

T-G796

## 最 終 報 告 書

*N*-エチルジエタノールアミン：チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる  
*in vitro* 染色体異常試験

試験番号 T-G796

試験期間

2023年12月13日-2024年3月19日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所  
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

試験委託者

厚生労働省

〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

T-G796

## 1. GLP 陳述書

試験番号 : T-G796

試験表題 : *N*-エチルジエタノールアミン：チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- 「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」  
(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)

 2024 年 3 月 19 日

---

試験責任者  
株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

## 2. 目次

1.	GLP 陳述書 .....	2
2.	目次 .....	3
3.	試験実施概要 .....	6
3.1	試験番号 .....	6
3.2	試験表題 .....	6
3.3	試験目的 .....	6
3.4	規制に関する情報 .....	6
3.4.1	GLP .....	6
3.4.2	毒性試験ガイドライン .....	6
3.5	試験委託者 .....	6
3.6	試験受託者 .....	6
3.7	試験施設 .....	7
3.8	試験責任者 .....	7
3.9	試験担当者 .....	7
3.10	試験日程 .....	7
3.11	予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのあ る事態及び試験計画書に従わなかったこと .....	7
3.12	資料保存 .....	7
3.13	試験責任者の署名 .....	8
4.	要約 .....	9
5.	緒言 .....	10
6.	試験材料 .....	10
6.1	被験物質及び陰性対照物質（溶媒） .....	10
6.1.1	被験物質 .....	10
6.1.2	陰性対照物質（溶媒） .....	11
6.2	被験液の調製 .....	11
6.2.1	細胞増殖抑制試験 .....	11
6.2.1.1	調製方法 .....	11
6.2.1.2	調製頻度 .....	11
6.2.2	染色体異常試験 .....	12
6.2.2.1	調製方法 .....	12
6.2.2.2	調製頻度 .....	12
6.3	陽性対照物質 .....	12
6.3.1	陽性対照物質 1 .....	12
6.3.2	陽性対照物質 2 .....	13
6.4	試験系及びその選択理由 .....	13

6.4.1	細胞株.....	13
6.5	試薬.....	14
6.5.1	S9 mix.....	14
6.5.2	培養液.....	15
7.	試験方法.....	15
7.1	容器及びスライド標本の識別法.....	15
7.2	用量の設定.....	16
7.2.1	細胞増殖抑制試験.....	16
7.2.2	染色体異常試験.....	16
7.3	培養容器数及び培養条件.....	16
7.4	処理方法.....	16
7.4.1	細胞増殖抑制試験.....	16
7.4.2	染色体異常試験.....	17
7.5	細胞毒性に関連するデータの表示.....	18
7.6	染色体標本の観察.....	18
7.6.1	観察手順.....	18
7.6.2	染色体異常の分類.....	19
7.7	統計解析.....	19
7.8	試験成立基準.....	20
7.9	結果の判定基準.....	20
7.10	確認試験.....	20
8.	試験結果.....	20
8.1	細胞増殖抑制試験.....	20
8.2	染色体異常試験.....	21
8.3	試験の成立.....	21
9.	考察.....	21
10.	結論.....	22

## 添付資料

Attachment 1	Historical Data of the Chromosomal Aberration Tests in CHL/IU Cells.....	23
--------------	---	----

## 表

Table 1	Results of the chromosomal aberration test [Short-term treatment: -S9 mix].....	24
Table 2	Results of the chromosomal aberration test [Short-term treatment: +S9 mix].....	25
Table 3	Results of the chromosomal aberration test [Continuous	

treatment: 24h] ..... 26

付表

Appendix 1	Results of the cell-growth inhibition test [Short-term treatment: -S9 mix] ..... 27
Appendix 2	Results of the cell-growth inhibition test [Short-term treatment: +S9 mix] ..... 28
Appendix 3	Results of the cell-growth inhibition test [Continuous treatment: 24h] ..... 29
Appendix 4	Results of the chromosomal aberration test [Short-term treatment: -S9 mix] ..... 30
Appendix 5	Results of the chromosomal aberration test [Short-term treatment: +S9 mix] ..... 31
Appendix 6	Results of the chromosomal aberration test [Continuous treatment: 24h] ..... 32
Appendix 7	Population doubling in the cell-growth inhibition test..... 33
Appendix 8	Population doubling in the chromosomal aberration test .. 34
信頼性保証書	..... 35

T-G796

### 3. 試験実施概要

#### 3.1 試験番号

T-G796

#### 3.2 試験表題

*N*-エチルジエタノールアミン：チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験

#### 3.3 試験目的

チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞の培養細胞（CHL/IU）を用いて、*N*-エチルジエタノールアミンの染色体異常誘発能を検討した。

#### 3.4 規制に関する情報

##### 3.4.1 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」  
(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環境企発第 110331010 号)

##### 3.4.2 毒性試験ガイドライン

- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」  
(平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長連名通知) (最終改正：平成 30 年 3 月 29 日)
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 473: *In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test」  
(2016 年 7 月 29 日)

#### 3.5 試験委託者

厚生労働省

医薬局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室

〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

#### 3.6 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

T-G796

### 3.7 試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所  
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

### 3.8 試験責任者

■■■■ ■■■■  
株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

### 3.9 試験担当者

被験物質管理責任者 : ■■■■ ■■■■  
試験担当者 : ■■■■ ■■■■■■ ■■■■■■■■ ■■■■■■■■ ■■■■

### 3.10 試験日程

試験開始日 : 2023年12月13日  
被験物質受領日 : 2023年11月1日  
細胞増殖抑制試験  
実験開始日 : 2023年12月15日  
実験終了日 : 2023年12月19日  
染色体異常試験  
実験開始日 : 2024年1月15日  
実験終了日 : 2024年2月6日 (短時間処理法)  
2024年2月8日 (連続処理法)  
試験終了日 : 2024年3月19日

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

本試験に関し、予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

### 3.12 資料保存

試験計画書原本(試験計画書変更書含む)、記録文書、生データ、被験物質保存試料、報告書類(最終報告書の原本を含む)及び染色体標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、その期間は試験終了後10年間とする。期間終了後の取り扱いについては、厚生労働省 医薬局 医薬品審査管理課 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。

T-G796

3.13 試験責任者の署名



2024年3月19日

---

試験責任者

株式会社ポゾリサーチセンター 東京研究所



#### 4. 要約

*N*-エチルジエタノールアミンの染色体異常誘発能を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の用量を設定するため、1340 µg/mL (10 mM相当)を最高用量とし、以下公比2で除した計8用量を設定し、細胞増殖抑制試験を行った。その結果、細胞増殖抑制率(100-RPD)は、連続処理法の最高用量である1340 µg/mLで50%以上を示し、短時間処理法では50%以上を示さなかった。50%細胞増殖抑制濃度(IC<sub>50</sub>)は、連続処理法で716 µg/mLと算出された。以上の結果より、染色体異常試験の用量は、短時間処理法では1340 µg/mLを最高用量とし、以下公比2で除した3用量を、連続処理法では1200 µg/mLを最高用量とし、以下公差150 µg/mLで減じた1050、900、750、600、450、300及び150 µg/mLの計8用量を設定した。

染色体異常試験では、短時間処理法は全ての用量を観察した。連続処理法では細胞増殖抑制率が55 ± 5%を示した用量を最高用量とし、600、450及び300 µg/mLの3用量を観察した。その結果、染色体構造異常(TA)及び数的異常(倍数性細胞及び核内倍加細胞)の出現頻度はいずれの処理法においても陰性対照群との比較で有意差はみられなかった。

なお、すべての処理法で、試験成立の基準を満たしたため、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、*N*-エチルジエタノールアミンは染色体異常試験条件下において、染色体構造異常及び数的異常を誘発しない(陰性)と結論した。

T-G796

## 5. 緒言

*N*-エチルジエタノールアミンのチャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (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。

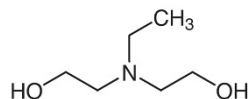
## 6. 試験材料

### 6.1 被験物質及び陰性対照物質 (溶媒)

#### 6.1.1 被験物質

以下の情報は非 GLP で実施された分析結果に基づく。なお、水及びジメチルスルホキシド (DMSO) の溶解性及び溶媒中での安定性は株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性検討の結果による。

製造者 : ██████████  
名称 : *N*-エチルジエタノールアミン  
別名 : 2,2'-Ethyliminodiethanol、  
*N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)ethylamine  
CAS 番号 : 139-87-7  
官報公示整理番号 : (2)-2408 (化審法)  
構造式又は示性式 :



分子式 : C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>  
分子量 : 133.19  
ロット番号 : ██████████  
入手量 : 25 mL  
純度 : 99.8%(GC)  
不純物の名称及び濃度 : 不明  
外観 : ごくうすい黄色透明液体  
沸点 : 251°C  
引火点 : 124°C  
安定性 : 適切な条件下においては安定  
使用期限 : 不明  
溶解度 : 水 ; 13.4 mg/mL で溶解  
DMSO ; 134 mg/mL で溶解  
溶媒中での安定性 : 水及び DMSO ; 発熱、ガスの発生等の反応性がなかつ

	た
保存条件	: 冷暗所（許容範囲：1~15°C、実測値は許容範囲内であった）・密栓・不活性ガス充填
保存場所	: 被験物質保存室
取扱い上の注意	: 取扱いは換気の良い場所で行う。適切な保護具を着用する。漏れ、あふれ、飛散しないよう注意し、みだりに蒸気を発生させない。取扱い後は手や顔などをよく洗う。蒸気やエアゾールが発生する場合には、換気、局所排気を用いる。皮膚、眼および衣類との接触を避ける。
保存試料	: 被験物質約 1 g を保存試料として保存した。保存試料は Ames 試験（試験番号：T-4074）と共通とした。
残余品の処理	: 使用後の残余は全て廃棄した。

### 6.1.2 陰性対照物質（溶媒）

名称	: 注射用水
規格	: 日本薬局方
メーカー	: 株式会社大塚製薬工場
ロット番号	: 3C78N
保存条件	: 室温
保存場所	: 標本作製室
溶媒の選択理由	: 被験物質の溶解性が良好であり、発泡、発熱、吸熱は認められなかった。 <i>in vitro</i> の遺伝毒性試験に広く用いられており、背景データが豊富であることから選択した。

## 6.2 被験液の調製

調製操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

### 6.2.1 細胞増殖抑制試験

#### 6.2.1.1 調製方法

10 mL のメスフラスコに被験物質 0.1340 g を秤量し、適量の溶媒を加えて溶解させたのち更に溶媒を加えて 10 mL とし、最高用量群液（調製濃度：13.4 mg/mL）を調製した。これを、溶媒で段階的に希釈（公比 2）して、6.70、3.35、1.68、0.838、0.419、0.209 及び 0.105 mg/mL 液とし、計 8 濃度を調製した。この時の用量（細胞暴露濃度）については第 7.2.1 項参照。

#### 6.2.1.2 調製頻度

用時に調製し、調製後 1 時間以内に使用した。

## 6.2.2 染色体異常試験

### 6.2.2.1 調製方法

25 mL のメスフラスコに被験物質 0.3350 g を秤量し、適量の溶媒を加えて溶解させたのち更に溶媒を加えて 25 mL とし、最高用量群液（調製濃度：13.4 mg/mL）を調製した。これを、溶媒で段階的に希釈（公比 2）して、6.70 及び 3.35 mg/mL 液とした。更に、13.4 mg/mL 液を希釈し、12.0 mg/mL 液を調製し、これを公差 1.50 mg/mL で希釈し、10.5、9.00、7.50、6.00、4.50、3.00 及び 1.50 mg/mL の計 11 濃度を調製した。短時間処理法では、13.4、6.70、3.35 mg/mL 液を、連続処理法では、12.0、10.5、9.00、7.50、6.00、4.50、3.00、1.50 mg/mL 液を使用した。この時の用量（細胞暴露濃度）については第 7.2.2 項参照。

### 6.2.2.2 調製頻度

用時に調製し、調製後 1 時間以内に使用した。

## 6.3 陽性対照物質

以下の 2 つの化合物を用いた。これらの陽性対照物質はガイドライン(OECD TG473)で推奨され、*in vitro* 染色体異常試験に広く使用されており、また、背景データが豊富であることから選択した。

### 6.3.1 陽性対照物質 1

#### 1) マイトマイシン（代謝活性化無し）

名称	: Mitomycin C（略称：MMC）
CAS 番号	: 50-07-7
メーカー	: 協和キリン株式会社
ロット番号	: 013MBK01
保存条件	: 室温
保存場所	: 培養細胞試験室

#### 2) MMC 溶液の調製

用時に調製した。

MMC (2 mg/vial) 1 瓶に生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K3F98）2 mL を加えて溶解し、1 mg/mL 溶液とした。この液を生理食塩液で更に 400 倍希釈して 2.5 µg/mL 溶液とした。

#### 3) MMC の用量

短時間処理法（代謝活性化無し）で 0.075 µg/mL、連続処理法で 0.050 µg/mL とした。



T-G796

## 6.5 試薬

### 6.5.1 S9 mix

#### 1) S9

名称	: S-9
メーカー	: オリエンタル酵母工業株式会社
内容量	: 2 mL/バイアル
ロット番号	: 23090106 (細胞増殖抑制試験)、23092907 (染色体異常試験)
由来	: SD系雄ラット、肝臓
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)
誘導物質の処理	: PB: 4日間腹腔内投与(30、60、60及び60 mg/kg) BF: PB投与3日目に単回腹腔内投与(80 mg/kg)
製造日	: 2023年9月15日(ロット番号; 23090106) 2023年9月29日(ロット番号; 23092907)
使用期限	: 2024年2月29日(ロット番号; 23090106) 2024年3月28日(ロット番号; 23092907)
週齢・性	: 7週齢・雄
平均体重	: 219.3 ± 8.7 g(ロット番号; 23090106) 220.8 ± 8.4 g(ロット番号; 23092907)
保存条件	: 冷凍(-70°C以下)
保存場所	: 培養細胞試験室

#### 2) コファクター

名称	: Cofactor C
メーカー	: オリエンタル酵母工業株式会社
内容量	: 4.7 mL/バイアル
ロット番号	: C23083006 (細胞増殖抑制試験)、C23092707 (染色体異常試験)
使用期限	: 2024年2月29日(ロット番号; C23083006) 2024年3月26日(ロット番号; C23092707)
保存条件	: 冷凍(-70°C以下)
保存場所	: 培養細胞試験室

#### 3) S9 mixの調製方法

用時調製した。S9とコファクターを2:4.7の割合(各1バイアル)で無菌的に混合してS9 mixを調製した。S9 mixの組成(1 mL中)を以下に示す。

水	: 0.7 mL
S9	: 0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	: 5 µmol
KCl	: 33 µmol

T-G796

グルコース-6-リン酸 : 5  $\mu$ mol  
酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP)  
: 4  $\mu$ mol  
HEPES 緩衝液 (pH7.2)  
: 4  $\mu$ mol

## 6.5.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM)に非働化した牛血清 (bovine serum、BS) を最終濃度が 10v/v%となるように添加した培養液 (10%BS-MEM) を調製した。調製後の培養液は冷蔵保存し、1 箇月以内に使用した。

### 1) 牛血清

メーカー : Thermo Fisher Scientific Inc.  
ロット番号 : 2659245  
保存条件 : 冷凍 (-20°C 以下)  
保存場所 : 培養細胞試験室

### 2) Minimum Essential Medium (MEM)

メーカー : Thermo Fisher Scientific Inc.  
ロット番号 : 2645336 (細胞増殖抑制試験)、2537078 (染色体異常試験)  
保存条件 : 冷蔵  
保存場所 : 標本作製室

## 7. 試験方法

各処理法の概略を以下に示す。

短時間処理法 (代謝活性化無し)

: S9 mix 非存在下で被験物質/対照物質 6 時間処理、その後 10%BS-MEM 培養液で 18 時間培養 (回復培養)

短時間処理法 (代謝活性化有り)

: S9 mix 存在下で被験物質/対照物質 6 時間処理、その後 10%BS-MEM 培養液で 18 時間培養 (回復培養)

連続処理法 (代謝活性化無し)

: S9 mix 非存在下で被験物質/対照物質 24 時間処理

### 7.1 容器及びスライド標本の識別法

容器は試験番号、試験群・処理法及び用量を示す記号・数字で識別した。染色体観察用のスライドは盲検法による観察のため、試験番号及び各容器に対応したコード番号を記したラベルで識別した。

## 7.2 用量の設定

### 7.2.1 細胞増殖抑制試験

各処理法における用量を設定する目的で、細胞毒性/細胞増殖抑制及び被験液添加による培養液性状の変化（沈殿物の有無を含む）を検討した。細胞毒性/細胞増殖抑制の強さは細胞集団倍加数（Population Doubling : PD）及び相対細胞集団倍加数（Relative Population Doubling : RPD）から算出する細胞増殖抑制率により推定した（詳細は第7.4.1項参照）。

最高用量は、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」に基づいて1340 µg/mL（10 mM相当）とした。以下、公比2で除して670、335、168、83.8、41.9、20.9及び10.5 µg/mLを設け、計8用量を各処理法に設定した。

被験物質処理群に加え、各処理法に陰性対照群を設けた。

### 7.2.2 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験における細胞増殖抑制率（100－RPD）は、連続処理法の最高用量である1340 µg/mLで50%以上を示し、短時間処理法では50%以上を示さなかった。50%細胞増殖抑制濃度（IC<sub>50</sub>）は、連続処理法で716 µg/mLと算出された。また、いずれの処理法でも、沈殿は認められなかった。以上の結果より、染色体異常試験の用量は、短時間処理法では1340 µg/mLを最高用量とし、以下公比2で除した670及び335 µg/mLの計3用量を、連続処理法では1200 µg/mLを最高用量とし、以下公差150 µg/mLで減じた1050、900、750、600、450、300及び150 µg/mLの計8用量を設定した。

また、被験物質処理群に加えて各処理法に陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

## 7.3 培養容器数及び培養条件

### 1) 培養容器数

培養にはγ線滅菌済みプラスチック製のプレート（直径60 mmシャーレ）を用いた。

細胞増殖抑制試験では各群1系列（single culture:培養終了時の細胞濃度測定用）、染色体異常試験では各群3系列（triplicate culture:2系列を染色体標本作製用、1系列を培養終了時の細胞濃度測定用）とした。

また、細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験とも、別に1枚のプレートを処理開始時の細胞濃度測定用として使用した。

### 2) 培養条件

温度37°C、加湿及び5%CO<sub>2</sub>下で培養した。

## 7.4 処理方法

### 7.4.1 細胞増殖抑制試験

試験操作のうち1)～5)の操作については、無菌環境下で実施した。



- 1) プレート（培養液 5.0 mL）当たり  $2 \times 10^4$  個の細胞を播種し、3日間培養した。
- 2) 培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態に異常がないことを確認した。
- 3) 下表に従って、培養液を除去し、陰性対照液又は被験液、あるいは S9 mix を添加した。

また、処理開始時細胞濃度測定用のプレート 1 枚について、0.25% trypsin 処理後に細胞を回収し、血球計算盤を用いて処理開始時の細胞濃度を測定した。

処理内容	短時間処理法		連続処理法
	代謝活性化無し	代謝活性化有り	
培養液除去量	0.500 mL	1.333 mL	0.500 mL
S9 mix 添加量 (S9 蛋白最終濃度)		0.833 mL (1.164 mg/mL)	
陰性対照液又は 被験液添加量	0.500 mL	0.500 mL	0.500 mL

- 4) 上記操作直後に、処理培養液の色調を肉眼で観察し、また、倒立位相差顕微鏡下で沈殿の有無を観察した。その後、短時間処理法では 6 時間、連続処理法では 24 時間培養（処理）した。
- 5) 短時間処理法では、6 時間の処理後、倒立位相差顕微鏡下で沈殿の有無と細胞の状態を観察した。次いで、処理培養液を捨て、2%牛血清添加生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい 10%BS-MEM 培養液 5.0 mL を加えて 18 時間培養（回復培養）した。
- 6) 培養終了後に、倒立位相差顕微鏡下で沈殿の有無と細胞の状態を観察した。
- 7) 次いで、各プレートを 0.25% trypsin で処理して細胞を回収し、血球計算盤を用いて培養終了時の細胞濃度を測定した。
- 8) 処理開始時及び培養終了時の細胞濃度から、次の式 1 及び 2 に従い、各群の PD 及び RPD を算出した。

$$PD = \frac{\log(\text{培養終了時の細胞濃度} \div \text{処理開始時の細胞濃度})}{\log 2} \quad \text{[式 1]}$$

$$RPD (\%) = \frac{(\text{被験物質処理群における PD})}{(\text{陰性対照群における PD})} \times 100 \quad \text{[式 2]}$$

- 9) RPD から細胞増殖抑制率 (=100-RPD) を算出した。細胞増殖抑制率が 50%以上の用量がみられたため、50%を挟む 2 点の直線式から、 $IC_{50}$  を算出した。

#### 7.4.2 染色体異常試験

- 1) 第 7.4.1 項の 1) ~ 2) と同じ操作を行った（処理開始時の細胞濃度測定を含む）。
- 2) 下表に従って、培養液を除去し、陰性対照液、被験液又は陽性対照液、あるいは

S9 mix を添加し、各処理群における処理培養液とした。

処理内容	短時間処理法		連続処理法
	代謝活性化無し	代謝活性化有り	
培養液除去量	0.500 mL (0.150 mL)*	1.333 mL (0.933 mL)*	0.500 mL (0.100 mL)*
S9 mix 添加量 (S9 蛋白最終濃度)	/		0.833 mL (1.034 mg/mL)
陰性対照液又は 被験液添加量	0.500 mL	0.500 mL	0.500 mL
陽性対照液 添加量	MMC: 0.150 mL	CP: 0.100 mL	MMC: 0.100 mL

\* : 陽性対照群での培養液除去量

- 3) 第 7.4.1 項の 4)~5) と同じ操作を行った (処理直後及び短時間処理法での 6 時間培養後の培養液と細胞の観察を含む)。  
ただし、各群 2 枚の染色体標本作製用プレートについては、培養終了の約 2 時間前にコルセミド (デメコルシン溶液、10 µg/mL) を 0.1 mL 加えた。
- 4) 培養終了後、各濃度群 2 枚の染色体標本作製用プレートについて、以下の手順で染色体標本作製した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。  
0.25% trypsin 処理後に細胞を回収し、0.075 M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理した後、カルノア固定液 (メチルアルコール/酢酸、3/1、v/v) 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 箇所水滴下し、風乾したのちギムザ液で染色して染色体標本とした。
- 5) 各群の残りの 1 枚のプレート (細胞濃度測定用プレート) を用いて沈殿物の有無及び細胞の状態を確認した。次いで、第 7.4.1 項の 7) 及び 8) の手順で PD、RPD 及び細胞増殖抑制率を算出した。

## 7.5 細胞毒性に関連するデータの表示

細胞濃度、RPD 及び細胞増殖抑制率は、四捨五入により整数表示、PD は四捨五入により小数点第 2 位まで表示した。また、IC<sub>50</sub> は有効数字 3 桁で表示した。

## 7.6 染色体標本の観察

### 7.6.1 観察手順

染色体が良く展開し、染色体モード数±2 のセントロメアを含んだ分裂中期像の細胞を顕微鏡下 (倍率: ×600) で各群 300 個 (2 系列×150 個/系列) 観察し、構造異常の種類と異常を持つ細胞の出現数を計数し、出現率を算出した。同時に数的異常 (倍数体及び核内倍加細胞を区別して計数する) の出現数を計数し、出現率を算出した。観察は盲検法により行った。

陰性対照群、陽性対照群及び短時間処理法の被験物質処理群は全て観察した。連続処理法の被験物質処理群は、細胞増殖抑制率が 55 ± 5% を示した用量を最高用量とし

た3用量である600、450及び300 µg/mLを観察した。

### 7.6.2 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更に以下のように定義・分類した。なお、構造異常については、ギャップを含む場合 (Total number of cells with aberration including gap : TAG) と含まない場合 (Total number of cells with aberration excluding gap : TA) に分けて集計した。

#### 1) 構造異常

ギャップ (g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)におけるギャップとは染色分体の同軸線上に、染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるもの

染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸線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線上にあっても、非染色部位の長さが染色分体の幅以上に離れているもの

染色分体型交換(cte) : 2カ所以上で生じた切断が相互に再結合する異常であり、染色体内交換と染色体間交換に分類できる。四放射状交換、三放射状交換などがある

染色体型切断(csb) : 分類はctbに準ずる。非染色部位が染色体の同軸線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線上にあっても、非染色部位の長さが染色分体の幅以上に長いもの

染色体型交換(cse) : 染色体内交換と染色体間交換に分類できる。二動原体染色体、環状染色体などがある

その他(other) : 断片化(frg)などがある

#### 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、倍加したもの (3倍体、4倍体など)。

倍数性 : 倍数性細胞 (polyploid cell)  
核内倍加の細胞 (cells with endoreduplicated chromosomes)

### 7.7 統計解析

それぞれの処理法ごとに、ギャップを含まない場合 (TA) の染色体構造異常を有する細胞の総頻度、数的異常を有する細胞 (倍数性細胞及び核内倍加細胞の合計) の総頻度について、以下の統計解析を行った。陰性対照群と被験物質処理群間で Fisher の直接確率計算法による対比較 (有意水準 : 0.05、片側) を行った。いずれの処理法でも被験物質処理群に有意な増加はみられなかったため、Cochran Armitage の傾向検定 (有意水準 : 0.05、片側) は実施しなかった。

また、染色体構造異常については、陰性対照群と陽性対照群との間でも Fisher の直接確率計算法による対比較（有意水準：0.05、片側）を行った。

いずれの検定も増加を示す場合についてのみ評価した。

## 7.8 試験成立基準

以下に示す全ての基準を満たした場合、試験成立とする。

- 1) 観察可能な用量が3用量以上あること
- 2) 陰性対照群における染色体異常の出現率が、陰性対照群背景データの95%管理範囲内 ( $\text{Mean} \pm 1.96 \text{ SD}$ ) であること
- 3) 陽性対照群における染色体構造異常の出現頻度が、陰性対照群と比べて有意な増加を示すこと
- 4) 試験（培養）環境に問題が認められないこと

## 7.9 結果の判定基準

以下の全ての基準を満たす場合、被験物質は染色体構造異常又は数的異常（倍数性細胞及び核内倍加細胞）誘発性を有する（陽性）と判定する。

- 1) 少なくとも1つの被験物質濃度群における染色体異常出現頻度が、陰性対照群と比べて有意な増加を示す
- 2) 上記の増加には Cochran Armitage の傾向検定で有意な用量依存性がみられる
- 3) 増加を示した被験物質濃度群の出現率が、陰性対照群背景データの95%管理範囲外である

## 7.10 確認試験

確認試験は実施しなかった。

## 8. 試験結果

### 8.1 細胞増殖抑制試験

結果を Appendix 1~3、Appendix 7 に示した。

- 1) 培養液の色調変化  
すべての処理法で、335  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で赤紫色への色調変化がみられた。
- 2) 沈殿  
すべての処理法で沈殿はみられなかった。
- 3) 細胞毒性  
細胞増殖抑制率は、連続処理法の最高用量である 1340  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 50%以上を示し、短時間処理法では 50%以上を示さなかった。50%細胞増殖抑制濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は、連続処理法で 716  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と算出された。

## 8.2 染色体異常試験

結果を Table 1~3、Appendix 4~6 及び Appendix 8 に示した。

### 1) 培養液の色調変化

短時間処理法ではすべての用量で、連続処理法では 300 µg/mL 以上の用量で赤紫色への色調変化がみられた。

### 2) 沈殿

すべての処理法で沈殿はみられなかった。

### 3) 細胞毒性

細胞増殖抑制率は、連続処理法の 600 µg/mL 以上で 50%以上を示し、短時間処理法では 50%以上を示さなかった。

### 4) 観察結果

染色体構造異常 (TA) の出現頻度は、短時間処理法の非代謝活性化では 1340、670 及び 335 µg/mL の用量で 2、2 及び 1、短時間処理法の代謝活性化では 1340、670 及び 335 µg/mL の用量で 2、1 及び 2、連続処理法では 600、450 及び 300 µg/mL の用量で 4、4 及び 1 であり、対応する陰性対照群との間に有意差はみられなかった。

数的異常 (倍数性細胞及び核内倍加細胞の合計) の出現頻度は、短時間処理法の非代謝活性化では 1340、670 及び 335 µg/mL の用量で 4、3 及び 1、短時間処理法の代謝活性化では 1340、670 及び 335 µg/mL の用量で 2、1 及び 1、連続処理法では 600、450 及び 300 µg/mL の用量で 4、1 及び 1 であり、対応する陰性対照群との間に有意差はみられなかった。

## 8.3 試験の成立

すべての処理法で、7.8 項の基準を満たしたため、試験は適切に実施されたと考えられた。

## 9. 考察

*N*-エチルジエタノールアミンの染色体異常誘発能を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験では、短時間処理法は全ての用量を観察した。連続処理法では細胞増殖抑制率が  $55 \pm 5\%$ を示した用量を最高用量とし、600、450 及び 300 µg/mL の 3 用量を観察した。その結果、染色体構造異常 (TA) 及び数的異常 (倍数性細胞及び核内倍加細胞) の出現頻度はいずれの処理法においても陰性対照群との比較で有意差はみられなかった。

T-G796

## 10. 結論

*N*-エチルジエタノールアミンは染色体異常試験条件下において、染色体構造異常及び数的異常を誘発しない（陰性）と結論した。

### Historical Data of the Chromosomal Aberration Tests in CHL/IU Cells

Negative control				Positive control						
Short-term treatment (50 studies, 15600 cells)				Short-term treatment (50 studies, 15000 cells)						
S9 mix	Time	Poly (%)	TA (%)	Substance	S9 mix	Time	Poly (%)	TA (%)		
+	6	Mean	0.6	0.7	CP	+	6	Mean	0.0	60.8
		S.D.	0.3	0.3				S.D.	0.0	12.2
		UCL	1.2	1.3				UCL	0.0	84.7
		LCL	0.0	0.1				LCL	0.0	36.9
Short-term treatment (50 studies, 15600 cells)				Short-term treatment (50 studies, 15000 cells)						
S9 mix	Time	Poly (%)	TA (%)	Substance	S9 mix	Time	Poly (%)	TA (%)		
-	6	Mean	0.7	0.7	MMC	-	6	Mean	0.1	20.5
		S.D.	0.2	0.3				S.D.	0.2	5.7
		UCL	1.1	1.3				UCL	0.5	31.7
		LCL	0.3	0.1				LCL	0.0	9.3
Continuous treatment (50 studies, 15600 cells)				Continuous treatment (50 studies, 15000 cells)						
S9 mix	Time	Poly (%)	TA (%)	Substance	S9 mix	Time	Poly (%)	TA (%)		
-	24	Mean	0.7	0.7	MMC	-	24	Mean	0.1	23.6
		S.D.	0.3	0.3				S.D.	0.2	6.5
		UCL	1.3	1.3				UCL	0.5	36.3
		LCL	0.1	0.1				LCL	0.0	10.9

Cumulative background data of chromosome aberration tests in cultured Chinese hamster cells line (CHL/IU), carried out under the same study conditions at BoZo Research Center Inc. from April 2019 to July 2023.

Negative control: solvent or extraction vehicle of the test formulations (water for injection, dimethyl sulfoxide, acetone, culture medium or 0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

Positive control: CP; Cyclophosphamide, 14 µg/mL

MMC; Mitomycin C, 0.075 µg/mL (for the short-term treatment)

MMC; Mitomycin C, 0.050 µg/mL (for the continuous treatment)

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

Time : Duration of treatment. Short-term treatment (6-hour treatment) was followed by 18-hour non-treatment culture.

Poly : polyploid cells and endoreduplication cells

TA : total number of cells with aberrations excluding gaps

UCL : 95% control limits(upper control limit)

LCL : 95% control limits(lower control limit When calculated value was less than 0, LCL value was regarded as 0%)

20231212

Table 1 *N*-Ethylidethanolamine: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells  
Results of the chromosomal aberration test [Short-term treatment: -S9 mix]

Treatment (h)	S9 mix	Dose Level (µg/mL)	Plate	Number of cells with structural chromosomal aberration <sup>a), b)</sup>									RPD (%)	Plate	Number of cells with numerical chromosomal aberration <sup>b)</sup>				
				Cells <sup>c)</sup> observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA	g	TAG			Cells <sup>d)</sup> observed	Polyloid cell	Endore-duplicated cell	Total	
6	NC		1	150	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100	1	152	2	0	2
			2	150	1	0	0	0	0	1	0	1	0		2	151	1	0	1
			Total	300	1(0.3)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)		2(0.7)	Total	303	3(1.0)	0(0.0)
	335			1	150	1	0	0	0	0	1	0	1	86	1	150	0	0	0
				2	150	0	0	0	0	0	0	1	1		2	151	1	0	1
				Total	300	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	1(0.3)	2(0.7)		0(0.0)	2(0.7)	Total	301	1(0.3)
	670			1	150	0	0	0	0	0	0	1	1	86	1	153	3	0	3
				2	150	0	2	0	0	0	2	0	2		2	150	0	0	0
				Total	300	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.7)	1(0.3)	3(1.0)		0(0.0)	3(1.0)	Total	303	3(1.0)
	1340			1	150	1	0	0	0	0	1	0	1	63	1	152	2	0	2
				2	150	0	1	0	0	0	1	0	1		2	152	2	0	2
				Total	300	1(0.3)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)		0(0.0)	2(0.7)	Total	304	4(1.3)
PC			1	150	7	20	0	0	0	27	0	27	63	1	150	0	0	0	
			2	150	7	21	0	0	0	28	0	28		2	150	0	0	0	
			Total	300	14(4.7)	41(13.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	55*(18.3)	0(0.0)	55(18.3)		0(0.0)	55(18.3)	Total	300	0(0.0)	0(0.0)

a): ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation, g: chromatid or chromosome gap

b): Value in the parentheses indicates percentage against the total number of cells observed. c): Diploid cells d): Diploid, polyloid, and endoreduplicated cells

TA: Total number of cells with aberration excluding gap, TAG: Total number of cells with aberration including gap

NC: Negative control (water for injection)

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

RPD: Relative population doubling

\*:  $p < 0.05$  (significantly different from the negative control group by Fisher's exact test)



Table 2 *N*-Ethylidethanolamine: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells  
Results of the chromosomal aberration test [Short-term treatment: +S9 mix]

Treatment (h)	S9 mix	Dose Level (µg/mL)	Plate	Number of cells with structural chromosomal aberration <sup>a), b)</sup>									RPD (%)	Plate	Number of cells with numerical chromosomal aberration <sup>b)</sup>				
				Cells <sup>c)</sup> observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA	g	TAG			Cells <sup>d)</sup> observed	Polyloid cell	Endore-duplicated cell	Total	
6	+	NC	1	150	1	0	0	0	0	0	1	0	1	100	1	151	1	0	1
			2	150	1	0	0	0	0	0	1	0	1	100	2	152	2	0	2
			Total	300	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)	100	Total	303	3(1.0)	0(0.0)	3(1.0)
		335	1	150	1	0	0	0	0	0	1	0	1	101	1	150	0	0	0
			2	150	0	1	0	0	0	0	1	0	1	101	2	151	1	0	1
			Total	300	1(0.3)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)	101	Total	301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)
	670	1	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	86	1	151	1	0	1	
		2	150	1	0	0	0	0	0	1	0	1	86	2	150	0	0	0	
		Total	300	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)	86	Total	301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)	
	1340	1	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57	1	151	1	0	1	
		2	150	0	2	0	0	0	0	2	0	2	57	2	151	1	0	1	
		Total	300	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)	57	Total	302	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)	
PC	1	150	12	96	0	0	0	0	105	0	105	51	1	150	0	0	0		
	2	150	19	84	0	0	0	0	98	0	98	51	2	150	0	0	0		
	Total	300	31(10.3)	180(60.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	203*(67.7)	0(0.0)	203(67.7)	51	Total	300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

a): ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation, g: chromatid or chromosome gap

b): Value in the parentheses indicates percentage against the total number of cells observed. c): Diploid cells d): Diploid, polyloid, and endoreduplicated cells

TA: Total number of cells with aberration excluding gap, TAG: Total number of cells with aberration including gap

NC: Negative control (water for injection)

PC: Positive control (CP; cyclophosphamide monohydrate, 14 µg/mL)

RPD: Relative population doubling

\*:  $p < 0.05$  (significantly different from the negative control group by Fisher's exact test)

Table 3 *N*-Ethyldiethanolamine: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells  
Results of the chromosomal aberration test [Continuous treatment: 24h]

Treatment (h)	S9 mix	Dose Level (µg/mL)	Plate	Number of cells with structural chromosomal aberration <sup>a), b)</sup>									RPD (%)	Plate	Number of cells with numerical chromosomal aberration <sup>b)</sup>				
				Cells <sup>c)</sup> observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA	g	TAG			Cells <sup>d)</sup> observed	Polyloid cell	Endore-duplicated cell	Total	
24	-	NC	1	150	0	0	0	0	0	0	0	1	1	100	1	151	1	0	1
			2	150	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	100	2	150	0	0
			Total	300	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	1(0.3)	2(0.7)		Total	301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)
			300	1	150	0	1	0	0	0	1	0	1		1	150	0	0	0
				2	150	0	0	0	0	0	0	0	0	89	2	151	1	0	1
			Total	300	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)		Total	301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)
			450	1	150	1	0	0	0	0	1	1	2		1	151	1	0	1
				2	150	2	1	0	0	0	3	0	3	82	2	150	0	0	0
			Total	300	3(1.0)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(1.3)	1(0.3)	5(1.7)		Total	301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)	
			600	1	150	0	2	0	0	0	2	1	3		1	152	2	0	2
				2	150	1	1	0	0	0	2	2	4	47	2	152	2	0	2
			Total	300	1(0.3)	3(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(1.3)	3(1.0)	7(2.3)		Total	304	4(1.3)	0(0.0)	4(1.3)	
		PC	1	150	10	26	0	0	0	34	0	34		1	150	0	0	0	
			2	150	13	33	0	0	0	44	0	44	71	2	150	0	0	0	
		Total	300	23(7.7)	59(19.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	78*(26.0)	0(0.0)	78(26.0)		Total	300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

a): ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation, g: chromatid or chromosome gap

b): Value in the parentheses indicates percentage against the total number of cells observed. c): Diploid cells d): Diploid, polyloid, and endoreduplicated cells

TA: Total number of cells with aberration excluding gap, TAG: Total number of cells with aberration including gap

NC: Negative control (water for injection)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 µg/mL)

RPD: Relative population doubling

\*:  $p < 0.05$  (significantly different from the negative control group by Fisher's exact test)

Appendix 1 *N*-Ethyl-diethanolamine: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cellsResults of the cell-growth inhibition test  
[Short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)	RPD <sup>a)</sup> (%)	Cell-growth inhibition rate (%) <sup>b)</sup>	Condition of cells <sup>c, e)</sup>		Condition of culture medium <sup>d)</sup>				
S9 mix	Treatment (h)				1)	2)	Color <sup>f)</sup>	Precipitates <sup>g)</sup>			
								1)	2)	3)	
-	6	0 (NC)	100	0	-	-	-	-	-	-	
		Test article	10.5	102	-2	-	-	-	-	-	-
			20.9	96	4	-	-	-	-	-	-
			41.9	96	4	-	-	-	-	-	-
			83.8	104	-4	-	-	-	-	-	-
			168	99	1	-	-	-	-	-	-
			335	85	15	-	-	reddish purple	-	-	-
			670	88	12	++	-	reddish purple	-	-	-
1340	51	49	+++	+	reddish purple	-	-	-			
Concentration of 50% cell-growth inhibition : Not determined											

NC : Negative control (water for injection)

a) RPD (relative population doubling) = PD (population doubling) of treated group / PD of negative control group × 100

b) Cell-growth inhibition rate was shown as 100 - RPD.

c) Condition of cells was observed 1): at the end of the treatment and 2): at the end of incubation.

d) Color of culture medium was observed immediately after addition of the test solutions. Presence or absence of precipitates was examined 1): immediately after addition of the test solution, 2): at the end of the treatment, 3): at the end of

e) -: Most of the cells were attached to the plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

+: A small number of cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

++: Approximately half of cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

Appendix 2 *N*-Ethyl-diethanolamine: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cellsResults of the cell-growth inhibition test  
[Short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)	RPD <sup>a)</sup> (%)	Cell-growth inhibition rate (%) <sup>b)</sup>	Condition of cells <sup>c, e)</sup>		Condition of culture medium <sup>d)</sup>				
S9 mix	Treatment (h)				Color <sup>f)</sup>		Precipitates <sup>g)</sup>				
					1)	2)	1)	2)	3)		
+	6	0 (NC)	100	0	-	-	-	-	-	-	
		Test article	10.5	98	2	-	-	-	-	-	-
			20.9	96	4	-	-	-	-	-	-
			41.9	98	2	-	-	-	-	-	-
			83.8	96	4	-	-	-	-	-	-
			168	90	10	-	-	-	-	-	-
			335	93	7	-	-	reddish purple	-	-	-
			670	75	25	+	-	reddish purple	-	-	-
1340	65	35	+++	+	reddish purple	-	-	-			
Concentration of 50% cell-growth inhibition : Not determined											

NC : Negative control (water for injection)

a) RPD (relative population doubling) = PD (population doubling) of treated group / PD of negative control group × 100

b) Cell-growth inhibition rate was shown as 100 - RPD.

c) Condition of cells was observed 1): at the end of the treatment and 2): at the end of incubation.

d) Color of culture medium was observed immediately after addition of the test solutions. Presence or absence of precipitates was examined 1): immediately after addition of the test solution, 2): at the end of the treatment, 3): at the end of

e) -: Most of the cells were attached to the plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

+: A small number of cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

Appendix 3 *N*-Ethyl-diethanolamine: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cellsResults of the cell-growth inhibition test  
[Continuous treatment: 24h]

Study type		Concentration (µg/mL)	RPD <sup>a)</sup> (%)	Cell-growth inhibition rate (%) <sup>b)</sup>	Condition of cells <sup>c, e)</sup>	Condition of culture medium <sup>d)</sup>			
S9 mix	Treatment (h)					Color <sup>f)</sup>	Precipitates <sup>g)</sup>		
							1)	2)	
-	24	0 (NC)	100	0	-	-	-	-	
		Test article	10.5	94	6	-	-	-	-
			20.9	97	3	-	-	-	-
			41.9	97	3	-	-	-	-
			83.8	92	8	-	-	-	-
			168	88	12	-	-	-	-
			335	83	17	-	reddish purple	-	-
			670	56	44	++	reddish purple	-	-
1340	-32	132	+++	reddish purple	-	-			
Concentration of 50% cell-growth inhibition : 716 µg/mL									

NC : Negative control (water for injection)

a) RPD (relative population doubling) = PD (population doubling) of treated group / PD of negative control group × 100

b) Cell-growth inhibition rate was shown as 100 - RPD.

c) Condition of cells was observed at the end of the treatment.

d) Color of culture medium was observed immediately after addition of the test solutions. Presence or absence of precipitates was examined 1): immediately after addition of the test solution, and 2): at the end of the incubation.

e) -: Most of the cells were attached to the plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

++: Approximately half of cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

Appendix 4 *N*-Ethylthiethanolamine: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells

## Results of the chromosomal aberration test

[Short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)	RPD <sup>a)</sup> (%)	Cell-growth inhibition rate (%) <sup>b)</sup>	Condition of cells <sup>c, e)</sup>		Condition of culture medium <sup>d)</sup>				
S9 mix	Treatment (h)				Condition of cells <sup>c, e)</sup>		Color <sup>f)</sup>	Precipitates <sup>g)</sup>			
					1)	2)		1)	2)	3)	
-	6	0 (NC)	100	0	-	-	-	-	-	-	
		Test article	335	86	14	-	-	reddish purple	-	-	-
			670	86	14	++	-	reddish purple	-	-	-
			1340	63	37	+++	+	reddish purple	-	-	-
		PC	63	37	-	-	-	-	-	-	-

NC : Negative control (water for injection)

PC : Positive control (Mitomycin C: 0.075 µg/mL)

a) RPD (relative population doubling) = PD (population doubling) of treated group / PD of negative control group × 100

b) Cell-growth inhibition rate was shown as 100 - RPD.

c) Condition of cells was observed 1): at the end of the treatment and 2): at the end of incubation.

d) Color of culture medium was observed immediately after addition of the test solutions. Presence or absence of precipitates was examined 1): immediately after addition of the test solution, 2): at the end of the treatment, 3): at the end of

e) -: Most of the cells were attached to the plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

+ : A small number of cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

++ : Approximately half of cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

Appendix 5 *N*-Ethyl-diethanolamine: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cellsResults of the chromosomal aberration test  
[Short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)	RPD <sup>a)</sup> (%)	Cell-growth inhibition rate (%) <sup>b)</sup>	Condition of cells <sup>c, e)</sup>		Condition of culture medium <sup>d)</sup>				
S9 mix	Treatment (h)				Color <sup>f)</sup>	Precipitates <sup>g)</sup>					
						1)	2)	1)	2)	3)	
+	6	0 (NC)	100	0	-	-	-	-	-	-	
		Test article	335	101	-1	-	-	reddish purple	-	-	-
			670	86	14	+	-	reddish purple	-	-	-
			1340	57	43	+++	+	reddish purple	-	-	-
		PC	51	49	-	-	-	-	-	-	-

NC : Negative control (water for injection)

PC : Positive control (Cyclophosphamide monohydrate: 14 µg/mL)

a) RPD (relative population doubling) = PD (population doubling) of treated group / PD of negative control group × 100

b) Cell-growth inhibition rate was shown as 100 - RPD.

c) Condition of cells was observed 1): at the end of the treatment and 2): at the end of incubation.

d) Color of culture medium was observed immediately after addition of the test solutions. Presence or absence of precipitates was examined 1): immediately after addition of the test solution, 2): at the end of the treatment, 3): at the end of

e) -: Most of the cells were attached to the plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

+: A small number of cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

Results of the chromosomal aberration test  
[Continuous treatment: 24h]

Study type		Concentration (µg/mL)	RPD <sup>a)</sup> (%)	Cell-growth inhibition rate (%) <sup>b)</sup>	Condition of cells <sup>c, e)</sup>	Condition of culture medium <sup>d)</sup>			
S9 mix	Treatment (h)					Color <sup>f)</sup>	Precipitates <sup>g)</sup>		
							1)	2)	
-	24	0 (NC)	100	0	-	-	-	-	
		Test article	150	89	11	-	-	-	-
			300	89	11	-	reddish purple	-	-
			450	82	18	+	reddish purple	-	-
			600	47	53	++	reddish purple	-	-
			750	37	63	++	reddish purple	-	-
			900	9	91	+++	reddish purple	-	-
			1050	-17	117	+++	reddish purple	-	-
			1200	-62	162	+++	reddish purple	-	-
PC	71	29	-	-	-	-			

NC : Negative control (water for injection)

PC : Positive control (Mitomycin C: 0.050 µg/mL)

a) RPD (relative population doubling) = PD (population doubling) of treated group/PD of negative control group × 100

b) Cell-growth inhibition rate was shown as 100 - RPD.

c) Condition of cells was observed at the end of the treatment.

d) Color of culture medium was observed immediately after addition of the test solutions. Presence or absence of precipitates was examined 1): immediately after addition of the test solution, and 2): at the end of the incubation.

e) -: Most of the cells were attached to the plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

+: A small number of cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

++: Approximately half of cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

f) -: No color changes

g) -: No precipitates



Appendix 7 *N*-Ethyl-diethanolamine: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells  
Population doubling in the cell-growth inhibition test

[Short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)	Cell counts ( $\times 10^4$ cells/mL)		PD	
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation		
-	6	0 (NC)		18	49	1.44
		Test article	10.5		50	1.47
			20.9		47	1.38
			41.9		47	1.38
			83.8		51	1.50
			168		48	1.42
			335		42	1.22
			670		43	1.26
			1340		30	0.74

[Short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)	Cell counts ( $\times 10^4$ cells/mL)		PD	
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation		
+	6	0 (NC)		18	52	1.53
		Test article	10.5		51	1.50
			20.9		50	1.47
			41.9		51	1.50
			83.8		50	1.47
			168		47	1.38
			335		48	1.42
			670		40	1.15
			1340		36	1.00

[Continuous treatment: 24h]

Study type		Concentration (µg/mL)	Cell counts ( $\times 10^4$ cells/mL)		PD	
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation		
-	24	0 (NC)		18	50	1.47
		Test article	10.5		47	1.38
			20.9		48	1.42
			41.9		48	1.42
			83.8		46	1.35
			168		44	1.29
			335		42	1.22
			670		32	0.83
			1340		13	-0.47

NC : Negative control (water for injection)

PD : Population doubling was determined as;

$[\log (\text{cell counts at the time of end} / \text{cell counts at the time of start treatment})] / \log 2$

Appendix 8 *N*-Ethyl-diethanolamine: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells  
Population doubling in the chromosomal aberration test

[Short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)	Cell counts ( $\times 10^4$ cells/mL)		PD	
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation		
-	6	0 (NC)	19	52	1.45	
		Test article		335	45	1.24
				670	45	1.24
				1340	36	0.92
				PC (MMC)	36	0.92

[Short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)	Cell counts ( $\times 10^4$ cells/mL)		PD	
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation		
+	6	0 (NC)	19	50	1.40	
		Test article		335	51	1.42
				670	44	1.21
				1340	33	0.80
				PC (CP)	31	0.71

[Continuous treatment: 24h]

Study type		Concentration (µg/mL)	Cell counts ( $\times 10^4$ cells/mL)		PD	
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation		
-	24	0 (NC)	19	54	1.51	
		Test article		150	48	1.34
				300	48	1.34
				450	45	1.24
				600	31	0.71
				750	28	0.56
				900	21	0.14
				1050	16	-0.25
				1200	10	-0.93
				PC (MMC)	40	1.07

NC : Negative control (water for injection)

PC : Positive control (MMC; Mitomycin C, 0.075 or 0.050 µg/mL, CP; Cyclophosphamide monohydrate, 14 µg/mL)

PD : Population doubling was determined as;

$[\log (\text{cell counts at the time of end} / \text{cell counts at the time of start treatment})] / \log 2$

T-G796

## 信頼性保証書 (1/2)

試験番号 : T-G796

試験表題 : *N*-エチルジエタノールアミン : チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験

本試験は以下に示す基準に従っ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」(平成 23 年 3 月 31 日:薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)

なお、調査は下記の通り実施し、報告致しました。

### 試験の調査

項目	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		2023 年 12 月 13 日	2023 年 12 月 15 日
試験計画書変更書 (1)		2024 年 1 月 11 日	2024 年 1 月 11 日
細胞播種		2024 年 1 月 15 日	2024 年 1 月 16 日
調製・保存(被験物質・陽性 対照物質)、被験物質の処理		2024 年 1 月 18 日	2024 年 1 月 18 日
染色体標本作製(固定)		2024 年 1 月 19 日	2024 年 1 月 23 日
染色体標本作製(染色)		2024 年 1 月 22 日	2024 年 1 月 23 日
染色体標本観察		2024 年 1 月 31 日	2024 年 2 月 2 日
生データ		2024 年 3 月 4 日	2024 年 3 月 7 日
最終報告書草案 帳票		2024 年 3 月 4 日	2024 年 3 月 4 日
改善確認		2024 年 3 月 5 日	2024 年 3 月 7 日
試験計画書変更書 (2)		2024 年 3 月 13 日	2024 年 3 月 13 日
生データ(被験物質関係)		2024 年 3 月 14 日	2024 年 3 月 14 日
最終報告書		2024 年 3 月 19 日	2024 年 3 月 19 日

## 信頼性保証書 (2/2)

施設調査			
項目	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 (CHL/IU)	[REDACTED]	2023年11月17日	2023年12月5日
		2023年11月20日	
		2023年11月21日	
		2023年11月22日	
		2023年11月24日	
		2023年11月30日	
		2023年12月1日	

2024年3月19日

株式会社ボゾリサーチセンター

信頼性保証部門