

T-G396



最 終 報 告 書

Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate の
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：T-G396

試験期間：2019 年 1 月 24 日-2019 年 3 月 27 日

試験実施施設

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 医薬・生活衛生局 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

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-G396


1. GLP 陳述書

試験番号 : T-G396

試験表題 : Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate 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)

 2019 年 3 月 27 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 研究部

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	試験委託者	6
3.5	試験受託者	6
3.6	試験実施施設	6
3.7	試験日程	6
3.8	試験責任者	6
3.9	試験担当者	7
3.10	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
3.11	試資料保存	7
3.12	試験責任者の署名	7
4.	要約	8
5.	緒言	9
6.	試験材料及び方法	10
6.1	被験物質及び溶媒	10
6.1.1	被験物質	10
6.1.2	溶媒	10
6.2	溶媒の設定理由	11
6.3	被験液の調製	11
6.3.1	調製方法	11
6.3.2	調製頻度	11
6.3.3	安定性	11
6.4	対照物質	11
6.4.1	陰性対照	11
6.4.2	陽性対照	11
6.5	使用細胞株	12
6.5.1	細胞株	12
6.5.2	細胞の選択理由	12
6.5.3	培養条件	13
6.6	S9 mix 及び培養液の調製	13
6.6.1	S9 mix	13

6.6.2	培養液.....	14
6.7	試験方法 ¹⁾	14
6.7.1	識別方法.....	14
6.7.2	用量の設定.....	15
6.7.3	細胞増殖抑制試験.....	15
6.7.4	染色体異常試験.....	17
6.7.5	数値の取扱い.....	18
6.7.6	標本の観察.....	18
6.7.7	染色体異常の分類.....	18
6.7.8	結果の判定.....	19
6.7.9	統計解析.....	19
6.7.10	判定基準.....	19
7.	試験結果.....	20
7.1	細胞増殖抑制試験.....	20
7.2	染色体異常試験.....	20
7.3	試験成立基準.....	20
8.	考察.....	21
9.	参考文献.....	22

添付資料

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

表

Table 1	Chromosomal aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate [Short-term treatment: -S9 mix].....	24
Table 2	Chromosomal aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate [Short-term treatment: +S9 mix].....	25
Table 3	Chromosomal aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate [Continuous treatment: 24hr].....	26

付表

Appendix 1-1	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate [Short-term treatment: -S9 mix].....	27
Appendix 1-2	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate [Short-term treatment: +S9 mix].....	28
Appendix 1-3	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate [Continuous treatment: 24hr].....	29
Appendix 2-1	Results of observation in the Chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate [Short-term treatment: -S9 mix].....	30
Appendix 2-2	Results of observation in the Chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate [Short-term treatment: +S9 mix].....	31
Appendix 2-3	Results of observation in the Chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate [Continuous treatment: 24hr].....	32
Appendix 3	Cell concentration, population doubling and relative increase in cell counts in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate	33
Appendix 4	Cell concentration, population doubling and relative increase in cell counts in the chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate....	34
信頼性保証書		35

T-G396

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

T-G396

3.2 試験表題

Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3.3 試験目的

ほ乳類の培養細胞（CHL/IU細胞株）を用いて、Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate の染色体異常誘発能を検討することを目的とした。

3.4 試験委託者

厚生労働省 医薬・生活衛生局 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.5 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

3.6 試験実施施設

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

3.7 試験日程

試験開始日	:	2019年	1月	24日
被験物質受領日	:	2019年	1月	8日
実験開始日	:	2019年	1月	26日
実験終了日	:	2019年	2月	26日
試験終了日	:	2019年	3月	27日

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 研究部

■■■■■■■■■■

3.9 試験担当者

被験物質保存責任者：

試験担当者：

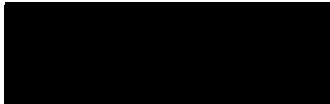
3.10 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

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。

3.11 試験資料保存

試験計画書原本（変更書含む）、記録文書、生データ、染色体標本、報告書類（最終報告書の原本を含む）及び被験物質の一部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最終報告書提出後 10 年間保存する。期間終了後の保存については、厚生労働省 医薬・生活衛生局 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。

3.12 試験責任者の署名

 2019 年 3 月 27 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 研究部

4. 要約

Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate 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、2000 µg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した計 8 用量を設定し、細胞増殖抑制試験を行った。短時間処理法の非代謝活性化では 62.5 µg/mL 以上の用量で、短時間処理法の代謝活性化では 125 µg/mL 以上の用量で、連続処理法では 31.3 µg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞毒性が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の非代謝活性化で 42 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化で 83 µg/mL、連続処理法で 27 µg/mL と算出された。以上の結果から、短時間処理法の非代謝活性化では 60.0 µg/mL を最高用量とし、以下等差 10 µg/mL で希釈した 5 用量を、短時間処理法の代謝活性化では 110 µg/mL を最高用量とし、以下等差 10 µg/mL で希釈した 7 用量を、連続処理法では 35.0 µg/mL を最高用量とし、以下等差 5 µg/mL で希釈した 5 用量を設定した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、いずれの処理法においても、陰性対照群と比較して統計的に有意な増加は認められず、陰性対照群の施設内背景データの 95%確率分布の範囲内であった。しかし、倍数体（poly 値）の出現率は、短時間処理法の非代謝活性化では 40.0 及び 30.0 µg/mL の用量で、陰性対照群と比較して統計的に有意な増加が認められ、統計学的に有意な用量依存性も認められた。短時間処理法の代謝活性化では 90.0 µg/mL の用量において、陰性対照群と比較して統計的に有意な増加が認められたが、統計学的に有意な用量依存性は認められなかった。陰性対照群の施設内背景データの 95%確率分布の範囲外でもあったため、染色体構造異常陰性、染色体数的異常陽性と判定した。ただし、数的異常細胞の誘発頻度は最大 3.2%であり、軽微な陽性と考えられた。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は背景データの 95%確率分布の範囲内にあった。これに対して、陽性対照群では、陰性対照群と比較すると、染色体構造異常において統計学的に有意な増加が認められた。したがって、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate は本試験条件下において、染色体構造異常は誘発しないが、染色体数的異常を誘発すると結論した。

5. 緒言

Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate の安全性評価の一環として、ほ乳類培養細胞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、遵守した基準及び準拠した毒性試験ガイドラインなどは以下の通りである。

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、
環保企発第 110331010 号)

2) 毒性試験ガイドライン

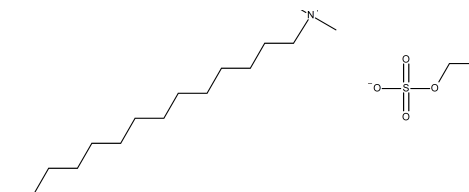
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
(平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・
03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環境省総
合環境政策局長連名通知) (最終改正：平成 30 年 3 月 29 日)
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 473」
(OECD 理事会：2016 年 7 月 29 日)

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

製造者 : XXXXXXXXXX
 入手量 : 29.3480 g (T-2844 と共通)
 名称 : Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate
 CAS 番号 : 19309-23-0
 官報公示整理番号 : 2-3231、9-1971 (化審法)
 構造式又は示性式 :



分子式 : $C_{18}H_{40}N.C_2H_5O_4S$
 分子量 : 395.64
 常温における性状 : 白色個体
 融点 : 150°C (分解)
 ロット番号 : XXXXXXXXXX
 純度 : 99.1wt%
 保存条件 : 冷暗所 (実測値 : 3.0 ~ 4.0°C)、密栓
 保存場所 : 東京研究所 被験物質保存室
 安定性 : 常温で安定、吸湿性有り
 取扱い上の注意 : 保護具 (手袋、マスク、保護メガネなど) を着用すること。
 使用後の処理 : 使用後の残量は、供給元に返却した。

6.1.2 溶媒

名称 : 注射用水
 製造元 : 株式会社大塚製薬工場
 ロット番号 : 8F87N
 規格 : 日本薬局方
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室

6.2 溶媒の設定理由

溶媒検討の結果、注射用水に 20.0 mg/mL で溶解であったため、溶媒として注射用水を選択した。

6.3 被験液の調製

6.3.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.2000 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を添加し、溶解した後に、メスアップして最高濃度の 20.0 mg/mL 被験液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：2000 µg/mL）を調製した。次いで、20.0 mg/mL 被験液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 7 段階希釈し、10.0、5.00、2.50、1.25、0.625、0.313 及び 0.156 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

被験物質 0.0400 g を 20 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を添加し、溶解した後に、メスアップして最高濃度の 2.00 mg/mL 被験液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：200 µg/mL）を調製した。次いで、2.00 mg/mL 被験液 2.75、2.50、2.25、2.00、1.75、1.50、1.25、1.00、0.875、0.750、0.625、0.500 及び 0.375 mL に対し、溶媒 2.25、2.50、2.75、3.00、3.25、3.50、3.75、4.00、4.125、4.25、4.375、4.50 及び 4.625 mL を添加し、1.10、1.00、0.900、0.800、0.700、0.600、0.500、0.400、0.350、0.300、0.250、0.200 及び 0.150 mg/mL の 14 濃度段階の被験液を調製した。

6.3.2 調製頻度

用時に調製した。

6.3.3 安定性

用時調製のため、安定性確認は実施しなかった。

6.4 対照物質

6.4.1 陰性対照

溶媒として用いる注射用水を陰性対照とした。

6.4.2 陽性対照

1) 非代謝活性化系

マイトマイシン C (MMC)

ロット番号	:	011MHB01
製造元	:	協和発酵キリン株式会社
力価	:	2 mg（力価）/瓶

保存方法 : 室温・遮光
保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室

2) 代謝活性化

シクロフォスファミド (CP)

ロット番号 : PTR2478
製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社
純度 : 生化学用 (97.0%以上)
保存方法 : 冷蔵、遮光
保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

3) 調製方法

調製はすべて用時に行った。

(1) MMC

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、ロット番号 : K8D96) を 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 (短時間処理法の非代謝活性化では培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。連続処理法では培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は、それぞれ 0.075 µg/mL 及び 0.050 µg/mL)。

(2) CP

CP 0.0140 g を γ 線滅菌済プラスチック遠沈管に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 : K8D96) を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度は 14 µg/mL)。

4) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験ガイドライン (前述 5. 2)) に使用が推奨されているため。

6.5 使用細胞株

6.5.1 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。独立行政法人 医薬基盤研究所から 2014 年 4 月 2 日に入手し、凍結保存した細胞について定期的に細胞の性状検査を実施して、性状が適正であること (培養形態、細胞倍加時間 15~20 時間以内、染色体のモード数が 25 本、マイコプラズマ等の汚染がない) が確認されたものを 30 継代以内で試験に使用した。使用時の細胞継代数は細胞増殖抑制試験で 17 継代、染色体異常試験で 21 継代であった。

6.5.2 細胞の選択理由

毒性試験ガイドライン (前述 5. 2)) に使用が推奨されているため。

6.5.3 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。

6.6 S9 mix 及び培養液の調製

6.6.1 S9 mix

S9 及び補酵素（S9／コファクターC セット、ロット番号：C180831061 及び C181026081）を混合し、S9 mix を調製した。調製は用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
製造元	:	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	:	18083106、18102608
製造日	:	2018 年 8 月 31 日（ロット番号：18083106） 2018 年 10 月 26 日（ロット番号：18102608）
種・系統	:	ラット・SD 系
週齢・性	:	7 週齢・雄
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)
投与方法	:	腹腔内投与
投与期間及び投与量	:	PB4 日間連続投与 30+60+60+60(mg/kg 体重) PB 投与 3 日目 BF 投与 80(mg/kg 体重)
使用期限	:	2019 年 2 月 28 日（ロット番号：18083106） 2019 年 4 月 25 日（ロット番号：18102608）
保存方法	:	冷凍(-70℃ 以下)
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 超低温フリーザ

2) 補酵素

名称	:	コファクターC
製造元	:	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	:	C18082906、C18102408
製造日	:	2018 年 8 月 29 日（ロット番号：C18082906） 2018 年 10 月 24 日（ロット番号：C18102408）
保存方法	:	冷凍(-70℃ 以下)
使用期限	:	2019 年 2 月 28 日（ロット番号：C18082906） 2019 年 4 月 23 日（ロット番号：C18102408）
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 超低温フリーザ

3) S9 mix の組成（1 mL 中）

水	:	0.7 mL
S9	:	0.3 mL

T-G396

MgCl ₂	:	5 µmol/mL
KCl	:	33 µmol/mL
グルコース-6-リン酸	:	5 µmol/mL
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 µmol/mL
HEPES 緩衝液(pH7.2)	:	4 µmol/mL

6.6.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM)(Cat.No.21442-25)に非働化（56°C、30 分）した牛血清(bovine serum、BS)を 10v/v%添加した培養液(10%BS-MEM)を用いた。調製後の培養液は冷蔵保存した。

1) 牛血清

ロット番号	:	1861237、1953586、1998112
製造元	:	Thermo Fisher Scientific Inc.
保存方法	:	冷凍（-20°C 以下の冷凍庫）
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 冷凍庫

2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号	:	L8R7448
製造元	:	ナカライテスク株式会社
保存方法	:	冷蔵（許容範囲：1 ~ 10°C）
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

6.7 試験方法 ¹⁾

試験は以下に示したステージの順に実施した。

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
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

6.7.1 識別方法

以下表示に従い、処理方法及び処理群を明記したラベルで使用器材を識別した。

対象	内容	記号又は数字
シャーレ	短時間処理法 代謝活性化	+
	短時間処理法 非代謝活性化	-
	連続処理法 24 時間処理	24-
	陰性対照群	NC
	被験液処理群	高濃度から 1、2、3・・・n の枝番号
	陽性対照群	PC
同一処理群内での識別		1、2、3
染色体標本	盲検法によってランダムにコード化した処理内容	試験番号とコンピュータが無作為に割り振った「01」～「99」までの 2 桁の番号及びスライドの枚数を表す枝番号

6.7.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

「新規化学物質等に係る試験の方法について」で定められた 2000 µg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した 1000、500、250、125、62.5、31.3 及び 15.6 µg/mL の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果より、以下の用量を設定した。これに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

処理方法	処理用量 (µg/mL)
短時間処理法 非代謝活性化	60.0、50.0、40.0、30.0 及び 20.0 (等差 10)
短時間処理法 代謝活性化	110、100、90.0、80.0、70.0、60.0 及び 50.0 (等差 10)
連続処理法	35.0、30.0、25.0、20.0 及び 15.0 (等差 5)

6.7.3 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の予備試験として実施した。なお、以下の試験操作のうち、無菌性を必要とする場合は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

- 短時間処理法の代謝活性化と非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理のそれぞれに、陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレ（プレート）はプラスチックプレート（直径 60 mm）を用い、各群 1 枚とした。また、相対細胞集団倍加数（Relative Cell Population Doubling Number、RPD）及び相対的細胞数増加（Relative Increase in Cell Counts、RICC）を算出するための処理開始時細胞数測定用にプレートを 1 枚設けた。
- 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、倒立位相差顕微鏡下で細胞に異常がないことを確認後、下表に従い、培養液の除去及び処理を行い、処理開始時細胞数測定用のプレート 1 枚については、以下の方法に従い細胞濃度を測定し、処理開始時の細胞濃度とした。

	短時間処理法		連続処理法
	非代謝活性化	代謝活性化	
培養液除去量	0.500 mL	1.333 mL	0.500 mL
S9 mix 添加量		0.833 mL	
溶媒・被験液 添加量	0.500 mL	0.500 mL	0.500 mL

- (1) 当該プレートの培養液を廃棄し、Phosphate-Buffered Saline (-) (PBS (-)) を適量加えプレートを洗浄した。
- (2) PBS(-)を廃棄し、0.25%トリプシン溶液(Trypsin 0.25%、Thermo Fisher Scientific Inc.) を 1 mL 加え、約 5 分間静置した。
- (3) プレートに新しい 10%BS-MEM 培養液を 1 mL 添加し、ピペッティングで細胞を剥離・分散させた後、血球計算盤を用いて細胞濃度を測定した。血球計算盤の計数値は、8 区画の平均値の小数点第 1 位を四捨五入したものを細胞集団倍加数 (Population Doubling Number、PD) 及び RICC の計算に用いた。
- 4) 被験物質処理後、倒立位相差顕微鏡下で析出の有無を観察し、肉眼で培養液の色調を確認した。確認後、短時間処理法では 6 時間、連続処理法では 24 時間培養した。
- 5) 6 時間培養後、短時間処理法については、4)同様に析出の有無を確認するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を約 2%となるように添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養した。
- 6) 培養終了後、倒立位相差顕微鏡下で析出の有無及び細胞の状態を確認した（短時間処理法の培養終了時の結果は、参考データとした）。
- 7) 次いで、3)の方法に従い、各プレートの細胞濃度を測定し、終了時の細胞濃度とした。
- 8) 得られた細胞濃度から、式 1、2 及び 3 に従い、陰性対照群を 100%とした各群の細胞数の RPD*及び RICC*を算出した。

$$PD (\%) = [\log (\text{処理 (培養) 終了時の細胞数} \div \text{処理開始時の細胞数})] \div \log 2 \quad \text{〔式 1〕}$$

$$RPD (\%) = \frac{(\text{被験物質処理群における細胞集団倍加数})}{(\text{陰性対照群における細胞集団倍加数})} \times 100 \quad \text{〔式 2〕}$$

$$RICC (\%) = \frac{(\text{被験物質処理群の細胞数 (培養終了時-処理開始時)})}{(\text{陰性対照群の細胞数 (培養終了時-処理開始時)})} \times 100 \quad \text{〔式 3〕}$$

- 9) 細胞増殖抑制率 (=100-RPD) *を算出し、50%を挟む 2 点の直線式から、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) を算出した。

*計算値が 0 以下の場合は 0%として扱った。

6.7.4 染色体異常試験

以下の試験操作のうち、無菌性を必要とする場合は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

- 1) 短時間処理法の代謝活性化と非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理のそれぞれに、陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレ（プレート）はプラスチックプレート（直径 60 mm）を用い、各群 3 枚（枝番号-1、2 及び 3）とした。また、RPD 及び RICC を算出するための処理開始時細胞数測定用にプレートを 1 枚設けた。
- 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。
- 3) 培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で細胞に異常がないことを確認後、下表に従い、培養液の除去及び処理を行い、開始時測定用のプレート 1 枚については、細胞増殖抑制試験に準じて、処理開始時の細胞濃度とした。

	短時間処理法		連続処理法
	非代謝活性化	代謝活性化	
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		0.833 mL	
溶媒・被験液・ 陽性対照物質液 添加量	0.500 mL (MMC: 0.150 mL)*	0.500 mL (CP: 0.100 mL)*	0.500 mL (MMC: 0.100 mL)*

*：（ ）内は、陽性対照群の培養液除去量及び陽性対照物質液添加量を示す。

- 4) 被験物質処理後、倒立位相差顕微鏡下で析出の有無及び肉眼で培養液の色を確認し、短時間処理法では 6 時間、連続処理法では 24 時間培養した。
- 5) 6 時間培養後、短時間処理法については倒立相差顕微鏡下で被験物質の析出及び細胞の状態を確認した。次いで、約 2% となるよう牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養した。
- 6) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を 0.1 mL 加えた。
- 7) 培養終了後、プレートの培養液を遠沈管に移し、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Thermo Fisher Scientific Inc.）で細胞を剥がし、回収・遠心分離した。次いで、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 箇所点滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞点滴後、約 1 日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- 8) 残る各群 1 枚のプレート（枝番号-3）は、倒立位相差顕微鏡下で析出の有無及び細胞の状態を確認した（短時間処理法の培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じて細胞濃度を測定し、RPD 及び RICC を算出した。

6.7.5 数値の取扱い

PD、RPD 及び RICC 算出には表示値を用い、下記の桁数に従って計算した。

- 1) 細胞濃度については、血球計算盤における 8 区画の計数値の平均値の小数点第 1 位を四捨五入し、整数で表示した（単位：計数値の平均値 $\times 10^4$ cells/mL）。
- 2) PD については、1) の表示値を用いて計算し、小数点第 3 位を四捨五入し、小数点第 2 位まで表示した。
- 3) RPD（百分率）については、2) の表示値を用い、小数点第 1 位を四捨五入し整数として表示した。
- 4) RICC（百分率）については、1) の表示値を用いて計算し、小数点第 1 位を四捨五入し整数として表示した。

6.7.6 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 150 細胞（各濃度当たり 300 細胞）の染色体が良く展開した分裂中期像を観察し、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数も記録した。染色体標本の観察はすべてブラインド化して行った。

なお、観察は、各処理法毎に 50%以上の細胞毒性を示す最低の濃度より、以下の用量を選択し、実施した。

処理方法	処理用量 (μg/mL)
短時間処理法 非代謝活性化	40.0、30.0 及び 20.0
短時間処理法 代謝活性化	100、90.0 及び 80.0
連続処理法	30.0、25.0 及び 20.0

6.7.7 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、構造異常は更に以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)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もの（非染色部分が染色分体の同軸上にある）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。

染色分体型切断(ctb) : 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。

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。

染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。

断片化(frg) : 一つの分裂中期像に非常に多くの切断やギャップが現れたもの。

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。

倍数性 : polyploidy（核内倍加体：endoreduplication を含む）

6.7.8 結果の判定

判定に際しては、染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現数によって判定した。構造異常の総出現数は、ギャップを含む場合（TAG）と含まない場合（TA）とに分け、総合判定は後者を用い、統計解析を実施し、判定基準に従って判定した。

6.7.9 統計解析

ギャップを含まない場合（TA）の染色体構造異常及び染色体数的異常の出現頻度について、陰性対照群と被験物質処理群間との間で Fisher の直接確率計算法²⁾による比較を行った（有意水準：片側 5%）。

上記の比較において、短時間処理法において有意な増加が認められたため、Cochran Armitage の傾向検定³⁾（有意水準：片側 5%）を行った。

また、染色体構造異常の出現頻度について、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²⁾による比較を行った（有意水準：片側 5%）。

6.7.10 判定基準

以下のすべての基準を満たす場合、陽性と判定した。

- 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率が、陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加を示す。
- 2) 上記の増加には統計学的に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. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

結果を Appendix 1-1~1-3、Appendix 3 に示した。

被験液添加に伴う析出の有無及び培養液の色調変化は、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 250 µg/mL 以上の用量で析出が認められ、500 µg/mL 以上の用量で白桃色への色調変化が認められた。短時間処理法の代謝活性化では、62.5 µg/mL 以上の用量で析出が認められ、125 µg/mL 以上の用量で白橙色への色調変化が認められた。細胞毒性の指標である RPD を算出した結果、短時間処理法の非代謝活性化では 62.5 µg/mL 以上の用量で、短時間処理法の代謝活性化では 125 µg/mL 以上の用量で、連続処理法では 31.3 µg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞毒性が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の非代謝活性化で 42 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化で 83 µg/mL、連続処理法で 27 µg/mL と算出された。

7.2 染色体異常試験

結果を Table 1~3、Appendix 2-1~2-3、Appendix 4 に示した。

被験液添加に伴う析出の有無及び培養液の色調変化は、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法ではすべての用量で認められなかった。短時間処理法の代謝活性化ではすべての用量で析出が認められ、色調変化は認められなかった。

構造異常の出現率（TA）は、短時間処理法の非代謝活性化では 40.0、30.0 及び 20.0 µg/mL の用量で 0.7、0.3 及び 0%であった。短時間処理法の代謝活性化では 100、90.0 及び 80.0 µg/mL の用量で 1.0、0.7 及び 0.3%であった。連続処理法では 30.0、25.0 及び 20.0 µg/mL の用量で 0.3、0.7 及び 0.7%であった。

数的異常（倍数体、Poly）の出現率は、短時間処理法の非代謝活性化では 40.0、30.0 及び 20.0 µg/mL の用量で 3.2、2.6 及び 0.3%であった。短時間処理法の代謝活性化では 100、90.0 及び 80.0 µg/mL の用量で 1.6、3.2 及び 0.7%であった。連続処理法では 30.0、25.0 及び 20.0 µg/mL の用量で 0、0.3 及び 0%であった。

7.3 試験成立基準

以下の基準を満たしたため、試験は適切に実施されたと判断した。

- 観察可能な 3 用量以上にて、評価された。
- 陰性対照群では異常の出現率は背景データの 95%確率分布の範囲内にあった。
- 陽性対照群では、陰性対照群と比較すると、染色体構造異常において統計的に有意な増加が認められた。
- 試験環境に特に問題は認められなかった。

8. 考察

Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate 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。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、いずれの処理法においても、陰性対照群と比較して統計的に有意な増加は認められず、陰性対照群の施設内背景データの 95%確率分布の範囲内であった。しかし、倍数体（poly 値）の出現率は、短時間処理法の非代謝活性化では 40.0 及び 30.0 µg/mL の用量で、陰性対照群と比較して統計的に有意な増加が認められ、統計学的に有意な用量依存性も認められた。短時間処理法の代謝活性化では 90.0 µg/mL の用量において、陰性対照群と比較して統計的に有意な増加が認められたが、統計学的に有意な用量依存性は認められなかった。陰性対照群の施設内背景データの 95%確率分布の範囲外でもあったため、染色体構造異常陰性、染色体数的異常陽性と判定した。ただし、数的異常細胞の誘発頻度は最大 3.2%であり、軽微な陽性と考えられた。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は背景データの 95%確率分布の範囲内にあった。これに対して、陽性対照群では、陰性対照群と比較すると、染色体構造異常において統計学的に有意な増加が認められた。したがって、試験は適切に実施されたと考えられた。

連続処理法で倍数性誘発が認められなかったことから、短時間処理法の非代謝活性化における倍数性の誘発は細胞分裂の阻害・遅延によるものと示唆される。

また、本被験物質は Ames 試験（TA98、TA100、TA1535、TA1537、WP2 *uvrA*）で陰性⁴⁾と報告されている。

以上の結果から、Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate は本試験条件下において、染色体構造異常は誘発しないが、染色体数的異常を誘発すると結論した。

9. 参考文献

- 1) 祖父尼俊雄監修（1999）：<改訂>染色体異常試験データ集、pp. 15-20、エル・アイ・シー、東京
- 2) Siegel S, Castellan NJ. Jr. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1988.
- 3) Agresti A, Categorical Data Analysis. New Jersey: Wiley InterScience; 2002
- 4) (2019)：Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate の細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号：T-2844）、株式会社ボゾリサーチセンター

Historical Data of the Chromosomal aberration Tests in CHL/IU Cells

Cumulative background data of chromosomal aberration tests in cultured Chinese hamster cells (line CHL/IU), carried out under the same study conditions at BoZo Research Center Inc.

Period for NC : April-2015-December-2018						
Treatment		Cells observed	Poly (%)	TA (%)		
S9 mix	Time					
NC	+	6-18	(18600)	(86.7)	(100.7)	
			Mean	0.7	0.8	
			S.D.	0.3	0.3	
			UCL	1.3	1.4	
			LCL*	0.1	0.2	
	(n=62)					
		-	6-18	(18600)	(78.0)	(111.3)
				Mean	0.6	0.9
				S.D.	0.3	0.3
				UCL	1.2	1.5
	LCL*			0.0	0.3	
	(n=62)					
		-	24-0	(17700)	(76.0)	(101.3)
				Mean	0.6	0.9
				S.D.	0.3	0.3
				UCL	1.2	1.5
	LCL*			0.0	0.3	
	(n=59)					
		-	48-0	(300)	(0.7)	(0.7)
				Mean	0.3	0.3
S.D.				#DIV/0!	#DIV/0!	
UCL				#DIV/0!	#DIV/0!	
LCL*	#DIV/0!			#DIV/0!		
(n=1)						

Period for PC : April-2015-December-2018						
Treatment		Cells observed	Poly (%)	TA (%)		
S9 mix	Time					
PC	+	6-18	(19200)	(2.0)	(7372.0)	
			Mean	0.0	57.6	
			S.D.	0.1	12.3	
			UCL	0.2	81.7	
			LCL*	0.0	33.5	
	(n=64)					
		-	6-18	(17700)	(18.0)	(3134.7)
				Mean	0.2	26.6
				S.D.	0.2	5.6
				UCL	0.6	37.6
	LCL*			0.0	15.6	
	(n=59)					
		-	24-0	(17400)	(27.3)	(3470.0)
				Mean	0.2	29.9
				S.D.	0.3	6.7
				UCL	0.8	43.0
	LCL*			0.0	16.8	
	(n=58)					
		-	48-0	(300)	(0.0)	(130.0)
				Mean	0.0	65.0
S.D.				#DIV/0!	#DIV/0!	
UCL				#DIV/0!	#DIV/0!	
LCL*	#DIV/0!			#DIV/0!		
(n=1)						

():number of observed.

Table 1 Chromosomal aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate
[Short-term treatment:-S9 mix]

Short-term treatment: 57 min																		
Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosomal aberration (%)								RPD (%)	RICC (%)	Number of cells with numerical chromosomal aberration (%)				trend test	
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	frg	TA(%)	g			TAG(%)	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)
6-18	-	NC	150	1	1	0	0	0	2	0	2	100	100	151	1	0	1	*2
			150	0	1	0	0	0	1	0	1			150	0	0	0	
			300	1(0.3)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.0)	0(0.0)	3(1.0)			301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)	
		20.0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	150	0	0	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0			151	1	0	1	
			300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)	
		30.0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	108	113	156	6	0	6	
			150	1	0	0	0	0	1	0	1			152	2	0	2	
			300	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)			308	8(2.6)	0(0.0)	8(2.6)*	
		40.0	150	0	1	0	0	0	1	0	1	30	20	154	4	0	4	
			150	0	1	0	0	0	1	1	2			156	5	1	6	
			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)			310	9(2.9)	1(0.3)	10(3.2)*	
		50.0	Not observed								0	0	Not observed					
		60.0	Not observed								0	0	Not observed					
		PC	150	4	19	0	0	0	23	0	23	113	123	150	0	0	0	
			150	6	20	0	0	0	25	0	25			150	0	0	0	
			300	10(3.3)	39(13.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	48(16.0)*	0(0.0)	48(16.0)			300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

frg: fragmentation, other: endoreduplication

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)

* $p < 0.05$ (Fisher's exact test), *2 $p < 0.05$ (Cochran Armitage trend test)

RPD: relative population doubling RPD is the population doubling of the treated groups compared to that of the negative control.

RICC: relative increase in cell counts RICC is the relative increase in cell count of the treated groups compared to that of the negative control.

Table 2 Chromosomal aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate
[Short-term treatment:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosomal aberration (%)								RPD (%)	RICC (%)	Number of cells with numerical chromosomal aberration (%)				trend test	
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	frg	TA(%)	g			TAG(%)	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)
6-18	+	NC	150	0	1	0	0	0	1	0	1	100	100	151	1	0	1	N.S.
			150	0	1	0	0	0	1	0	1			152	2	0	2	
			300	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)			303	3(1.0)	0(0.0)	3(1.0)	
		50.0	Not observed								102	103	Not observed					
		60.0	Not observed								108	113	Not observed					
		70.0	Not observed								99	97	Not observed					
		80.0	150	0	1	0	0	0	1	0	1	80	71	151	1	0	1	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0			151	1	0	1	
			300	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)			302	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)	
		90.0	150	1	0	0	0	0	1	0	1	67	55	155	0	5	5	
			150	0	1	0	0	0	1	0	1			155	2	3	5	
			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)			310	2(0.6)	8(2.6)	10(3.2)*	
		100	150	1	1	0	0	0	2	0	2	24	16	151	1	0	1	
			150	0	1	0	0	0	1	0	1			154	1	3	4	
			300	1(0.3)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.0)	0(0.0)	3(1.0)			305	2(0.7)	3(1.0)	5(1.6)	
		110	Not observed								0	0	Not observed					
		PC	150	3	74	0	0	0	75	0	75	69	58	150	0	0	0	-
			150	5	79	0	0	0	81	0	81			150	0	0	0	
			300	8(2.7)	153(51.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	156(52.0)*	0(0.0)	156(52.0)			300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

frg: fragmentation, other: endoreduplication

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 (cyclophosphamide, 14 µg/mL)

*: $p < 0.05$ (Fisher's exact test), N.S.: not significant (Cochran Armitage trend test)

RPD: relative population doubling RPD is the population doubling of the treated groups compared to that of the negative control.

RICC: relative increase in cell counts RICC is the relative increase in cell count of the treated groups compared to that of the negative control.

Table 3 Chromosomal aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate
[Continuous treatment:24hr]

		Continuous treatment, 24h												Number of cells with numerical chromosomal aberration (%)				
Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosomal aberration (%)								RPD (%)	RICC (%)						
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	frg	TA(%)	g			TAG(%)	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	
24-0	-	NC	150	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	151	1	0	1	
			150	1	0	0	0	0	1	0	1			151	1	0	1	
			300	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)			302	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)	
		15.0	Not observed								104	106	Not observed					
			20.0	150	0	0	0	0	0	0			0	0	150	0	0	0
				150	1	1	0	0	0	2			0	2	90	84	150	0
	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)	300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)				
		25.0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	78	69	151	1	0	1	
			150	1	1	0	0	0	2	0	2			150	0	0	0	
			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)			301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)	
		30.0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	47	34	150	0	0	0	
			150	1	0	0	0	0	1	0	1			150	0	0	0	
			300	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)			300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		35.0	Not observed								36	25	Not observed					
			PC	150	4	22	0	0	0	26			0	26	150	0	0	0
				150	6	21	0	0	0	25			0	25	92	88	150	0
	300	10(3.3)		43(14.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	51(17.0)*	0(0.0)	51(17.0)	300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)				

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

frg: fragmentation, other: endoreduplication

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)

*: $p < 0.05$ (Fisher's exact test)

RPD: relative population doubling RPD is the population doubling of the treated groups compared to that of the negative control.

RICC: relative increase in cell counts RICC is the relative increase in cell count of the treated groups compared to that of the negative control.

Appendix 1-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

[Short-term treatment : -S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		RPD ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition ratio(%) ^{b)}	Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)					Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)	
-	6-18	0 (NC)		100	0	-	-	-	-
		Test article	15.6	89	11	-	-	-	-
			31.3	75	25	++	-	-	-
			62.5	0 ^{g)}	100	+++	-	-	-
			125	0 ^{g)}	100	+++	-	-	-
			250	0 ^{g)}	100	+++	-	+	+
			500	0 ^{g)}	100	h)	Whitish pink	+	+*
			1000	0 ^{g)}	100	++	Whitish pink	+	+*
			2000	0 ^{g)}	100	++	Whitish pink	+	+*
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					42	µg/mL			

NC : Negative Control (water for injection)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) Cell-growth inhibition ratio was shown as 100 - RPD. The value was regarded as 0%, when value was 0 and fewer

c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.

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

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

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

+

+

+

g) The value was regarded as 0%, because cell counts were 0 or PD was 0 and below.

h) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

All calculations were carried out using Excel 2010

Appendix 1-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

[Short-term treatment : +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		RPD ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition ratio(%) ^{b)}	Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)					Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
								1)	2)
+	6-18	0 (NC)		100	0	-	-	-	-
		Test article	15.6	116	0	-	-	-	-
			31.3	90	10	-	-	-	-
			62.5	74	26	-	-	+	+
			125	0 ^{g)}	100	+++	Whitish orange	+	+
			250	0 ^{g)}	100	+++	Whitish orange	+	+
			500	0 ^{g)}	100	h)	Whitish orange	+	+*
			1000	0 ^{g)}	100	h)	Whitish orange	+	+*
			2000	0 ^{g)}	100	h)	Whitish orange	+	+*
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					83	µg/mL			

NC : Negative Control (water for injection)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) Cell-growth inhibition ratio was shown as 100 - RPD. The value was regarded as 0%, when value was 0 and fewer

c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

+* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

g) The value was regarded as 0%, because cell counts were 0 or PD was 0 and below.

h) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

All calculations were carried out using Excel 2010

Appendix 1-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

[Continuous treatment : 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	RPD ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition ratio(%) ^{b)}	Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)				Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	24-0	0 (NC)		100	0	-	-	-	-
		Test article	15.6	74	26	+	-	-	-
			31.3	42	58	++	-	-	-
			62.5	0 ^{g)}	100	+++	-	-	-
			125	0 ^{g)}	100	+++	-	-	-
			250	0 ^{g)}	100	+++	-	+	+
			500	0 ^{g)}	100	h)	Whitish pink	+	+*
			1000	0 ^{g)}	100	h)	Whitish pink	+	+*
			2000	0 ^{g)}	100	h)	Whitish pink	+	+*
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					27	µg/mL			

NC : Negative Control (water for injection)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) Cell-growth inhibition ratio was shown as 100 - RPD. The value was regarded as 0%, when value was 0 and fewer

c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.

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

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

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

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

+* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

g) The value was regarded as 0%, because cell counts were 0 or PD was 0 and below.

h) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

All calculations were carried out using Excel 2010

Appendix 2-1

Results of observation in the chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

[Short-term treatment : -S9 mix]

Chromosomal aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)			Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}	
						1)	2)
-	6-18	0 (NC)		-	-	-	-
		Test article	20.0	-	-	-	-
			30.0	+	-	-	-
			40.0	++	-	-	-
			50.0	+++	-	-	-
			60.0	+++	-	-	-
		PC		-	-	-	-

NC : Negative control (water for injection)

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

a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.

- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

c) - : No changes of color

d) - : Absence of precipitates

Appendix 2-2

Results of observation in the chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

[Short-term treatment : +S9 mix]

Chromosomal aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation ^{a)}				
S9 mix	time (hr)		Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}		
						1)	2)
+	6-18	0 (NC)	-	-	-	-	
		Test article	50.0	-	-	+	+
			60.0	-	-	+	+
			70.0	+	-	+	+
			80.0	++	-	+	+
			90.0	+++	-	+	+
			100	+++	-	+	+
			110	+++	-	+	+
		PC	-	-	-	-	

NC : Negative control (water for injection)

PC : Positive control (cyclophosphamide : 14 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.
- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates
 + : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 2-3

Results of observation in the chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

[Continuous treatment : 24hr]

Chromosomal aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)			Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}	
						1)	2)
-	24-0	0 (NC)		-	-	-	-
		Test article	15.0	-	-	-	-
			20.0	+	-	-	-
			25.0	+	-	-	-
			30.0	++	-	-	-
			35.0	+++	-	-	-
		PC		-	-	-	-

NC : Negative control (water for injection)

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

a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.

- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

c) - : No changes of color

d) - : Absence of precipitates

Appendix 3

Cell concentration, population doubling and relative increase in cell counts in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

[Short-term treatment : -S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts ^{a)} (×10 ⁴ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁴ cells/mL)	PD	RICC
S9 mix	time (hr)					
-	6-18	0 (NC)	18	42	1.22	100
		15.6		38	1.08	83
		31.3		34	0.92	67
		62.5		1	-4.17	0 ^{d)}
		125		0	c)	0 ^{d)}
		250		0	c)	0 ^{d)}
		500		0	c)	0 ^{d)}
		1000		0	c)	0 ^{d)}
		2000		0	c)	0 ^{d)}

[Short-term treatment : +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts ^{a)} (×10 ⁴ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁴ cells/mL)	PD	RICC
S9 mix	time (hr)					
+	6-18	0 (NC)	18	46	1.35	100
		15.6		53	1.56	125
		31.3		42	1.22	86
		62.5		36	1.00	64
		125		0	c)	0 ^{d)}
		250		0	c)	0 ^{d)}
		500		0	c)	0 ^{d)}
		1000		0	c)	0 ^{d)}
		2000		0	c)	0 ^{d)}

[Continuous treatment : 24hr]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts ^{a)} (×10 ⁴ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁴ cells/mL)	PD	RICC
S9 mix	time (hr)					
-	24-0	0 (NC)	18	39	1.12	100
		15.6		32	0.83	67
		31.3		25	0.47	33
		62.5		0	c)	0 ^{d)}
		125		0	c)	0 ^{d)}
		250		0	c)	0 ^{d)}
		500		0	c)	0 ^{d)}
		1000		0	c)	0 ^{d)}
		2000		0	c)	0 ^{d)}

NC : Negative Control (water for injection)

The number of cells on the plate of each dose was measured using the hemocytometer (8 areas) at the time of start ^{a)} and end ^{b)} for treatment. Cell counts were displayed as the mean of measured values.

PD : Population Doubling was determined as;

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

RICC : Relative Increase in Cell Counts was determined as;

$\{[\text{Increase in number of cells intreated cultures (final - starting)}] / [\text{Increase in number of cells control cultures (final - starting)}]\} \times 100$

c) The value was incalculable because of cytotoxicity.

d) The value was regarded as 0%, because RICC was 0 and below.

All calculations were carried out using Excel 2010

Appendix 4

Cell concentration, population doubling and relative increase in cell counts in the chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

[Short-term treatment : -S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts ^{a)} (×10 ⁴ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁴ cells/mL)	PD	RICC
S9 mix	time (hr)					
-	6-18	0 (NC)	18	48	1.42	100
		20.0		48	1.42	100
		30.0		52	1.53	113
		40.0		24	0.42	20
		50.0		3	-2.58	0 ^{d)}
		60.0		0	c)	0 ^{d)}
		PC		55	1.61	123

[Short-term treatment : +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts ^{a)} (×10 ⁴ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁴ cells/mL)	PD	RICC
S9 mix	time (hr)					
+	6-18	0 (NC)	18	49	1.44	100
		50.0		50	1.47	103
		60.0		53	1.56	113
		70.0		48	1.42	97
		80.0		40	1.15	71
		90.0		35	0.96	55
		100		23	0.35	16
		110		6	-1.58	0 ^{d)}
		PC		36	1.00	58

[Continuous treatment : 24hr]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts ^{a)} (×10 ⁴ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁴ cells/mL)	PD	RICC
S9 mix	time (hr)					
-	24-0	0 (NC)	18	50	1.47	100
		15.0		52	1.53	106
		20.0		45	1.32	84
		25.0		40	1.15	69
		30.0		29	0.69	34
		35.0		26	0.53	25
		PC		46	1.35	88

NC : Negative control (water for injection)

The number of cells on the plate of each dose was measured using the hemocytometer (8 areas) at the time of start^{a)} and end^{b)} for treatment. Cell counts were displayed as the mean of measured values.

PD : Population Doubling was determined as;

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

RICC : Relative Increase in Cell Counts was determined as;

$$\{[\text{Increase in number of cells intreated cultures (final - starting)}] / [\text{Increase in number of cells control cultures (final - starting)}]\} \times 100$$

c) The value was incalculable because of cytotoxicity.

d) The value was regarded as 0%, because RICC was 0 and below.

All calculations were carried out using Excel 2010

T-G396

信頼性保証書 (1/2)

試験番号 : T-G396

試験表題 : Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate 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		2019 年 1 月 24 日	2019 年 1 月 24 日
試験計画書変更書 (1)		2019 年 2 月 6 日	2019 年 2 月 6 日
細胞播種		2019 年 2 月 9 日	2019 年 2 月 12 日
調製・保存 (被験物質・ 陽性対照物質) 処理		2019 年 2 月 12 日	2019 年 2 月 12 日
染色体標本作製 (固定)		2019 年 2 月 13 日	2019 年 2 月 14 日
染色体標本作製 (染色)		2019 年 2 月 14 日	2019 年 2 月 14 日
染色体標本観察		2019 年 2 月 21 日	2019 年 2 月 21 日
生データ		2019 年 3 月 19 日	2019 年 3 月 19 日
改善確認		2019 年 3 月 19 日	2019 年 3 月 19 日
最終報告書草案 表・付表		2019 年 3 月 19 日	2019 年 3 月 19 日
改善確認		2019 年 3 月 19 日	2019 年 3 月 19 日
申請資料		2019 年 3 月 19 日	2019 年 3 月 19 日

信頼性保証書 (2/2)

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
最終報告書		2019 年 3 月 27 日	2019 年 3 月 27 日

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		2018 年 12 月 22 日	2018 年 12 月 28 日
		2018 年 12 月 25 日	
		2018 年 12 月 26 日	
		2018 年 12 月 27 日	
		2018 年 12 月 28 日	

2019 年 3 月 27 日

株式会社ボゾリサーチセンター

信頼性保証部門