

T-G703

最 終 報 告 書

Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]- :
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験

試験番号 T-G703

試験期間

2022 年 12 月 19 日-2023 年 3 月 22 日

試験施設

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

試験委託者

厚生労働省

〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

T-G703

1. GLP 陳述書

試験番号 : T-G703

試験表題 : Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: チャイニーズ・
ハムスター培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保
企発第 110331010 号)

 2023 年 3 月 22 日

試験責任者
株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

2. 目次

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

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

添付資料

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

表

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

treatment: 24h]	26
-----------------	----

付表

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

T-G703

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

T-G703

3.2 試験表題

Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]- : チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験

3.3 試験目的

チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞の培養細胞（CHL/IU）を用いて、Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-の染色体異常誘発能を検討した。

3.4 規制に関する情報

3.4.1 GLP

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
（平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号）

3.4.2 毒性試験ガイドライン

- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
（平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 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: *In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test」
（2016 年 7 月 29 日）

3.5 試験委託者

厚生労働省

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

3.6 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

3.7 試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

T-G703

〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

3.8 試験責任者

■■■■ ■■■■

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

3.9 試験担当者

被験物質管理責任者 : ■■■■ ■■■■

試験担当者 : ■■■■ ■■■■■■ ■■■■■■ ■■■■■■ ■■■■
■■■■ ■■■■

3.10 試験日程

試験開始日 : 2022 年 12 月 19 日

被験物質受領日 : 2022 年 11 月 30 日

細胞増殖抑制試験

実験開始日 : 2022 年 12 月 19 日

実験終了日 : 2022 年 12 月 23 日

染色体異常試験

実験開始日 : 2023 年 1 月 20 日

実験終了日 : 2023 年 2 月 13 日

試験終了日 : 2023 年 3 月 22 日

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

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

3.12 資料保存

試験計画書原本（試験計画書変更書含む）、記録文書、生データ、被験物質保存試料、報告書類（最終報告書の原本を含む）及び染色体標本は株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は試験終了後 5 年間とする。期間終了後の取り扱いについては、厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

T-G703

3.13 試験責任者の署名



2023 年 3 月 22 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

4. 要約

Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-の染色体異常誘発能を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の用量を設定するため、2000 µg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で除した計 8 用量を設定し、細胞増殖抑制試験を行った。その結果、細胞増殖抑制率は、短時間処理法では 250 µg/mL 以上の用量で、連続処理法では 125 µg/mL 以上の用量で 50%以上を示した。50%細胞増殖抑制濃度（IC₅₀）は、短時間処理法の非代謝活性化では 142 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化では 168 µg/mL、連続処理法では 102 µg/mL と算出された。以上の結果より、染色体異常試験の用量は、短時間処理法の非代謝活性化では 175 µg/mL を最高用量とし、以下等差 25.0 µg/mL で減じた 6 用量を、短時間処理法の代謝活性化では 200 µg/mL を最高用量とし、以下等差 25.0 µg/mL で減じた 7 用量を、連続処理法では 120 µg/mL を最高用量とし、以下等差 10.0 µg/mL で減じた 7 用量を設定した。

染色体異常試験では、細胞増殖抑制率が $55 \pm 5\%$ を示した用量を最高用量とし、短時間処理法の非代謝活性化では 150、125 及び 100 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化では 175、150 及び 125 µg/mL、連続処理法では 110、100 及び 90.0 µg/mL を観察した。その結果、短時間処理法の代謝活性化で染色体構造異常（TA）の出現頻度は陰性対照群との比較で有意差はみられなかったが、数的異常（倍数性細胞及び核内倍加細胞）の出現頻度は陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示し（Fisher の直接確率計算法、 $p < 0.05$ ）、その出現率は陰性対照群の施設内背景データの 95%管理上限を超え、傾向検定においても有意な用量依存性が認められた（Cochran Armitage の傾向検定、 $p < 0.05$ ）。短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では、染色体構造異常（TA）及び数的異常（倍数性細胞及び核内倍加細胞）の出現頻度はいずれの処理法においても陰性対照群との比較で有意差はみられなかった。

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

以上の結果から、Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-は本試験条件下において、染色体構造異常は誘発しない（陰性）が、数的異常を誘発する（陽性）と結論した。

5. 緒言

Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-のチャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。

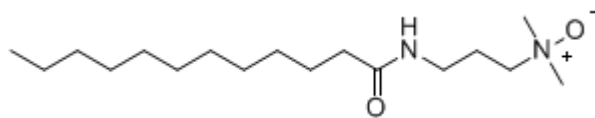
6. 試験材料

6.1 被験物質及び陰性対照物質（溶媒）

6.1.1 被験物質

以下の情報は非 GLP で実施された分析結果に基づく。なお、水の溶解性及び溶媒中の安定性は株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果による。

製造者	:	██████████
名称	:	Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-
商品名	:	██████████
CAS 番号	:	61792-31-2
官報公示整理番号	:	2-809（化審法）
構造式又は示性式	:	



分子式	:	C ₁₇ H ₃₆ N ₂ O ₂
分子量	:	300.6
ロット番号	:	██████████
入手量	:	25 g
純度	:	>99.0%
不純物の名称及び濃度	:	不明
引火点	:	>212F
常温における性状	:	固体
安定性	:	安定
使用期限	:	不明
溶解度	:	水：20 mg/mL 溶解
溶媒中での安定性	:	水：発熱、ガスの発生等の反応性がなかった
保存条件	:	冷凍（許容範囲：-20℃以下、実測値は許容範囲内であった）・暗所・密閉
保存場所	:	被験物質保存室
取扱い上の注意	:	容器の内容物を取り扱うときは注意する。飲食、喫煙、またはトイレ設備を使用する前に、石けんと水で洗う。
保存試料	:	被験物質約 1 g を保存試料として保存した。

残余品の処理 : 使用後の残余は全て廃棄した。

6.1.2 陰性対照物質（溶媒）

名称 : 注射用水
規格 : 日本薬局方
メーカー : 株式会社大塚製薬工場
ロット番号 : 2D94N、2E93N
保存条件 : 室温
保存場所 : 標本作製室
溶媒の選択理由 : 被験物質の溶解性が良好であり、発泡、発熱、吸熱は認められなかった。*in vitro* の遺伝毒性試験に広く用いられており、背景データが豊富であることから選択した。

6.2 被験液の調製

調製操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

6.2.1 細胞増殖抑制試験

6.2.1.1 調製方法

10 mL のメスフラスコに被験物質 0.2000 g を秤量し、適量の溶媒を加えて溶解させたのち更に溶媒を加えて 10 mL とし、最高用量群液（調製濃度：20.0 mg/mL）を調製した。これを、溶媒で段階的に希釈（公比 2）して、10.0、5.00、2.50、1.25、0.625、0.313 及び 0.156 mg/mL 液とし、計 8 濃度を調製した。この時の用量（細胞暴露濃度）については第 7.2.1 項参照。

6.2.1.2 調製頻度

用時に調製し、調製後 1 時間以内に使用した。

6.2.2 染色体異常試験

6.2.2.1 調製方法

50 mL のメスフラスコに被験物質 0.1000 g を秤量し、適量の溶媒を加えて溶解させたのち更に溶媒を加えて 50 mL とし、最高用量群液（調製濃度：2.00 mg/mL）を調製した。これを、溶媒で直接希釈して、1.75、1.50、1.25、1.20、1.10、1.00、0.900、0.800、0.750、0.700、0.600 及び 0.500 mg/mL 液とし、計 13 濃度を調製した。短時間処理法の非代謝活性化では 1.75、1.50、1.25、1.00、0.750 及び 0.500 mg/mL 液を、短時間処理法の代謝活性化では 2.00、1.75、1.50、1.25、1.00、0.750 及び 0.500 mg/mL 液を、連続処理法では 1.20、1.10、1.00、0.900、0.800、0.700 及び 0.600 mg/mL 液を使用した。この時の用量（細胞暴露濃度）については第 7.2.2 項参照。

6.2.2.2 調製頻度

用時に調製し、調製後 1 時間以内に使用した。

6.3 陽性対照物質

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

6.3.1 陽性対照物質 1

1) マイトマイシン (代謝活性化無し)

名称	: Mitomycin C (略称 : MMC)
CAS 番号	: 50-07-7
メーカー	: 富士フイルム和光純薬株式会社
ロット番号	: WTH2468
保存条件	: 冷所
保存場所	: 培養細胞試験室

2) MMC 溶液の調製

用時に調製した。

MMC 1.0 mg を遠沈管に秤取し、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 K2E92) 2 mL を加えて溶解し、0.5 mg/mL 溶液とした。この液を生理食塩液で更に 200 倍希釈して 2.5 µg/mL 溶液とした。

3) MMC の用量

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

6.3.2 陽性対照物質 2

1) シクロフォスファミド (代謝活性化有り)

名称	: Cyclophosphamide monohydrate (略称 : CP)
CAS 番号	: 6055-19-2
規格	: 生化学用 (97%以上)
メーカー	: 富士フイルム和光純薬株式会社
ロット番号	: SKE6784
保存条件	: 冷蔵、遮光
保存場所	: 培養細胞試験室

2) CP 溶液の調製

用時に調製した。

CP 14.0 mg を遠沈管に秤取した。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 K2E92) を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製

T-G703

した。

3) CP の用量

短時間処理法（代謝活性化系）で 14 µg/mL とした。

6.4 試験系及びその選択理由

当試験で使用する細胞株はガイドライン（OECD TG473）で推奨されている細胞の一つであり、*in vitro* 染色体異常試験に広く使用されており、背景データが豊富であることから選択した。

6.4.1 細胞株

細胞名	: チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞 (CHL/IU)
供給源	: [REDACTED]
ロット番号	: [REDACTED]
入手日	: 2020 年 12 月 9 日
凍結条件	: 液体窒素 (−196°C)
特性検査	: 細胞の形態が正常(シャーレ底面に接着し紡錘状の形態を有する)、細胞倍加時間 15~20 時間以内(実測値; 18.9 時間)、染色体数が 25 本の細胞が 70%以上、染色体異常発生率が 5%未満であり、マイコプラズマの汚染がないことが確認されたものを用いた。
供試時の継代数	: 使用時の細胞継代数は細胞増殖抑制試験で 7 継代、染色体異常試験で 16 継代であった(許容範囲: 3~30 継代)。

6.5 試薬

6.5.1 S9 mix

1) S9

名称	: S-9
メーカー	: オリエンタル酵母工業株式会社
内容量	: 2 mL/バイアル
ロット番号	: 22093007 (細胞増殖抑制試験)、22102108 (染色体異常試験)
由来	: SD 系雄ラット、肝臓
誘導物質	: フェノバルビタール(PB)及び 5,6-ベンゾフラボン(BF)
誘導物質の処理	: PB : 4 日間腹腔内投与 (30、60、60 及び 60 mg/kg) BF : PB 投与 3 日目に単回腹腔内投与 (80 mg/kg)

T-G703

製造日	: 2022 年 9 月 30 日 (ロット番号 ; 22093007) 2022 年 10 月 21 日 (ロット番号 ; 22102108)
使用期限	: 2023 年 3 月 29 日 (ロット番号 ; 22093007) 2023 年 4 月 20 日 (ロット番号 ; 22102108)
週齢・性	: 7 週齢・雄
平均体重	: 221.2 ± 7.8 g (ロット番号 ; 22093007) 219.6 ± 10.7 g (ロット番号 ; 22102108)
保存条件	: 冷凍 (−70°C 以下)
保存場所	: 培養細胞試験室

2) コファクター

名称	: Cofactor C
メーカー	: オリエンタル酵母工業株式会社
内容量	: 4.7 mL/バイアル
ロット番号	: C22092807 (細胞増殖抑制試験)、C22101908 (染色体異常試験)
使用期限	: 2023 年 3 月 27 日 (ロット番号 ; C22092807) 2023 年 4 月 18 日 (ロット番号 ; C22101908)
保存条件	: 冷凍 (−70°C 以下)
保存場所	: 培養細胞試験室

3) S9 mix の調製方法

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

水	: 0.7 mL
S9	: 0.3 mL
MgCl ₂	: 5 μmol
KCl	: 33 μmol
グルコース-6-リン酸	: 5 μmol
酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADP)	: 4 μmol
HEPES 緩衝液 (pH7.2)	: 4 μmol

6.5.2 培養液

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

1) 牛血清

メーカー	: Thermo Fisher Scientific Inc.
------	---------------------------------

T-G703

ロット番号 : 2471439
保存条件 : 冷凍 (−20℃ 以下)
保存場所 : 培養細胞試験室

2) Minimum Essential Medium (MEM)

メーカー : Thermo Fisher Scientific Inc.
ロット番号 : 2444918 (細胞増殖抑制試験)、2508904 (染色体異常試験)
保存条件 : 冷蔵
保存場所 : 標本作製室

7. 試験方法

各処理法の概略を以下に示す。

短時間処理法 (代謝活性化無し)

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

短時間処理法 (代謝活性化有り)

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

連続処理法 (代謝活性化無し)

: S9 mix 非存在下で被験物質/対照物質 24 時間処理

7.1 容器及びスライド標本の識別法

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

7.2 用量の設定

7.2.1 細胞増殖抑制試験

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

最高用量は、ガイドライン「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づいて 2000 µg/mL とした。以下、公比 2 で除して 1000、500、250、125、62.5、31.3 及び 15.6 µg/mL を設け、計 8 用量を各処理群に設定した。

被験物質処理群に加え、各処理法に陰性対照群を設けた。

7.2.2 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、細胞増殖抑制率（100－RPD）は、短時間処理法では 250 µg/mL 以上の用量で、連続処理法では 125 µg/mL 以上の用量で 50%以上を示した。50%細胞増殖抑制濃度（IC₅₀）は、短時間処理法の非代謝活性化では 142 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化では 168 µg/mL、連続処理法では 102 µg/mL と算出された。なお、いずれの処理法でも、すべての用量で沈殿は認められなかった。以上の結果より、染色体異常試験の用量を下表の通り設定した。

また、被験物質処理群に加えて各処理法に陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

処理法	適用濃度（µg/mL）
短時間処理法 非代謝活性化	175、150、125、100、75.0 及び 50.0
短時間処理法 代謝活性化	200、175、150、125、100、75.0 及び 50.0
連続処理法	120、110、100、90.0、80.0、70.0 及び 60.0

7.3 培養容器数及び培養条件

1) 培養容器数

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

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

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

2) 培養条件

温度 37°C、加湿及び 5%CO₂ 下で培養した。

7.4 処理方法

7.4.1 細胞増殖抑制試験

試験操作のうち 1)～5)の操作については、無菌環境下で実施した。

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

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

処理内容	短時間処理法		連続処理法
	代謝活性化無し	代謝活性化有り	
培養液除去量	0.500 mL	1.333 mL	0.500 mL
S9 mix 添加量 (S9 蛋白最終濃度)		0.833 mL (0.975 mg/mL)	
陰性対照液又は 被験液添加量	0.500 mL	0.500 mL	0.500 mL

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

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

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

- 9) RPD から細胞増殖抑制率（=100-RPD）を算出した。細胞増殖抑制率が 50%以上の用量がみられたため、50%を挟む 2 点の直線式から、IC₅₀ を算出した。

7.4.2 染色体異常試験

- 1) 第 7.4.1 項の 1) ～ 2) と同じ操作を行った（処理開始時の細胞濃度測定を含む）。
- 2) 下表に従って、培養液を除去し、陰性対照液、被験液又は陽性対照液、あるいは S9 mix を添加し、各処理群における処理培養液とした。

処理内容	短時間処理法		連続処理法
	代謝活性化無し	代謝活性化有り	
培養液除去量	0.500 mL (0.150 mL)*	1.333 mL (0.933 mL)*	0.500 mL (0.100 mL)*
S9 mix 添加量 (S9 蛋白最終濃度)		0.833 mL (1.074 mg/mL)	
陰性対照液又は 被験液添加量	0.500 mL	0.500 mL	0.500 mL
陽性対照液 添加量	MMC: 0.150 mL	CP: 0.100 mL	MMC: 0.100 mL

*：陽性対照群での培養液除去量

- 3) 第 7.4.1 項の 4)～5) と同じ操作を行った（処理直後及び短時間処理法での 6 時間培養後の培養液と細胞の観察を含む）。
ただし、各群 2 枚の染色体標本作製用プレートについては、培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 µg/mL）を 0.1 mL 加えた。
- 4) 培養終了後、各濃度群 2 枚の染色体標本作製用プレートについて、以下の手順で染色体標本作製した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。
0.25% trypsin 処理後に細胞を回収し、0.075 M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理した後、カルノア固定液（メチルアルコール/酢酸、3/1、v/v）で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所水滴下し、風乾したのちギムザ液で染色して染色体標本とした。
- 5) 各群の残りの 1 枚のプレート（細胞濃度測定用プレート）を用いて沈殿物の有無及び細胞の状態を確認した。次いで、第 7.4.1 項の 7)～9) の手順で PD、RPD 及び細胞増殖抑制率を算出した。

7.5 細胞毒性に関連するデータの表示

細胞濃度、RPD 及び細胞増殖抑制率は、四捨五入により整数表示、PD は四捨五入により小数点第 2 位まで表示した。また、IC₅₀ は有効数字 3 桁で表示した。

7.6 染色体標本の観察

7.6.1 観察手順

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

陰性対照群及び陽性対照群は全て観察した。被験物質処理群は、細胞増殖抑制率が $55 \pm 5\%$ を示した用量を最高用量とし、短時間処理法の非代謝活性化では 150、125 及び 100 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化では 175、150 及び 125 µg/mL、連続処理法では 110、100 及び 90.0 µg/mL を観察した。

7.6.2 染色体異常の分類

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

1) 構造異常

- ギャップ (g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)におけるギャップとは染色分体の同軸線上に、染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるもの
- 染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸線上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸線上にあっても、非染色部位の長さが染色分体の幅以上に離れているもの
- 染色分体型交換(cte) : 2 ヶ所以上で生じた切断が相互に再結合する異常であり、染色体内交換と染色体間交換に分類できる。四放射状交換、三放射状交換などがある
- 染色体型切断(csb) : 分類は ctb に準ずる。非染色部位が染色体の同軸線上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸線上にあっても、非染色部位の長さが染色分体の幅以上に長いもの
- 染色体型交換(cse) : 染色体内交換と染色体間交換に分類できる。二動原体染色体、環状染色体などがある
- その他(other) : 断片化(frg)などがある

2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり、倍加したもの（3 倍体、4 倍体など）。

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

7.7 統計解析

それぞれの処理法ごとに、ギャップを含まない場合（TA）の染色体構造異常を有する細胞の総頻度、数的異常を有する細胞（倍数性細胞及び核内倍加細胞の合計）の総頻度について、以下の統計解析を行った。陰性対照群と被験物質処理群間で Fisher の直接確率計算法による対比較（有意水準：0.05、片側）を行った。

上記の比較において、短時間処理法の代謝活性化において有意な増加が認められたため、Cochran Armitage の傾向検定（有意水準：0.05、片側）を行った。

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

いずれの検定も増加を示す場合についてのみ評価した。

7.8 試験成立基準

以下に示す全ての基準を満たした場合、試験成立とする。

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

7.9 結果の判定基準

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

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

7.10 確認試験

確認試験は実施しなかった。

8. 試験結果

8.1 細胞増殖抑制試験

結果を Appendix 1~3、Appendix 7 に示した。

- 1) 培養液の色調変化
短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 2000 $\mu\text{g/mL}$ の用量で淡橙色、短時間処理法の代謝活性化では 2000 $\mu\text{g/mL}$ の用量で淡黄色への色調変化が観察された。
- 2) 沈殿
すべての処理法で沈殿は観察されなかった。
- 3) 細胞毒性
細胞増殖抑制率は、短時間処理法では 250 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で、連続処理法では 125 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 50%以上を示した。50%細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) は、短時間処理法の非代謝活性化では 142 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の代謝活性化では 168 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法では 102 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。

8.2 染色体異常試験

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

1) 培養液の色調変化

すべての処理法で色調変化は観察されなかった。

2) 沈殿

すべての処理法で沈殿は観察されなかった。

3) 細胞毒性

細胞増殖抑制率は、短時間処理法の非代謝活性化では 150 µg/mL 以上の用量で、短時間処理法の代謝活性化では 175 µg/mL 以上の用量で、連続処理法では 110 µg/mL 以上の用量で 50%以上を示した。

4) 観察結果

染色体構造異常 (TA) の出現頻度は、短時間処理法の非代謝活性化では 150、125 及び 100 µg/mL の用量で 2、1 及び 3、短時間処理法の代謝活性化では 175、150 及び 125 µg/mL の用量で 3、1 及び 2、連続処理法では 110、100 及び 90.0 µg/mL の用量で 2、1 及び 4 であり、対応する陰性対照群との間に有意差はみられなかった。

数的異常 (倍数性細胞及び核内倍加細胞の合計) の出現頻度は、短時間処理法の非代謝活性化では 150、125 及び 100 µg/mL の用量で 3、4 及び 4、短時間処理法の代謝活性化では 175、150 及び 125 µg/mL の用量で 10、4 及び 1、連続処理法では 110、100 及び 90.0 µg/mL の用量で 1、1 及び 2 であり、短時間処理法の代謝活性化の 175 µg/mL で陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示し (Fisher の直接確率計算法、 $p < 0.05$)、その出現率は陰性対照群の施設内背景データの 95%管理上限を超え、傾向検定においても有意な用量依存性が認められた (Cochran Armitage の傾向検定、 $p < 0.05$)。D₂₀ 値は 1.5 mg/mL であった。短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では、対応する陰性対照群との間に有意差はみられなかった。

8.3 試験の成立

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

9. 考察

Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-の染色体異常誘発能を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験では、細胞増殖抑制率が $55 \pm 5\%$ を示した用量を最高用量とし、短時間処理法の非代謝活性化では 150、125 及び 100 µg/mL、短時間処理法の代謝活性

化では 175、150 及び 125 µg/mL、連続処理法では 110、100 及び 90.0 µg/mL を観察した。その結果、短時間処理法の代謝活性化で染色体構造異常 (TA) の出現頻度は陰性対照群との比較で有意差はみられなかったが、数的異常 (倍数性細胞及び核内倍加細胞) の出現頻度は陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示し (Fisher の直接確率計算法、 $p < 0.05$)、その出現率は陰性対照群の施設内背景データの 95% 管理上限を超え、傾向検定においても有意な用量依存性が認められた (Cochran Armitage の傾向検定、 $p < 0.05$)。短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では、染色体構造異常 (TA) 及び数的異常 (倍数性細胞及び核内倍加細胞) の出現頻度はいずれの処理法においても陰性対照群との比較で有意差はみられなかった。

10. 結論

Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-は本試験条件下において、染色体構造異常は誘発しない (陰性) が、数的異常を誘発する (陽性) と結論した。

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

Negative control					Positive control					
Short-term treatment (50 studies, 15300 cells)					Short-term treatment (50 studies, 15000 cells)					
S9 mix	Time		Poly (%)	TA (%)	Substance	S9 mix	Time	Poly (%)	TA (%)	
+	6	Mean	0.7	0.6	CP	+	6	Mean	0.0	61.3
		S.D.	0.3	0.3				S.D.	0.0	10.5
		UCL	1.3	1.2				UCL	0.0	81.9
		LCL	0.1	0.0				LCL	0.0	40.7
Short-term treatment (50 studies, 15300 cells)					Short-term treatment (50 studies, 15000 cells)					
S9 mix	Time		Poly (%)	TA (%)	Substance	S9 mix	Time	Poly (%)	TA (%)	
-	6	Mean	0.7	0.7	MMC	-	6	Mean	0.1	20.7
		S.D.	0.2	0.3				S.D.	0.2	4.5
		UCL	1.1	1.3				UCL	0.5	29.5
		LCL	0.3	0.1				LCL	0.0	11.9
Continuous treatment (50 studies, 15300 cells)					Continuous treatment (50 studies, 15000 cells)					
S9 mix	Time		Poly (%)	TA (%)	Substance	S9 mix	Time	Poly (%)	TA (%)	
-	24	Mean	0.7	0.7	MMC	-	24	Mean	0.1	23.5
		S.D.	0.3	0.3				S.D.	0.2	4.5
		UCL	1.3	1.3				UCL	0.5	32.3
		LCL	0.1	0.1				LCL	0.0	14.7

Cumulative background data of chromosome aberration tests in cultured Chinese hamster cells line (CHL/IU), carried out under the same study conditions at BoZo Research Center Inc. from November 2018 to July 2022.

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

Positive control: CP; Cyclophosphamide, 14 µg/mL

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

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

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

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

Poly : polyploid cells and endoreduplication cells

TA : total number of cells with aberrations excluding gaps

UCL : 95% control limits(upper control limit)

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

Table 1 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Results of the chromosomal aberration test [Short-term treatment: -S9 mix]

Treatment (h)	S9 mix	Dose Level (µg/mL)	Plate	Number of cells with structural chromosomal aberration ^{a), b)}									RPD (%)	Plate	Number of cells with numerical chromosomal aberration ^{b)}			
				Cells ^{c)} observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA	g	TAG			Cells ^{d)} observed	Polyploid cell	Endore- duplicated cell	Total
6	-	NC	1	150	1	0	0	0	0	1	1	2	100	1	151	1	0	1
			2	150	0	2	0	0	0	2	0	2		2	151	1	0	1
			Total	300	1(0.3)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.0)	1(0.3)	4(1.3)		Total	302	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)
		100	1	150	1	1	0	0	0	2	1	3	100	1	153	3	0	3
			2	150	0	1	0	0	0	1	1	2		2	151	1	0	1
			Total	300	1(0.3)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.0)	2(0.7)	5(1.7)		Total	304	4(1.3)	0(0.0)	4(1.3)
		125	1	150	1	0	0	0	0	1	1	2	82	1	152	2	0	2
			2	150	0	0	0	0	0	0	0	0		2	152	2	0	2
			Total	300	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	1(0.3)	2(0.7)		Total	304	4(1.3)	0(0.0)	4(1.3)
		150	1	150	0	2	0	0	0	2	0	2	47	1	151	1	0	1
			2	150	0	0	0	0	0	0	0	0		2	152	2	0	2
			Total	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)		Total	303	3(1.0)	0(0.0)	3(1.0)
		PC	1	150	10	23	0	0	0	33	0	33	74	1	150	0	0	0
			2	150	5	24	0	0	0	29	0	29		2	150	0	0	0
			Total	300	15(5.0)	47(15.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	62*(20.7)	0(0.0)	62(20.7)		Total	300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

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

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

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

NC: Negative control (water for injection)

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

RPD: Relative population doubling

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

Table 2 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Results of the chromosomal aberration test [Short-term treatment: +S9 mix]

Treatment (h)	S9 mix	Dose Level (µg/mL)	Plate	Number of cells with structural chromosomal aberration ^{a), b)}									RPD (%)	Plate	Number of cells with numerical chromosomal aberration ^{b)}			
				Cells ^{c)} observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA	g	TAG			Cells ^{d)} observed	Polyploid cell	Endore- duplicated cell	Total
6	+	NC	1	150	0	1	0	0	0	1	0	1	100	1	152	2	0	2
			2	150	1	1	0	0	0	2	1	3		2	151	1	0	1
			Total	300	1(0.3)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.0)	1(0.3)	4(1.3)		Total	303	3(1.0)	0(0.0)	3(1.0)#
		125	1	150	0	0	0	0	0	0	0	0	80	1	151	1	0	1
			2	150	1	1	0	0	0	2	0	2		2	150	0	0	0
			Total	300	1(0.3)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)		Total	301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)
		150	1	150	0	0	0	0	0	0	0	0	68	1	151	0	1	1
			2	150	0	1	0	0	0	1	0	1		2	153	2	1	3
			Total	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)		Total	304	2(0.7)	2(0.7)	4(1.3)
		175	1	150	0	1	0	0	0	1	0	1	44	1	153	1	2	3
			2	150	2	0	0	0	0	2	0	2		2	157	1	6	7
			Total	300	2(0.7)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.0)	0(0.0)	3(1.0)		Total	310	2(0.6)	8(2.6)	10*(3.2)
		PC	1	150	6	90	0	0	0	95	0	95	52	1	150	0	0	0
			2	150	8	102	0	0	0	110	0	110		2	150	0	0	0
			Total	300	14(4.7)	192(64.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	205*(68.3)	0(0.0)	205(68.3)		Total	300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

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

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

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

NC: Negative control (water for injection)

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

RPD: Relative population doubling

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

#: $p < 0.05$ (statically significant trend by Cochran-Armitage trend test)

Table 3 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Results of the chromosomal aberration test [Continuous treatment: 24h]

Treatment (h)	S9 mix	Dose Level (µg/mL)	Plate	Number of cells with structural chromosomal aberration ^{a), b)}								RPD (%)	Plate	Number of cells with numerical chromosomal aberration ^{b)}				
				Cells ^{c)} observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA	g			TAG	Cells ^{d)} observed	Polyploid cell	Endore- duplicated cell	Total
24	-	NC	1	150	0	1	0	0	0	1	0	1	100	1	151	1	0	1
			2	150	0	1	0	0	0	1	0	1		2	151	1	0	1
			Total	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)		Total	302	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)
		90.0	1	150	2	0	0	0	0	2	0	2	80	1	152	2	0	2
			2	150	1	1	0	0	0	2	0	2		2	150	0	0	0
			Total	300	3(1.0)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(1.3)	0(0.0)	4(1.3)		Total	302	2(0.7)	0(0.0)	2(0.7)
		100	1	150	0	1	0	0	0	1	0	1	61	1	151	1	0	1
			2	150	0	0	0	0	0	0	0	0		2	150	0	0	0
			Total	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)		Total	301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)
		110	1	150	0	0	0	0	0	0	0	0	48	1	150	0	0	0
			2	150	1	1	0	0	0	2	1	3		2	151	1	0	1
			Total	300	1(0.3)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.7)	1(0.3)	3(1.0)		Total	301	1(0.3)	0(0.0)	1(0.3)
		PC	1	150	10	27	0	0	0	36	0	36	69	1	150	0	0	0
			2	150	9	33	0	0	0	41	0	41		2	150	0	0	0
			Total	300	19(6.3)	60(20.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	77*(25.7)	0(0.0)	77(25.7)		Total	300	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

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

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

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

NC: Negative control (water for injection)

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

RPD: Relative population doubling

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

Appendix 1 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Results of the cell-growth inhibition test
[Short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)		RPD ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition rate (%) ^{b)}	Condition of cells ^{c, e)}		Condition of culture medium ^{d)}			
S9 mix	Treatment (h)					Color ^{f)}	Precipitates ^{g)}				
							1)	2)	1)	2)	3)
-	6	0 (NC)		100	0	-	-	-	-	-	-
		Test article	15.6	98	2	-	-	-	-	-	-
			31.3	100	0	-	-	-	-	-	-
			62.5	91	9	-	-	-	-	-	-
			125	58	42	++	+	-	-	-	-
			250	h)	h)	+++	TOX	-	-	-	-
			500	h)	h)	TOX	TOX	-	-	-	-
			1000	h)	h)	TOX	TOX	-	-	-	-
			2000	h)	h)	TOX	TOX	Light orange	-	-	-
Concentration of 50% cell-growth inhibition : 142 µg/mL											

NC : Negative control (water for injection)

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

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

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

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

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

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

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

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

TOX: There existed few cells attached to the plate and almost all cells were detached and/or dead.

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

h) RPD and cell-growth inhibition rate could not be calculated because the number of cells was zero.

Appendix 2 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Results of the cell-growth inhibition test
[Short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)		RPD ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition rate (%) ^{b)}	Condition of cells ^{c, e)}		Condition of culture medium ^{d)}			
S9 mix	Treatment (h)							Color ^{f)}	Precipitates ^{g)}		
						1)	2)		1)	2)	3)
+	6	0 (NC)		100	0	-	-	-	-	-	-
		Test article	15.6	91	9	-	-	-	-	-	-
			31.3	91	9	-	-	-	-	-	-
			62.5	81	19	-	-	-	-	-	-
			125	76	24	+	+	-	-	-	-
			250	h)	h)	+++	TOX	-	-	-	-
			500	h)	h)	TOX	TOX	-	-	-	-
			1000	h)	h)	TOX	TOX	-	-	-	-
			2000	h)	h)	TOX	TOX	Light yellow	-	-	-
Concentration of 50% cell-growth inhibition : 168 µg/mL											

NC : Negative control (water for injection)

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

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

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

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

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

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

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

TOX: There existed few cells attached to the plate and almost all cells were detached and/or dead.

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

h) RPD and cell-growth inhibition rate could not be calculated because the number of cells was zero.

Appendix 3 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Results of the cell-growth inhibition test
[Continuous treatment: 24h]

Study type		Concentration (µg/mL)		RPD ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition rate (%) ^{b)}	Condition of cells ^{c, e)}	Condition of culture medium ^{d)}		
S9 mix	Treatment (h)						Color ^{f)}	Precipitates ^{g)}	
								1)	2)
-	24	0 (NC)		100	0	-	-	-	-
		Test article	15.6	103	-3	-	-	-	-
			31.3	95	5	-	-	-	-
			62.5	95	5	-	-	-	-
			125	23	77	++	-	-	-
			250	h)	h)	TOX	-	-	-
			500	h)	h)	TOX	-	-	-
			1000	h)	h)	TOX	-	-	-
			2000	h)	h)	TOX	Light orange	-	-
Concentration of 50% cell-growth inhibition : 102 µg/mL									

NC : Negative control (water for injection)

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

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

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

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

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

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

TOX: There existed few cells attached to the plate and almost all cells were detached and/or dead.

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

h) RPD and cell-growth inhibition rate could not be calculated because the number of cells was zero.

Appendix 4 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Results of the chromosomal aberration test
[Short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)	RPD ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition rate (%) ^{b)}	Condition of cells ^{c, e)}		Condition of culture medium ^{d)}					
S9 mix	Treatment (h)						Color ^{f)}	Precipitates ^{g)}				
					1)	2)		1)	2)	3)		
-	6	0 (NC)		100	0	-	-	-	-	-	-	
		Test article	50.0	102	-2	-	-	-	-	-	-	-
			75.0	100	0	-	-	-	-	-	-	-
			100	100	0	+	-	-	-	-	-	-
			125	82	18	++	-	-	-	-	-	-
			150	47	53	+++	+	-	-	-	-	-
			175	24	76	+++	++	-	-	-	-	-
		PC		74	26	-	-	-	-	-	-	-

NC : Negative control (water for injection)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

Appendix 5 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Results of the chromosomal aberration test
[Short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Concentration (µg/mL)	RPD ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition rate (%) ^{b)}	Condition of cells ^{c, e)}		Condition of culture medium ^{d)}				
S9 mix	Treatment (h)						Color ^{f)}	Precipitates ^{g)}			
					1)	2)		1)	2)	3)	
+	6	0 (NC)		100	0	-	-	-	-	-	-
		Test article	50.0	95	5	-	-	-	-	-	-
			75.0	90	10	-	-	-	-	-	-
			100	85	15	+	-	-	-	-	-
			125	80	20	+	-	-	-	-	-
			150	68	32	+	+	-	-	-	-
			175	44	56	++	+	-	-	-	-
			200	24	76	++	++	-	-	-	-
		PC		52	48	-	-	-	-	-	-

NC : Negative control (water for injection)

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

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

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

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

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

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

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

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

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

Appendix 6 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Results of the chromosomal aberration test
[Continuous treatment: 24h]

Study type		Concentration (µg/mL)	RPD ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition rate (%) ^{b)}	Condition of cells ^{c, e)}	Condition of culture medium ^{d)}			
S9 mix	Treatment (h)					Color ^{f)}	Precipitates ^{g)}		
							1)	2)	
-	24	0 (NC)		100	0	-	-	-	-
		Test article	60.0	90	10	-	-	-	-
			70.0	87	13	-	-	-	-
			80.0	82	18	-	-	-	-
			90.0	80	20	+	-	-	-
			100	61	39	+	-	-	-
			110	48	52	+	-	-	-
			120	38	62	++	-	-	-
		PC		69	31	-	-	-	-

NC : Negative control (water for injection)

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

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

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

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

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

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

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

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

f) -: No color changes

g) -: No precipitates

Appendix 7 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: *In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Population doubling in the cell-growth inhibition test

[Short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell counts ($\times 10^4$ cells/mL)		PD
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation	
-	6	0 (NC)		45	1.49
		Test article	16	44	1.46
				45	1.49
				41	1.36
				29	0.86
				0	a)
				0	a)
				0	a)
				0	a)
				0	a)
		2000		0	a)

[Short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell counts ($\times 10^4$ cells/mL)		PD
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation	
+	6	0 (NC)		45	1.49
		Test article	16	41	1.36
				41	1.36
				37	1.21
				35	1.13
				0	a)
				0	a)
				0	a)
				0	a)
		2000		0	a)

[Continuous treatment: 24h]

Study type		Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell counts ($\times 10^4$ cells/mL)		PD
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation	
-	24	0 (NC)		42	1.39
		Test article	16	43	1.43
				40	1.32
				40	1.32
				20	0.32
				0	a)
				0	a)
				0	a)
				0	a)
		2000		0	a)

NC : Negative control (water for injection)

PD : Population doubling was determined as;

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

a) PD could not be calculated because the number of cells was zero.

Appendix 8 Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-*In vitro* chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells
Population doubling in the chromosomal aberration test

[Short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell counts ($\times 10^4$ cells/mL)		PD
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation	
-	6	0 (NC)	23	52	1.18
		50.0		53	1.20
		75.0		52	1.18
		100		52	1.18
		125		45	0.97
		150		34	0.56
		175		28	0.28
		PC (MMC)		42	0.87

[Short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell counts ($\times 10^4$ cells/mL)		PD
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation	
+	6	0 (NC)	23	52	1.18
		50.0		50	1.12
		75.0		48	1.06
		100		46	1.00
		125		44	0.94
		150		40	0.80
		175		33	0.52
		200		28	0.28
		PC (CP)		35	0.61

[Continuous treatment: 24h]

Study type		Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell counts ($\times 10^4$ cells/mL)		PD
S9 mix	Treatment (h)		At the initiation of the treatment	At the end of the incubation	
-	24	0 (NC)	23	59	1.36
		60.0		54	1.23
		70.0		52	1.18
		80.0		50	1.12
		90.0		49	1.09
		100		41	0.83
		110		36	0.65
		120		33	0.52
		PC (MMC)		44	0.94

NC : Negative control (water for injection)

PC : Positive control (MMC; Mitomycin C, 0.075 or 0.050 $\mu\text{g/mL}$, CP; Cyclophosphamide monohydrate, 14 $\mu\text{g/mL}$)

PD : Population doubling was determined as;

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

T-G703

信頼性保証書（1/2）

試験番号 : T-G703

試験表題 : Dodecanamide, N-[3-(dimethyloxidoamino)propyl]-: チャイニーズ・
ハムスター培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験

本試験は以下に示す基準に従って実施されたことを保証致します。

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」（平成 23 年 3 月 31 日:薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環企発第 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		2022 年 12 月 19 日	2022 年 12 月 19 日
試験計画書変更書（1）		2023 年 1 月 18 日	2023 年 1 月 18 日
細胞播種		2023 年 1 月 20 日	2023 年 1 月 24 日
調製・保存（被験物質・ 陽性対照物質）、処理		2023 年 1 月 23 日	2023 年 1 月 24 日
染色体標本作製（固定）		2023 年 1 月 24 日	2023 年 1 月 27 日
染色体標本作製（染色）		2023 年 1 月 25 日	2023 年 1 月 27 日
染色体標本観察		2023 年 2 月 8 日	2023 年 2 月 10 日
生データ		2023 年 3 月 14 日	2023 年 3 月 14 日
改善確認		2023 年 3 月 14 日	2023 年 3 月 15 日
最終報告書草案 帳票		2023 年 3 月 14 日	2023 年 3 月 14 日
改善確認		2023 年 3 月 14 日	2023 年 3 月 15 日
申請資料		2023 年 3 月 14 日	2023 年 3 月 14 日
改善確認		2023 年 3 月 14 日	2023 年 3 月 15 日
最終報告書		2023 年 3 月 22 日	2023 年 3 月 22 日

信頼性保証書 (2/2)

施設調査			
項 目	担当者	調 査 日	部門責任者及び 運営管理者への 報告日
培養細胞の性状検査	■■■■■■■■■■	2022 年 11 月 4 日	
	■■■■■■■■■■	2022 年 11 月 7 日	
	■■■■■■■■■■	2022 年 11 月 8 日	
	■■■■■■■■■■	2022 年 11 月 10 日	
	■■■■■■■■■■	2022 年 12 月 1 日	
	■■■■■■■■■■	2022 年 12 月 2 日	
	■■■■■■■■■■	2022 年 12 月 5 日	2022 年 12 月 7 日

2023 年 3 月 22 日

株式会社ボゾリサーチセンター

信頼性保証部門