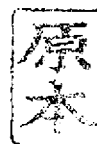




BOZO RESEARCH
CENTER INC.



最 終 報 告 書

ラウリルリン酸ナトリウムの
ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1148

2005 年 11 月 10 日

株式会社 **ボソリサーチセンター**

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

目 次

	頁
目 次	1
要 約	9
緒 言	10
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び媒体	11
1) 被験物質	11
2) 媒体	11
2. 被験液の調製	12
1) 調製方法	12
2) 保存方法	12
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) 供試は乳類培養細胞	14
2) 入手先及び入手年月日	14
3) 細胞の選択理由	14
4) 染色体構成	15
5) 増殖様式	15
6) 培養液	15

	頁
7) 培養条件	15
8) 細胞の保存	15
5. S9mix 及び培養液	15
1) S9 mix	15
2) 培養液	16
6. 試験方法	17
1) 識別方法	17
2) 細胞増殖抑制試験	17
3) 染色体異常試験	19
4) 標本の観察	20
5) 染色体異常の分類	20
6) 判定基準	21
 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	25
3) 数的異常	25
考察	27
参考文献	28

Figures and Tables

- Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with Phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test treated with Phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 2-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with Phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test treated with phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 3-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with Phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [continuous treatment: 24 hr]
- Fig. 3-2 Results of the chromosome aberration test treated with phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [continuous treatment: 24 hr]
- Fig. 4-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with Phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [continuous treatment: 48 hr]
- Fig. 4-2 Results of the chromosome aberration test treated with phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [continuous treatment: 48 hr]

Table 1-1 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid, dodecyl ester,
sodium salt [short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid, dodecyl ester,
sodium salt [short-term treatment: -S9 mix]

Table 1-3 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid, dodecyl ester,
sodium salt [continuous treatment: 24 hr]

Table 1-4 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid, dodecyl ester,
sodium salt [continuous treatment: 48 hr]

Table 2-1 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [short-term treatment: +S9 mix]

Table 2-2 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [short-term treatment: -S9 mix]

Table 2-3 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [continuous treatment: 24 hr]

Table 2-4 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid,
dodecyl ester, sodium salt [continuous treatment: 48 hr]

要 約

ラウリルリン酸ナトリウム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、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 2880 μ g/mL とし、細胞増殖抑制試験を実施した。被験物質は染色体異常試験に推奨されている全ての溶媒に対して不溶であったため、0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁して試験を実施した。その結果、短時間処理法では 360 μ g/mL 以上の用量で、連続処理法では 180 μ g/mL 以上の用量で、それぞれ被験物質と推測される物質が細胞密度測定用標本のプレート底面へ固着したため、単層培養細胞密度計（モノセレータ）を用いての細胞密度測定において信頼出来る 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）が算出できなかった。しかし、細胞状態の観察においては、これらの用量では細胞毒性が認められたことから、最高用量を固着した物質によって染色体異常観察用標本の作製及び観察が妨げられる可能性が少なく、かつ細胞毒性が確認された最低濃度と定め、短時間処理法では 360 μ g/mL を、連続処理法では 180 μ g/mL を最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 4 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においては構造異常及び数的異常（倍数体）の出現率は増加しなかった。短時間処理法の非代謝活性化においては構造異常の出現率は増加しなかったが、数的異常（倍数体）の出現率にわずかな増加が認められた。これに対して、連続処理法では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに構造異常の出現率は増加しなかったが、数的異常（倍数体）の用量依存的な著しい出現率の増加が認められた。なお、観察細胞の 20% に倍数体が認められる用量である PD₂₀値は 24 時間処理では 1.02 mg/mL、48 時間処理では 0.03 mg/mL であった。各処理法ともに陰性及び陽性対照における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、さらに試験施設の背景値と同様であった。また、陰性対照群における数的異常（倍数体）の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、さらに試験施設の背景値と同様であった。従って試験は適切に実施されたものと考えられる。

以上の結果から、ラウリルリン酸ナトリウムは、本試験条件下において染色体の構造異常の誘発能を有さないが、数的異常（倍数体）の誘発能を有すると判定した。

緒 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、ラウリルリン酸ナトリウムの安全性試験の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/TU）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。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び媒体

1) 被験物質

被験物質は厚生労働省医薬食品局審査管理課より供給された。被験物質情報（Attached Data 1～3）及び安定性情報（Attached Data 4）はより提供された。なおこれらの情報はにおける非 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 :

名称 : ラウリルリン酸ナトリウム

Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt

CAS 番号 : 50957-96-5

構造式

又は示性式 : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{PO}_3\text{OHNa}$ ($\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{NaO}_4\text{P}$)

性状 : 白色粉末、わずかに特異なおいがある。

分子量 : 288.30

ロット番号 :

保存方法 : 室温（保存期間中の実測値：8℃～28℃）、密封

安定性 : 実験終了後の被験物質を分析した結果、品質には問題なく、安定であることを確認した（Attached Data 4）。

取り扱い上の

注意 : 作業場の換気を十分に行い、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防いだ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをした。

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び変異原室

返却 : 被験物質の残量は、すべての関連試験終了後に試験委託者に返却した。

2) 媒体

名称 : カルボキシメチルセルロースナトリウム

ロット番号 : 2115

規 格 : 日本薬局方
製 造 元 : 丸石製薬株式会社
保 存 方 法 : 室温
保 存 場 所 : 御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室
溶媒の選択理由 : 供試前の媒体検討の結果、被験物質は注射用水、エタノール、DMSO 及びアセトンに不溶であったため、0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を溶媒として懸濁した。

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 0.2880 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 28.8 mg/mL 溶液(プレートに 0.50 mL 添加した際の最終濃度:2880 µg/mL) を調製した。次いで、28.8 mg/mL 懸濁液を公比 2 (各濃度の被験液 5 mL : 溶媒 5 mL) で順次 7 段階希釈し、14.4、7.20、3.60、1.80、0.90、0.45 及び 0.23 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 0.2880 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 28.8 mg/mL 懸濁液 (プレートに 0.50 mL 添加した際の最終濃度: 2880 µg/mL) を調製した。次いで、28.8 mg/mL 懸濁液を公比 2 (各濃度の被験液 5 mL : 溶媒 5 mL) で順次 7 段階希釈し、14.4、7.20、3.60、1.80、0.90、0.45 及び 0.23 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。このうち 3.60、1.80、0.90、0.45 及び 0.23 mg/mL の 5 濃度の被験液を試験に用いた。

連続処理法では、被験物質 0.2880 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 28.8 mg/mL 懸濁液 (プレートに 0.50 mL 添加した際の最終濃度: 2880 µg/mL) を調製した。次いで、28.8 mg/mL 懸濁液を公比 2 (各濃度の被験液 5 mL : 溶媒 5 mL) で順次 8 段階希釈し、14.4、7.20、3.60、1.80、0.90、0.45、0.23 及び 0.11 mg/mL の 9 濃度段階の被験液を調製した。このうち 1.80、0.90、0.45、0.23 及び 0.11 mg/mL の 5 濃度の被験液を試験に用いた。

2) 保存方法

被験液は用時に調製し、保存は行わなかった。

3) 安定性

被験物質に 0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を添加した際に、発泡が認められたが、発熱、吸熱及び色調などの変化は認められなかった。

3. 対照物質

1) 陰性対照

溶媒の 0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を陰性対照物質とした。

名 称 : カルボキシメチルセルロースナトリウム

ロット番号 : 2115

規 格 : 日本薬局方

製 造 元 : 丸石製薬株式会社

保 存 方 法 : 室温

保 存 場 所 : 御殿場研究所 第 1 研究棟被験物質調製室

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 : CKP7428

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 : 416ACG

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

CP をプラスチック遠沈管 (50 mL) に 0.0140 g 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、K4A96) を 20.0 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.9 mL に 0.1 mL を加えた時の最終濃度: 14 µg/mL) を調製した。

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、K4A96) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1.00 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.25 mL : 生理食塩液 4.75 mL) し、0.0500 及び 0.00250 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.9 mL に 0.00250 mg/mL 溶液を 0.1 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.05 µg/mL)。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて発癌物質として処分した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

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) 供試は乳類培養細胞

細胞は、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。入手後液体窒素で凍結保存していた細胞を融解後、継代培養して試験に用いた。

2) 入手先及び入手年月日

元株細胞は、2001 年 12 月 26 日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。入手後、継代数の少ない細胞をジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号 KSH7174、試薬特級 99%以上、和光純薬工業株式会社) を 10 vol% 添加した培養液に懸濁し、液体窒素中で保存した。この保存細胞を融解後、継代培養し細胞の性状検査を実施して性状などが適正であることを確認した後に試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験で 23 継代、染色体異常試験では短時間処理法で 5 継代、連続処理法で 9 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が入手時の情報で確認されている。

3) 細胞の選択理由

染色体数が少なく比較的大型で染色体異常の観察に適すること、自然発生の染色体異常出現率が低いこと、種々の化学物質に対して感受性が高いこと、バックグラウンドデータが豊富であることなどの理由から本細胞を選択した。

4) 染色体構成

試験に使用した細胞は性状検査において 70%の細胞が染色体数 25 本を示し、モードは 25 本で適切であった。

5) 増殖様式

試験に使用した細胞は、プレート上で単層状に増殖し、倍加時間は細胞増殖抑制試験に用いた細胞では 18.6 時間、染色体異常試験に用いた細胞では 19.0 時間であった。これらは入手時の特性（単層状に増殖、倍加時間 18～20 時間）と同様であり適切な増殖様式であった。

6) 培養液

培養液は Minimum Essential Medium (GIBCO™、Cat.No.11095-080、Invitrogen Co.) を購入して用いた。これに温度 56℃で 30 分間非働化した仔牛血清を 10 vol%添加して培養液を調製した。

7) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37℃の高湿度条件下で培養し、1～4 日ごとに継代培養した。

8) 細胞の保存

培養液に 10 vol%ジメチルスルホキシド (DMSO、JIS 規格試薬特級 99%以上、和光純薬工業株式会社) を加え、液体窒素中で保存した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

S9 mix は、オリエンタル酵母工業株式会社より S9/コファクターC セット（ロット番号 C040806051）を購入し、用時に調製を行った。なお、製品分析書に記載された S9 及びコファクターC についての詳細情報及び保存条件を以下に記載した。

(1) S9

名 称 : S9

ロット番号 : 04080605

製造日 : 2004 年 8 月 6 日

種 系 統 : ラット・SD 系

性 : 雄

週 齢 : 7 週齢

体 重 : 212.4±9.5 g

誘 導 物 質 : フェノバルビタール (PB) と 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+60mg/kg body weight

BF 1日 80mg/kg body weight

保 存 方 法 : 冷凍 (−80℃)

使 用 期 限 : 2005 年 2 月 5 日

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C

ロット番号 : C04080305

製 造 日 : 2004 年 8 月 3 日

保 存 方 法 : 冷凍 (−80℃)

使 用 期 限 : 2005 年 2 月 2 日

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	
		ジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

2) 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No.11095-080) に、Life Technologies Inc.より購入し非働化 (56℃, 30 分) した仔牛血清(CS)を 10 vol%添加して調製した培養液(CS-MEM)を用いた。調製後の CS-MEM は冷蔵保存した。

(1) 仔牛血清

名 称 : Calf serum (CS)
 ロット番号 : 364570
 製造元 : Life Technologies Inc.
 保存方法 : 冷凍 (−80℃)
 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 : 1227683
 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¹⁻⁴⁾

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・連続処理法	
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

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を「NC」、被験物質処理群を濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルを使用機材等に貼付して識別した。

(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 (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を使用機材等に貼付して識別した。

2) 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するための予備試験として実施し

た。いずれの処理法においても最高濃度を 2880 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 1440、720、360、180、90.0、45.0 及び 23.0 $\mu\text{g/mL}$ の計 8 濃度を設定し、これに陰性対照を設けた。また、短時間処理法では代謝活性化と非代謝活性化で試験を実施した。

(1) 短時間処理法

シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート (直径 60 mm) を 2 枚とし、シャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞 (培養液 5.0 mL) を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び 0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 0.50mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.50mL を加えた。非代謝活性化では、陰性対照については、培養液 0.50 mL を取り除き、0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 0.50mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.50 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.50 mL を加えた。各群ともに添加後 6 時間培養し、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。培養終了後、培養液を取り除き生理食塩液で細胞を洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。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) を用いて細胞の染色の濃淡から細胞密度を測定し、陰性対照の値を 100%として 50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) を求めた。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した (培養終了時の結果は、参考データとした)。加えて、細胞密度測定用標本における細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。

(2) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、培養液 0.50 mL を取り除き、陰性対照については 0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 0.50mL を、被験物質処理群については、各濃度の被験液 0.50 mL を加え、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。培養終了後、短時間処理法と同様に培養液の色、細胞の状態及び析出の有無を観察した後に、洗浄、固定、染色し、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) を求めた。加えて、細胞密度測定用標本における細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。

3) 染色体異常試験

(1) 用量設定の根拠

細胞増殖抑制試験においては、短時間処理法及び連続処理法ともに 180 $\mu\text{g/mL}$ 以上で細胞密度測定用標本に被験物質と推測される物質がプレート底面へ固着し、その結果、定法通りの単層培養細胞密度計（モノセレータ）を用いての細胞密度測定と 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）の算出が出来なかった。しかし、倒立位相差顕微鏡で細胞の培養状態を観察した結果、短時間処理法の代謝活性化及び連続処理法では 90 $\mu\text{g/mL}$ で、短時間処理法の非代謝活性化では 45 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性が確認された。また、単層培養細胞密度計（モノセレータ）用の標本を倒立位相差顕微鏡で観察した結果、短時間処理法では 720 $\mu\text{g/mL}$ 以下で、連続処理法では 90 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性が確認された。そこで、染色体異常試験の最高用量を、固着した物質によって染色体異常観察用標本の作製及び観察が妨げられる可能性が少なく、かつ細胞状態の観察において細胞毒性が確認された最低濃度と定め、短時間処理法では 360 $\mu\text{g/mL}$ を、連続処理法では 180 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として以下一定の公比で希釈した各 4 試験用量を設定した。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

(2) 短時間処理法

シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を 4 枚とし、シャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では、陰性対照については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び 0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 0.50 mL を加えた。被験物質処理群については培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.50 mL を加えた。陽性対照については培養液 0.933 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び CP 0.1 mL を加えた。非代謝活性化では、陰性対照については培養液 0.50 mL を取り除き、0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 0.50 mL を加えた。被験物質処理群については培養液 0.50 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.50 mL を加えた。陽性対照については培養液 0.1 mL を取り除き、MMC 0.1 mL を加えた。各群ともに添加後 6 時間培養し、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。なお、染色体観察用標本作製に際しては、細胞分裂を分裂中期で停止させるため標本作製約 2 時間前にコルセミド 0.1 mL（最終濃度：0.2 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液で単離した細胞を遠心分離し、0.075M 塩化カリウム溶液で低張処理し、メチル

アルコール：酢酸=3：1液で固定した。スライドガラス1枚につき2箇所固定した細胞を滴下し、空気乾燥後2%ギムザ液で染色標本作製した。染色体観察用標本は、1枚のシャーレから2枚作製した。各処理群で残る2枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じ洗浄、固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、6時間の被験物質処理終了時及び18時間の培養終了時に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

(3) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し3日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、陰性対照については、培養液0.50 mLを取り除き、0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液0.50 mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.50 mLを取り除き、各濃度の被験液0.50 mLを加えた。陽性対照については培養液0.1 mLを取り除き、MMC 0.1 mLを加えた。各群ともに添加後24時間あるいは48時間培養を続けた。なお、染色体観察用標本は短時間処理法と同様に作製した。各処理群で残る2枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じて洗浄、固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、被験物質処理終了時に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

4) 標本の観察

各濃度当たり200個（シャーレ当たり100個）のよく広がっ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。同時に数的異常（倍数体）の数も記録した。染色体数46本以上を持つ細胞を倍数体とし、8倍体も観察対象として含め、その出現数を記録した。なお、客観的な観察を行うため染色体観察用標本はすべて盲検法により観察した。

5) 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

染色体構造が、その細胞が本来持っている固有の構造（核型）と異なる場合を構造異常と定義した。

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 : polyploid (核内倍加体 : endoreduplication を含む)

6) 判定基準

2 枚のシャーレ間で異常細胞の出現率に著しいばらつきがないこと、陰性対照で異常細胞の出現率が 5%未満であること、陽性対照でギャップ以外の異常細胞の出現率が 10%以上であること、被験物質処理群の 3 用量以上における染色体標本の評価が可能であること及び培養条件など試験環境に異常が認められないことを本試験の成立条件とした。

石館らの判定基準^{1,2,3)}に従い、各試験群の異常細胞の出現率に対して以下のような判定基準を設けた。

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 (+)

染色体構造異常を有する細胞の総出現率はギャップを含む場合(TAG)と含まない場合(TA)について集計し、ギャップを含まない場合について判定を行った。異常細胞の出現に

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^{2,3,4)}。

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. 2-1 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化及び非代謝活性化ともに 180 µg/mL 以上の濃度で、被験物質と推測される物質が細胞密度測定用標本のプレート底面へ固着したため、360 µg/mL 以上では単層培養細胞密度計（モノセレータ）を用いての細胞密度測定において信頼出来る測定値が得られず、正確な 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）の算出が出来なかった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化では 90 µg/mL で、非代謝活性化では 45 µg/mL 以上で細胞毒性が認められた。また、非代謝活性化では 720 µg/mL 以上で培養液が乳赤色の色調変化を示した。さらに、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、1440 µg/mL 以上で被験物質の析出が認められた。なお、標本作製前の細胞状態の観察においては、代謝活性化では 45 µg/mL 以上で、非代謝活性化では 90 µg/mL で細胞毒性が観察された。また、細胞密度測定用標本の細胞状態の倒立位相差顕微鏡による観察においては、代謝活性化では 180 µg/mL 以上で、非代謝活性化では 90 µg/mL 以上で細胞毒性が認められた。さらに、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 90 µg/mL 以上で、被験物質と推測される膜状の物質がプレート底面の一部または全面に、用量の増加に伴って薄くから厚く固着しているのが観察された。

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. 3-1 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 4-1 及び Table 1-4 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理及び 48 時間処理ともに 180 µg/mL 以上の濃度で、被験物質と推測される物質が細胞密度測定用標本のプレート底面へ固着したため、24 時間処理では 90 µg/mL 以上で、48 時間処理では 360 µg/mL 以上で単層培養細胞密度計（モノセレータ）を用いての細胞密度測定において信頼出来る測定値が得られず、正確な 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）の算出が出来なかった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに 90 µg/mL 以上で細胞毒性が認められ、720 µg/mL 以上で培養液の乳赤色化が認められた。また、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、1440 µg/mL 以上で被験物質の析出が認められた。なお、細胞密度測定用標本の細胞状態の倒立位相差顕微鏡による観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 90 µg/mL 以上で細胞毒性が認められ、被験物質と推測される膜状の物質がプレート底面の一部または全面に、用量の増加に伴って薄くから厚く固着しているのが観察された。

2. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験では、被験物質と推測される物質がプレート底面へ固着したため単層培養細胞密度計（モノセレータ）を用いての細胞密度測定が行えず、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を基準とした染色体異常試験における用量の設定が出来なかった。そこで、染色体異常試験の最高用量を、固着した物質によって染色体異常観察用標本の作製及び観察が妨げられる可能性が少なく、かつ細胞状態の観察において細胞毒性が確認された用量よりも高い用量と定め、短時間処理法では 360 µg/mL を、連続処理法では 180 µg/mL を最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 4 試験用量を設定し染色体異常誘発能を検討した。

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

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 180 µg/mL 以上で被験物質と推測される物質がプレート底面へ固着し、細胞の状態が観察出来なかった。培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。なお、細胞密度測定用標本の細胞状態の倒立位相差顕微鏡による観察においては、代謝活性化では 360 µg/mL で細胞毒性が認められた。さらに、代謝活性化では 90 µg/mL 以上で、非代謝活性化では 180 µg/mL 以上で、被験物質と推測される膜状の物質がプレート底面の全面に、用量の増加に伴って薄くから厚く固着しているのが観察された。

連続処理法では 24 時間及び 48 時間処理ともに 90 µg/mL 以上で細胞毒性が認められ、180 µg/mL 以上で被験物質と推測される物質がプレート底面へ固着し、細胞の状態が観察出来なかった。培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。なお、細胞密度測定用標本の細胞状態の倒立位相差顕微鏡による観察においては、24 時間処理及び 48

時間処理ともに 90 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性が認められ、被験物質と推測される膜状の物質がプレート底面の全面に、用量の増加に伴って薄くから厚く固着しているのが観察された。

2) 構造異常

構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では 360 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、180 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、45 $\mu\text{g/mL}$ で 0%及び 23 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%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も、360 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、180 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、45 $\mu\text{g/mL}$ で 0%及び 23.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。さらに、連続処理法の 24 時間処理では 180 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、45 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、23 $\mu\text{g/mL}$ で 0%及び 11 $\mu\text{g/mL}$ 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、180 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、45 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、23 $\mu\text{g/mL}$ で 0%及び 11 $\mu\text{g/mL}$ 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及び陽性対照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 5) と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

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 360 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、180 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、45 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%及び 23 $\mu\text{g/mL}$ 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、360 $\mu\text{g/mL}$ で 4.0%、180 $\mu\text{g/mL}$ で 4.0%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 4.5%、45 $\mu\text{g/mL}$ で 4.5%及び 23.0 $\mu\text{g/mL}$ で 2.5%と陰性の判定基準である 5%未満であったが、出現率のわずかな増加が認められた。さらに、連続処理法の 24 時間処理では 180 $\mu\text{g/mL}$ で 12.5%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 12.5%、45 $\mu\text{g/mL}$ で 6.0%、23 $\mu\text{g/mL}$ で 4.5%及び 11 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%と陽性の判定基準である 10%を越える用量依存性の出現率の増加が認められた。また、48 時間処理では、180 $\mu\text{g/mL}$ で 43.5%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 52.5%、45 $\mu\text{g/mL}$ で 26.0%、23 $\mu\text{g/mL}$ で 2.5%及び 11 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%と陽性の判定基準である 10%を越える用量依存性の著しい出現率の増加が認められた。なお、48 時間処理では、180 $\mu\text{g/mL}$ で 4.0%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 11.5%、45 $\mu\text{g/mL}$ で 5.0%の 8 倍体の出現が認められ、さらに 180 $\mu\text{g/mL}$ で 4.0%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 6.5%、45 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%の細粉化 (pulverization) 又は premature chromosome condensation を伴う倍数体の出現が認められた。

各処理法ともに陰性対照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 5) と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

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構造異常及び数的異常（倍数体）ともに出現率の増加は認められなかった。非代謝活性化では構造異常の出現率の増加は認められなかったが、数的異常（倍数体）のわずかな増加が認められた。また、連続処理法では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに構造異常の出現率の増加は認められなかったが、数的異常（倍数体）の出現率に用量依存性を伴う著しい増加が認められた。出現した倍数体には 8 倍体が多く認められ、さらに細粉化（pulverization）又は premature chromosome condensation を伴う倍数体が出現した。倍数体の増加を生じた機序については不明であるが、細粉化（pulverization）や premature chromosome condensation は細胞融合、細胞質分裂阻害、紡錘糸阻害、染色体橋、染色体断片などによって生じた多核細胞や小核を含む細胞が非同調的に細胞分裂に入った時に内的要因によって生じる事実が明らかにされている⁶⁾こと、核内倍加体の出現が全く認められなかったことから、本被験物質は細胞融合や細胞質分裂に及ぼす影響によって倍数体を生じたものと推察される。

ラウリルリン酸ナトリウムの類縁体である sulfuric acid, monododecyl ester, sodium salt は *Aspergillus nidulans* において mitotic aneuploid を誘発しないこと⁶⁾、マウスリンフォーマアッセイでは非代謝活性化系において陰性であること⁷⁾が報告されている。

一方、陰性対照における染色体の構造異常を有する細胞の出現率は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、2 枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現率に著しい差はなく、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。

以上の結果から、ラウリルリン酸ナトリウムは、本試験条件下において染色体の構造異常の誘発能を有さないが、数的異常（倍数体）の誘発能を有すると判定した。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354 (1977)
- 2) 石館基監修：染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1987)
- 3) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集：厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、1992
- 4) Matsuoka, A., *et al.*: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290 (1979)
- 5) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店、1988
- 6) Assinder, S.J. & Upshall, A. : Paramorphogenic and genotoxic activity of Triton X-100 and sodium dodecyl sulphate in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.*, 142, 179-181 (1985)
- 7) McGregor, D.B. *et al.*: Responses of the L5178Y tk⁺/tk⁻ mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 12, 85-154 (1988)

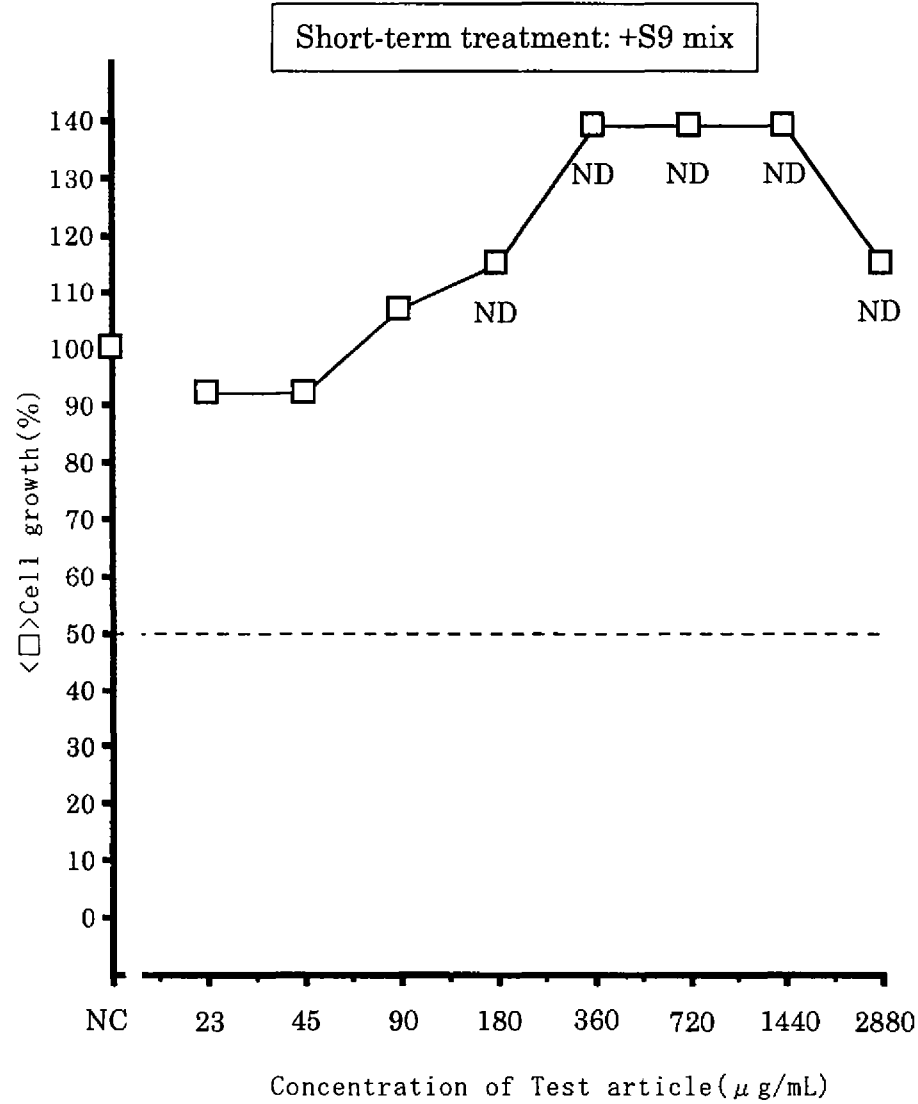


Fig. 1-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
 NC:negative control
 ND:Measurement of cell density could not be done accurately since membrane-like strucutre, which was suspected to be the test substance, adhered to the surface of the cell layer

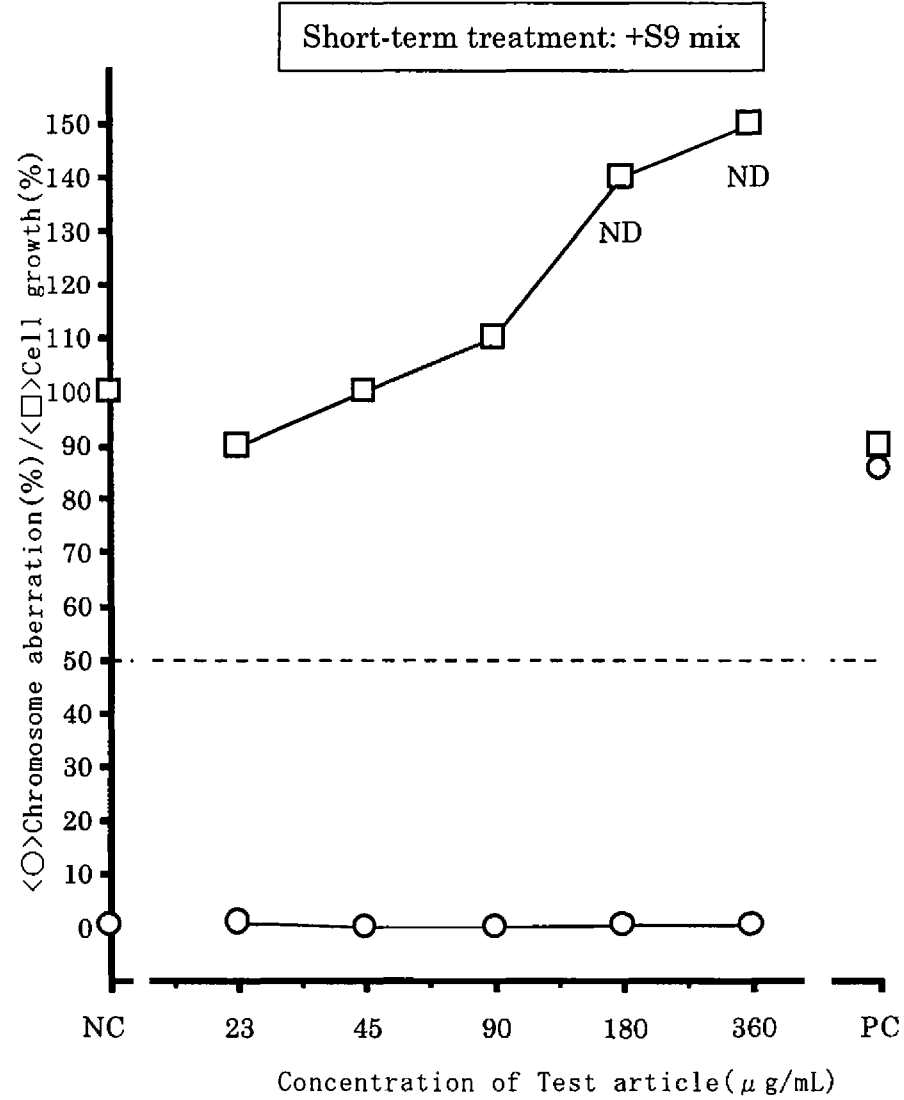


Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
 □:cell-growth ○:chromosome aberration
 NC:negative control PC:positive control
 ND:Measurement of cell density could not be done accurately since membrane-like strucutre, which was suspected to be the test substance, adhered to the surface of the cell layer

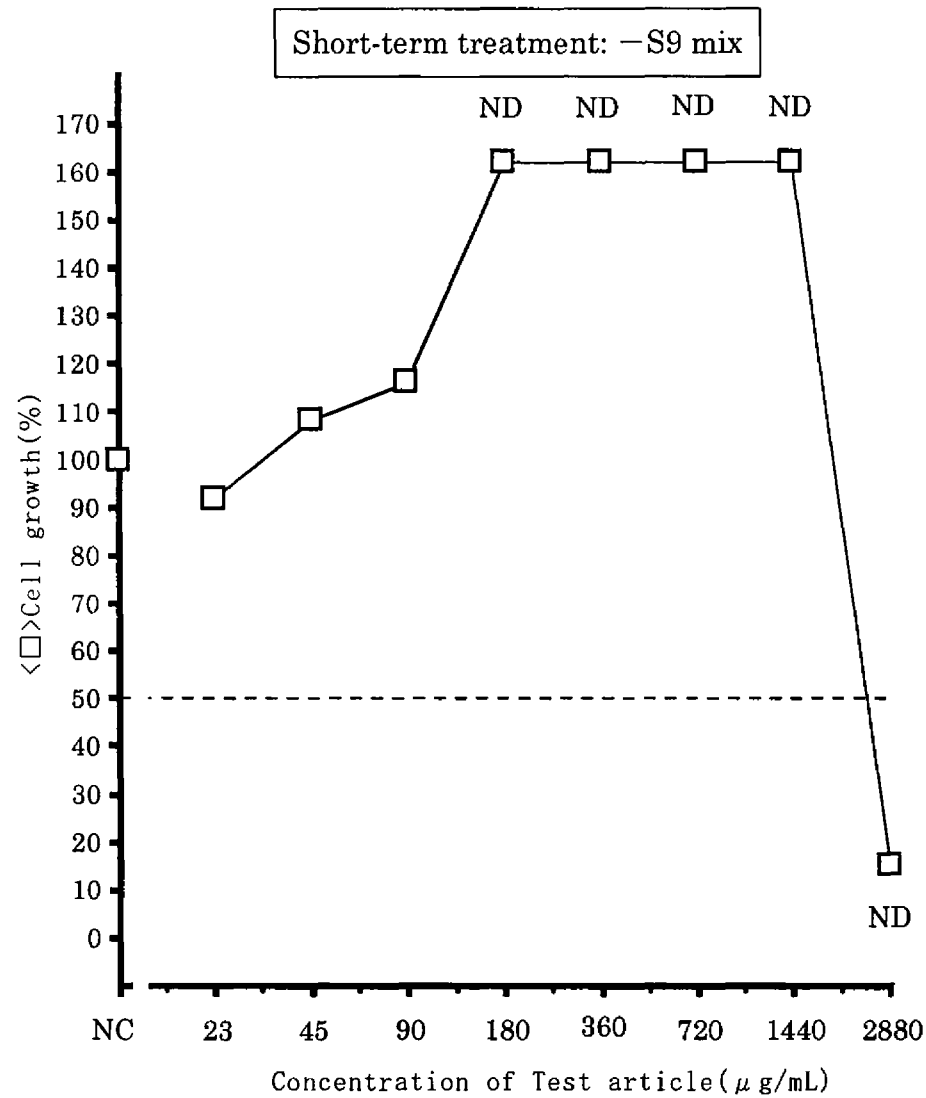


Fig. 2-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
 NC:negative control
 ND:Measurement of cell density could not be done accurately since membrane-like structure, which was suspected to be the test substance, adhered to the surface of the cell layer

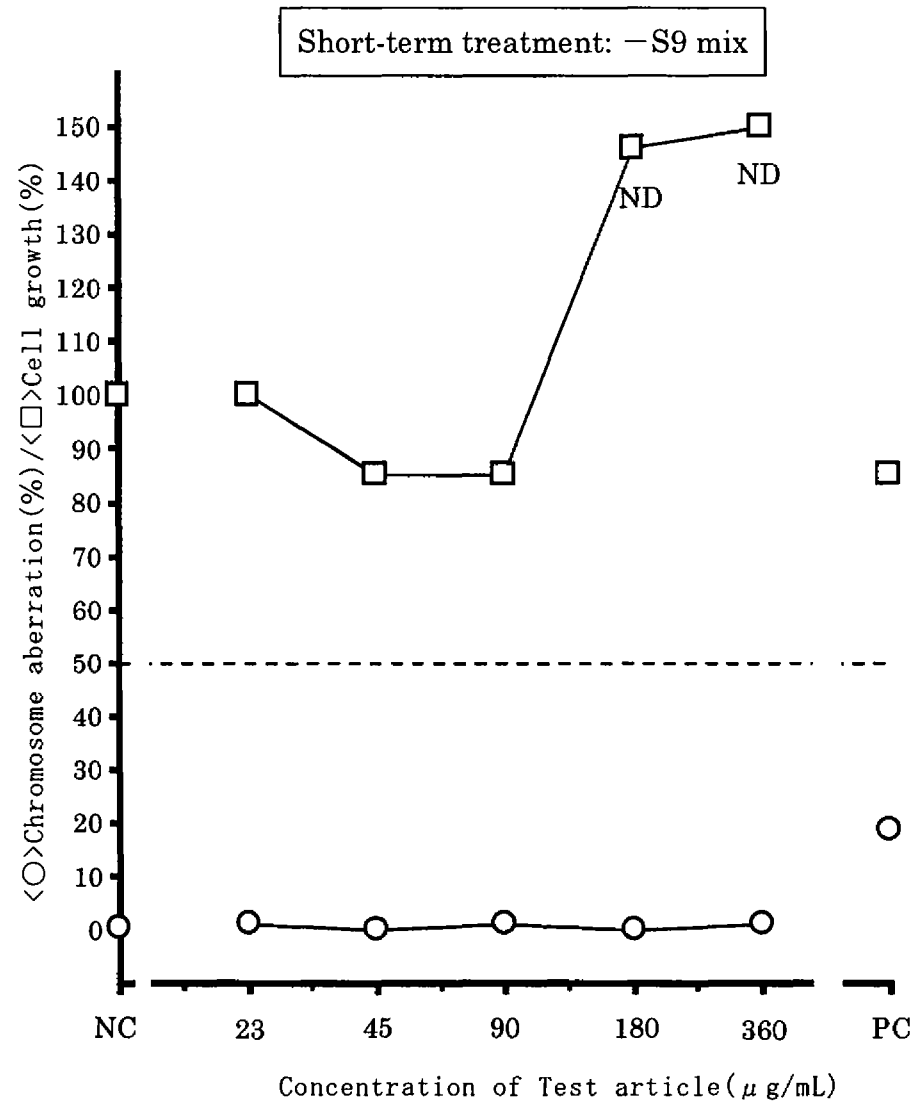


Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
 $\square$:cell-growth $\circ$:chromosome aberration
 NC:negative control PC:positive control
 ND:Measurement of cell density could not be done accurately since membrane-like structure, which was suspected to be the test substance, adhered to the surface of the cell layer

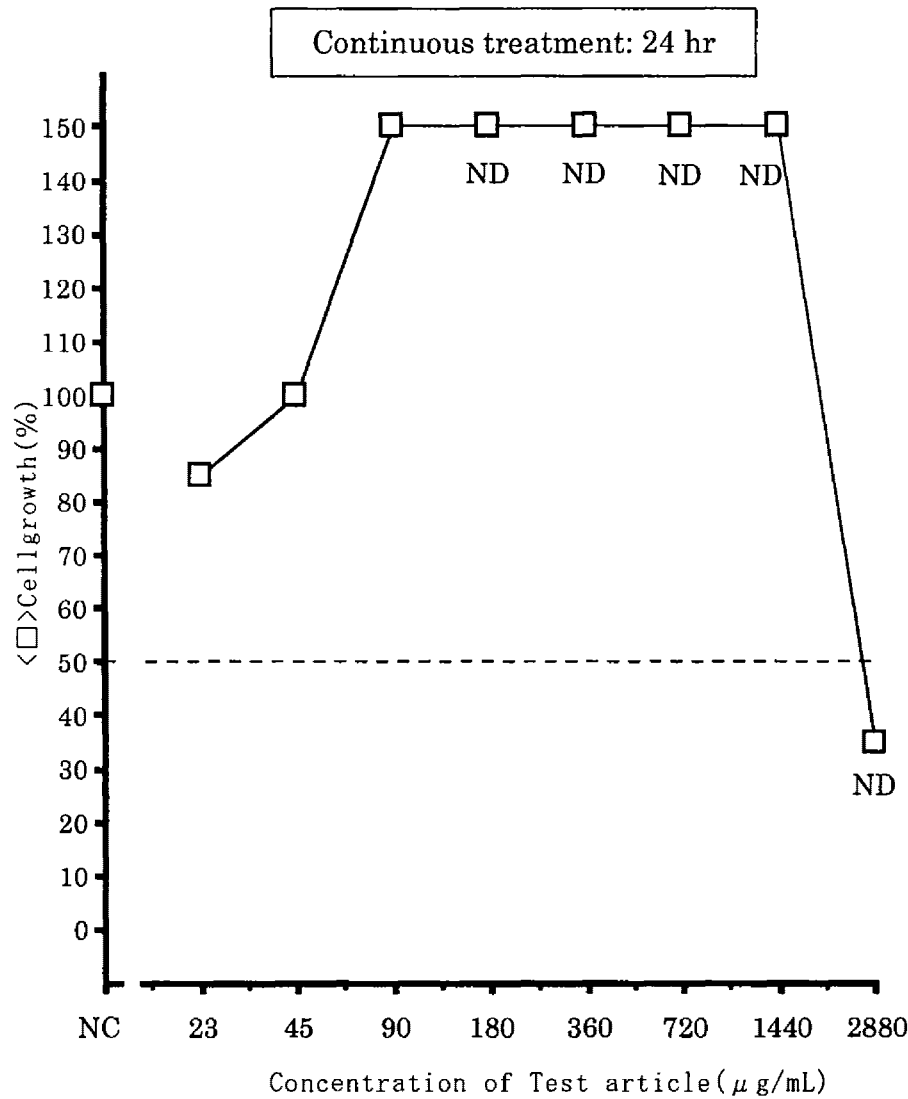


Fig. 3-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
 NC:negative control
 ND:Measurement of cell density could not be done accurately since membrane-like strucutre, which was suspected to be the test substance, adhered to the surface of the cell layer

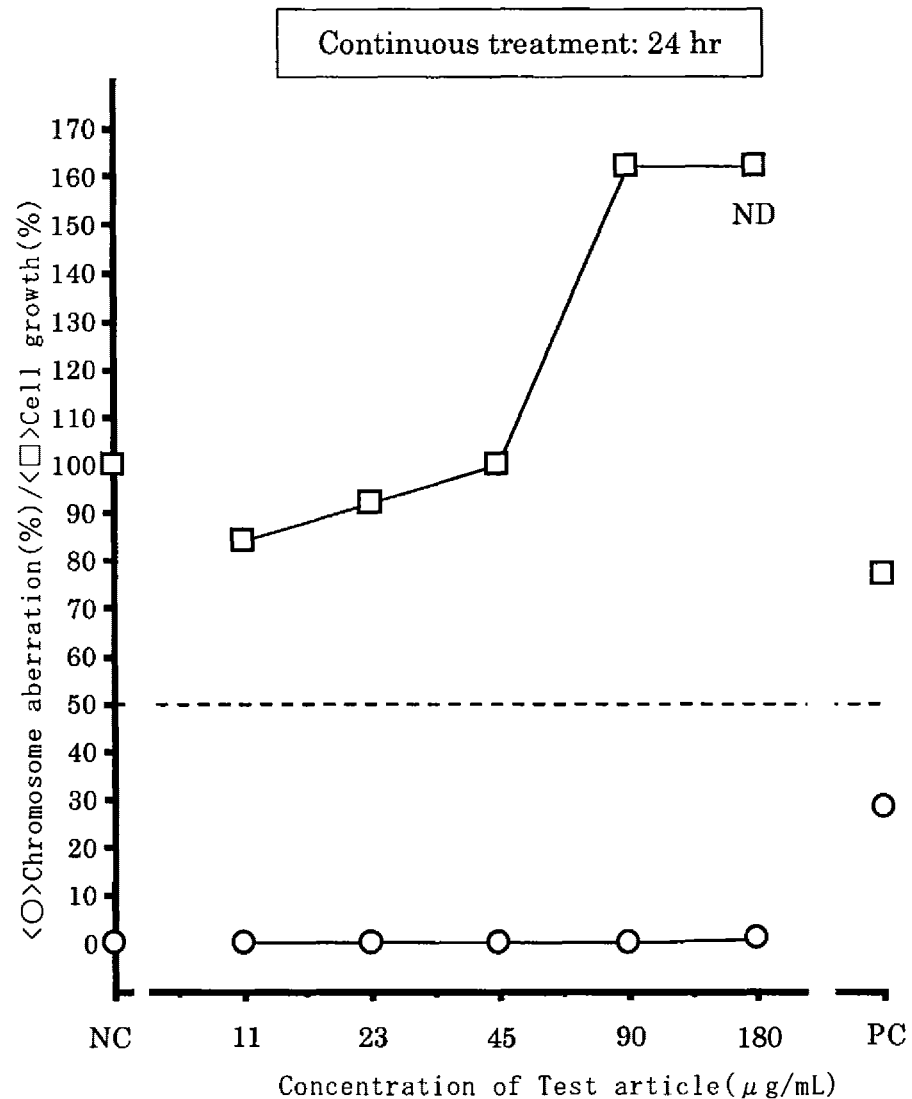


Fig. 3-2 Results of the chromosome aberration test treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
 $\square$:cell-growth $\circ$:chromosome aberration
 NC:negative control PC:positive control
 ND:Measurement of cell density could not be done accurately since membrane-like strucutre, which was suspected to be the test substance, adhered to the surface of the cell layer

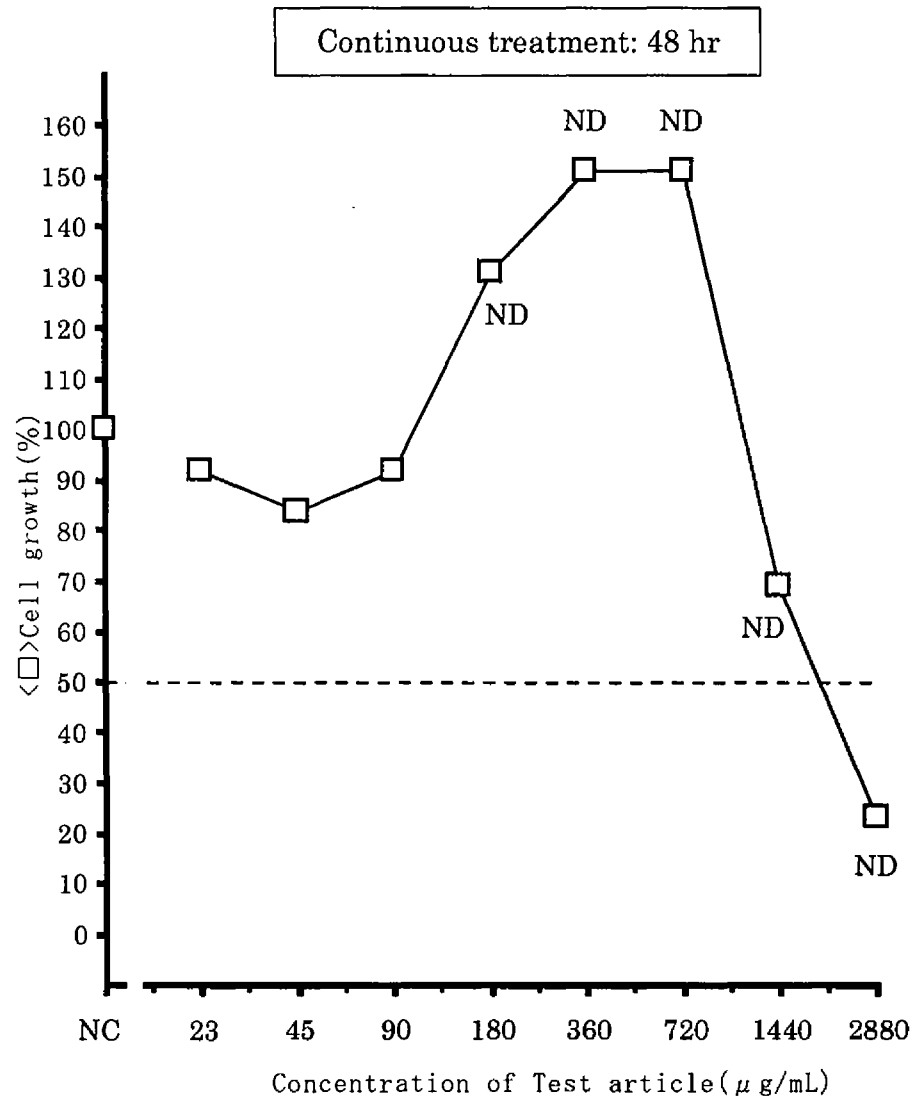


Fig. 4-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
 NC:negative control
 ND:Measurement of cell density could not be done accurately since membrane-like strucutre, which was suspected to be the test substance, adhered to the surface of the cell layer

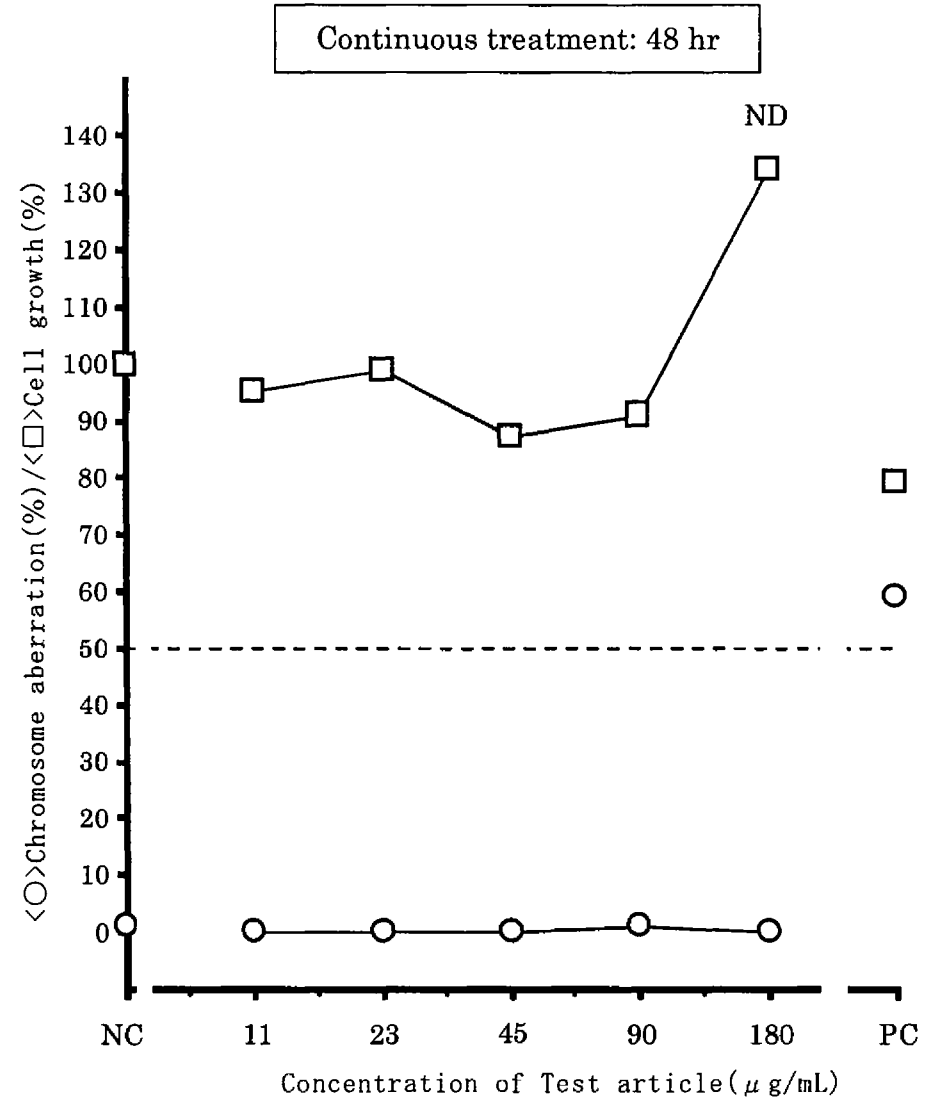
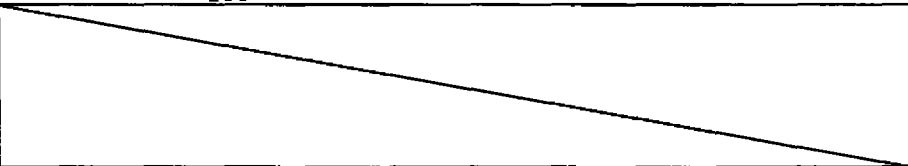


Fig. 4-2 Results of the chromosome aberration test treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
 □:cell-growth ○:chromosome aberration
 NC:negative control PC:positive control
 ND:Measurement of cell density could not be done accurately since membrane-like strucutre, which was suspected to be the test substance, adhered to the surface of the cell layer

Table 1-1 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid , dodecyl ester, sodium salt
[short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test					Chromosome aberration test						
S9 Time mix (hr)	Cell growth ratio		Observation ^{c)}			Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell growth ratio		Observation ^{c)}					
	Plate 1 and 2		Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}		Precipitates /Crystals ^{f)}	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)} 116	100	- -	- -	- -	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	- -	- -	- -	
		23	99 99	92	- -	- -	- -		100 79	90	- -	- -	- -	
			45	99 99	92	- -	- -			- -	100 100	100	- -	- -
		90		116 116	107	+ +	- -		- -	100 119		110	- -	- -
			180	116 ^{h)} 133 ^{h)}	115 ^{h)}	NO ^{g)} NO ^{g)}	- -		- -		140 ^{h)} 140 ^{h)}	140 ^{h)}	NO ^{g)} NO ^{g)}	- -
		360		150 ^{h)} 150 ^{h)}	139 ^{h)}	NO ^{g)} NO ^{g)}	- -		- -	150 ^{h)} 150 ^{h)}		150 ^{h)}	NO ^{g)} NO ^{g)}	- -
			720	150 ^{h)} 150 ^{h)}	139 ^{h)}	NO ^{g)} NO ^{g)}	- -		- -		100 79	90	- -	- -
		1440		150 ^{h)} 150 ^{h)}	139 ^{h)}	NO ^{g)} NO ^{g)}	- -		+ +	100 79		90	- -	- -
			2880	150 ^{h)} 99 ^{h)}	115 ^{h)}	NO ^{g)} NO ^{g)}	- -		+ +		100 79	90	- -	- -
		PC												

Concentration of 50% cell growth inhibition: above 2880.000 μ g/mL

Table 1-2 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid , dodecyl ester, sodium salt
[short-term treatment: -S9 mix]

Study type	S9 Time mix (hr)	Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test					Chromosome aberration test									
			Cell growth ratio		Observation ^{o)}			Cell growth ratio		Observation ^{o)}							
			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	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)} 85	100	-	-	-	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	-	-	-				
		23	85 85	92	-	-	-	Test article	23	100	-	-	-				
		45	100 100	108	+	-	-										
		90	114 ^{h)} 100 ^{h)}	116 ^{h)}	+	-	-										
		180	150 ^{h)} 150 ^{h)}	162 ^{h)}	NO ^{g)}	-	-										
		360	150 ^{h)} 150 ^{h)}	162 ^{h)}	NO ^{g)}	-	-										
		720	150 ^{h)} 150 ^{h)}	162 ^{h)}	NO ^{g)}	Milk-Red	-										
		1440	150 ^{h)} 150 ^{h)}	162 ^{h)}	NO ^{g)}	Milk-Red	+										
		2880	14 ^{h)} 14 ^{h)}	15 ^{h)}	NO ^{g)}	Milk-Red	+										
		PC												PC	85 85	85	-
Concentration of 50% cell growth inhibition: 2287.059 μ g/mL ^{h)}																	

Table 1-3 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
[continuous treatment: 24hr]

Study type	S9 Time mix (hr)	Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test					Test article		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test						
			Cell growth ratio		Observation ^{c)}						Cell growth ratio		Observation ^{c)}				
			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}				Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}		
24	Test article	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	Test article	Test article	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-		
			100		-	-	-				85		-	-	-		
		23	85	85	-	-	-			Test article	Test article	11	85	84	-	-	-
			85		-	-	-						71		-	-	-
		45	100	100	-	-	-					23	85	92	-	-	-
			100		-	-	-						85		-	-	-
		90	150	150	+	-	-					45	100	100	-	-	-
			150		+	-	-						85		-	-	-
		180	150 ^{b)}	150 ^{h)}	NO ^{g)}	-	-					90	150 ^{h)}	162 ^{h)}	+	-	-
			150 ^{h)}		NO ^{g)}	-	-						150 ^{h)}		+	-	-
		360	150 ^{b)}	150 ^{h)}	NO ^{g)}	-	-					180	150 ^{h)}	162 ^{h)}	NO ^{g)}	-	-
			150 ^{h)}		NO ^{g)}	-	-						150 ^{h)}		NO ^{g)}	-	-
		720	150 ^{b)}	150 ^{h)}	NO ^{g)}	Milk-Red	-					PC	71	77	-	-	-
			150 ^{h)}		NO ^{g)}	Milk-Red	-						71		-	-	-
		1440	150 ^{b)}	150 ^{h)}	NO ^{g)}	Milk-Red	+					Concentration of 50% cell growth inhibition: 2547.692 μ g/mL					
			150 ^{h)}		NO ^{g)}	Milk-Red	+										
		2880	28 ^{h)}	35 ^{h)}	NO ^{g)}	Milk-Red	+										
			42 ^{h)}		NO ^{g)}	Milk-Red	+										
		PC										PC					

NC: Negative Control (0.5%(w/v) sodium carboxymethyl cellulose solution)

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

e): - : No changes of color

f): - : Absence of precipitates/crystals

+ : Membranous substance was observed floating on the surface of culture medium.

g): Observation of cell condition could not be done since membrane-like structure, which was suspected to be the test substance, adhered to the surface of the cell layer.

h): These values are unreliable since adherence of membrane-like structure to the surface of the cell layer inhibited accurate measurement of the cell density

Table 2-1 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
[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	1.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	26-1 48-1
			(100)	(2)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)				
		360	200	0.5	—	1	0	1	0	0	0	0.5	1.0	—	11-1 25-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)				
		180	200	1.0	—	0	0	0	0	0	1	0.5	0.5	—	80-1 47-1
			(100)	(2)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)				
(100)	(0)		(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)						
90	200	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	08-1 57-1		
	(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)						
	(100)	(2)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)						
45	200	0.5	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	03-1 32-1		
	(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)						
	(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)						
23	200	0.0	—	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	—	52-1 27-1		
	(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)						
	(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)						
PC	200	0.5	—	3	53	154	0	0	0	85.5	86.0	+	75-1 70-1		
	(100)	(1)		(1)	(23)	(76)	(0)	(0)	(0)	(85)	(86)				
	(100)	(0)		(2)	(30)	(78)	(0)	(0)	(0)	(86)	(86)				

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 (0.5% Sodium carboxy methyl cellulose solution)

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

Table 2-2 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
[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 (100) (100)	1.5 (2) (1)	-	(1) (0)	(0) (0)	(1) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.5 (1) (0)	1.0 (2) (0)	-	04-1 71-1
		360	200 (100) (100)	4.0 (4) (4)	-	(1) (0)	(0) (1)	(1) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	1.0 (1) (1)	1.5 (2) (1)	-	01-1 15-1
		180	200 (100) (100)	4.0 (4) (4)	-	(0) (1)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.0 (0) (0)	0.5 (0) (1)	-	76-1 78-1
		90	200 (100) (100)	4.5 (4) (5)	-	(0) (0)	(0) (1)	(0) (0)	(0) (0)	(1) (0)	(0) (0)	1.0 (1) (1)	1.0 (1) (1)	-	99-1 97-1
		45	200 (100) (100)	4.5 (5) (4)	-	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	-	74-1 88-1
		23	200 (100) (100)	2.5 (2) (3)	-	(1) (0)	(1) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(1) (0)	(0) (0)	1.0 (2) (0)	1.5 (3) (0)	-	65-1 19-1
		PC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	(1) (2)	(9) (7)	(11) (10)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (1)	18.5 (19) (18)	20.0 (20) (20)	+	95-1 23-1

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 (0.5% Sodium carboxy methyl cellulose solution)

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

Table 2-3 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
[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 (100) (100)	0.5 (0) (1)	-	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)	-	34-1 07-1
		180	200 (100) (100)	12.5 (12) (13)	+	0 (0) (0)	0 (0) (0)	2 (2) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1.0 (2) (0)	1.0 (2) (0)	-	54-1 87-1
		90	200 (75) (64) (61)	12.5 (8) (7) (10)	+	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)	0.0 (0) (0) (0)	-	41-1 39-1 39-2
		45	200 (100) (100)	6.0 (6) (6)	$\pm$	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)	-	50-1 20-1
		23	200 (100) (100)	4.5 (4) (5)	-	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)	-	18-1 53-1
		11	200 (100) (100)	1.5 (1) (2)	-	1 (0) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.5 (0) (1)	-	61-1 67-1
		PC	200 (100) (100)	1.5 (2) (1)	-	8 (2) (6)	17 (9) (8)	40 (18) (22)	0 (0) (0)	3 (2) (1)	0 (0) (0)	28.5 (28) (29)	32.0 (30) (34)	+	83-1 46-1

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 (0.5% Sodium carboxy methyl cellulose solution)

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

Table 2-4 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt
[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 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	(0) (0)	(0) (1)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (1)	(0) (0)	1.0 (0) (2)	1.0 (0) (2)	-	98-1 14-1
		180	200 (100) (100)	43.5 (46) (41)	+	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	-	72-1 82-1
		90	200 (100) (100)	52.5 (45) (60)	+	(0) (0)	(0) (0)	(0) (2)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	1.0 (0) (2)	1.0 (0) (2)	-	62-1 13-1
		45	200 (100) (100)	26.0 (33) (19)	+	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	-	68-1 96-1
		23	200 (100) (100)	2.5 (2) (3)	-	(1) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	-	92-1 21-1
		11	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	-	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	-	56-1 44-1
		PC	200 (100) (100)	1.0 (1) (1)	-	(0) (2)	(8) (17)	(45) (55)	(1) (0)	(0) (0)	(1) (1)	59.0 (53) (65)	59.5 (53) (66)	+	36-1 12-1

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 (0.5% Sodium carboxy methyl cellulose solution)

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