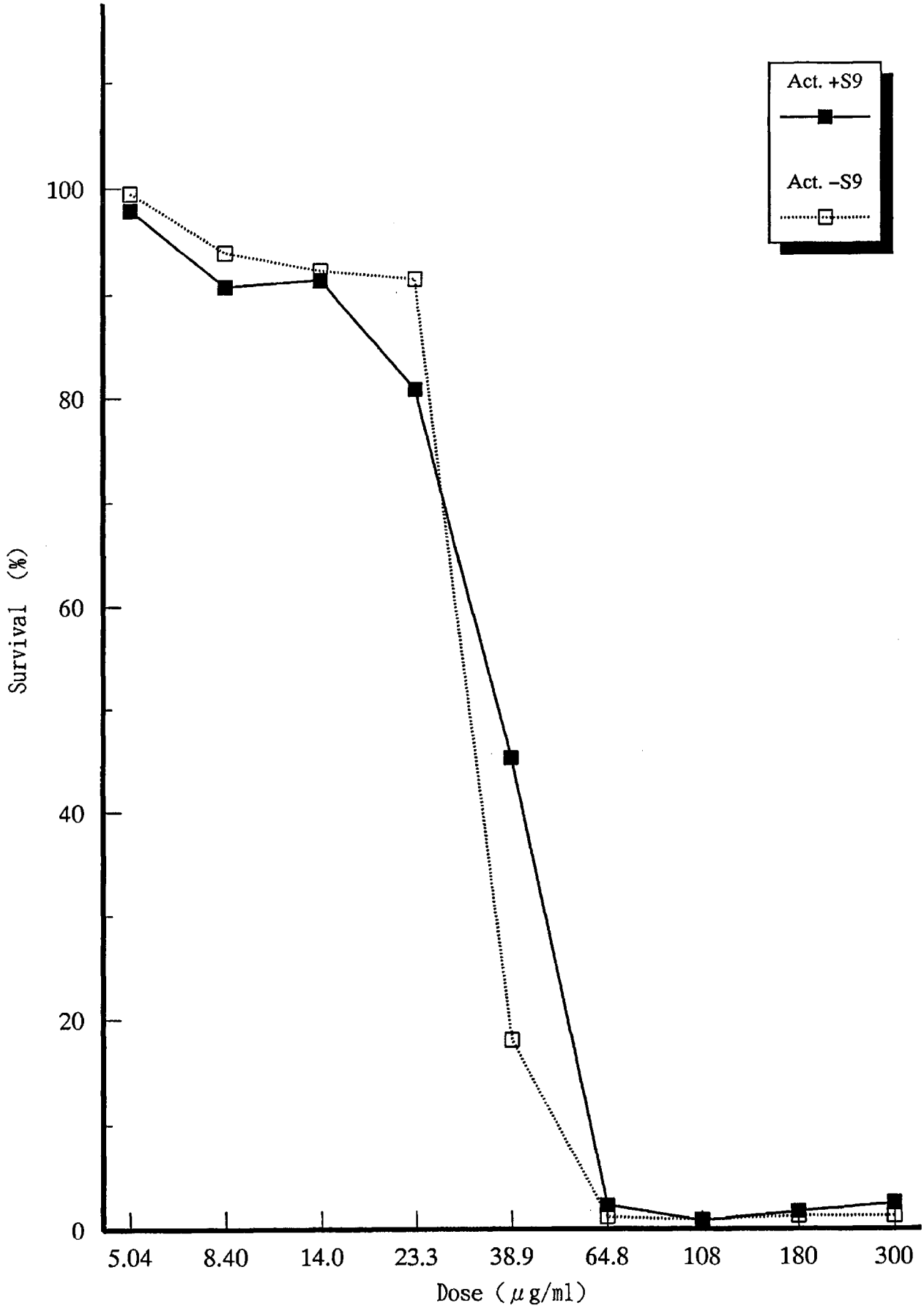


Figure 2. Dose-survival curves of nonylphenol [activation method]

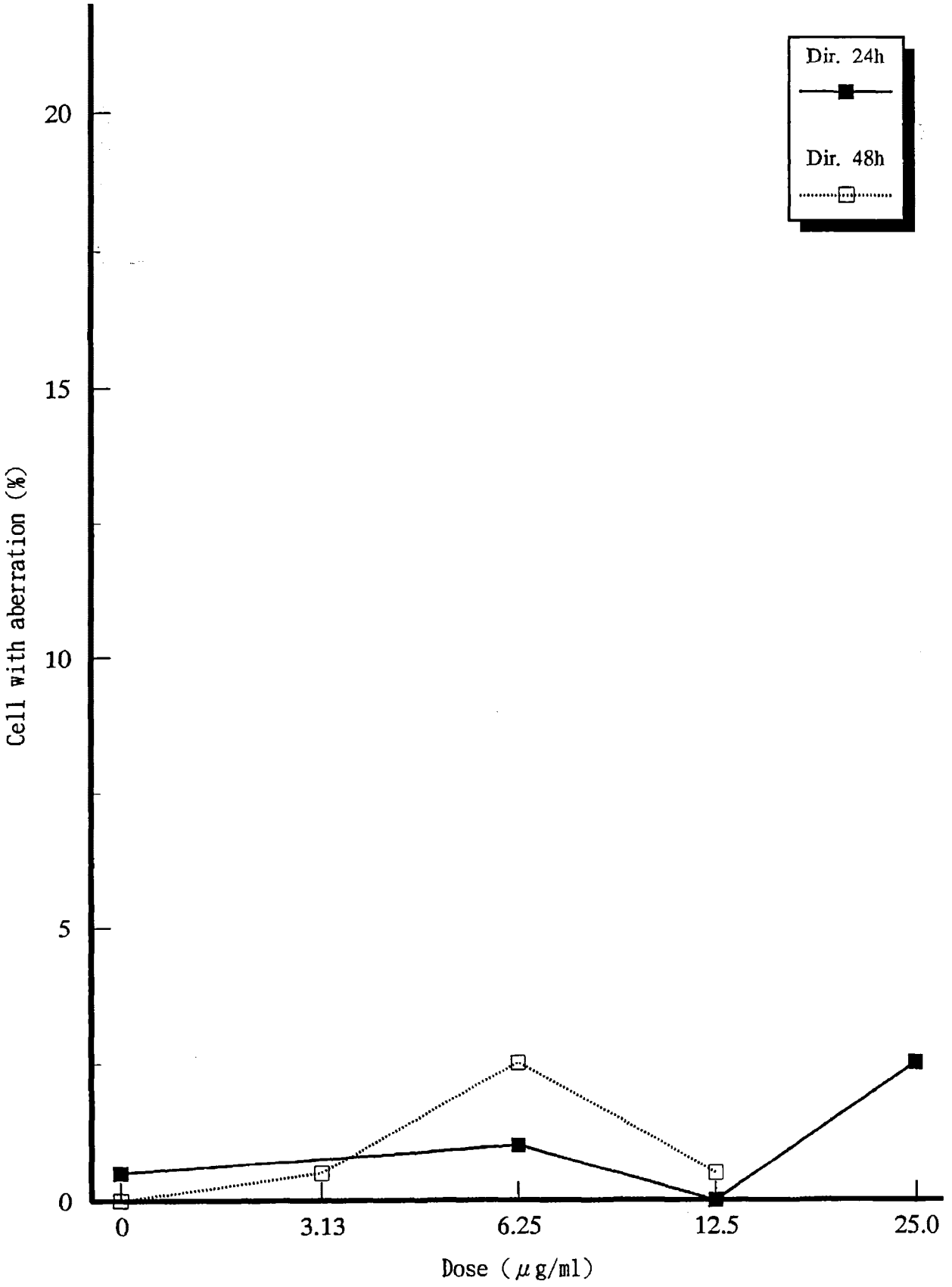


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by nonylphenol [direct method]

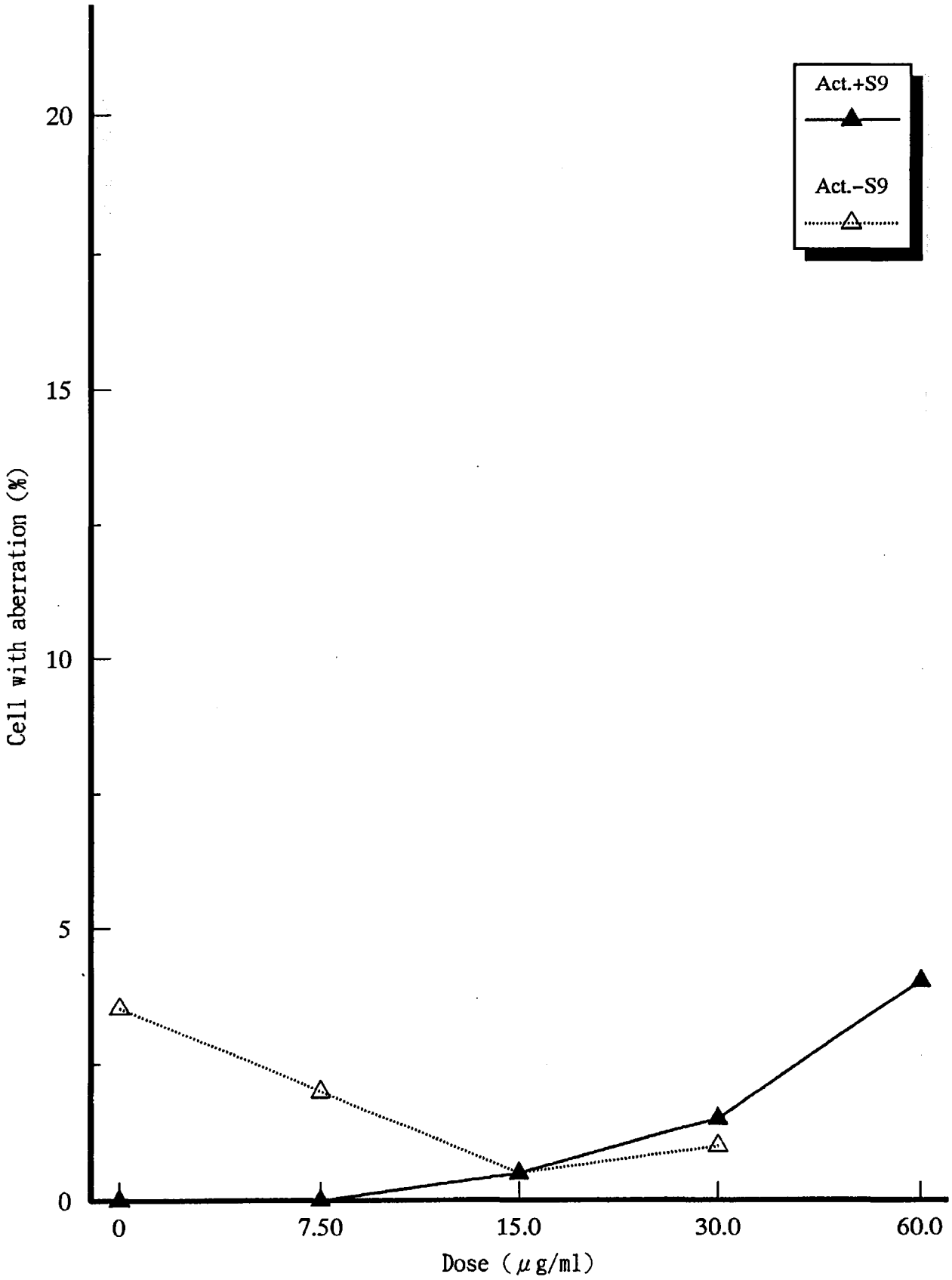


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by nonylphenol [activation method]

Table 1. Results of growth inhibition test on nonylphenol [direct method]

24 h treatment				48 h treatment			
Dose (μg/ml)	Survival (%)		[Mean]	Dose (μg/ml)	Survival (%)		[Mean]
0	100.0	100.0	[100.0]	0	100.0	100.0	[100.0]
5.04	92.5	92.1	[92.3]	5.04	93.1	95.9	[94.5]
8.40	104.8	82.9	[93.8]	8.40	96.0	103.0	[99.5]
14.0	88.7	80.2	[84.4]	14.0	98.8	100.0	[99.4]
23.3	91.7	73.7	[82.7]	23.3	70.7	81.6	[76.1]
38.9	2.5	1.9	[2.2]	38.9	5.5	4.8	[5.1]
64.8	0.4	1.5	[0.9]	64.8	2.7	3.4	[3.0]
108	0.7	0.8	[0.8]	108	2.9	3.3	[3.1]

50% Growth inhibition dose was as follows:

24 h treatment -------- 23.2 (μg/ml)

48 h treatment -------- 25.9 (μg/ml)

Table 2. Results of growth inhibition test on nonylphenol [activation method]

With S9 mix				Without S9 mix			
Dose (μg/ml)	Survival (%)		[Mean]	Dose (μg/ml)	Survival (%)		[Mean]
0	100.0	100.0	[100.0]	0	100.0	100.0	[100.0]
5.04	99.6	96.1	[97.9]	5.04	101.6	97.3	[99.5]
8.40	91.9	89.4	[90.7]	8.40	98.7	89.1	[93.9]
14.0	92.6	89.9	[91.3]	14.0	94.4	90.0	[92.2]
23.3	86.7	75.0	[80.8]	23.3	100.0	82.8	[91.4]
38.9	39.4	51.0	[45.2]	38.9	21.2	14.8	[18.0]
64.8	2.8	1.8	[2.3]	64.8	1.8	0.6	[1.2]
108	1.3	0.4	[0.8]	108	0.3	1.5	[0.9]
180	1.6	1.8	[1.7]	180	1.7	0.9	[1.3]
300	3.4	1.6	[2.5]	300	1.4	1.2	[1.3]

50% Growth inhibition dose was as follows:

With S9 mix ---------- 31.8 (μg/ml)

Without S9 mix -------- 29.3 (μg/ml)

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with nonylphenol [direct method : 24 hrs]

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge-ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO #	0	200	0	0	0	1	0	0	0.5 -	0.5 -	0.0 -	−
nonylphenol	6.25	200	1	0	0	1	0	0	1.0 -	0.5 -	0.0 -	−
	12.5	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	0.0 -	−
	25.0	200	1	1	0	1	2	0	2.5 -	2.0 -	0.5 -	−
	50.0	Toxic										
MMC ##	0.05	200	19	49	0	95	1	0	65.5 +	61.5 +	0.5 -	+

#: Solvent control ##: Positive control (mitomycin C)

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

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with nonylphenol [direct method : 48 hrs]

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge-ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO #	0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	0.0 -	—
nonylphenol	3.13	200	1	0	0	0	0	0	0.5 -	0.0 -	1.0 -	—
	6.25	200	0	0	1	5	0	0	2.5 -	2.5 -	0.0 -	—
	12.5	200	0	1	0	0	0	0	0.5 -	0.5 -	0.0 -	—
	25.0	Toxic										
MMC ##	0.025	200	14	47	0	91	6	0	60.0 +	59.0 +	1.0 -	+

#: Solvent control ##: Positive control (mitomycin C)

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

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with nonylphenol [activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge-ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO #	0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	0.5 -	−
nonylphenol	7.50	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	0.0 -	−
	15.0	200	0	1	0	0	0	0	0.5 -	0.5 -	0.0 -	−
	30.0	200	0	0	0	2	1	0	1.5 -	1.5 -	3.0 -	−
	60.0	200	2	1	0	6	0	0	4.0 -	3.5 -	0.0 -	−
CP ##	12.5	200	7	17	0	66	1	0	39.5 +	38.0 +	0.0 -	+

#: Solvent control ##: Positive control (cyclophosphamide)

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

Table 6. Chromosome aberration test on CHL cells treated with nonylphenol [activation method : -S9]

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge-ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO #	0	200	4	0	1	1	1	0	3.5 -	1.5 -	1.0 -	—
nonylphenol	7.50	200	1	0	0	2	1	0	2.0 -	1.5 -	1.0 -	—
	15.0	200	0	0	0	1	0	0	0.5 -	0.5 -	0.0 -	—
	30.0	200	1	0	0	1	0	0	1.0 -	0.5 -	0.5 -	—
	60.0	Toxic										
CP ##	12.5	200	0	1	0	0	0	0	0.5 -	0.5 -	0.0 -	—

#: Solvent control ##: Positive control (cyclophosphamide)

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