



最 終 報 告 書

2-ニトロ-p-クレゾールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1250

本資料は原本から複写したものに相違ありません。

株式会社 ボゾリサーチセンター

試験責任者： [REDACTED]

日付： 2007 年 9 月 28 日

2007 年 9 月 28 日

株式会社 ボゾリサーチセンター

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

試験責任者陳述書

試験番号 : M-1250

試験表題 : 2-ニトロ-p-クレゾールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施したものであります。

- ・「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」
(平成 15 年 11 月 21 日 : 薬食発第 1121003 号、平成 15.11.17 製局第 3 号、環保
企発第 031121004 号、平成 17 年 4 月 1 日最終改正)
- ・「OECD Principles of Good Laboratory Practice」
(OECD 理事会 : 1997 年 11 月 26 日)

2007 年 9 月 28 日

株式会社ボゾリサーチセンター

試験責任者

信頼性保証書

試験番号 : M-1250

試験表題 : 2-ニトロ-p-クレゾールのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

- ・「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」
(平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121003 号、製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 17 年 4 月 1 日最終改正)
- ・「OECD Principles of Good Laboratory Practice」
(OECD 理事会：1997 年 11 月 26 日)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2007 年 9 月 28 日

株式会社ボゾリサーチセンター

信頼性保証部門責任者

試験における調査

調 査 項 目	調査担当者	調 査 日	試験責任者及び 運営管理者への報告日
試験計画書		2006 年 8 月 1 日	2006 年 8 月 1 日
試験計画書変更書 (1)		2006 年 8 月 2 日	2006 年 8 月 3 日
試験計画書変更書 (2)		2006 年 8 月 15 日	2006 年 8 月 18 日
細胞播種		2006 年 8 月 18 日	2006 年 8 月 21 日
試験計画書変更書 (3)		2006 年 8 月 21 日	2006 年 8 月 22 日
調製・被験物質の保存		2006 年 8 月 21 日	2006 年 8 月 22 日
被験物質処理		2006 年 8 月 21 日	2006 年 8 月 22 日
固定		2006 年 8 月 22 日	2006 年 8 月 22 日
染色		2006 年 8 月 23 日	2006 年 8 月 24 日
染色体標本観察		2006 年 8 月 25 日	2006 年 8 月 25 日
試験計画書変更書 (4)		2006 年 8 月 29 日	2006 年 8 月 29 日

次頁に続く

続き

調 査 項 目	調査担当者	調 査 日	試験責任者及び 運営管理者への報告日
染色体標本観察（連続処理法）		2006 年 9 月 8 日	2006 年 9 月 12 日
試験計画書変更書（5）		2007 年 1 月 23 日	2007 年 1 月 24 日
生データ		2007 年 2 月 19 日	2007 年 2 月 20 日
改善確認		2007 年 2 月 28 日	2007 年 3 月 1 日
最終報告書草案・図・表		2007 年 2 月 20 日	
		2007 年 2 月 21 日	2007 年 2 月 22 日
生データ（被験物質関係）		2007 年 9 月 19 日	2007 年 9 月 19 日
最終報告書		2007 年 9 月 28 日	2007 年 9 月 28 日

プロセス調査

調 査 項 目	調査担当者	調 査 日	部門責任者及び 運営管理者への報告日
培養細胞の性状検査		2006 年 7 月 21 日	
		2006 年 7 月 24 日	
		2006 年 7 月 27 日	2006 年 7 月 28 日
陽性対照物質の管理		2006 年 11 月 30 日	2006 年 12 月 4 日

目 次

	頁
目 次	1
試験実施概要	5
試験従事者一覧	7
要 約	8
緒 言	10
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び溶媒	11
1) 被験物質	11
2) 溶媒	11
2. 被験液の調製	12
1) 調製方法	12
2) 調製頻度	13
3) 安定性	13
3. 対照物質	13
1) 陰性対照	13
2) 陽性対照	13
4. 使用細胞株	14
1) 細胞株	14
2) 細胞の選択理由	15
3) 培養条件	15
4) 細胞の性状検査	15
5. S9mix 及び培養液	15
1) S9 mix	15

	頁
2) 培養液	16
6. 試験方法	17
1) 識別方法	17
2) 用量の設定	18
3) 細胞増殖抑制試験	18
4) 染色体異常試験	19
5) 確認試験	21
6) 標本の観察	21
7) 染色体異常の分類	21
8) 判定基準	22
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	23
1) 短時間処理法	23
2) 連続処理法	23
2. 染色体異常試験	24
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	24
2) 構造異常	24
3) 数的異常	25
3. 確認試験	25
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	25
2) 構造異常	25
3) 数的異常	26
考察	27
参考文献	28
Attached Data 1 試験成績書	29
Attached Data 2 報告書	30
Attached Data 3 Background Data in the Testing Facility	31

Photographs of Metaphase Chromosomes

Photo. 1 A metaphase chromosome from the negative control group

[Confirmation test: +S9 mix]

Photo. 2 A metaphase chromosome from the 600 µg/mL group with chromatid exchanges

[Confirmation test: +S9 mix]

Figures and Tables

Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [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-cresol [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-cresol [Continuous treatment: 24 hr]

Fig. 1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [Continuous treatment: 48 hr]

Fig. 2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [Short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [Short-term treatment: -S9 mix]

Fig. 2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [Continuous treatment: 24 hr]

Fig. 2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [Continuous treatment: 48 hr]

Fig. 2-5 Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [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-cresol [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-cresol [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-cresol [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-cresol [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-cresol [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-cresol [Short-term treatment: -S9 mix]

Table 2-3 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [Continuous treatment: 24 hr]

Table 2-4 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [Continuous treatment: 48 hr]

Table 2-5 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [Short-term treatment: +S9 mix]

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

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

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [continuous treatment: 24 hr]

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [continuous treatment: 48 hr]

Table 3-5 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol [confirmation test]

試験実施概要

1. 試験計画書

試験番号 : M-1250

試験表題 : 2-ニトロ-p-クレゾールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

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。

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

4. 試験受託者 : 株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

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
運営管理者 XXXXXXXXXX

6. 被験物質

供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

製造者 : 東京化成工業株式会社

名称 : 2-ニトロ-p-クレゾール、2-nitro-p-cresol

受領日 : 2006 年 6 月 13 日

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室 冷蔵庫及び第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫

7. 試験日程

試験開始日 : 2006 年 8 月 1 日

実験開始日 : 2006 年 8 月 4 日

細胞増殖抑制試験 : 2006 年 8 月 4 日～2006 年 8 月 10 日

染色体異常試験

短時間処理法 : 2006 年 8 月 18 日～2006 年 8 月 26 日

連続処理法 : 2006 年 9 月 1 日～2006 年 9 月 13 日

確認試験

短時間処理法 : 2006 年 9 月 1 日～2006 年 9 月 8 日

実験終了日 : 2006 年 9 月 8 日

試験終了日 : 2007 年 9 月 28 日

8. 試験責任者 : 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所 研究部



9. 試験担当者

試験主担当者 :



試験担当者 :

10. 試験の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

11. 資料保存

試験計画書（試験計画書変更書を含む）原本、記録文書、生データ、染色体標本及び報告書類（最終報告書は原本）は株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

12. 試験責任者の署名又は記名・なつ印

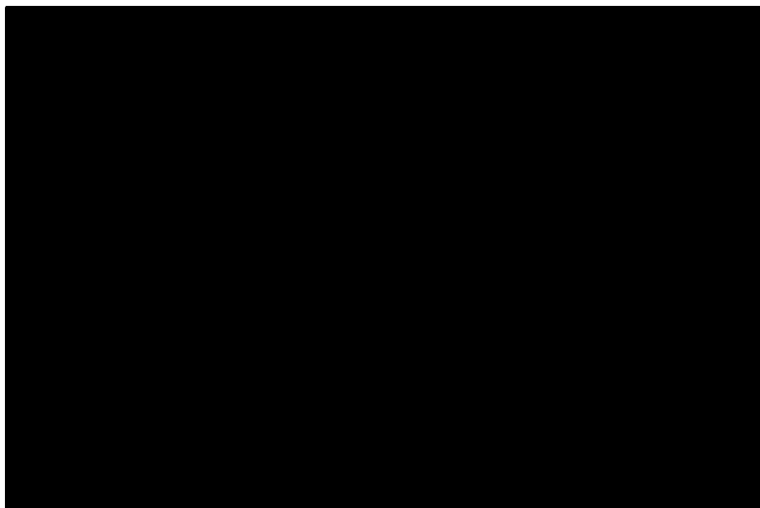


: 2007 年 9 月 28 日



試験従事者一覧

被験液の調製 :
細胞の播種 :
被験物質の処理 :
細胞増殖抑制率測定用
標本の作製 :
細胞増殖抑制率測定 :
染色体観察用標本の作製 :
染色体標本のコード化 :
染色体標本観察 :



要 約

2-ニトロ-p-クレゾール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、毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 1600 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、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及び非代謝活性化では 200 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 400 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 200 $\mu\text{g/mL}$ 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）は短時間処理法の代謝活性化では 190.0 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 192.3 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 252.6 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 200.0 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。これより、染色体異常試験では、短時間処理法及び連続処理法ともに 400 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 5 試験用量を設定し染色体異常誘発能を検討した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では、400、200、100、50 及び 25 $\mu\text{g/mL}$ 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 8.5、3.5、2.5、0 及び 1.0%を示し、400 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満であったため疑陽性と判定した。また、短時間処理法の非代謝活性化では、400、200、100、50 及び 25 $\mu\text{g/mL}$ 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 0.5、0、0.5、0.5 及び 3.5%を示し、いずれも 5%未満であったため陰性と判定した。さらに、連続処理法の 24 時間処理では、400、200、100、50 及び 25 $\mu\text{g/mL}$ 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 1.5、0.5、1.0、0 及び 1.0%を示し、いずれも 5%未満であったため陰性と判定した。また、連続処理法の 48 時間処理では、400、200、100、50 及び 25 $\mu\text{g/mL}$ 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 3.0、2.0、1.5、0 及び 0%を示し、いずれも 5%未満であったため陰性と判定した。なお、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったため、陰性と判定した。

短時間処理法の代謝活性化で、染色体構造異常が疑陽性を示したために確認試験を実施したが、800 及び 700 $\mu\text{g/mL}$ では細胞毒性のため規定数の分裂中期像が観察できず TOX と判定した。また、600、500、400 及び 300 $\mu\text{g/mL}$ 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 11.5、7.5、2.0 及び 4.5%で、600 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10%以上を、500 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示し

たため陽性と判定した。なお、倍数性細胞の出現率はいずれの用量においても 5%未満であったため、陰性と判定された。一方、各処理法の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全て陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値と同様であった。更に、各処理法の陽性対照群における染色体構造異常の出現率は全て陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値と同様の顕著な誘発が認められた。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-クレゾールは、本試験条件下において染色体の構造異常誘発能を有するが倍数体誘発能は有さないものと判定した。

結 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-クレゾールの安全性試験の一環として、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。

Good Laboratory Practice (GLP)

- ・「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」
（平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121003 号、平成 15.11.17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 17 年 4 月 1 日最終改正）
- ・「OECD Principles of Good Laboratory Practice」
（OECD 理事会：1997 年 11 月 26 日）

毒性試験法ガイドライン

- ・「新規化学物質等に係る試験の方法について」
（平成 15 年 11 月 21 日；薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成 17 年 4 月 1 日最終改正）
- ・「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 473」
（OECD 理事会：1997 年 7 月 21 日）

試験材料及び方法

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

被験物質情報 (Attached Data 1) は東京化成工業株式会社における非 GLP 下での分析に基づくものである。

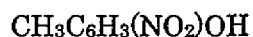
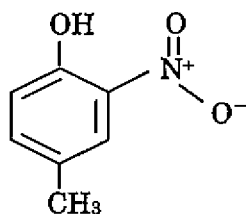
供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

製造者 : 東京化成工業株式会社

名称 : 2-ニトロ-p-クレゾール、2-nitro-p-cresol

CAS 番号 : 119-33-5

構造式又は示性式 :



純度 : 99.8%

入手量 : 25g

性状 : 黄色粉末

分子量 : 153.14

ロット番号 : FBR01

安定性 : 試験終了後、東京化成工業株式会社において安定性を確認し、その結果を入手して安定性を確認した (Attached Data 2)。

保存方法 : 冷暗所 (保存期間中の実測温度 : 3~7℃)、密栓

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室 冷蔵庫及び第1研究棟被験物質調製室 冷蔵庫

残余物の取り扱い : 被験物質の残余物はすべて廃棄した。

2) 溶媒

名称 : ジメチルスルホキシド (DMSO)

ロット番号 : SDP6175

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 変異原室

溶媒の選択理由 : 被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を実施し、被験物質がジメチルスルホキシド (DMSO) に 160 mg/mL 溶解することが確認されたため DMSO を溶媒とした。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3200 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。DMSO で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 160 mg/mL 溶液 (プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度 : 1600 µg/mL) を調製した。次いで、160 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、80.0、40.0、20.0、10.0、5.00、2.50 及び 1.25 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 0.0800 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 40.0 mg/mL 溶液 (プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度 : 400 µg/mL) を調製した。次いで、40.0 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL : 溶媒 1 mL) で順次 4 段階希釈し、20.0、10.0、5.00 及び 2.50 mg/mL の 5 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 40.0 から 2.50 mg/mL の被験液を用いた。

連続処理法では、被験物質 0.0800 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 40.0 mg/mL 溶液 (プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度 : 400 µg/mL) を調製した。次いで、40.0 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL : 溶媒 1 mL) で順次 4 段階希釈し、20.0、10.0、5.00 及び 2.50 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理及び 48 時間処理ともに 40.0 から 2.50 mg/mL の被験液を用いた。

(3) 染色体異常試験 (確認試験 : 短時間処理法・代謝活性化)

被験物質 0.5000 g を 5 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 100 mg/mL 溶液 (プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度 : 1000 µg/mL) を調製した。次いで、100 mg/mL 溶液を等差で希釈し、80.0 (100 mg/mL

溶液 0.8 mL : 溶媒 0.2 mL)、70.0 (100 mg/mL 溶液 0.7 mL : 溶媒 0.3 mL)、60.0 (100 mg/mL 溶液 0.6 mL : 溶媒 0.4 mL)、50.0 (100 mg/mL 溶液 0.5 mL : 溶媒 0.5 mL)、40.0 (100 mg/mL 溶液 0.4 mL : 溶媒 0.6 mL) 及び 30.0 (100 mg/mL 溶液 0.3 mL : 溶媒 0.7 mL) mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。試験には 80.0 から 30.0 mg/mL の被験液を用いた。

2) 調製頻度

使用時に調製した。

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および触知にて観察し、被験液の安定性情報とした。

3. 対照物質

1) 陰性対照

溶媒 (DMSO) を陰性対照物質とした。

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 変異原室 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 : 463AEC

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 変異原室 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 代謝活性化では、CP 0.014 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、K5G95) 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。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、K5G95) 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) 。

染色体異常試験の連続処理法では、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、K6D80) 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 4.9 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 µg/mL) 。

確認試験 (短時間処理法 代謝活性化) では、染色体異常試験 短時間処理法 代謝活性化と同様な方法により調製を行った。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

前記 (毒性試験法ガイドライン) 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。

4. 使用細胞株

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 7 継代、染色体異常試験では短時間処理法で 11 継代、連続処理法及び確認試験で 15 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。

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、さら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。

3) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂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。

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、30 代を越えない範囲で継代培養を行っているものについて、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の特性について定期的に検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。

5. S9 mix 及び培養液

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	: 06051202
製 造 日	: 2006 年 5 月 12 日
種 ・ 系 統	: ラット・SD 系
性	: 雄
週 齢	: 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+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	: 2006 年 11 月 11 日 (製造後 6 箇月)

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 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 : 060616
 製 造 日 : 2006 年 6 月 16 日
 保 存 方 法 : 冷凍 (超低温フリーザー)
 使用 期 限 : 2006 年 12 月 15 日 (製造後 6 箇月)
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 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 mL
		330mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/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	
		ジヌクレオチドリリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		注射用水 (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、注射用水に融解、pH 調製、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。

2) 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No.11095-080) 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 : 511116
 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 変異原室 超低温フリーザー

(2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロ ッ ト 番 号 : 1335043

製 造 元 : Invitrogen Corporation

保 存 方 法 : 冷蔵

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 冷蔵庫

6. 試験方法 ¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	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
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
3. 確認試験	短時間処理法	代謝活性化

1) 識別方法

(1) 細胞増殖抑制試験

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群(Negative Control)の場合「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。ただし、陽性対照群(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」～「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。

(3) 確認試験：短時間処理法・代謝活性化

染色体異常試験と同様に番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 用量の設定

(1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1600 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 800、400、200、100、50.0、25.0 及び 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 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、短時間処理法及び連続処理法の 48 時間処理では 200 $\mu\text{g/mL}$ で、連続処理法の 24 時間処理では 400 $\mu\text{g/mL}$ 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）は短時間処理法の代謝活性化では 190.0 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 192.3 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 252.6 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 200.0 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。これらの結果より、短時間処理法及び連続処理法の 48 時間処理では 50%細胞抑制濃度が 200 $\mu\text{g/mL}$ の近傍にあるため、実験誤差を考慮したうえで明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる濃度として、一段階上の 400 $\mu\text{g/mL}$ を染色体異常試験における最高濃度とし、連続処理法の 24 時間処理では 50%細胞増殖抑制濃度が 200 $\mu\text{g/mL}$ を確実に超えていたため、400 $\mu\text{g/mL}$ を染色体異常試験における最高濃度とした。これより、短時間処理法及び連続処理法ともに最高用量を 400 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で希釈した 200、100、50.0 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ の計 5 用量を設定した。

(3) 確認試験

染色体異常試験・短時間処理法の結果、代謝活性化における最高用量の 400 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の結果が得られた。そこで、最高用量を 800 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下等差で希釈した 700、600、500、400 及び 300 $\mu\text{g/mL}$ の計 6 用量を設定した。

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被験物質用量群、陰性対照群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質処理群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験

物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色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。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群、陰性対照群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5 mL）を播種した。培養 3 日後に培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色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、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。

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被験物質用量群、陰性対照群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.933 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mL を取り除き、陰

性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.150 mL を取り除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色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 各群 2 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のための培養終了約 2 時間前にコルセミド（ジメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 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 箇所へ滴下した。染色体標本はプレートあたり 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作製した。
- ⑤ 残る各群 2 枚のプレートは、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作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理及び 48 時間処理のそれぞれに被験物質用量群、陰性対照群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60mm）を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。また、陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。いずれの場合も、その後 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、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色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、短時間処理法と同様にして染色体標本作製した。
- ④ 残る各群 2 枚のプレートは、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作製し、単層培養密度計を用いて細胞密度を測定した。

5) 確認試験

(1) 短時間処理法 代謝活性化

- ① 被験物質用量群、陰性対照群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.933 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色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 18 時間の培養終了後、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色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、染色体異常試験の短時間処理法と同様にして染色体標本作製した。
- ⑤ 残る 2 枚のプレートは、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作製し、単層培養密度計を用いて細胞密度を測定した。

6) 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。同時に染色体数 46～54 本を持つ細胞を倍数体とし、そ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、保存資料とした。

7) 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、構造異常はさら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と定義した。

染色分体型切断(ctb) : 切断とは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と定義した。

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を染色体型切断と定義した。

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)

8) 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¹⁾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(%)に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 (－)
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。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

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%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は代謝活性化では 200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 190.0 $\mu\text{g/mL}$ であった。また非代謝活性化では 200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 192.3 $\mu\text{g/mL}$ であった。

(2) 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し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で、非代謝活性化では 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化では 1600、800、400 及び 200 $\mu\text{g/mL}$ で橙色、100 及び 50.0 $\mu\text{g/mL}$ で黄色、25.0 及び 12.5 $\mu\text{g/mL}$ で淡黄色の色調変化が認められた。非代謝活性化では 1600、800、400 及び 200 $\mu\text{g/mL}$ で橙色、100、50.0 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で淡橙黄色の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 800 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で析出が認められた。

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%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は 24 時間処理では 400 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 252.6 $\mu\text{g/mL}$ であった。また 48 時間処理では 200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 200.0 $\mu\text{g/mL}$ であった。

(2) 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し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認め

られた。肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 1600、800、400 及び 200 $\mu\text{g/mL}$ で橙色、100、50.0 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で淡橙黄色の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 800 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で析出が認められた。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 2-1、2-2、Table 2-1、2-2、3-1、3-2 に、連続処理法の結果を Fig. 2-3、2-4、Table 2-3、2-4、3-3、3-4 に示した。

1) 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は、細胞増殖抑制試験の場合とほぼ同様であった。すなわち、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し、陰性対照群と比較すると、短時間処理法の代謝活性化では 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。また短時間処理法の非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、短時間処理法の代謝活性化では 400 及び 200 $\mu\text{g/mL}$ で橙色、100 及び 50.0 $\mu\text{g/mL}$ で黄色、25.0 $\mu\text{g/mL}$ で淡黄色の色調変化が認められた。また、非代謝活性化では 400 及び 200 $\mu\text{g/mL}$ で橙色、100、50.0 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で淡橙黄色の色調変化が認められた。一方、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 400、200 及び 100 $\mu\text{g/mL}$ で橙色、50.0 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で淡橙色の色調変化が認められた。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、短時間処理法及び連続処理法ともに析出は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では 400 $\mu\text{g/mL}$ では 8.5%、200 $\mu\text{g/mL}$ で 3.5%、100 $\mu\text{g/mL}$ で 2.5%、50.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、400 $\mu\text{g/mL}$ において 8.5% と疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。一方、非代謝活性化では、400 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、200 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、100 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、50.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 3.5% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。更に、連続処理法の 24 時間処理では 400 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%、200 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、100 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、50.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。また、48 時間処理では、400 $\mu\text{g/mL}$ で 3.0%、200 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%、100 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%、50.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 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及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性

及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ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。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では 400 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、200 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、100 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、50.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、非代謝活性化においては、400 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、200 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、100 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、50.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。更に、連続処理法の 24 時間処理では 400 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、200 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、100 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、50.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、48 時間処理では、400 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、200 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、100 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、50.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

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) とほぼ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。

3. 確認試験

短時間処理法の代謝活性化の結果を Fig. 2-5、Table 2-5 及び 3-5 に示した。

1) 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は、細胞増殖抑制試験の場合とほぼ同様な傾向であった。すなわち、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し、陰性対照群と比較すると、300 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、800、700、600、500、400 及び 300 $\mu\text{g/mL}$ で橙色の色調変化が認められた。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、600 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で析出が認められた。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、800 及び 700 $\mu\text{g/mL}$ で細胞が観察されず TOX と判定された。また 600 $\mu\text{g/mL}$ で 11.5%、500 $\mu\text{g/mL}$ で 7.5%、400 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0% 及び 300 $\mu\text{g/mL}$ で 4.5% と、600 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上を、500 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満をそれぞれ示した。

陰性対照群及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ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。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、800 及び 700 $\mu\text{g/mL}$ で細胞が観察されず TOX と判定された。また 600 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%、500 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、400 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 300 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

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) とほぼ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。

考 察

被験物質は、染色体異常試験において、短時間処理法の代謝活性化では、400 µg/mL で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) が、疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満であったため疑陽性と判定した。一方、短時間処理法の非代謝活性化では染色体の構造異常を有する細胞の出現率は増加せず、倍数性細胞の出現率の増加も認められなかった。また、連続処理法でも、24 時間連続処理及び 48 時間連続処理ともに染色体の構造異常を有する細胞の出現率は増加せず、倍数性細胞の出現率の増加も認められなかった。

染色体異常試験の短時間処理法において、代謝活性化で疑陽性と判定されたため短時間処理法の代謝活性化について確認試験を実施した。確認試験の代謝活性化では、600 µg/mL で TA 値が陽性の判定基準である 10%以上であったため陽性と、500 µg/mL で TA 値が疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満であったため疑陽性と判定した。さらに確認試験の代謝活性化において異常細胞の出現率に用量依存性が認められたため、総合的に陽性と判定した。また、確認試験の代謝活性化における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¹⁾は 0.77 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 値は¹⁾15 であった。

なお、いずれの処理法においても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全て陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値と同様であった。更に、いずれの処理法においても陽性対照群における染色体構造異常の出現率は全て陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値と同様の顕著な誘発が認められた。従って試験は適切に実施されたものと考えられた。また、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。

2-ニトロ-p-クレゾールの類縁体である 4-ニトロ-m-クレゾール⁶⁾、2-ニトロフェノール⁷⁾ 及び 4-ニトロフェノール⁷⁾は、細菌を用いる復帰突然変異試験において陰性と、3-ニトロフェノール⁸⁾及び 2-アミノフェノール⁹⁾は陽性と報告されている。

以上の結果から、2-ニトロ-p-クレゾールは、本試験条件下において染色体の構造異常誘発能を有するが倍数体誘発能は有さないものと判定した。

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
- 2) 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
- 3) 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), *日本化粧品科学会誌*, 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
- 6) Corbett M D, Wei C I, Johnston J J, Chang P F, Cobett B R (1987): Mutagenicity of the C-nitroso analog of fenitrothion, *Toxicol Lett.* 35, 201-207
- 7) Shimizu M, Yano E (1986): Mutagenicity of mono-nitrobenzene derivatives in the Ames test and rec assay, *Mutation Res.* 170, 11-22
- 8) Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans (1992): salmonella mutagenicity tests:V. Results from the testing of 311 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.* 19 (Suppl.21), 2-141
- 9) De Flora S, Zanicchi P, Camoirano A, Bennicelli, C, Badolati G (1984): Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test, *Mutation Res.* 133, 161-198



試験成績書

2006年6月22日

三立ケミ株式会社 御中

東京化成工業株式会社 品質保証部
〒103-0023
東京都中央区日本橋本町4丁目10番1号
TEL:03(5640)8860、FAX:03(5640)8025

製品名：2-ニトロベンゾグレートール					
製品コード： N0186	等級： EP	製品ロット： FBR01	判定： 合格	数量： 25g×4	
項目	結果		規格値		
純度 (GC)	99.8 %		99.0 %以上		
凝固点	31.6 deg-C		30.0 ~ 33.0 deg-C		

報 告 書

株式会社ボゾリサーチセンター

様

整理 No.Q0212

2006 年 12 月 20 日

東京化成工業株式会社

分析センター

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町 4-10-1

TEL 03-5640-8860

FAX 03-5640-8025



N0186 2-Nitro-p-cresol の分析につきましてご報告致します。

1. 分析試料

N0186 2-Nitro-p-cresol FBR01 [東京化成工業 (株) 製]

2. 分析結果

純度(GC)

(1) 分析条件

カラム : MPS5 (5%phenyl95%Methylsilicone)

0.25 μ × 30m × 0.25mmカラム温度 : 最初 120℃で 10 分間保ち、その後 20℃/min で 300℃まで昇温し、
その温度に 6 分間保つ。

気化室温度 : 300℃

検出器温度 : 300℃

キャリアガス : ヘリウム 線速度 30cm/sec.

検出器 : FID

注 入 法 : スプリット法 スプリット比 (1 : 150)

注 入 量 : 試料 50mg + 7セトトリル溶液 1mL, 1.0 μ l

定 量 法 : 未補正面積百分率法

機 器 : S2010

(2) 結果

①99.9% ②99.9% 平均 99.9%

Background Data in the Testing Facility

Background data of chromosome aberration tests in cultured Chinese hamster cells, based on recent 5 studies carried out under the same conditions at Bozo Research Center Inc.

		Period : March-2005 — March-2006										
Treatment		Cells observed	Polyploide cells(%)	Number of aberration							TA	TAG
S9 mix	Time			g	ctb	cte	csb	cse	other			
NC	+	6-18	1000	(3)	(2)	(2)	(4)	(0)	(1)	(0)	(7)	(9)
			%	0.3	0.2	0.2	0.4	0.0	0.1	0.0	0.7	0.9
			Min(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			Max(%)	1.5	1.0	0.5	1.0	0.0	0.5	0.0	1.5	1.5
	-	6-18	1000	(3)	(0)	(3)	(1)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)
			%	0.3	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4
			Min(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			Max(%)	1.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0
	-	24-0	1000	(4)	(2)	(0)	(3)	(0)	(1)	(0)	(4)	(6)
			%	0.4	0.2	0.0	0.3	0.0	0.1	0.0	0.4	0.6
			Min(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			Max(%)	1.5	0.5	0.0	1.0	0.0	0.5	0.0	1.0	0.5
	-	48-0	1000	(6)	(4)	(2)	(5)	(0)	(2)	(0)	(9)	(13)
			%	0.6	0.4	0.2	0.5	0.0	0.2	0.0	0.9	1.3
			Min(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
			Max(%)	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.5	0.0	2.0	3.0
Total		4000	(16)	(8)	(7)	(13)	(0)	(4)	(0)	(24)	(32)	
		%	0.4	0.2	0.2	0.3	0.0	0.1	0.0	0.6	0.8	
PC	+	(CP) 6-18	1000	(2)	(16)	(96)	(565)	(0)	(2)	(3)	(623)	(627)
			%	0.2	1.6	9.6	56.5	0.0	0.2	0.3	62.3	62.7
			Min(%)	0.0	0.0	5.5	35.5	0.0	0.0	0.0	40.0	40.0
			Max(%)	1.0	3.0	15.0	72.0	0.0	0.5	0.5	78.5	79.0
	-	(MMC) 6-18	1000	(0)	(13)	(56)	(100)	(0)	(2)	(0)	(153)	(164)
			%	0.0	1.3	5.6	10.0	0.0	0.2	0.0	15.3	16.4
			Min(%)	0.0	0.5	3.0	7.0	0.0	0.0	0.0	12.0	13.5
			Max(%)	0.0	2.0	7.0	13.5	0.0	0.5	0.0	18.5	20.0
	-	(MMC) 24-0	1000	(6)	(17)	(57)	(201)	(0)	(1)	(0)	(252)	(266)
			%	0.6	1.7	5.7	20.1	0.0	0.1	0.0	25.2	26.6
			Min(%)	0.0	0.5	4.0	14.5	0.0	0.0	0.0	17.5	18.0
			Max(%)	1.5	3.0	7.0	27.0	0.0	0.5	0.0	32.5	35.0
	-	(MMC) 48-0	1000	(2)	(22)	(133)	(502)	(0)	(8)	(2)	(589)	(598)
			%	0.2	2.2	13.3	50.2	0.0	0.8	0.2	58.9	59.8
			Min(%)	0.0	0.5	6.0	46.5	0.0	0.0	0.0	55.0	56.5
			Max(%)	0.5	4.5	22.5	54.5	0.0	1.5	0.5	62.5	63.0

(): number of observed.

Negative control(NC) : dimethylsulfoxide

Positive control(PC) : CP;Cyclophosphamide, 14µg/mL (used for the system with metabolic activation method)

MMC;Mitomycin C, 0.05 or 0.075µg/mL (used for the system without metabolic activation metho

S9 mix : without metabolic activation (-); with metabolic activation (+)

Time : Treatment hours - Hours of incubation without test article

Max(%) and Min(%) : Maximum and minimum of the total data where in each group was taken into consideration

Aberration g : gap (chromatid and chromosome gap)

ctb : chromatid break

csb : chromosome break

cte : chromatid exchange

cse : chromosome exchange

TA : number of cells with aberrations excluding gaps

TAG : total number of cells aberrations including gaps

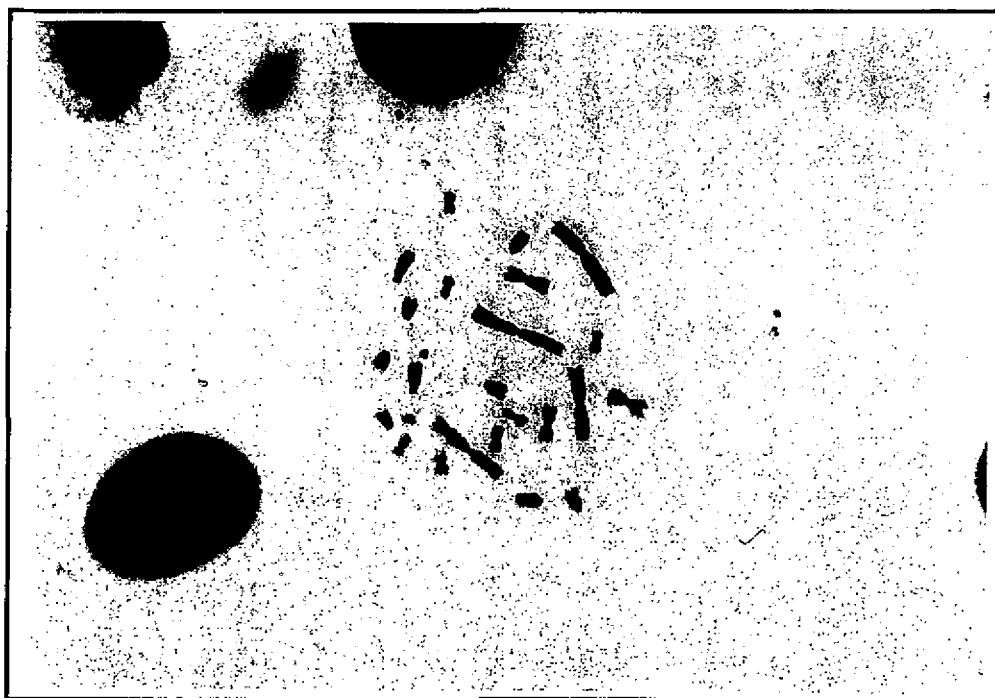


Photo. 1 A metaphase chromosome from the negative control group
[Confirmation test: +S9 mix]

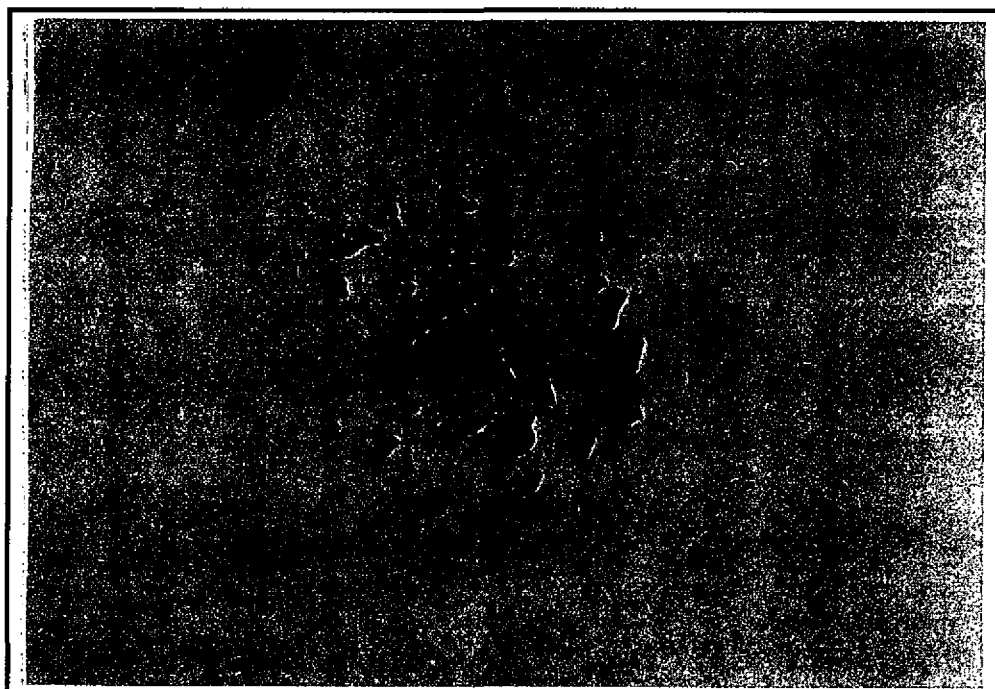


Photo. 2 A metaphase chromosome from the 600 µg/mL group
with chromatid exchanges
[Confirmation test: +S9 mix]

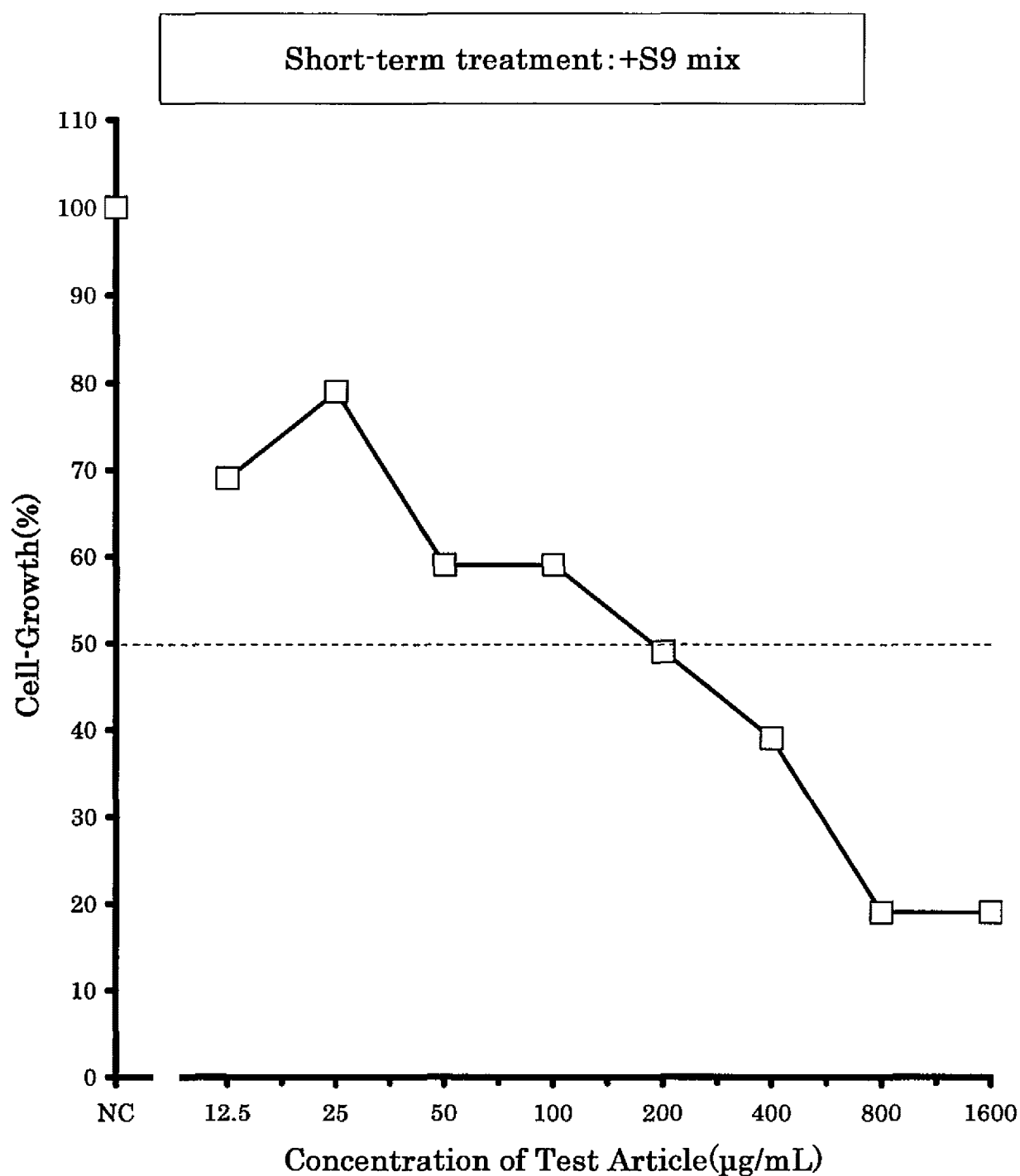


Fig.1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol

NC: Negative control

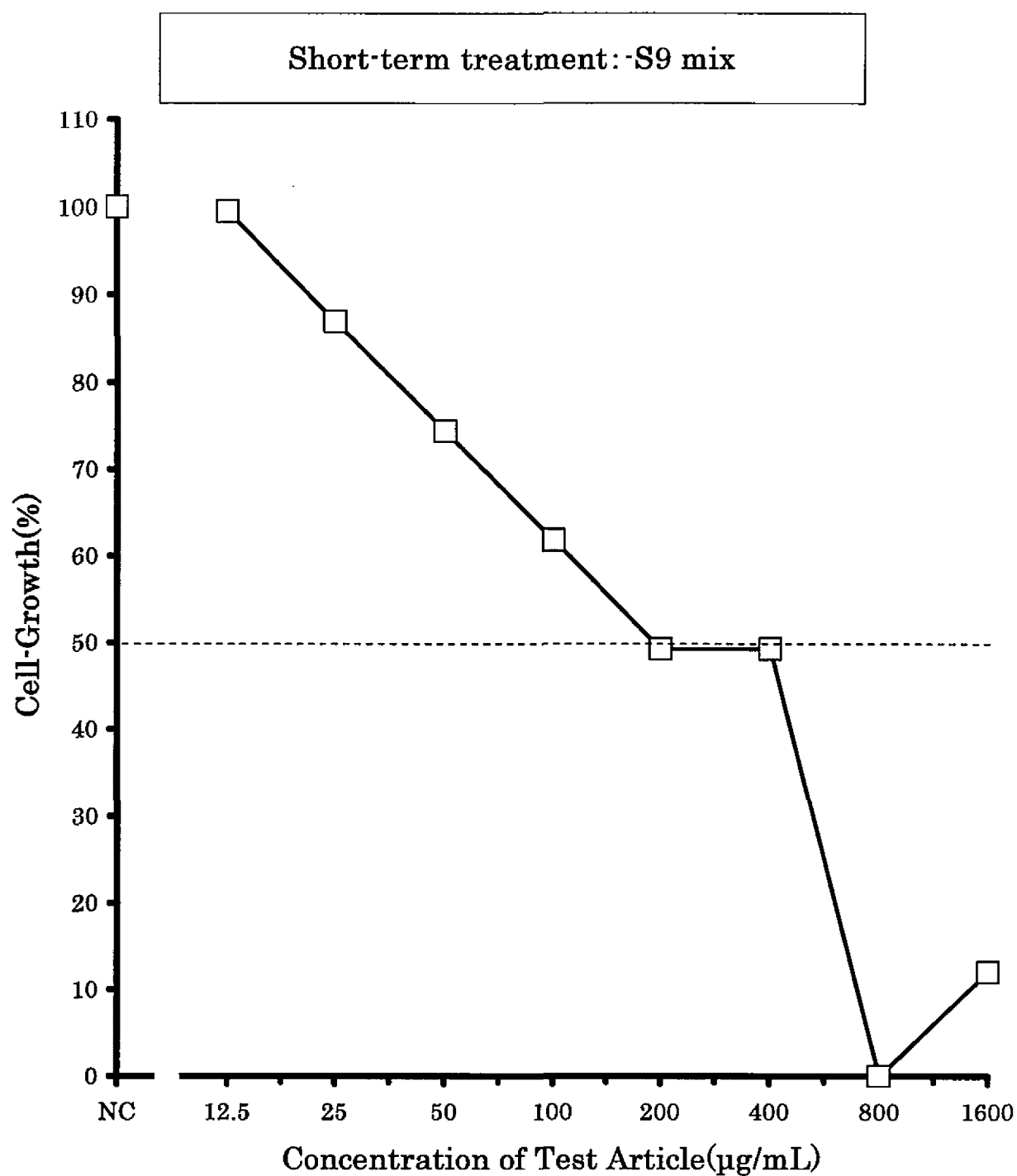


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol

NC: Negative control

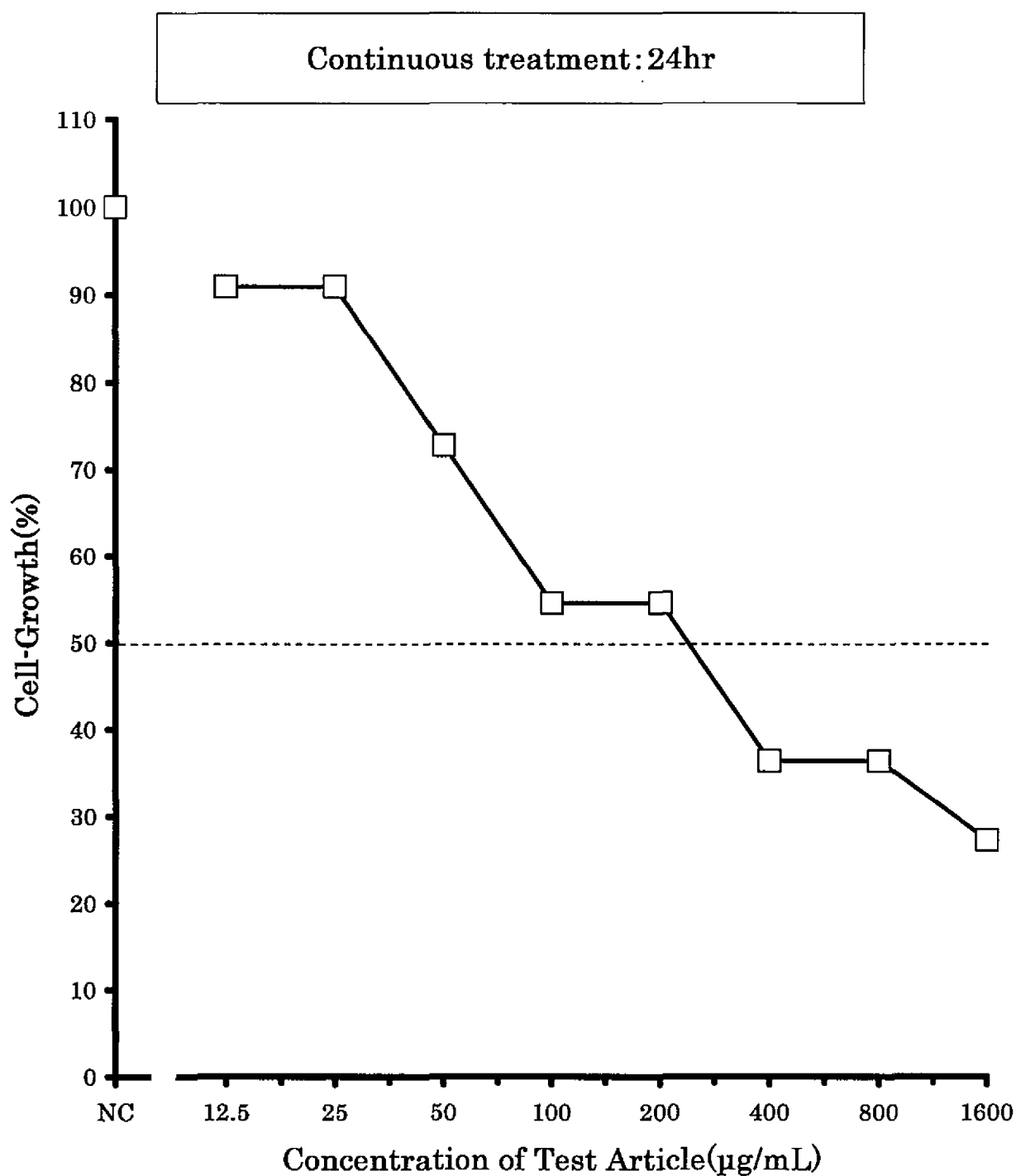


Fig.1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol

NC: Negative control

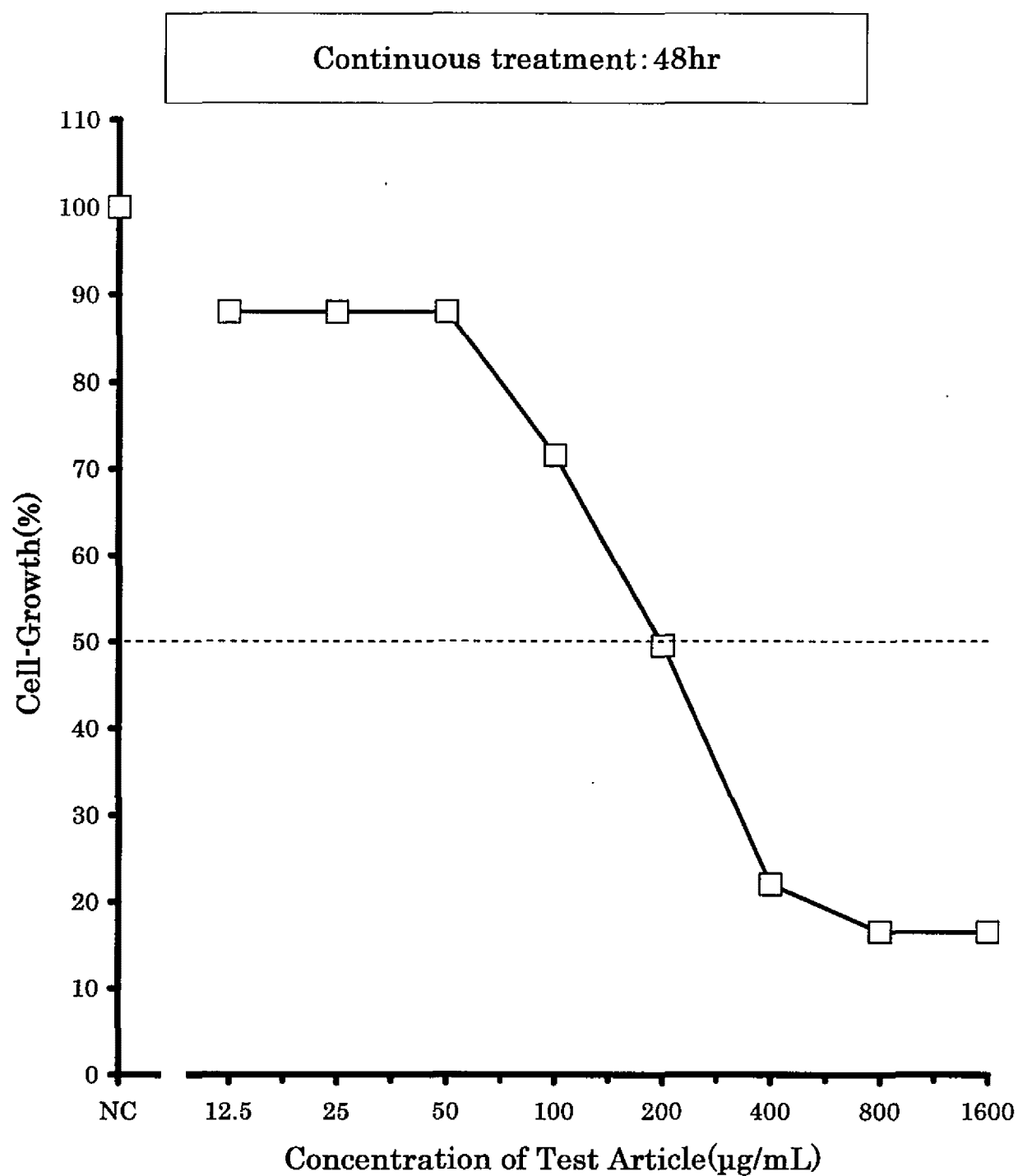


Fig.1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol

NC: Negative control

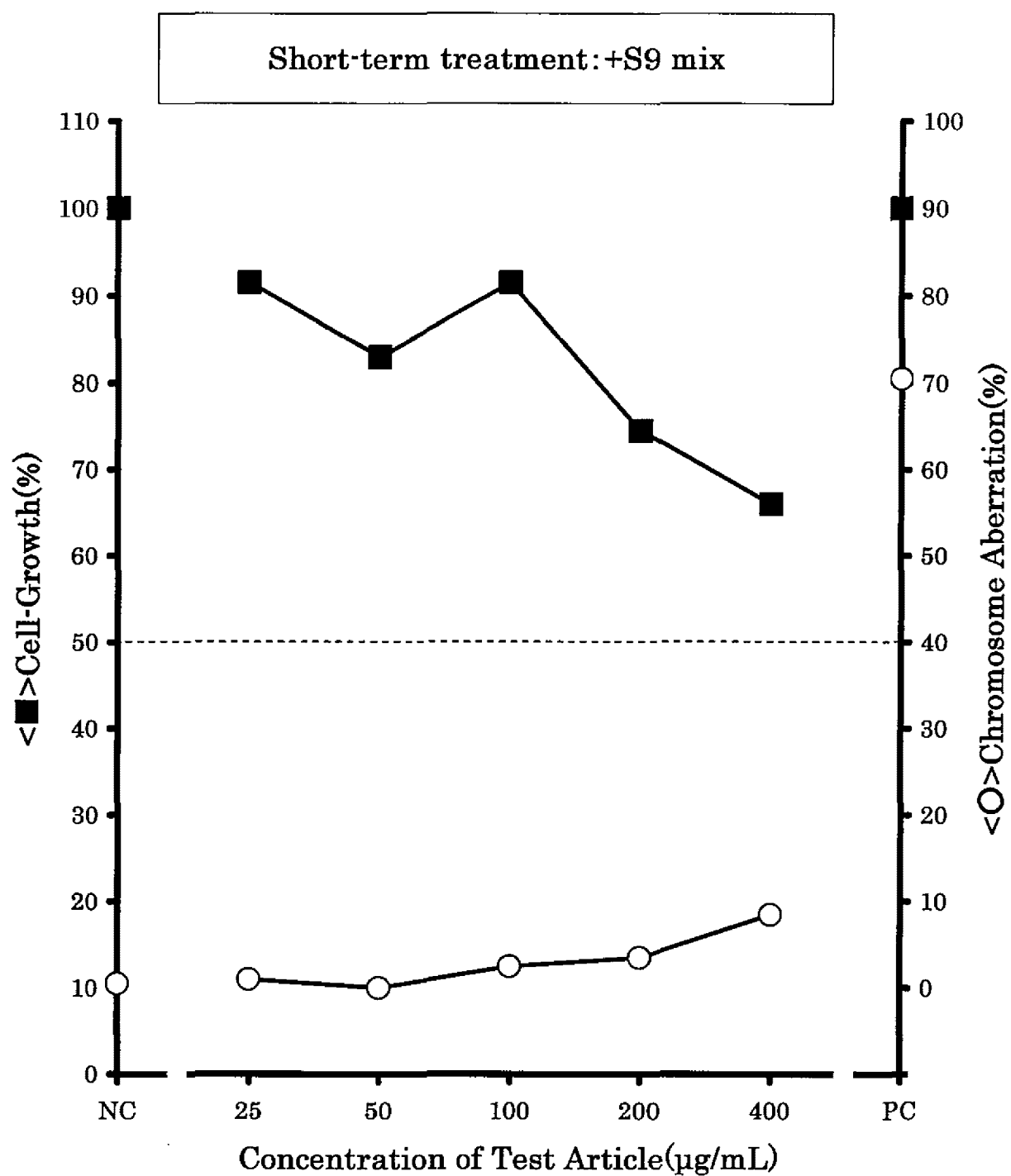


Fig.2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol

NC: Negative control

PC: Positive control

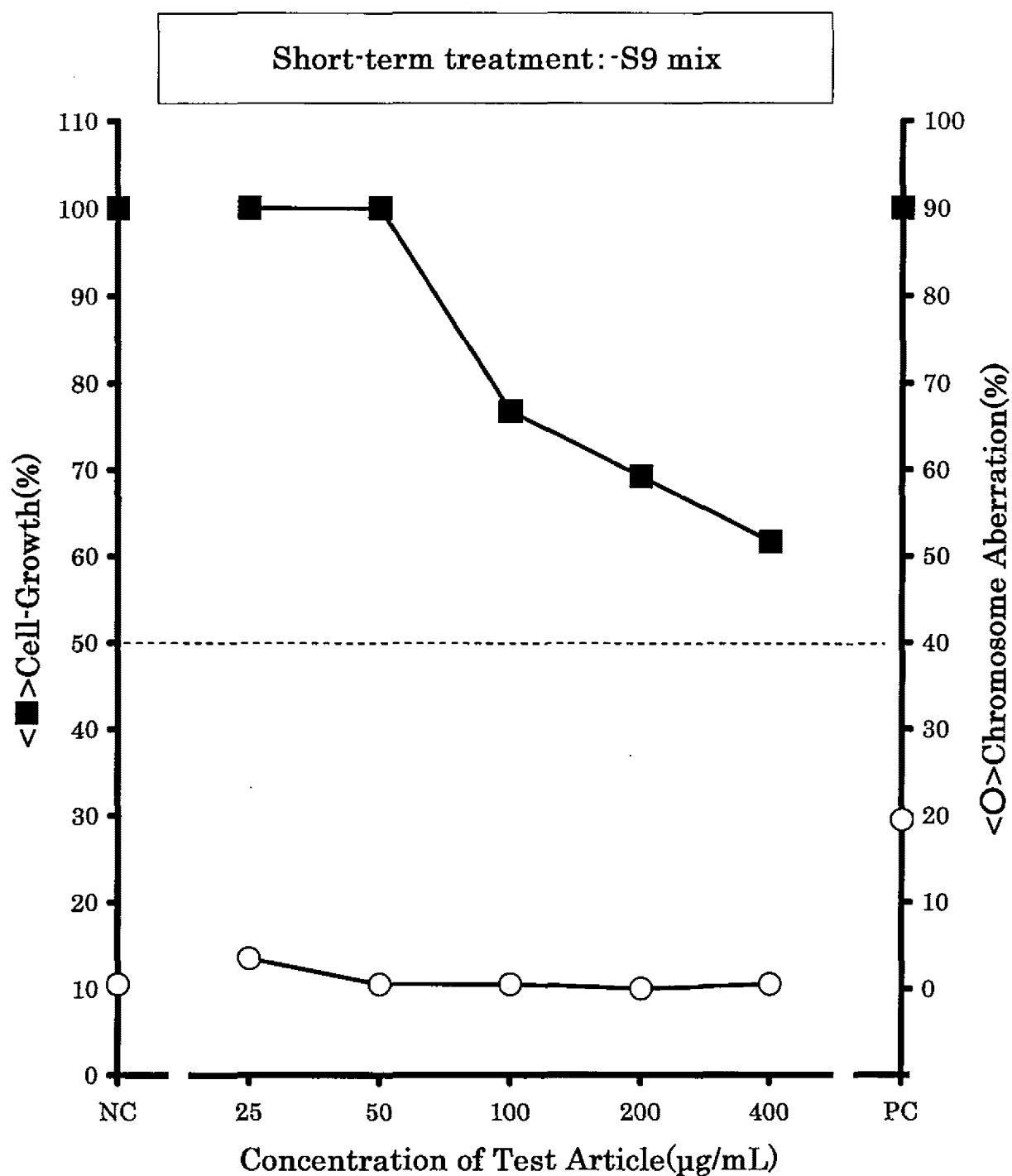


Fig.2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol

NC: Negative control

PC: Positive control

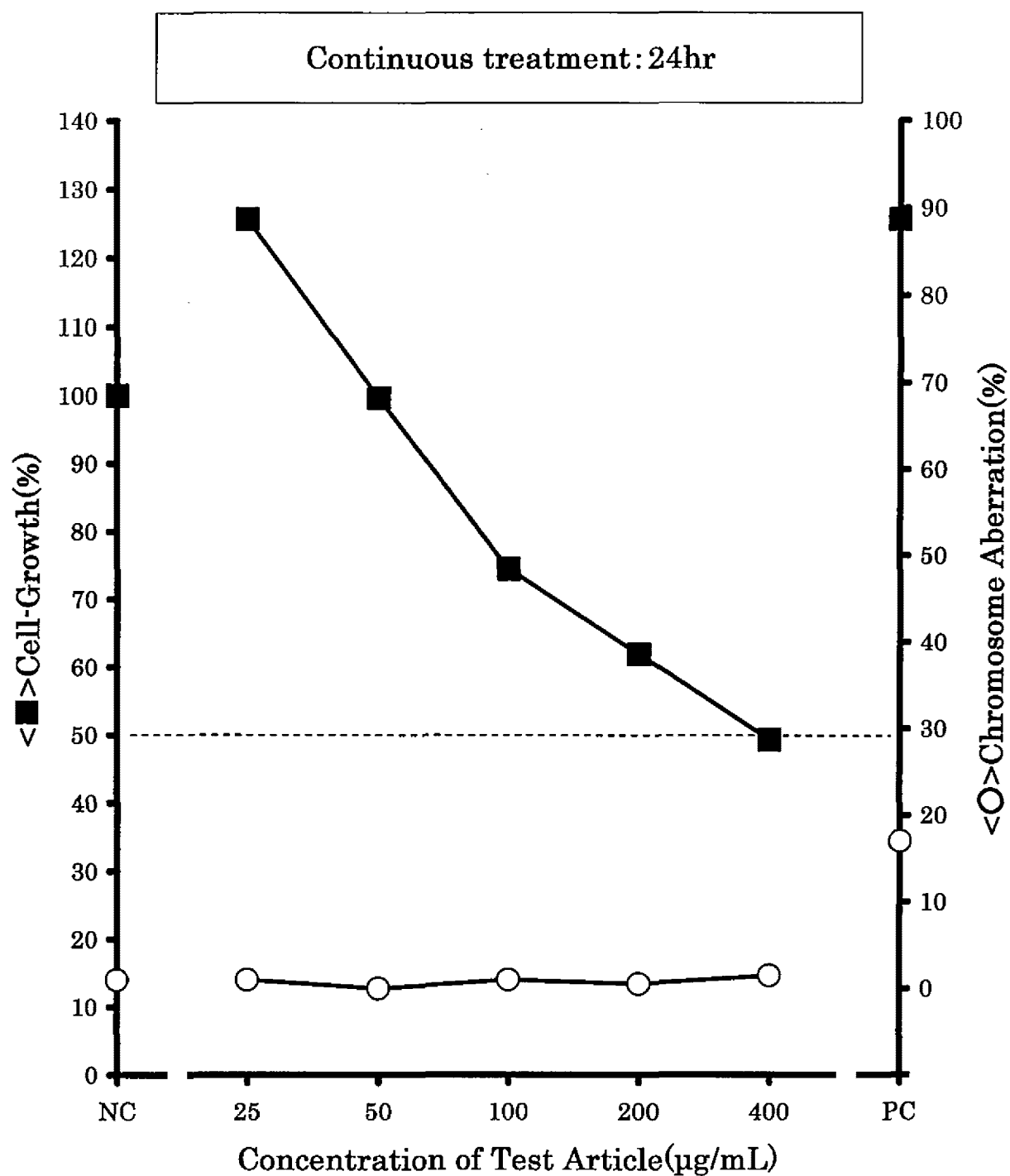


Fig.2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol

NC: Negative control PC: Positive control

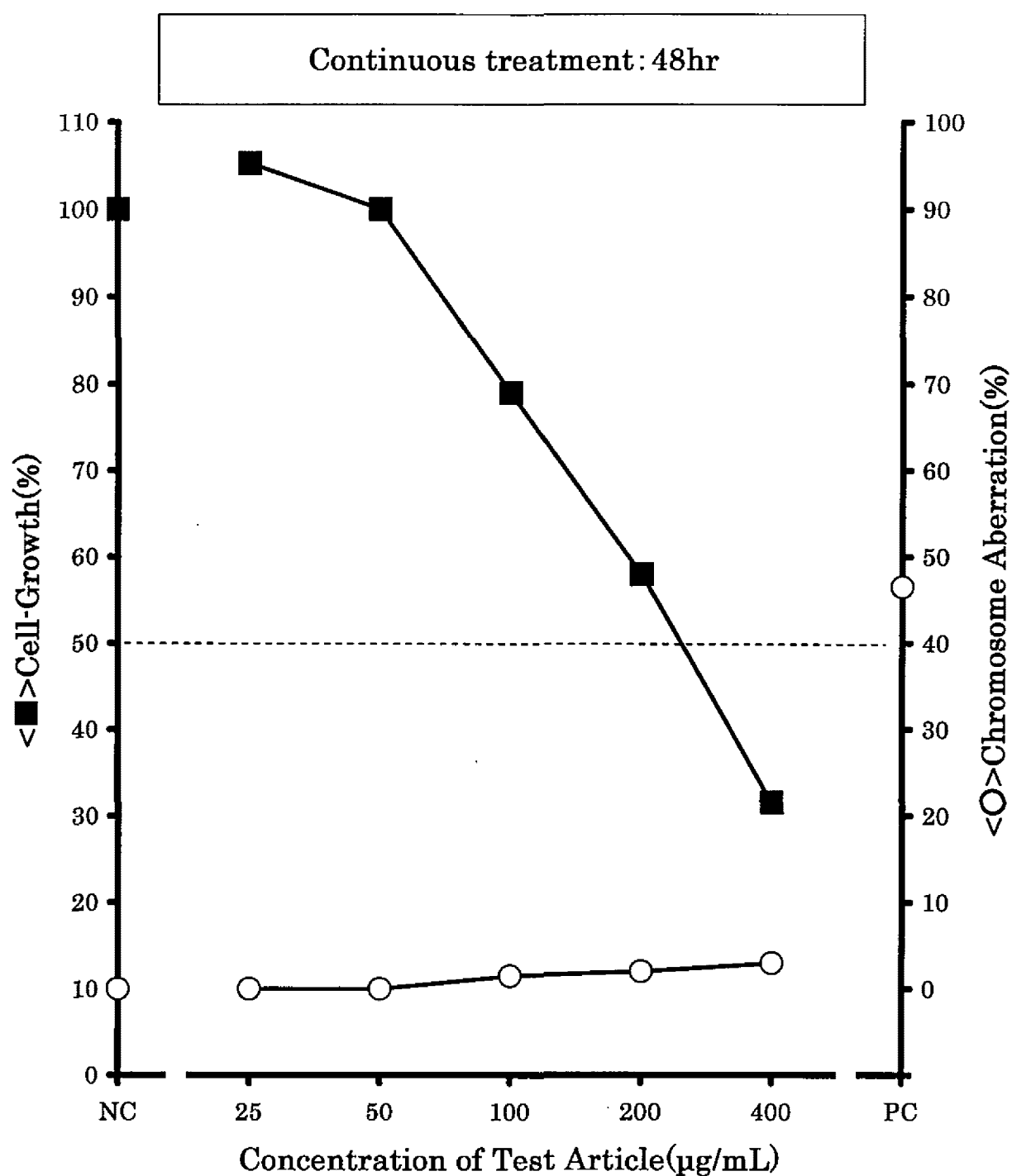


Fig.2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol

NC: Negative control

PC: Positive control

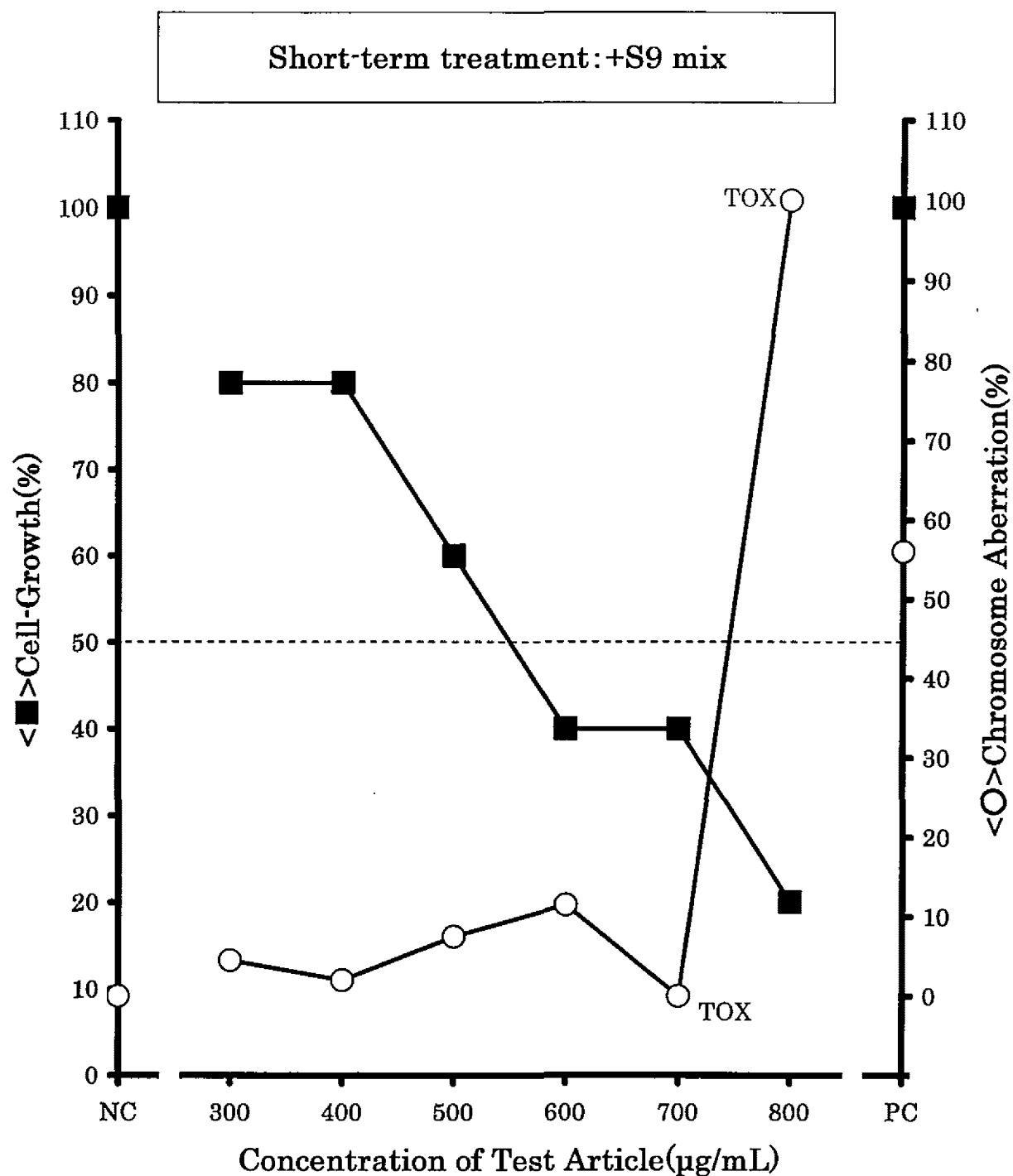


Fig.2-5 Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol

NC: Negative control PC: Positive control
 TOX: Cell toxicity was observed.

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
+	6-18	Test article	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
					100		—	—	—
			12.5	79	69	+	Light-yellow	—	
				59		+	Light-yellow	—	
			25	79	79	+	Light-yellow	—	
				79		+	Light-yellow	—	
			50	59	59	++	Yellow	—	
				59		++	Yellow	—	
			100	59	59	++	Yellow	—	
				59		++	Yellow	—	
			200	59	49	++	Orange	—	
				39		++	Orange	—	
			400	39	39	+++	Orange	—	
				39		+++	Orange	—	
			800	19	19	+++	Orange	+	
				19		+++	Orange	+	
			1600	19	19	+++	Orange	+	
				19		+++	Orange	+	
Concentration of 50% cell-growth inhibition: 190.0 µg/mL									

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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) Observation of plate 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 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[Short-term treatment: S9 mix]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	6-18	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		12.5	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		25	74	87	+	Light-orange-yellow	—
			99		+	Light-orange-yellow	—
		50	74	74	++	Light-orange-yellow	—
			74		++	Light-orange-yellow	—
		100	49	62	++	Light-orange-yellow	—
			74		++	Light-orange-yellow	—
		200	49	49	++	Orange	—
			49		++	Orange	—
		400	49	49	++	Orange	—
			49		++	Orange	—
		800	0	0	+++	Orange	+
			0		+++	Orange	+
		1600	24	12	+++	Orange	+
			0		+++	Orange	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					192.3	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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) Observation of plate 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 1-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{d)}
—	24	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			120		—	—	—
		12.5	100	91	—	—	—
			100		—	—	—
		25	100	91	+	Light-orange-yellow	—
			100		+	Light-orange-yellow	—
		50	80	73	+	Light-orange-yellow	—
			80		+	Light-orange-yellow	—
		100	60	55	++	Light-orange-yellow	—
			60		++	Light-orange-yellow	—
		200	60	55	++	Orange	—
			60		++	Orange	—
		400	40	36	+++	Orange	—
			40		+++	Orange	—
		800	40	36	+++	Orange	+
			40		+++	Orange	+
		1600	40	27	+++	Orange	+
			20		+++	Orange	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					252.6	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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) Observation of plate 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 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
—	48	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
			100		—	—	—	
		Test article	12.5	88	88	—	—	—
				88		—	—	—
			25	88	88	+	Light-orange-yellow	—
				88		+	Light-orange-yellow	—
			50	88	88	++	Light-orange-yellow	—
				88		++	Light-orange-yellow	—
			100	77	72	++	Light-orange-yellow	—
				66		++	Light-orange-yellow	—
			200	44	50	++	Orange	—
				55		++	Orange	—
			400	22	22	+++	Orange	—
				22		+++	Orange	—
			800	11	17	+++	Orange	+
				22		+++	Orange	+
			1600	11	17	+++	Orange	+
				22		+++	Orange	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					200.0	µg/mL		

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

- 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) Observation of plate 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 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
+	6-18	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
				100		—	—	
		Test article	25	100	92	+	Light-yellow	—
				83		+	Light-yellow	—
			50	83	83	+	Yellow	—
				83		+	Yellow	—
			100	100	92	++	Yellow	—
				83		++	Yellow	—
			200	66	75	++	Orange	—
				83		++	Orange	—
			400	66	66	+++	Orange	—
				66		+++	Orange	—
		PC		100	100	—	—	—
				100		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(cyclophosphamide, 14µg/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) Observation of plate 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

Table 2-2 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[Short-term treatment: -S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
—	6-18	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
			85		—	—	—	
		Test article	25	100	100	—	Light-orange-yellow	—
				85		—	Light-orange-yellow	—
			50	100	100	+	Light-orange-yellow	—
				85		+	Light-orange-yellow	—
			100	71	77	++	Light-orange-yellow	—
				71		++	Light-orange-yellow	—
			200	57	69	++	Orange	—
				71		++	Orange	—
			400	57	62	++	Orange	—
				57		++	Orange	—
		PC	85	100	—	—	—	
			100		—	—	—	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.075µg/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) Observation of plate 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

Table 2-3 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[Continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	24	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
				99		—	—	
		Test article	25	125	126	—	Light-orange	—
				125		—	Light-orange	—
			50	99	99	+	Light-orange	—
				99		+	Light-orange	—
			100	74	74	++	Orange	—
				74		++	Orange	—
			200	74	62	++	Orange	—
				49		++	Orange	—
			400	49	49	+++	Orange	—
				49		+++	Orange	—
		PC		125	126	—	—	—
				125		—	—	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05μg/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) Observation of plate 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

Table 2-4 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[Continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	48	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			90		—	—	—
		Test article	100	105	—	Light-orange	—
			100		—	Light-orange	—
			90	100	+	Light-orange	—
			100		+	Light-orange	—
			70	79	++	Orange	—
			80		++	Orange	—
			50	58	++	Orange	—
			60		++	Orange	—
			30	32	+++	Orange	—
			30		+++	Orange	—
		PC	110	116	—	—	—
			110		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05µg/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) Observation of plate 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

Table 2-5 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[Short-term treatment: +S9 mix]

Confirmation test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
+	6-18	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
				100		—	—	
		Test article	300	80	80	+	Orange	—
				80		+	Orange	—
			400	80	80	++	Orange	—
				80		++	Orange	—
			500	60	60	+++	Orange	—
				60		+++	Orange	—
			600	40	40	+++	Orange	+
				40		+++	Orange	+
			700	40	40	+++	Orange	+
				40		+++	Orange	+
			800	20	20	+++	Orange	+
				20		+++	Orange	+
		PC		100	100	—	—	—
				100		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(cyclophosphamide, 14µg/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) Observation of plate 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 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[short-term treatment: +S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NC	200	0.5	—	1	1	0	0	0	0	0.5	1.0	—	33-1 25-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		400	200	0.0	—	3	6	10	0	1	0	8.5	10.0	±	16-1 16-2 80-1
			(79)	(0)		(2)	(2)	(5)	(0)	(1)	(0)	(8)	(10)		
			(83)	(0)		(1)	(2)	(4)	(0)	(0)	(0)	(6)	(7)		
			(38)	(0)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		
		200	200	0.5	—	1	5	2	0	0	0	3.5	4.0	—	31-1 69-1
			(100)	(1)		(0)	(4)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)		
			(100)	(0)		(1)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(3)	(4)		
		100	200	0.5	—	1	3	1	0	1	0	2.5	3.0	—	83-1 47-1
			(100)	(1)		(1)	(3)	(1)	(0)	(0)	(0)	(4)	(5)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)		
		50	200	0.0	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	26-1 70-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		25	200	0.0	—	1	1	2	0	0	0	1.0	1.5	—	18-1 94-1
			(100)	(0)		(1)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.0	—	3	23	135	0	0	0	70.5	71.0	+	62-1 73-1
			(100)	(0)		(2)	(13)	(67)	(0)	(0)	(0)	(71)	(72)		
			(100)	(0)		(1)	(10)	(68)	(0)	(0)	(0)	(70)	(70)		

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 (dimethyl sulfoxide)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μ g/mL)

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

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	6-18	NC	200	0.0	-	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	-	15-1 13-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		400	200	1.0	-	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	-	82-1 71-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		200	200	0.0	-	2	0	0	0	0	0	0.0	1.0	-	68-1 50-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)		
-	6-18	100	200	0.0	-	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	-	30-1 08-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		50	200	0.0	-	1	1	0	0	0	0	0.5	1.0	-	72-1 98-1
			(100)	(0)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
-	6-18	25	200	0.0	-	2	6	1	0	0	0	3.5	4.5	-	78-1 01-1
			(100)	(0)		(1)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(4)		
			(100)	(0)		(1)	(3)	(1)	(0)	(0)	(0)	(4)	(5)		
-	6-18	PC	200	0.0	-	2	13	26	0	0	1	19.5	20.5	+	86-1 24-1
			(100)	(0)		(1)	(6)	(12)	(0)	(0)	(0)	(18)	(19)		
			(100)	(0)		(1)	(7)	(14)	(0)	(0)	(1)	(21)	(22)		

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 (dimethyl sulfoxide)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 μ g/mL)

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[continuous treatment:24hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	24-0	NC	200	0.5	-	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	-	63-1 49-1
			(100)	(1)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		400	200	0.0	-	1	2	1	0	0	0	1.5	2.0	-	32-1 55-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		200	200	0.0	-	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	-	56-1 92-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
-	24-0	100	200	0.0	-	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	-	90-1 81-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		50	200	0.5	-	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	-	64-1 29-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
-	24-0	25	200	0.0	-	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	-	02-1 22-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
-	24-0	PC	200	0.0	-	2	13	22	0	0	0	17.0	17.5	+	76-1 28-1
			(100)	(0)		(1)	(5)	(10)	(0)	(0)	(0)	(15)	(16)		
			(100)	(0)		(1)	(8)	(12)	(0)	(0)	(0)	(19)	(19)		

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 (dimethyl sulfoxide)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[continuous treatment:48hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	48-0	NC	200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	87-1 37-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		400	200	0.0	-	1	2	3	0	1	0	3.0	3.5	-	51-1 05-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(1)	(1)	(2)	(0)	(1)	(0)	(4)	(5)		
		200	200	1.0	-	2	0	3	0	1	0	2.0	3.0	-	75-1 95-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(2)	(0)	(1)	(0)	(3)	(3)		
			(100)	(1)		(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)		
-	48-0	100	200	0.0	-	0	0	3	0	0	0	1.5	1.5	-	46-1 84-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		50	200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	99-1 61-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
-	48-0	25	200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	60-1 43-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
-	48-0	PC	200	0.0	-	1	16	85	0	0	1	46.5	46.5	+	06-1 52-1
			(100)	(0)		(1)	(9)	(42)	(0)	(0)	(0)	(47)	(47)		
			(100)	(0)		(0)	(7)	(43)	(0)	(0)	(1)	(46)	(46)		

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 (dimethyl sulfoxide)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 3-5 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 2-nitro-p-cresol
[confirmation test]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NC	200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	96-1 91-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		800	1	0.0	TOX	0	0	1	0	0	0	100.0	100.0	TOX	53-1 53-2 19-1 19-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(1)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		700	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	44-1 44-2 65-1 65-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		600	200	2.0	-	1	6	18	0	0	0	11.5	12.0	+	36-1 11-1
			(100)	(2)		(0)	(3)	(11)	(0)	(0)	(0)	(14)	(14)		
			(100)	(2)		(1)	(3)	(7)	(0)	(0)	(0)	(9)	(10)		
		500	200	1.0	-	1	5	9	0	1	0	7.5	8.0	±	88-1 21-1
			(100)	(1)		(0)	(3)	(5)	(0)	(1)	(0)	(9)	(9)		
			(100)	(1)		(1)	(2)	(4)	(0)	(0)	(0)	(6)	(7)		
		400	200	0.0	-	0	1	3	0	0	0	2.0	2.0	-	41-1 38-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
		300	200	0.0	-	2	4	5	0	0	0	4.5	5.5	-	03-1 54-1
			(100)	(0)		(1)	(3)	(4)	(0)	(0)	(0)	(7)	(8)		
			(100)	(0)		(1)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(3)		
		PC	200	0.0	-	0	14	103	0	0	0	56.0	56.0	+	57-1 40-1
			(100)	(0)		(0)	(9)	(51)	(0)	(0)	(0)	(58)	(58)		
			(100)	(0)		(0)	(5)	(52)	(0)	(0)	(0)	(54)	(54)		

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.

TOX: cell toxicity was observed.

NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μ g/mL)