

最終報告書

シュウ酸二水和物のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1280

数ポンリサーチセンター

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

	真
目	次1
試験多	庝施概要 ·······5
試験衍	详事者一覧8
要	約9
緒	言10
試験材	対料及び方法
1.	被験物質及び溶媒11
1)	被験物質11
2)	溶媒
2.	被験液の調製12
1)	調製方法12
2)	調製頻度12
3)	安定性13
3. 5	対照物質13
1)	陰性対照13
2)	陽性対照13
4. 1	吏用細胞株14
1)	細胞株14
2)	細胞の選択理由14
3)	培養条件14
4)	細胞の性状検査14
5. \$	59mix 及び培養液 ·······15
1)	S9 mix

	頁
2)	培養液16
6.	試験方法16
1)	識別方法17
2)	用量の設定17
3)	細胞増殖抑制試験18
4)	染色体異常試験19
5)	標本の観察20
6)	染色体異常の分類20
7)	判定基準21
試験結	60.400
1. 斜	
1)	短時間処理法
2)	連続処理法
2. 募	染色体異常試験23
1)	被験物質処理終了時の培養細胞の観察23
2)	構造異常23
3)	数的異常24
考察	25
参考文	献

試験実施概要

1. 試験計画書

試験番号 : M·1280

試験表題: シュウ酸二水和物のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験目的 : ほ乳類の培養細胞 (CHL/IU 細胞株) を用いて、本被験物質の染色体

異常誘発能の有無を明らかにした。

3. 試験委託者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

〒100-8916 東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

4. 試験受託者 : 株式会社ボゾリサーチセンター

〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

5. 試験実施施設 : 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

6. 被験物質

供 給 者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

製 造 者

名 称 : シュウ酸二水和物、しゅう酸二水和物

Oxalic acid dihydrate

别 名: Ethanedioic acid, dihydrate

受 領 日 : 2006年12月26日

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室

要 約

シュウ酸二水和物の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

初めに、毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 1300 μg/mL を最高用量とし て、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、50%または明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が 認められる用量は、短時間処理法の代謝活性化では 1300 µg/mL 以上、非代謝活性化では 1300 μg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 163 μg/mL、48 時間処理では 81.3 μg/mL であった。 50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は、短時間処理法の代謝活性化では 1300 μg/mL 以上、非代 謝活性化では 789.3 μg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 163 μg/mL を、48 時間処理では 79.5 μg/mL と算出された。しかしながら、短時間処理法では 81.3 μg/mL 以上の用量で、連続処理 法では 40.6 µg/mL 以上の用量で被験物質の析出が認められ、高用量においてはシャーレ底面に 析出物が固着しモノセレーターによる細胞増殖抑制濃度の測定値に影響を与えていることが確 認され、染色体標本の観察に際して析出が観察を阻害する可能性が推測された。また、顕微鏡 によって細胞状態を確認したところ、短時間処理法及び連続処理法ともに 650 μg/mL 以上の用 量で、死滅細胞によると思われる残渣がシャーレ底面に認められた。これらの結果を総合的に 勘案して、ガイドラインに定められた「適切な間隔で 3 段階以上の染色体分析ができる用量」 が得られ、さらに「析出の認められる用量を 1~2 用量含める」ために、短時間処理法の代謝活 性化では 650 µg/mL を、非代謝活性化では 325 µg/mL を、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 163 μg/mL を染色体異常試験における最高用量に設定し、以下公比 2 で希釈し た各6用量を設定し染色体異常誘発能の有無を検討した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法及び連続処理法ともに染色体の構造異常及び倍数体の 出現率の増加は認められなかった。一方、各処理法の陰性対照群における染色体の構造異常及 び倍数体の出現率は全て陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値と同様であった。更に、 各処理法の陽性対照群における染色体構造異常の出現率は全て陽性の判定基準を超え、試験施 設の背景値と同様の顕著な誘発が認められた。従って試験は適切に実施されたものと考えられ た。

以上の結果から、シュウ酸二水和物は、本試験条件下において染色体の構造異常及び倍数体 の誘発能は有さないものと判定した。

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、シュウ酸二水和物の安全性試験の一環として、ほ乳類の培養細胞(CHL/IU)を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

Good Laboratory Practice (GLP)

- 「新規化学物質に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」
 (平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、最終改正:平成 17 年 4 月 1 日)
- ・「OECD Principles of Good Laboratory Practice」 (OECD 理事会: 1997年11月26日)

毒性試験法ガイドライン

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

試験材料及び方法

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

被験物質情報 (Attached Data 1) は製造者における非 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 : シュウ酸二水和物、しゅう酸二水和物、Oxalic acid dihydrate

別 名 : Ethanedioic acid, dihydrate

CAS番号 : 121-47-1

構造式又は示性式:

2H2O

C2H2O4 · 2H2O

越 度: 99.7%

入 手 量: 25g

性 状: 白色の結晶性粉末

分 子 量: 126.06

ロット番号:

安 定 性: 試験終了後に製造者において特性を測定し、その結果を入手し

て安定性を確認した。

保 存 方 法 : 室温 (保存期間中の実測温度:16℃~24℃) 、暗所

保 存 場 所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室

残余物の取り扱い: 被験物質の残余物はすべて製造者において廃棄した。

2) 溶媒

名 称:注射用水

ロット番号: 6D73N、6E79N

規 格: 日本薬局法

製 造 元 : 株式会社大塚製薬工場

保存方法:室温

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

溶媒の選択理由 : 被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、注射用

水に 130 mg/mL で溶解することが確認されたため、注射用水

を溶媒として使用した。

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 0.2600 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 130 mg/mL 溶液(プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度: 1300 μ g/mL)を調製した。次いで、130 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL:溶媒 1 mL)で順次 7 段階希釈し、65.0、32.5、16.3、8.13、4.06、2.03 及び 1.02 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 0.1300 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 65.0 mg/mL 溶液(プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度: 650 μ g/mL)を調製した。次いで、65.0 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL:溶媒 1 mL)で順次 6 段階希釈し、32.5、16.3、8.13、4.06、2.03 及び 1.02 mg/mL の 7 濃度段階の被験液を調製した。このうち、代謝活性化では 65.0 から 2.03 mg/mL の被験液を、非代謝活性化では 32.5 から 1.02 mg/mL の被験液を用いた。

連続処理法では、被験物質 0.0650 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 32.5 mg/mL 溶液(プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度:325 μ g/mL)を調製した。次いで、32.5 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL:溶媒 1 mL)で順次 6 段階希釈し、16.3、8.13、4.06、2.03、1.02 及び 0.508 mg/mL の 7 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理及び 48 時間処理ともに 16.3 から 0.508 mg/mL の被験液を用いた。

2) 調製頻度

使用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

使用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

3) 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化は認められず、安定であることを確認した。

3. 対照物質

1) 陰性対照

溶媒として用いた注射用水を陰性対照物質とした。

2) 陽性対照

(1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化では マイトマイシンCを用いた。

名 称: シクロフォスファミド (以下 CP と略記する)

ロット番号: SDP4062

製 造 元: 和光純薬工業株式会社

越 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

ロット番号: 480AEL

製 造 元: 協和醗酵工業株式会社

力 価: 2mg (力価)/瓶

保 存 方 法 : 室温、遮光

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 発癌性物質室温保存庫

(2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K6G71) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度: 14 μg/mL) を調製した。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、K6G71)を注射筒で 2 mL 加えて溶解した(1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈(溶液 0.250 mL: 生理食塩液 4.750 mL)し、0.050 及

mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 μg/mL)。

染色体異常試験の連続処理法では、MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液(日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K6G71)を注射筒で 2 mL 加えて溶解した(1 mg/mL)。 次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈(溶液 0.250 mL:生理食塩液 4.750 mL)し、 0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した(培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 μg/mL)。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験法ガイドラインに使用が推奨されていること、及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

4. 使用細胞株

1) 細胞株

チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手 (2004年11月2日) し、継代数の少ないものを液体窒素中で保存し、これを融解し継代培養したものを使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では9継代、染色体異常試験では短時間処理法で13継代、連続処理法で19継代であった。また、元株細胞はマイコプラズマ陰性であることを入手時の情報で確認した。

2) 細胞の選択理由

自然発生染色体異常の発現率が低いこと、さらに種々の化学物質に対して感受性が高く、 バックグラウンドデータが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

3) 培養条件

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

4) 細胞の性状検査

試験に使用する細胞は凍結保存から解凍し、30代を越えない範囲で継代培養を行っているものについて、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等の特性について定期的に検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より S9 と、自家調製を行ったコファクターを用時に混合して S9 mix を調製した。本試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件及び使用期限とコファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りであった。

(1) S9

名 称: S9

ロット番号 : 06092907

製 造 日 : 2006年9月29日

種 · 系統 : ラット·SD系

性 : 雄

週 齢 : 7週齢

誘 導 物 質 : フェノバルビタール (PB) 及び 5, 6·ベンゾフラボン (BF)

投 与 法 : 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60 mg/kg body weight

BF 1日 80 mg/kg body weight

保存方法: 冷凍(超低温フリーザー)

使 用 期 限 : 2007 年 3 月 28 日 (製造後 6 箇月)

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(2) 補酵素

名 称 : コファクター

ロット番号 : 061207

製 造 日 : 2006年12月7日

保 存 方 法 : 冷凍(超低温フリーザー)

使 用 期 限 : 2007 年 6 月 6 日 (製造後 6 箇月)

保存場所: 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(3) S9 mix の組成

S9 2 mL

補酵素 4.7 mL 20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2) 1.34 mL

50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液 0.67 mL

330mmol/L 塩化カリウム水溶液

0.67 mL

0.67 mL

50mmol/L グルコース・6・リン酸水溶液

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

 $0.67 \, \mathrm{mL}$

注射用水 (精製水)

 $0.67 \, \mathrm{mL}$

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と 同様になるように各成分の必要量を秤取し、注射用水に融解、pH 調製、 ろ過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、 有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

2) 培養液

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

(1) 牛血清

ロット番号: 542384、571834

製 造 元: Invitrogen Corporation

保 存 方 法 : 冷凍 (-80℃設定の冷凍庫)

保 存 場 所: 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号: 1367407

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

試験方法 1-5)

試験は以下のステージ順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理

1) 識別方法

(1) 細胞增殖抑制試験

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照群 (Positive Control) は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダム にコード化した「01」~「99」までの2 桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 用量の設定

(1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1300 μg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 650、325、163、81.3、40.6、20.3 及び 10.2 μg/mL の計 8 用量を設定する。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果では、50%または明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、短時間処理法の代謝活性化では 1300 μg/mL 以上、非代謝活性化では 1300 μg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 163 μg/mL を、48 時間処理では 81.3 μg/mL で、50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法の代謝活性化では 1300 μg/mL以上、非代謝活性化では 789.3 μg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 163.0 μg/mL を、48 時間処理では 79.5 μg/mL と算出された。しかしながら、短時間処理法では 81.3 μg/mL 以上の用量で、連続処理法では 40.6 μg/mL 以上の用量で被験物質の析出が認

められ、高用量においてはシャーレ底面に固着する現象が認められ、析出がモノセレーターによる細胞増殖抑制濃度の測定値に影響を与えていることと、染色体標本の観察に際して析出が観察を阻害する可能性が推測された。また、顕微鏡によって細胞状態を確認したところ、短時間処理法及び連続処理法ともに 650 μg/mL 以上の用量で、死滅細胞によると思われる残渣がシャーレ底面に認められた。これらの結果を総合的に勘案して、短時間処理法の代謝活性化では 650 μg/mL を、非代謝活性化では 325 μg/mL を、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 163 μg/mL を染色体異常試験における最高用量に設定した。

3) 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。

(1) 短時間処理法

- ① 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質用量群、陰性対照群を設けた。プレートは各群2枚とし、プラスチックプレート(直径60mm)を用いた。
- ② プレート当たり 2×104個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種した。培養 3 日後に、代謝活性化では培養液 0.883 mLを取り除き、S9 mix 0.833 mLに続き陰性対照群では溶媒 0.050 mLを、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mLを加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mLを取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mLを、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mLを加えた。いずれの場合も、その後 6 時間培養した。
- ③ 培養6時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、 倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、 新しい培養液5.0 mL を加え更に18時間培養を続けた。
- ④ 培養終了後、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計(モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社)を用いて細胞密度を測定し、陰性対照の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度(概略値)を求めた。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群、陰性対照群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート(直径 60 mm)を用いた。
- ② プレート当たり 2×104個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種した。培養 3 日後に培養

液 0.050~mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050~mL を、被験物質用量群では各 濃度の被験液 0.050~mL を加えた。いずれの場合も、その後 24~時間及び 48~時間培養した。

③ 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度(概略値)を求めた。

4) 染色体異常試験

(1) 短時間処理法

- ① 代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれに被験物質用量群、陰性対照群及び陽性対 照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート(直径 60 mm)を 用いた。
- ② プレート当たり 2×104個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種した。培養 3 日後に、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mLを、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mLを加えた。陽性対照群では培養液 0.933 mLを除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL(最終濃度:14 μg/mL)を加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mLを取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mLを、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mLを加えた。陽性対照群では培養液 0.150 mLを除き、MMC 0.150 mL(最終濃度:0.075 μg/mL)を加えた。いずれの場合も、その後 6 時間培養した。
- ③ 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、 倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、 新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- ④ 各群 2 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のために培養終了約 2 時間前にコルセミド(ジメコルシン溶液、10 μg/mL、和光純薬工業株式会社)を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液(Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.)で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール:酢酸=3:1液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレートあたり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。

⑤ 残る各群 2 枚のプレートは、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色 した標本を作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理及び 48 時間処理のそれぞれに被験物質用量群、陰性対照群及び陽性対 照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート(直径 60mm)を 用いた。
- ② プレート当たり 2×104個の細胞 (培養液 5.0 mL) を播種した。培養 3 日後に培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。また、陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL (最終濃度: 0.050 μg/mL) を加えた。いずれの場合も、その後 24 時間及び 48 時間培養した。
- ③ 24 時間及び 48 時間の培養終了後、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を 観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の培養状態を確認した。次いで、短 時間処理法と同様にして染色体標本を作製した。
- ④ 残る各群 2 枚のプレートは、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色 した標本を作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

5) 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂 中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に染色体数 46 ~54 本を持つ細胞を倍数体とし、その出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とした。

6) 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常はさらに以下のように定義・分類した。

(1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

ギャップ(g)

染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは 染色体また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。

その他(other) : 断片化 (frg) 他。

(2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数(二倍体)と異なり倍化した場合 を数的異常と定義した。

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

7) 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準 Dに従い染色体の構造並びに数的 異常を持つ細胞の出現率 (%) によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率判定基準5% 未満陰 性 (一)5% 以上 10% 未満疑陽性 (±)10% 以上陽 性 (+)

染色体構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合(TAG)と含まない場合(TA)とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

試験結果

1. 細胞增殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞增殖抑制濃度

50%または明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、短時間処理法の代謝活性化では 1300 μg/mL以上、非代謝活性化では 1300 μg/mLであった。50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は、短時間処理法の代謝活性化では 1300 μg/mL以上、非代謝活性化では 789.3 μg/mL と算出された。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察すると、代謝活性化では 10.2 µg/mL以上において、非代謝活性化では 20.3 µg/mL以上において、細胞の浮遊・形態変化が認められ、非代謝活性化では 163 µg/mL で細胞の剥離・死滅が認められた。また、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 325 µg/mL以上では、被験物質のため細胞状態の観察が不可能であった。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 650 µg/mL以上で培養液交換前の観察において培養液の淡橙色から淡黄色化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに変化は認められなかった。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1·3 及び Table 1·3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1·4 及び Table 1·4 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

50%または明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、連続処理法の 24時間処理では $163~\mu g/mL$ 、48時間処理では $81.3~\mu g/mL$ であった。50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、連続処理法の 24時間処理では $163~\mu g/mL$ を、48時間処理では $79.5~\mu g/mL$ と算出された。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察すると、24 時間処理では 20.3 µg/mL 以上において、48 時間処理では 40.6 µg/mL 以上において、細胞の浮遊・形

態変化が認められ、24 時間処理では 163 µg/mL で細胞の剥離・死滅が認められた。また、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 325 µg/mL 以上では、被験物質のため細胞状態の観察が不可能であった。肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 650 µg/mL 以上で培養液の淡橙色から淡黄色化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに変化は認められなかった。

2. 染色体異常試験

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

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察すると、短時間処理法の代謝活性化では 163 µg/mL 以上で、非代謝活性化では 81.3 µg/mL 以上で、連続処理法の 24時間処理では 40.6 µg/mL 以上で、48時間処理では 81.3 µg/mL 以上で細胞の浮遊・形態変化が認められた。なお、短時間処理法の代謝活性化では 650 µg/mL で、非代謝活性化では 325 µg/mL で被験物質のため細胞状態の観察が不可能であった。肉眼による培養液の色調の観察では、短時間処理法の代謝活性化において 650 µg/mL で培養液交換前の観察において培養液の淡橙色化が認められた。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、短時間処理法及び連続処理法ともに析出は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率(TA)は、短時間処理法の代謝活性化では 650 μg/mL で 0.5%、325 μg/mLで 0%、163 μg/mLで 0.5%、81.3 μg/mLで 0%、40.6 μg/mLで 0.5%及び 20.3 μg/mL で 0%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。また、非代謝活性化では、325 μg/mL で 40%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。また、非代謝活性化では、325 μg/mL で 40.5%、40.6 μg/mL で 0.5%、20.3 μg/mL で 1.5%及び 10.2 μg/mL で 2.0%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。連続処理法の 24時間処理では 163 μg/mL で 0.5%、81.3 μg/mL で 0.5%、40.6 μg/mL で 0%、20.3 μg/mL で 1.0%、10.2 μg/mL で 0%及び 5.08 μg/mL で 0%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。また、48 時間処理では 163 μg/mL で 0%、81.3 μg/mL で 0%、81.3 μg/mL で 0%、40.6 μg/mL で 0.5%、20.3 μg/mL で 1.0%、10.2 μg/mL で 0.5%及び 5.08 μg/mL で 0%、40.6 μg/mL で 0.5%、20.3 μg/mL で 1.0%、10.2 μg/mL で 0.5%及び 5.08 μg/mL で 0%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。

各処理法ともに陰性対照群及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性

及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 3)とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では650 μg/mLで0%、325 μg/mLで0%、163 μg/mLで0%、81.3 μg/mLで0%、40.6 μg/mLで0%及び20.3 μg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満を示した。また、非代謝活性化では、325 μg/mLで細胞毒性のため分裂中期細胞の観察が行えずTOXと判定され、163 μg/mLで1.0%、81.3 μg/mLで0%、40.6 μg/mLで0%、20.3 μg/mLで0%及び10.2 μg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満を示した。連続処理法の24時間処理では163 μg/mLで1.0%、81.3 μg/mLで1.0%、40.6 μg/mLで1.0%、20.3 μg/mLで0.5%、10.2 μg/mLで0.5%及び5.08 μg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満を示した。また、48時間処理では163 μg/mLで0.5%、81.3 μg/mLで0.5%、81.3 μg/mLで0.5%、40.6 μg/mLで0.5%、20.3 μg/mLで0%、10.2 μg/mLで0%、10.2 μg/mLで0%及び5.08 μg/mLで0.5%、81.3 μg/mLで0.5%、40.6 μg/mLで0%、20.3 μg/mLで0%、10.2 μg/mLで0%及び5.08 μg/mLで0.5%と陰性の判定基準である5%未満を示した。

各処理法ともに陰性対照群における倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 3)とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

考 察

被験物質は、染色体異常試験において、短時間処理法及び連続処理法ともに染色体の構造異常を有する細胞の出現率は増加せず、倍数性細胞の出現率の増加も認められなかった。

なお、いずれの処理法においても陰性対照群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率は全て陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値と同様であった。更に、いずれの処理法においても陽性対照群における染色体構造異常の出現率は全て陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値と同様に顕著な誘発が認められた。また、2 枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、シュウ酸二水和物は、本試験条件下において染色体の構造異常及び倍数体 の誘発能は有さないものと判定した。

参考文献

- 1) 石館 基監修 (1987): <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19·24、エル・アイ・シー、 東京
- Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, Mutation Res., 48, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, Mutation Res., 66, 277-290
- 4) 石館 基 (1982): 哺乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment · Mammalian Cell Systems), 日本香粧品科学会誌, 6, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271

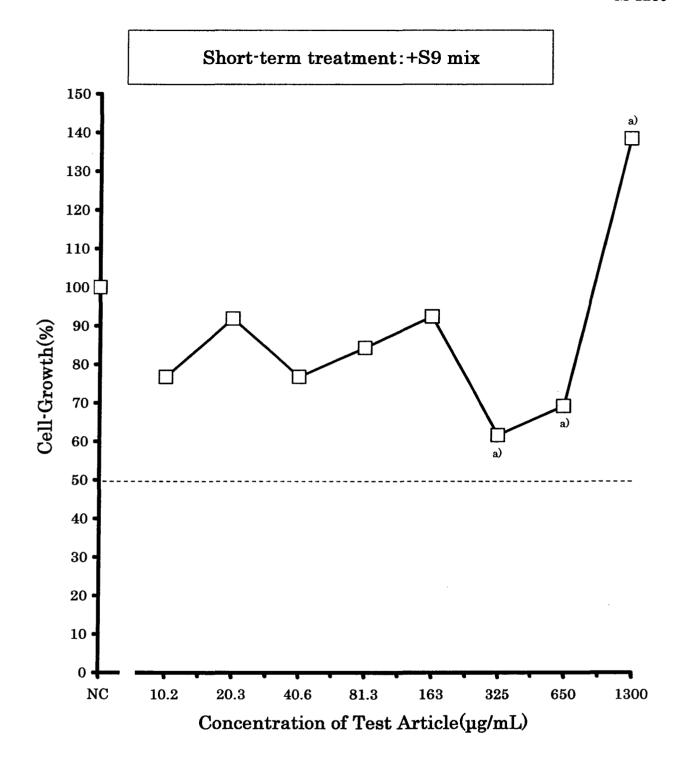


Fig.1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate

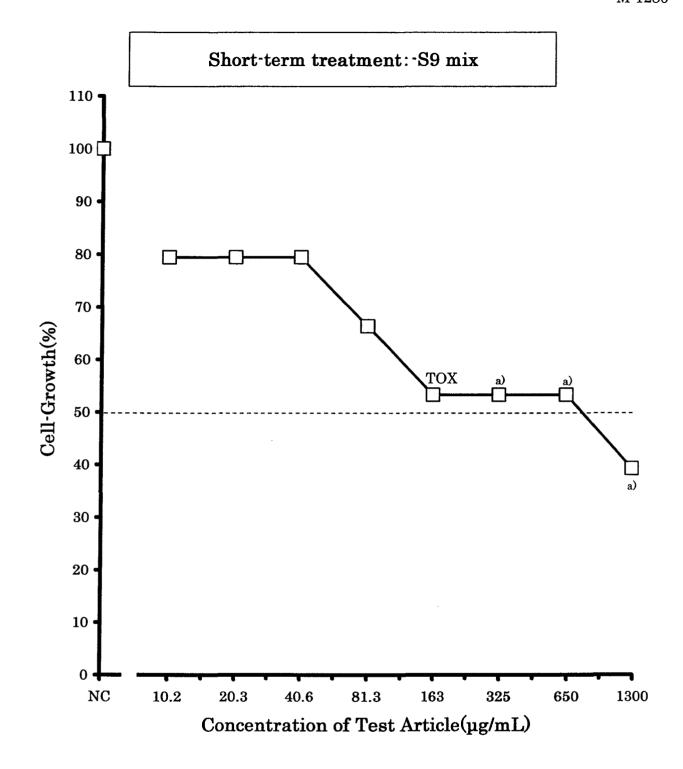


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

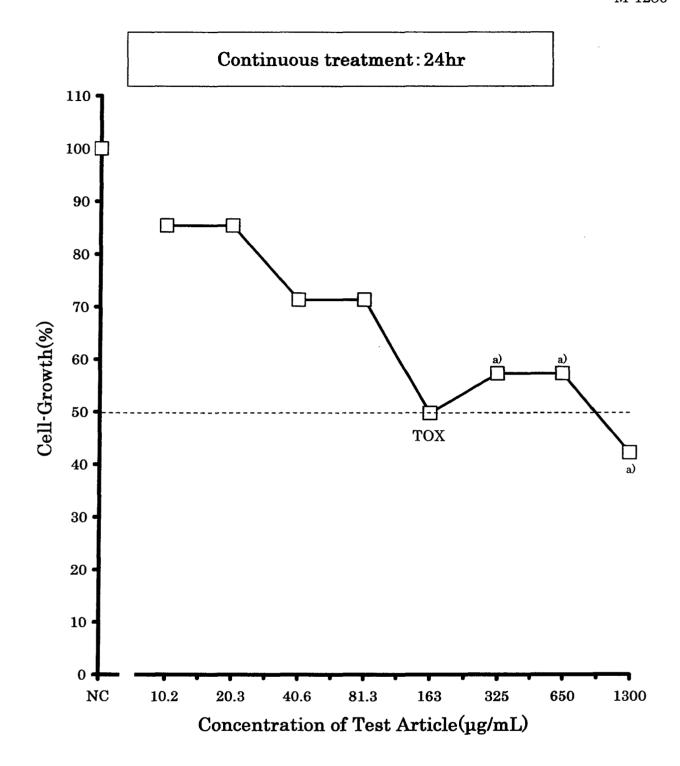


Fig.1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

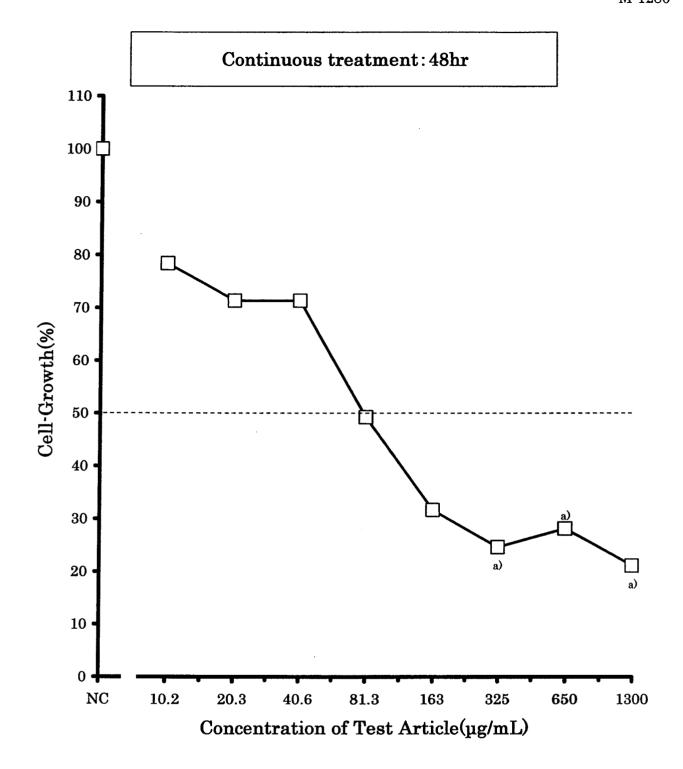


Fig.1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate

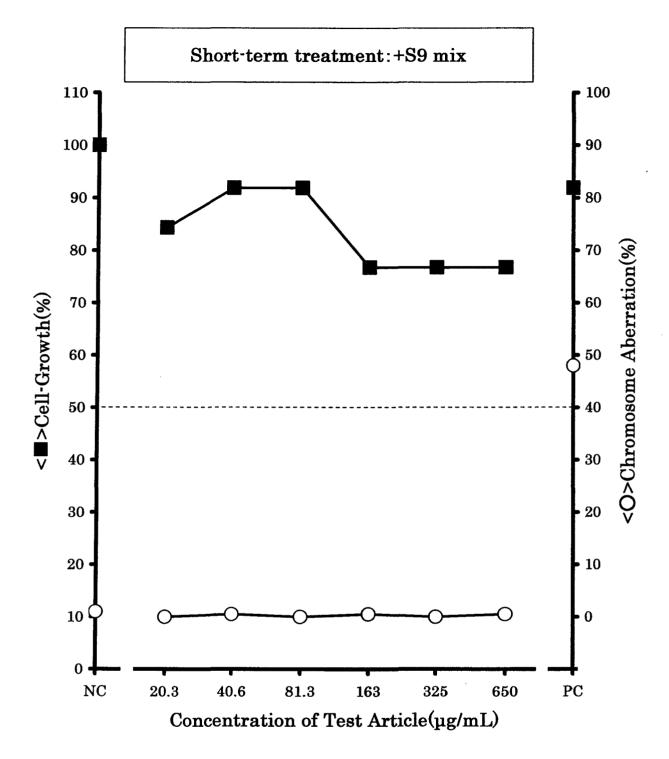


Fig.2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate

PC: Positive control

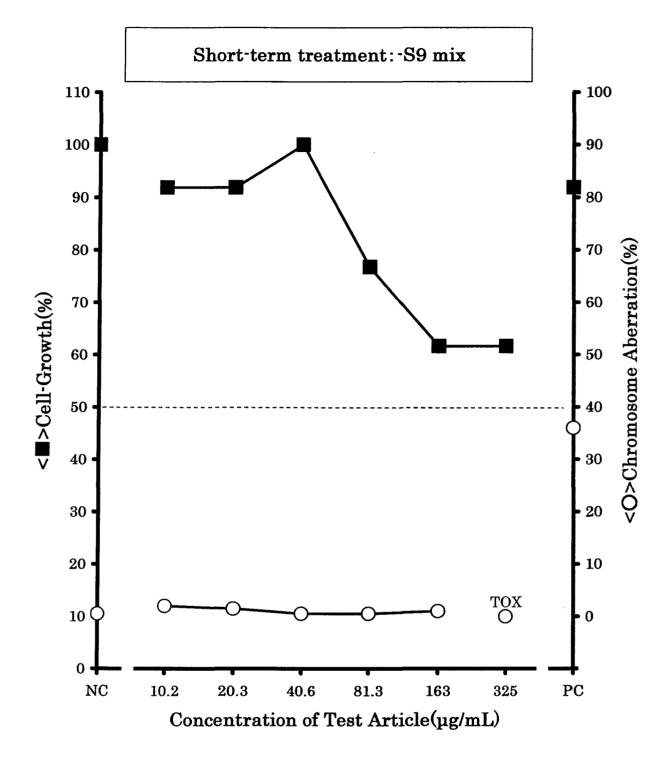


Fig.2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate

PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

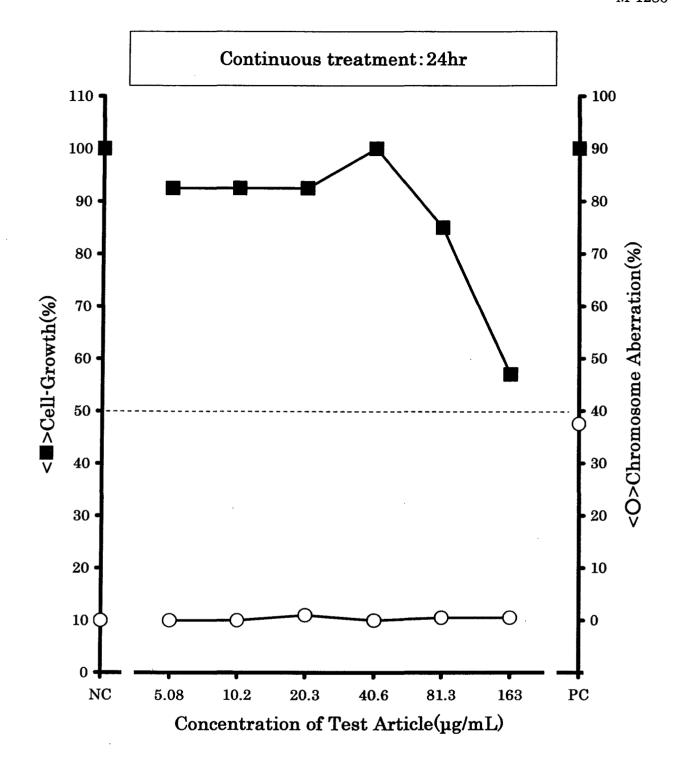


Fig.2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate

PC: Positive control

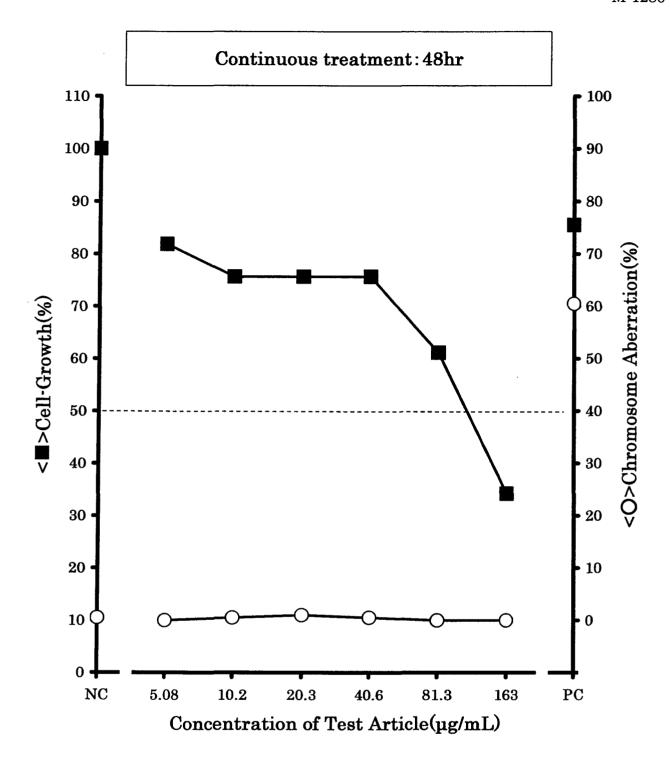


Fig.2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate

PC: Positive control

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate [Short-term treatment:+S9 mix]

Study type Treatment and		Cell-growth ratio		hibition test Observation c)				
S9	time	Conc	entration	Plate	Mean b)	Condition	Color of	Precipitates
mix	(hr)	(µ	g/mL)	1 and 2	(%)	of cells ^{d)}	medium ^{e)}	/Crystals ^{f)}
			(NC)	100 ^{a)}	100	_		
			(140)	85	100		-	
			10.2	71	77	+	_	
			10.4	71		+	<u> </u>	
			20.3	85	92	+		
			20.0	85		+		
			40.6	71	77	+		
	l	ക		71		+		
+	6-18	icle	81.3	85	84	+		
'	0.10	Test article		71		+	<u> </u>	
		st :	163	100	92	+		
	Ī	Ţ	100	71		+		
		_	325	57	62	g)	-	
	}		020	57		g)		
			650	71	69	g)	Light-orange	
		į		57		g)	Light-orange	
			1300	128	138	g)	Light-yellow	
			1000	128	100	g)	Light-yellow	

- 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
- g) Condition of cells could not be observed since substances suspected to be the test article was adhered on the bottom of plates.

Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate

		-		Cel	ll-growth in	hibition test		
Stud	y type	Treat	ment and		wth ratio	Observation c)		
S9	time	Conc	entration	Plate	Mean b)	Condition	Color of	Precipitates
mix	(hr)	(p	ıg/mL)	1 and 2	(%)	of cells ^{d)}	medium ^{e)}	/Crystals ^{f)}
		((NC)	100 a)	100	-		
			/(IVO)	114	100			
			10.2	85	79			-
			10.2	85	19		-	-
			20.3	85	79	+		_
				85	19	+		-
			40.6	85	79	+		
	1	ക	40.0	85	7.5	+		************************************
_	6-18	icl	81.3	71	66	+++		
	0 10	art	01.0	71		+++		
	ĺ	Test article	163	57	53	TOX		
		Te	100	57		TOX	—	
	l	_	325	57	53	g)	_	
	ļ		020	57	00	g)		<u>—</u>
			650	57	53	g)	Light-yellow	-
	ŀ			57		g)	Light-yellow	<u>—</u>
			1300	42	39	g)	Light-yellow	<u>-</u>
			1000	42		g)	Light-yellow	
		Conce	ntration of	50% cell-	growth inhi	ibition: 789	0.3 μg/mL	

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
 - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
 - +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
 - TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
- g) Condition of cells could not be observed since substances suspected to be the test article was adhered on the bottom of plates.

Table 1-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate

[Continuous treatment: 24hr]

				Cel	l-growth in	hibition test		<u> </u>
Stud	y type	Treat	ment and		wth ratio	Observation c)		
S9	time	Conc	entration	Plate	Mean b)	Condition	Color of	Precipitates
mix	(hr)	(p	g/mL)	1 and 2	(%)	of cells d)	medium ^{e)}	/Crystals ^{f)}
			(NC)	100 ^{a)}	100		_	
1			(140)	99	100		-	
1			10.2	85	85	_	_	_
			10.2	85	00			
			Test article 40.6 81.3 163	85	85	+		
				85		+	<u> </u>	
				71	71	+	_	
	1	ao		71		+	<u> </u>	
_	24	icl		71	71	+++		-
		art		71		+++		
	I	st	163	42	50	TOX		
	l	Te		57		TOX	<u> </u>	
			325	57	57	g)	_	
	Ī	į		57		g)	—	<u>—</u>
			650	57	57	g)	Light-orange	-
	İ	į		57		g)	Light-orange	<u>—</u>
		į	1300	42	42	g)	Light-yellow	
			1000	42		g)	Light-yellow	
		Conce	ntration of	50% cell-{	growth inhi	bition: 168	3.0 µg/mL	

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
 - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
 - +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
 - TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
- g) Condition of cells could not be observed since substances suspected to be the test article was adhered on the bottom of plates.

Table 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate [Continuous treatment: 48hr]

				Cel	l-growth in	hibition test		
Stud	y type	Treat	ment and	Cell-gro	wth ratio	Observation c)		
S9	time	Conc	entration	Plate	Mean b)	Condition	Color of	Precipitates
mix	(hr)	(p	ıg/mL)	1 and 2	(%)	of cells ^{d)}	medium ^{e)}	/Crystals ^{f)}
		((NC)	100 ^{a)}	100	-	_	
			(110)	99	100	-	-	-
			10.2	78	78	-	-	-
			10.2	78	10	<u></u>		
			20.3	71	71		-	
			20.0	71		-	<u> </u>	
			40.6	71	71	+		
	İ	മ	40.0	71		+	——————————————————————————————————————	
_	48	Test article	81.3	49	49	++	<u> </u>	
	10	art	01.0	49		++	——————————————————————————————————————	
	ĺ	st	163	35	32	+++		
		Te	100	28	02	+++		
			325	28	25	g)	_	
	- 1			21	20	g)	<u> </u>	
			650	28	28	g)	Light-orange	
į		ļ		28		g)	Light-orange	—
			1300	21	21	g)	Light-yellow	-
				21		g)	Light-yellow	
		Conce	ntration of	50% cell-{	growth inhi	bition: 79	.5 µg/mL	

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
 - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
 - ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
 - +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
- g) Condition of cells could not be observed since substances suspected to be the test article was adhered on the bottom of plates.

Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate [Short-term treatment:+S9 mix]

	Chromosome aberration test									
Stud	ly type	Treat	tment and	Cell-growth ratio		Observation c)				
S9	time	Conc	entration	Plate	Mean b)	Condition	Color of	Precipitates		
mix	(hr)	(r	ıg/mL)	1 and 2	(%)	of cells ^{d)}	medium ^{e)}	/Crystals ^{f)}		
		()(NC)	100 a)	100			_		
)(NC)	85	100		_			
			•	20.3	85	84	-	<u></u>		
			40.0	71	04		_	_		
		d)	163 article 81.3	85	92	_	_	_		
				85		-		—		
		icle		85	92	-	—	_		
+	6-18	rti	01.0	85			-	_		
'	0 10	3t 8	163	71	77	+	 -			
		Ţe	103	71	, ,	+	—	_		
		_	325	71	77	+	_			
	:		020	71	, ,	+	_	_		
			650 71 7	77	g)	Light-orange				
		•••••••	000	71		g)	Light-orange	—		
		PC		85	92			-		
				85	94			-		

PC: Positive Control(cyclophosphamide, 14µg/mL)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
 - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
- g) Condition of cells could not be observed since substances suspected to be the test article was adhered on the bottom of plates.

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

	Chromosome aberration test										
Stud	y type	Treat	ment and	Cell-gro	wth ratio	Observation c)					
S9	time	Conc	entration	Plate	Mean b)	Condition	Color of	Precipitates			
mix	(hr)	(p	ıg/mL)	1 and 2	(%)	of cells ^{d)}	medium ^{e)}	/Crystals ^{f)}			
		((NC)	100 a)	100		-				
)(IVC)	85	100	—		-			
			10.2	85	92						
			10.2	85	32		<u> </u>	***************************************			
1		Test article	20.3	85	92						
	Ī			85		-		—			
			40.6	85	100	<u> </u>		—			
	6-18			100				<u>—</u>			
	0 10	st 8	81.3	71	77	+		_			
		Te	01.0	71	, ,	+					
	-	_	163	57	62	+++					
			100	57	02	+++		—			
	į		325	57	62	g)		-			
]		020	57	02	g)		—			
			PC	85	92	<u> </u>	_				
			10	85	32		_				

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

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
 - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
 - +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals
- g) Condition of cells could not be observed since substances suspected to be the test article was adhered on the bottom of plates.

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

	Chromosome aberration test										
Stud	y type	Treat	tment and	Cell-growth ratio		Observation c)					
S9	time	Conc	entration	Plate	Mean b)	Condition	Color of	Precipitates /Crystals ^{f)}			
mix	(hr)	(1	ıg/mL)	1 and 2	(%)	of cells ^{d)}	medium ^{e)}	/Crystals ^{f)}			
			O(NC)	100 ^{a)}	100	_	_	_			
)(IVC)	100	100		-				
		************		5.08	100	93	_		-		
			0.00	85	90	-		<u> </u>			
		article	10.2 a tricle 20.3 40.6	85	93			_			
				100			<u>—</u>	—			
				100	93		_	-			
l _	24			85							
	2.4	st 8		100	100	+	_	_			
		Te	40.0	100	100	+	—	—			
			81.3	85	85	++		_			
			U1. 0	85		++					
			163	57	57	+++	_				
			100	57	····	+++	_				
			PC	100	100						
1		rC		100	100		-	-			

PC: Positive Control(mitomycin C, 0.05µg/mL)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
 - + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
 - ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
 - +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals

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

	Chromosome aberration test										
Stud	ly type	Trea	tment and	Cell-growth ratio		Observation c)					
S9	time	Cond	entration	Plate	Mean b)	Condition	Color of	Precipitates			
mix	(hr)	(1	ıg/mL)	1 and 2	(%)	of cells ^{d)}	medium ^{e)}	/Crystals ⁰			
			O(NC)	100 ^{a)}	100	-					
)(IVO)	93	100	_	_	_			
		***************				5.08	79	82		-	_
			0.00	79	04		<u> </u>	<u>—</u>			
			10.2	73	76	-		_			
1		st article	10.2	73				—			
1			20.3	73	76		_	_			
_	48		20.0	73	70	<u> </u>	—	—			
	10		40.6	73	76			_			
		Test	10.0	73				—			
			81.3	59	61	++					
			01. 0	59		++	—				
			163	33	34	+++					
	l			33		+++		-			
			PC	86	85		_	_			
				79	00	_	_				

PC: Positive Control(mitomycin C, 0.05µg/mL)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
 - ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
 - +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates/crystals

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate [Short-term treatment:+S9 mix]

S9		Conc.	Cells	D-11-i					M.			- l									
mix	Time(h)	Cone. (μg/mL)	observed	Polyploid cells (%)	Judge.	_	g	ctb			r of cte		esb		cse	other		TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
		NC	200 (100) (100)	0. 0 (0) (0)		(0 0) 0)	(0 0) 0)	(2 1) 1)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	1. 0 (1) (1)	1.0 (1) (1)		13-1 86-1
		650	200 (100) (100)	0. 0 (0) (0)	•	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(1 1) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	_	70-1 54-1
		325	200 (100) (100)	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)		65-1 33-1
+	6-18	163	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	_	(0 0) 0)	(1 0) 1)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)		45-1 07-1
		81. 3	200 (100) (100)	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)	_	99-1 78-1
		40. 6	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	_	(0 0) 0)	(1 1) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	_	95-1 31-1
		20. 3	200 (100) (100)	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)	_	28-1 15-1
		PC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)		(0 0) 0)	(6 4) 2)	(93 43) 50)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	48. 0 (46) (50)	48. 0 (46) (50)	+	40-1 48-1

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 (water for injection)

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

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate [Short-term treatment:-S9 mix]

			[SHOTE CEI	m treatment.	. 39 1111													·			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
S9	Time(h)	Conc.	Cells	Polyploid	Judge.	_			Nu	mbe:	r of	abei	rati	on				- TA	TAG	Tudas	C1: 4-
mix	r rue (II)	(μg/mL)	observed	cells (%)	Juage.		g		ctb	_	cte		sb		cse	otł	ner	(%)	(%)	Juage.	Slide No.
		NC	200 (100) (100)	1. 0 (1) (1)	_	(0 0) 0)	(1 1) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	_	43-1 26-1
		325	0 (0) (0) (0) (0)	0.0 (0) (0) (0) (0)	TOX	(((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) (0) (0)	0.0 (0) (0) (0) (0)	TOX	03-1 03-2 63-1 63-2
		163	200 (100) (100)	1.0 (1) (1)	_	(0 0) 0)	(0) 0)	(2 1) 1)	(0) 0)	(0) 0)	(0 0) 0)	1.0 (1) (1)	1.0 (1) (1)	_	05-1 44-1
	6-18	81. 3	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)		(0 0) 0)	(1 1) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)		22-1 97-1
		40. 6	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	_	(0 0) 0)	(1 0) 1)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)	_	21-1 69-1
		20. 3	200 (100) (100)	0. 0 (0) (0)		(0 0) 0)	(3 0) 3)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	1.5 (0) (3)	1.5 (0) (3)		61-1 93-1
		10. 2	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	(0 0) 0)	(2 1) 1)	(2 1) 1)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	2. 0 (2) (2)	2. 0 (2) (2)	_	02-1 92-1
		PC	200 (100) (100)	0. 0 (0) (0)	_	(0 0) 0)	(23 15) 8)	(52 19) 33)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	36. 0 (33) (39)	36. 0 (33) (39)	+	81-1 06-1

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 (water for injection)

PC: Positive control (mitomycin C, $0.075 \mu \text{ g/mL}$)

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate [Continuous treatment:24hr]

				S creatment	- 2 1111]																
39	Time(h)	Conc.	Cells	Polyploid	Judge.				Nu	mbe	r of	aber	rati	on				· TA	TAG	Tudao	Slide
ix	11me (11)	$(\mu \text{ g/mL})$	observed	cells (%)	Juage.		g	ctb		cte		csb		cse		other		(%)	(%)	Juuge.	No.
		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)	_	90-1 76-1
		163	200 (96) (4) (100)	1.0 (0) (0) (2)	_	((0 0) 0) 0)	(1 0) 0) 1)	((0 0) 0) 0)	((0 0) 0) 0)	(0 0) 0) 0)	(0 0) 0) 0)	0.5 (0) (0) (1)	0.5 (0) (0) (1)	_	57-1 57-2 82-1
		81. 3	200 (100) (100)	1. 0 (1) (1)	_	(0 0) 0)	(1 1) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)		77-1 47-1
_	24-0	40. 6	200 (100) (100)	1.0 (2) (0)	_	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)		67-1 32-1
		20. 3	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)	-	(0 0) 0)	(2 1) 1)	(1 0) 1)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	1.0 (1) (1)	1. 0 (1) (1)	_	62-1 72-1
		10. 2	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 (0) (0)	0.0 (0) (0)	420	12-1 49-1
		5. 08	200 (100) (100)	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)		79-1 35-1
		PC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	(0 0) 0)	(15 5) 10)	(61 33) 28)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	37. 5 (38) (37)	37. 5 (38) (37)	+	73-1 29-1

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 (water for injection)

PC: Positive control (mitomycin C, $0.05 \mu \text{ g/mL}$)

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Oxalic acid dihydrate [Continuous treatment:48hr]

S9	m: (1)	Conc.	Cells	Polyploid					Nu	mbe:	rof	aber	rati	ion							
mix	Time(h)	$(\mu \text{ g/mL})$	observed	cells (%)	Judge.		g		ctb		cte		csb		cse		ner	TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
		NC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	_	(0 0) 0)	(1 0) 1)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)	_	85-1 11-1
		163	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)		(1 1) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0. 0 (0) (0)	0.5 (1) (0)		66-1 38-1
		81. 3	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)		53-1 89-1
_	48-0	40. 6	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	_	(0 0) 0)	(1 1) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	_	16-1 37-1
		20. 3	200 (100) (100)	0. 0 (0) (0)		(0 0) 0)	(1 1) 0)	(1 0) 1)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	1.0 (1) (1)	1.0 (1) (1)	_	51-1 39-1
		10. 2	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)		(0 0) 0)	(1 1) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	_	91-1 09-1
		5. 08	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)		64-1 88-1
		PC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	_	(0 0) 0)	(28 16) 12)	(105 51) 54)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	(0 0) 0)	60. 5 (60) (61)	60. 5 (60) (61)	+	04-1 17-1

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 (water for injection)

PC: Positive control (mitomycin C, $0.05 \mu \text{ g/mL}$)