

T-G024



最 終 報 告 書

試験名 : Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester のほ乳類培養細胞を用いる
染色体異常試験

試験番号 : T-G024

試験期間 : 2011 年 10 月 25 日-2012 年 3 月 23 日

試験実施施設

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

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1 丁目 2 番 2 号

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-G024

1. GLP 陳述書

試験番号 : T-G024

試験表題 : Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

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

2012 年 3 月 23 日

試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

2. 目次

1.	GLP 陳述書	2
2.	目次	3
3.	試験実施概要	7
3.1	試験番号	7
3.2	試験表題	7
3.3	試験目的	7
3.4	試験委託者	7
3.5	試験受託者	7
3.6	試験実施施設	7
3.7	試験日程	7
3.8	試験責任者	7
3.9	試験担当者	8
3.10	予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事 態及び試験計画書に従わなかったこと	8
3.11	資料保存	8
3.12	試験責任者の記名・なつ印及びその日付	8
4.	要約	9
5.	緒言	10
5.1	Good Laboratory Practice (GLP)	10
5.2	遺伝毒性試験ガイドライン	10
6.	試験材料及び方法	11
6.1	被験物質及び溶媒	11
6.1.1	被験物質	11
6.1.2	溶媒	12
6.2	被験液の調製	12
6.2.1	調製方法	12
6.2.2	調製頻度	13
6.2.3	安定性	13
6.3	対照物質	13
6.3.1	陰性対照	13
6.3.2	陽性対照	13
6.4	使用細胞株	14
6.4.1	細胞株	14
6.4.2	細胞の選択理由	14
6.4.3	培養条件	14
6.5	S9 mix 及び培養液の調製	14

6.5.1	S9 mix	14
6.5.2	培養液	15
6.6	試験方法 ¹⁻⁵⁾	16
6.6.1	識別方法	17
6.6.2	用量の設定	17
6.6.3	細胞増殖抑制試験	17
6.6.4	染色体異常試験	18
6.6.5	標本の観察	20
6.6.6	染色体異常の分類	20
6.6.7	判定基準	21
7.	試験結果及び考察	22
7.1	細胞増殖抑制試験	22
7.2	染色体異常試験	22
8.	参考文献	23

添付資料

添付資料

測定成績書（被験物質の安定性）



- Fig. 1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester
[Continuous treatment: 24hr]
- Fig. 4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester
[Continuous treatment: 48hr]

表

Table 1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 3	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester [Continuous treatment: 24hr]
Table 4	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester [Continuous treatment: 48hr]

付表

Appendix 1	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester
Appendix 2-1	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester [Short-term treatment: +S9 mix]
Appendix 2-2	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester [Short-term treatment: -S9 mix]
Appendix 2-3	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester [Continuous treatment: 24hr]
Appendix 2-4	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester [Continuous treatment: 48hr]

T-G024

- | | |
|--------------|---|
| Appendix 3-1 | Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester
[Short-term treatment: +S9 mix] |
| Appendix 3-2 | Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester
[Short-term treatment: -S9 mix] |
| Appendix 3-3 | Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester
[Continuous treatment: 24hr] |
| Appendix 3-4 | Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester
[Continuous treatment: 48hr] |

信賴性保証書

T-G024

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

T-G024

3.2 試験表題

Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3.3 試験目的

ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

3.4 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 東京都千代田区霞が関 1 丁目 2 番 2 号

3.5 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

3.6 試験実施施設

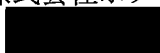
株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11
株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

3.7 試験日程

試験開始日	:	2011 年 10 月 25 日
被験物質受領日	:	2011 年 9 月 21 日
実験開始日	:	2011 年 11 月 4 日
実験終了日	:	2011 年 12 月 19 日
試験終了日	:	2012 年 3 月 23 日

3.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

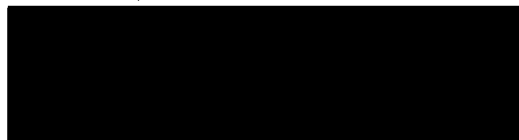


3.9 試験担当者

被験物質保存責任者：

化学分析責任者：

試験担当者：



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

試験計画書に従わなかったことはなかった。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として、東京研究所での被験物質保存期間中、保存温度が許容範囲の上限をわずかに逸脱した。しかしながら、後日に実施された被験物質の安定性の測定において異常は認められなかったことから、試験の信頼性に影響を及ぼすことはなかったと判断した。

3.11 資料保存

試験計画書（試験計画書変更書を含む）原本、記録文書、生データ、染色体標本及び報告書類（最終報告書は原本）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最終報告書提出後 10 年間保存する。期間終了後の保存については、厚生労働省 医薬食品局 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。

3.12 試験責任者の記名・なつ印及びその日付



2012 年 3 月 23 日



株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

4. 要約

Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果を基に、短時間処理法では 5000 µg/mL を最高用量として以下公比 2 で計 3 用量を、連続処理法では 5000 µg/mL を最高用量として以下公比 1.5 で計 4 用量を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA 値) 及び倍数体の出現率は、いずれの処理方法においても、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester は本試験条件下において、染色体構造異常及び染色体数的異常は誘発しないと結論した。

5. 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、Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester の安全性評価の一環として、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。

5.1 Good Laboratory Practice (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）

5.2 遺伝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：薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企
発第 110331009 号）
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 473」
（OECD 理事会：1997 年 7 月 21 日）

使用後の処理 : 被験物質の残量は安定性を確認後、すべて廃棄した。

6.1.2 溶媒

名称 : 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液
(略称：0.5 w/v%CMC-Na 水溶液)

ロット番号 : C20111101、C20111116

製造元 : 自家調製

保存方法 : 冷蔵

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

溶媒の選択理由 : 供試前試験を実施した結果、注射用水(50.0 mg/mL)、DMSO 及びアセトン(500 mg/mL)に不溶であった。そのため、メノウ製の乳鉢と乳棒ですりつぶしながら 0.5 w/v%CMC-Na 水溶液で懸濁(50.0 mg/mL)したところ、良好な懸濁状態がえられたことから、0.5 w/v%CMC-Na 水溶液を用いることとした。

調製方法 : カルボキシメチルセルロースナトリウム（日本薬局方、丸石製薬株式会社、Lot No.0115）を注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、Lot No.1D80N）に溶解して 0.5 w/v%水溶液とし、高圧蒸気滅菌をした。

6.2 被験液の調製

6.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 1.0000 g を秤取し、メノウ製の乳鉢と乳棒を用いてすりつぶした。20 mL メスフラスコに移し、溶媒で懸濁した後にメスアップして最高濃度の 50.0 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：5000 µg/mL）を調製した。次いで、50.0 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 10 mL：溶媒 10 mL）で順次 9 段階希釈し、25.0、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 mg/mL の 10 濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験

(1) 短時間処理法

被験物質 1.0000 g を秤取し、メノウ製の乳鉢と乳棒を用いてすりつぶした。20 mL メスフラスコに移し、溶媒で懸濁した後にメスアップして最高濃度の 50.0 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：5000 µg/mL）を調製した。次いで、50.0 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 10 mL：溶媒 10 mL）で順次 2 段階希釈し、25.0 及び 12.5 mg/mL の 3 濃度段階の被験液を調製した。

(2) 連続処理法

被験物質 1.2500 g を秤取し、メノウ製の乳鉢と乳棒を用いてすりつぶした。25 mL

メスフラスコに移し、溶媒で懸濁した後にメスアップして最高濃度の 50.0 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：5000 µg/mL）を調製した。次いで、50.0 mg/mL 懸濁液を公比 1.5（各濃度の被験液 16 mL：溶媒 8 mL）で順次 3 段階希釈し、33.3、22.2 及び 14.8 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を調製した。

6.2.2 調製頻度

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。

6.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液が安定であることを確認した。

6.3 対照物質

6.3.1 陰性対照

溶媒として用いた 0.5 w/v% CMC-Na 水溶液を陰性対照とした。

6.3.2 陽性対照

1) 代謝活性化

シクロフォスファミド（CP）

ロット番号	:	CDL2851
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	:	東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

2) 非代謝活性化

マイトマイシン C（MMC）

ロット番号	:	557AJL
製造元	:	協和醗酵キリン株式会社
力価	:	2 mg（力価）/瓶
保存方法	:	室温、遮光
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室

3) 調製方法

調製はすべて用時に行い、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

(1) 染色体異常試験 短時間処理法 代謝活性化

CP 0.0140 g を γ 線滅菌済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、ロット番号：K0J96）を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した（培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度は 14 µg/mL）。

(2) 染色体異常試験 短時間処理法 非代謝活性化及び連続処理法

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：K0J96）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（短時間処理法では培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液 0.150 mL を、連続処理法では培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度はそれぞれ 0.075 及び 0.050 µg/mL）。

4) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験ガイドライン（前述 5.2）に使用が推奨されている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。

6.4 使用細胞株

6.4.1 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。ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 2010 年 10 月 13 日に入手し、凍結保存した細胞について定期的に細胞の性状検査を実施して、性状が適正であること（培養形態、細胞倍加時間 15～20 時間以内、染色体数の平均が 25 本、マイコプラズマ等の汚染がない）が確認されたものを 30 継代以内で試験に使用した。なお、使用時の細胞継代数は細胞増殖抑制試験では 17 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 21 継代、連続処理法では 3 継代であった。

6.4.2 細胞の選択理由

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、背景データも多いこと及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられていることから、本細胞株を選択した。

6.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で培養した。

継代は 2～4 日ごとに行った。

6.5 S9 mix 及び培養液の調製

6.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素 (S9/コファクターC セット、ロット番号:C110909061 及び C111007071、オリエンタル酵母工業株式会社) を混合し、S9 mix を調製した。調製は使用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	11090906、11100707
製造日	:	2011 年 9 月 9 日（ロット番号：11090906） 2011 年 10 月 7 日（ロット番号：11100707）

T-G024

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)
投与方法 : 腹腔内投与
投与期間及び投与量 : PB 4 日間 30+60+60+60 mg/kg body weight
BF 1 日 80 mg/kg body weight
保存方法 : 冷凍 (−70°C 以下の冷凍庫)
使用期限 : 2012 年 3 月 8 日 (ロット番号 : 11090906)
2012 年 4 月 6 日 (ロット番号 : 11100707)
保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室 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 : C11090706、C11100507
製造日 : 2011 年 9 月 7 日 (ロット番号 : C11090706)
2011 年 10 月 5 日 (ロット番号 : C11100507)
保存方法 : 冷凍 (−70°C 以下の冷凍庫)
使用期限 : 2012 年 3 月 6 日 (ロット番号 : C11090706)
2012 年 4 月 4 日 (ロット番号 : C11100507)
保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室 超低温フリーザー

3) S9 mix の組成

S9	2 mL		
補酵素	4.7 mL	20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	1.34 mL
		50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330 mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40 mmol/L 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) 水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

6.5.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM)(GIBCO™, Cat.No.11095)に非働化 (56°C、30 分) した牛血清(bovine serum、BS) を 10 v/v% 添加した培養液(BS-MEM)を用いた。調製後の培養液は冷蔵保存した。

1) 牛血清

ロット番号 : 8117878
製造元 : Invitrogen Corporation
保存方法 : 冷凍 (−20°C 以下の冷凍庫)

T-G024

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷凍庫

2) MEM

ロット番号 : 951548、1007551、1023152

製造元 : Invitrogen Corporation

保存方法 : 冷蔵

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

6.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下に示したステージの順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化
		非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 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

6.6.1 識別方法

以下のように定めた記号又は数字を記したラベルを、シャーレ及びスライドガラスに貼付して識別を行った。

対象	内容	記号又は数字
シャーレ	短時間処理法 代謝活性化	+
	短時間処理法 非代謝活性化	-
	連続処理法 24 時間処理	24-
	連続処理法 48 時間処理	48-
	陰性対照群	NC
	被験物質処理群	高濃度から 1、2、3・・・n の枝番号
	陽性対照群	PC
同一処理群内での識別		①、②、③、④
染色体標本	盲検法によってランダムにコード化した処理内容	試験番号とコンピュータが無作為に割り振った「01」～「99」までの 2 桁の番号及びスライドの枚数を表す枝番号

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 5000 µg/mL とし、以下公比 2 で希釈した 2500、1250、625、313、156、78.1、39.1、19.5 及び 9.77 µg/mL の計 10 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

短時間処理法では 5000 µg/mL を最高用量として以下、公比 2 で希釈した計 3 用量を、連続処理法では 5000 µg/mL を最高用量として以下、公比 1.5 で希釈した計 4 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。

6.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。なお、以下の試験操作のうち、無菌性を必要とした場合は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

- 1) 短時間処理法の代謝活性化と非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに、陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレはプラスチックプレート（直径 60 mm）を用い、各群 2 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。
- 3) 培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、下表に従い、培養液の除去及び処理を行った。

	短時間処理法		連続処理法	
	代謝活性化	非代謝活性化	24 時間処理	48 時間処理
培養液除去量	1.333 mL	0.500 mL	0.500 mL	0.500 mL
S9 mix 添加量	0.833 mL			
溶媒・被験液 添加量	0.500 mL	0.500 mL	0.500 mL	0.500 mL

- 4) 各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、短時間処理法については6時間、連続処理法については24時間及び48時間培養した。
- 5) 短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化については、培養6時間後に肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液5.0 mLを加え、更に18時間培養を続けた。
- 6) 培養終了後、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、確認した（短時間処理法の培養終了時の結果は、参考データとした）。次いで、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。
- 7) 単層細胞密度測定装置（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、陰性対照群の値を100%として、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。

6.6.4 染色体異常試験

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

- 1) 短時間処理法
 - (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに、陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレ（プレート）はプラスチックプレート（直径60 mm）を用い、プレートは各群4枚とした。
 - (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液5.0 mL）を播種した。
 - (3) 培養3日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、下表に従い、培養液の除去及び処理を行った。

	代謝活性化	非代謝活性化
培養液除去量	1.333 mL (0.933 mL)*	0.500 mL (0.150 mL)*
S9 mix 添加量	0.833 mL	
溶媒・被験液・ 陽性対照物質液 添加量	0.500 mL (CP: 0.100 mL)*	0.500 mL (MMC: 0.150 mL)*

* () 内は、陽性対照群の培養液除去量及び陽性対照物質液添加量を示す。

- (4) 各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6時間培養した。
- (5) 培養6時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕

微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。

- (6) 各群 2 枚のプレート（枝番号-①及び-②）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 µg/mL、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。
- (7) 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 箇所点滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞点滴後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- (8) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-③及び-④）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレ（プレート）はプラスチックプレート（直径 60 mm）を用い、プレートは各群 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。
- (3) 培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、下表に従い、培養液の除去及び処理を行った。

	24 時間処理	48 時間処理
培養液除去量	0.500 mL (0.100 mL)*	0.500 mL (0.100 mL)*
溶媒・被験液・ 陽性対照物質液 添加量	0.500 mL (MMC: 0.100 mL)*	0.500 mL (MMC: 0.100 mL)*

* () 内は、陽性対照群の培養液除去量及び陽性対照物質液添加量を示す。

- (4) 各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (5) 各群 2 枚のプレート（枝番号-①及び-②）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 µg/mL、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。
- (6) 染色体標本の作製に際し、陰性対照群及び被験物質処理群については培養液を廃棄し、新しい培養液 5.0 mL を添加した遠沈管に細胞を回収した。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箇所水滴下した。染色体標本はプレート当たり2枚作製した。細胞滴下後、約1日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約15分間染色して染色体標本を作製した。

- (7) 残る各群2枚のプレート（枝番号-③及び-④）は、24時間及び48時間の培養の終了時に肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。その後、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、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

6.6.5 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。同時に倍数体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。

6.6.6 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、構造異常は更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又は染色分体の同軸上に断片があるもの（非染色部分が染色分体の同軸上にある）であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるもの。
- 染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)など。

2) 数的異常

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

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

6.6.7 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¹⁾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 (-)
5%以上 10%未満	疑陽性 (±)
10%以上	陽 性 (+)

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。

7. 試験結果及び考察

7.1 細胞増殖抑制試験

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

各処理法における 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理では毒性が認められず 5000 µg/mL 以上と、連続処理法の 48 時間処理では 3372 µg/mL と算出された。

7.2 染色体異常試験

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

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）及び倍数体の出現率は、いずれの処理方法においても、すべての用量で陰性を示したため、陰性と判定した。

すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

なお、本被験物質を構成するステアリン酸⁶⁾及びエチレングリコール⁷⁾は、細菌を用いる復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ細胞を用いる遺伝子突然変異試験及び CHO 細胞を用いる染色体異常試験⁷⁾で陰性と報告されている。

以上の結果から、Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester は本試験条件下において、染色体構造異常及び染色体数的異常は誘発しないと結論した。

8. 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
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M and Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutat. 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
- 6) National Toxicology Program, NIH “Stearic acid”
http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm?searchterm=57-11-4&fuseaction=ntpsearch.searchresults (accessed 2012-02-06)
- 7) National Toxicology Program, NIH “Ethylene glycol”
http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm?searchterm=107-21-1&fuseaction=ntpsearch.searchresults (accessed 2012-02-06)

測定成績書
(被験物質の安定性)

試験番号 : T-G024

被験物質 : Octadecanoic acid,1,2-ethanediyl ester
(ロット番号：DCH0971)

測定項目 : 赤外吸収スペクトルの確認 (ATR 法)

ステージ : 被験物質の安定性分析

測定日 : 2012 年 1 月 6 日

判定基準 : 参照スペクトル ¹⁾ と同一波数のところに同様な強度の吸収を認める。

1) XXXXXXXXXX : Octadecanoic acid,1,2-ethanediyl ester の GC を用いた被験液中濃度測定法バリデーション及び均一性・安定性試験 (媒体：0.5 w/v%メチルセルローズ溶液) 並びに IR を用いた特性及び安定性試験 (株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所、試験番号：A-2426)

結果 : 参照スペクトルと同一波数のところに同様な強度の吸収を認めた。
なお、赤外吸収スペクトルは次のページに示す。

判定 : 適

基準 : 「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)

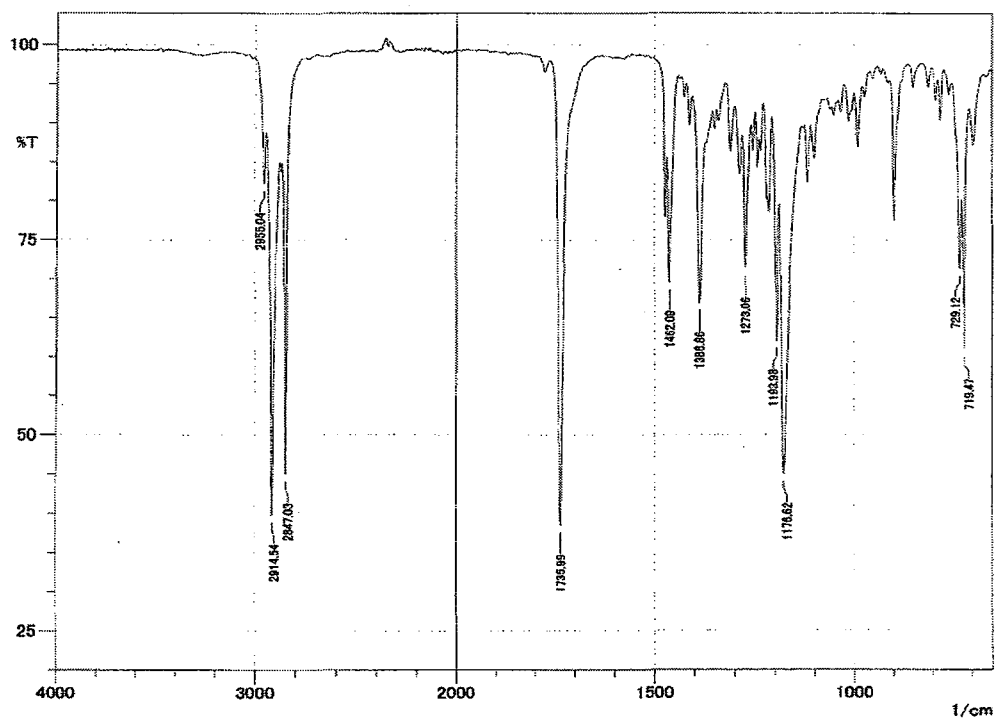
XXXXXXXXXX 2012 年 1 月 12 日
化学分析責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

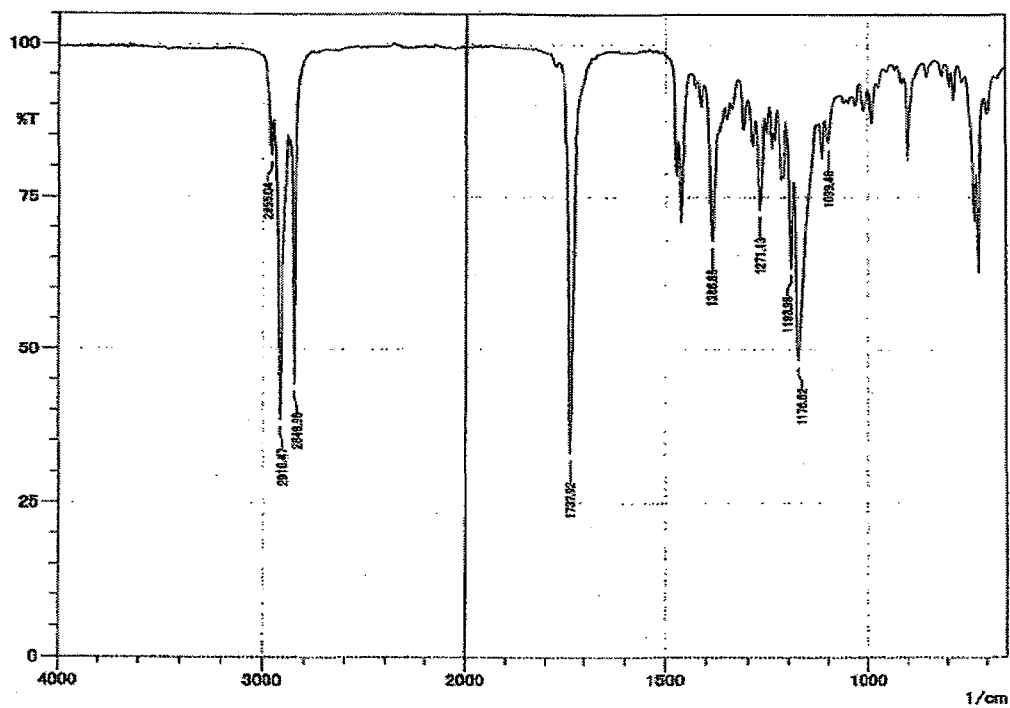
添付資料

試験番号 : T-G024
(2/2)

結果 : 赤外吸収スペクトル



(被験物質の安定性分析)



(参照スペクトル)

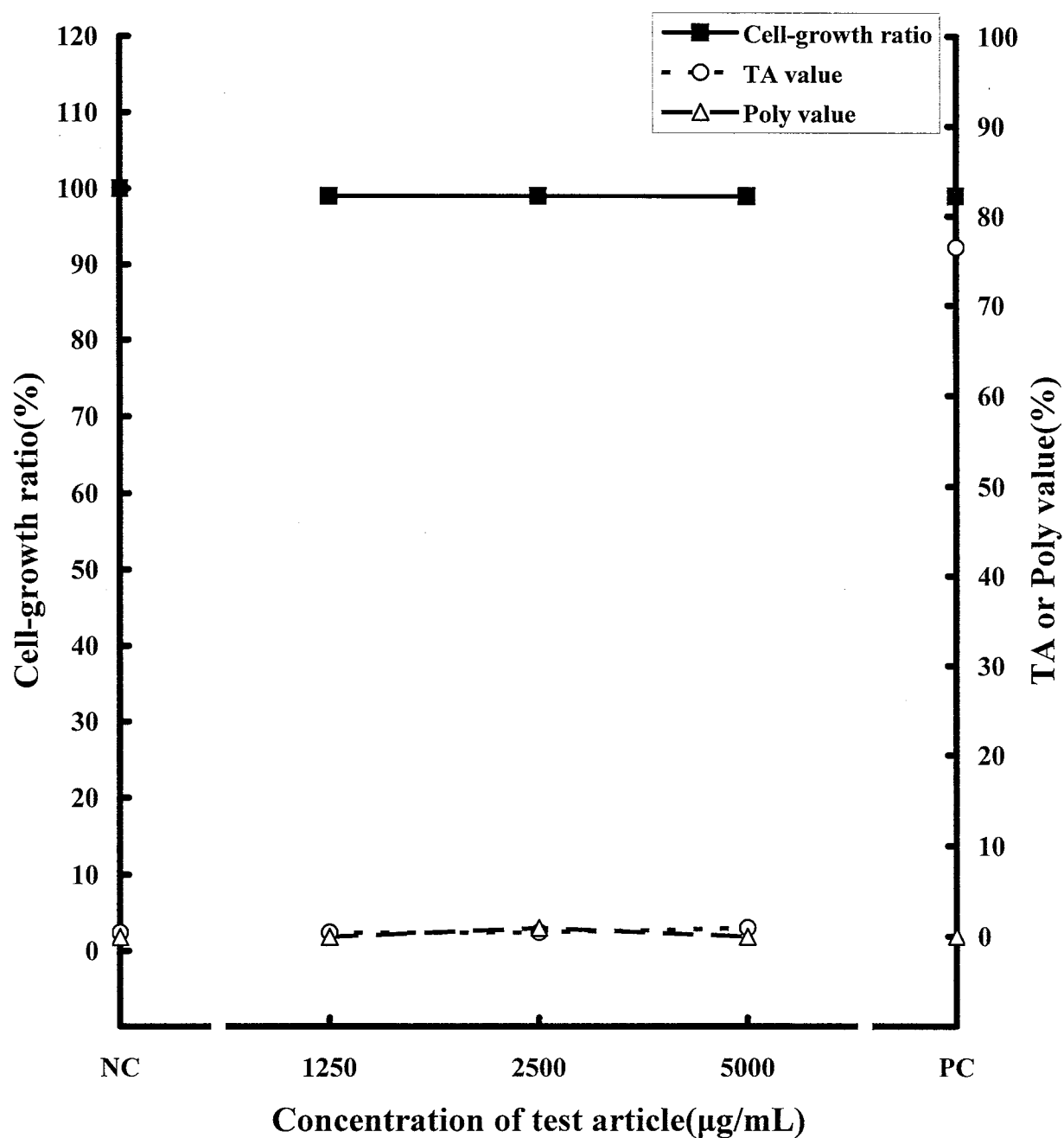


Fig. 1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Short-term treatment: +S9 mix]

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

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

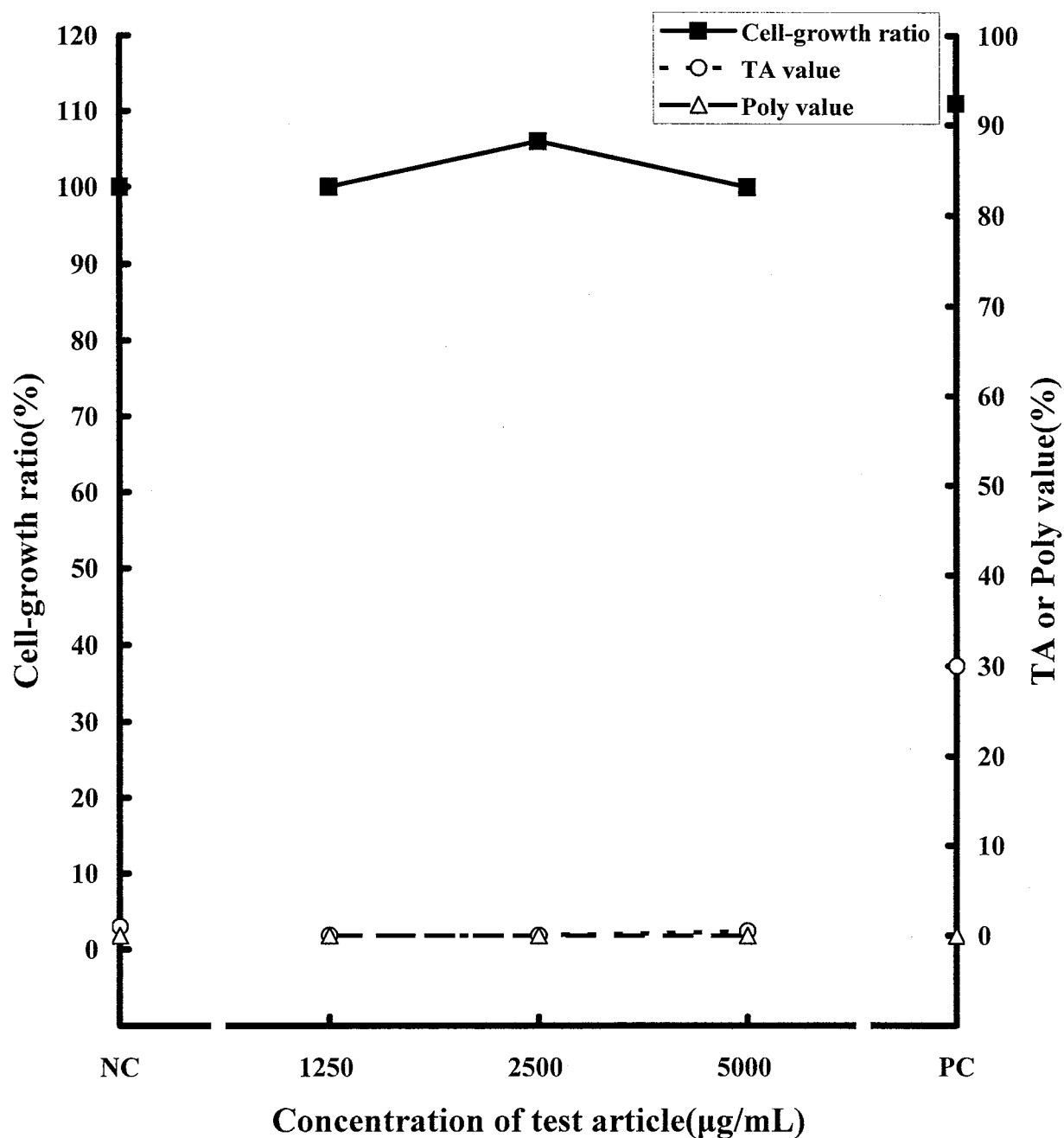


Fig. 2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Short-term treatment: -S9 mix]

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

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

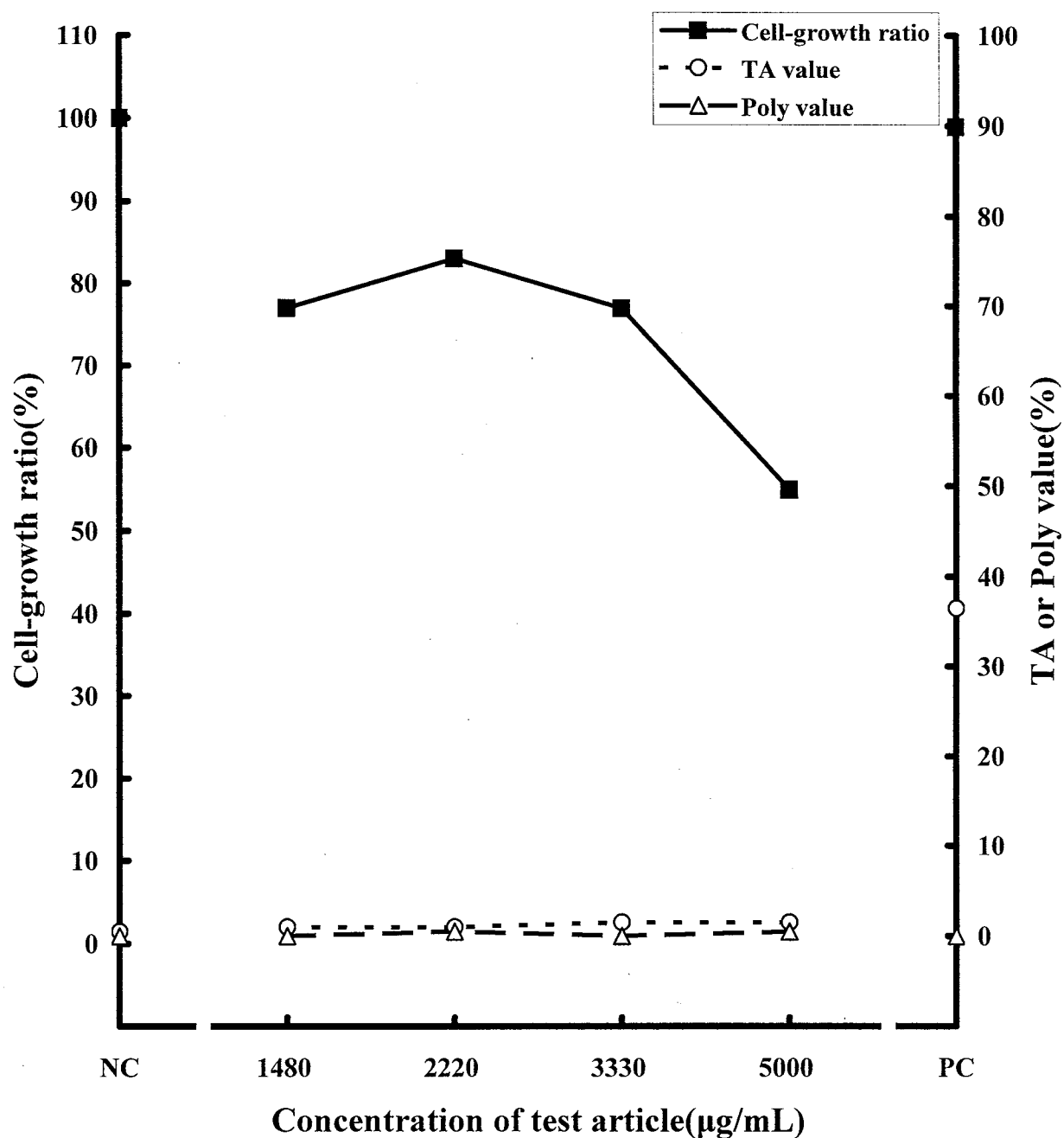


Fig. 3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Continuous treatment: 24hr]

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

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

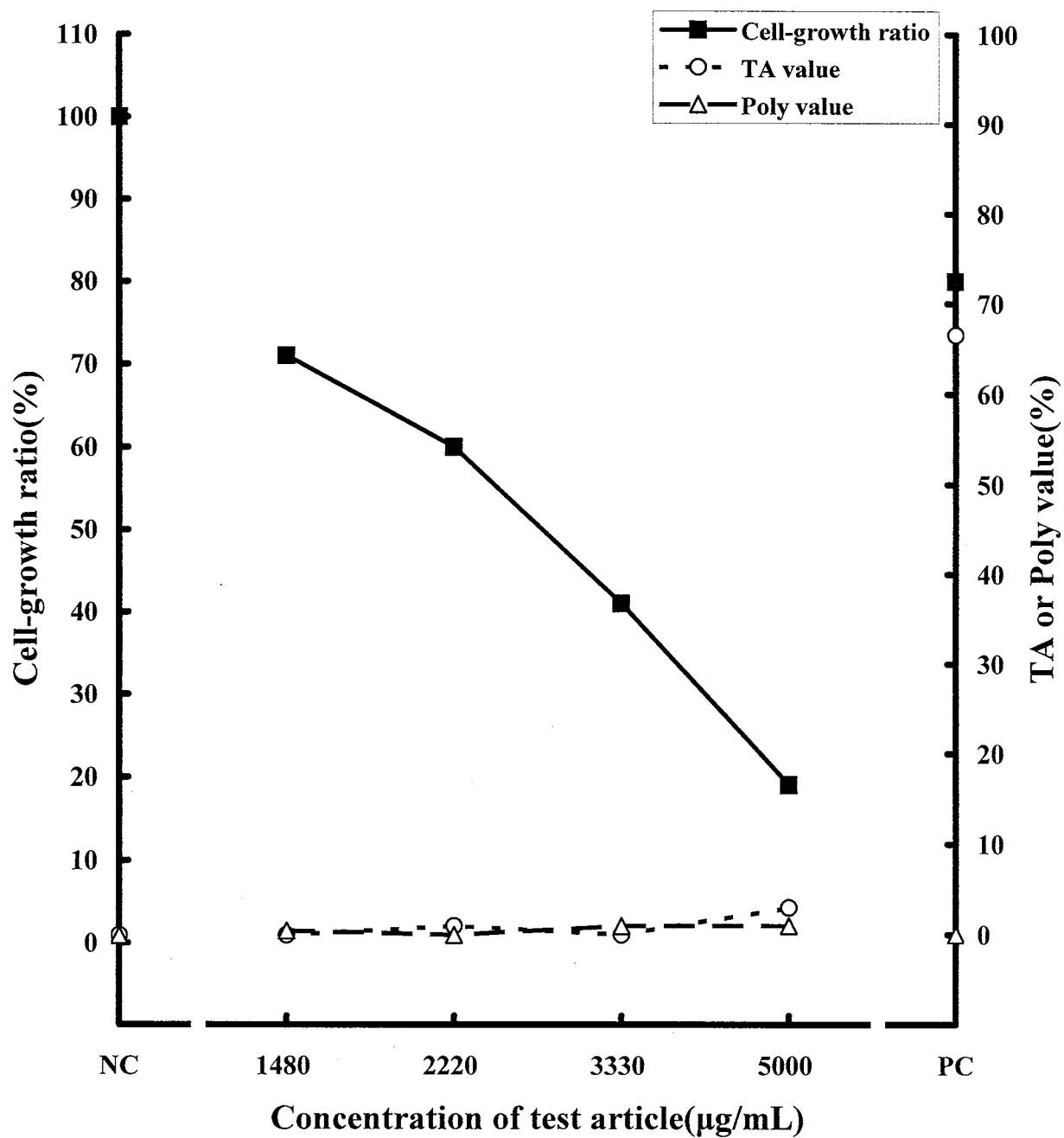


Fig. 4

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Continuous treatment: 48hr]

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

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

Table 1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1, 2-ethanediyl ester
[Short-term treatment:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Judge- ment
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	
6-18	+	NC	100	1	0	0	0	0	1	0	1	100	100	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	-
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		1250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	99	100	0	0	-
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(99)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		2500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	99	100	2	0	-
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(99)	200	2(1.0)	0(0.0)	
		5000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	
			100	1	1	0	0	0	2	0	2	99	100	0	0	-
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	(99)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		PC	100	8	75	0	0	0	75	0	75	99	100	0	0	
			100	12	77	0	0	0	78	0	78	99	100	0	0	-
			200	20(10.0)	152(76.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	153(76.5)	0(0.0)	153(76.5)	(99)	200	0(0.0)	0(0.0)	

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 (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

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

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1, 2-ethanediyl ester
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Judge- ment
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	
6-18	-	NC	100	1	0	0	0	0	1	0	1	100	100	0	0	-
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	100	100	0	0	
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		1250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		2500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	111	100	0	0	
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(106)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		5000	100	1	0	0	0	0	1	1	2	100	100	0	0	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	2(1.0)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		PC	100	5	26	0	0	0	30	1	31	111	100	0	0	-
			100	2	29	0	0	0	30	0	30	111	100	0	0	
			200	7(3.5)	55(27.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	60(30.0)	1(0.5)	61(30.5)	(111)	200	0(0.0)	0(0.0)	

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 (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

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

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1, 2-ethanediyl ester
[Continuous treatment:24hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Judge- ment
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	
24-0	-	NC	100	1	0	0	0	0	1	0	1	100	100	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	-
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		1480	100	1	0	0	0	0	1	0	1	77	100	0	0	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	77	100	0	0	-
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	(77)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		2220	100	1	0	0	0	0	1	0	1	77	100	0	0	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	88	100	1	0	-
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	(83)	200	1(0.5)	0(0.0)	
		3330	100	1	1	0	0	0	2	0	2	77	100	0	0	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	77	100	0	0	-
			200	2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	(77)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		5000	100	1	0	0	0	0	1	0	1	55	100	1	0	
			100	2	0	0	0	0	2	0	2	55	100	0	0	-
			200	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	(55)	200	1(0.5)	0(0.0)	
		PC	100	6	34	0	0	0	39	0	39	99	100	0	0	
			100	11	26	0	0	0	34	0	34	99	100	0	0	-
			200	17(8.5)	60(30.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	73(36.5)	0(0.0)	73(36.5)	(99)	200	0(0.0)	0(0.0)	

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 (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

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

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1, 2-ethanediyl ester
[Continuous treatment:48hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Judge- ment
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	
48-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	104	100	0	0	
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		1480	100	0	0	0	0	0	0	0	0	74	100	1	0	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	70	100	0	0	
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(71)	200	1(0.5)	0(0.0)	
		2220	100	0	0	0	0	0	0	0	0	59	100	0	0	-
			100	1	1	0	0	0	2	0	2	64	100	0	0	
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	(60)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		3330	100	0	0	0	0	0	0	0	0	44	100	0	0	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	39	100	2	0	
			200	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)	200	2(1.0)	0(0.0)	
		5000	100	3	1	0	0	0	4	0	4	19	100	2	0	-
			100	1	1	0	0	0	2	0	2	19	100	0	0	
			200	4(2.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	6(3.0)	0(0.0)	6(3.0)	(19)	200	2(1.0)	0(0.0)	
		PC	100	16	62	0	0	0	65	0	65	80	100	0	0	-
			100	14	62	0	1	0	68	0	68	84	100	0	0	
			200	30(15.0)	124(62.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	133(66.5)	0(0.0)	133(66.5)	(80)	200	0(0.0)	0(0.0)	

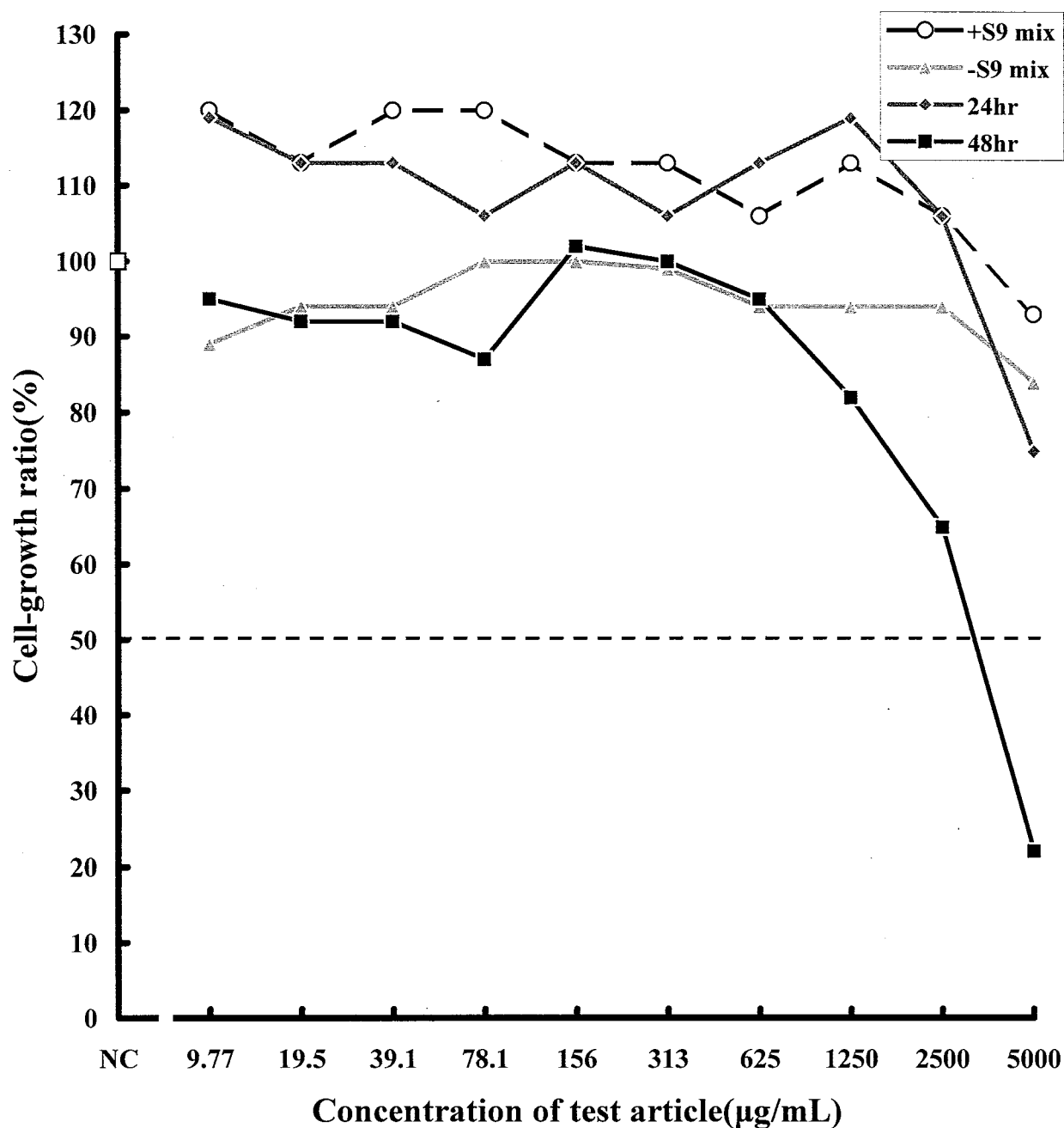
g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

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

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

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

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.



Appendix 1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

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

Appendix 2-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test										
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
								1)	2)	
+	6-18	Test article	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
					87		-	-	-	-
			9.77	112	120	-	-	+	+	
				112		-	-	+	+	
			19.5	112	113	-	-	+	+	
				99		-	-	+	+	
			39.1	112	120	-	-	+	+	
				112		-	-	+	+	
			78.1	112	120	-	-	+	+	
				112		-	-	+	+	
			156	99	113	-	-	+	+	
				112		-	-	+	+	
			313	99	113	-	-	+	+	
				112		-	-	+	+	
			625	99	106	-	-	+	+	
				99		-	-	+	+	
			1250	99	113	-	-	+	+	
				112		-	-	+	+	
			2500	99	106	-	-	+	+	
				99		-	-	+	+	
			5000	87	93	-	-	+	+	
				87		-	-	+	+	
Concentration of 50% cell-growth inhibition : above 5000 µg/mL										

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

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

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 2-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Short-term treatment:-S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)	
-	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	9.77	99	89	-	-	+	+
				79		-	-	+	+
			19.5	89	94	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			39.1	99	94	-	-	+	+
				89		-	-	+	+
			78.1	89	100	-	-	+	+
				110		-	-	+	+
			156	89	100	-	-	+	+
				110		-	-	+	+
		313	99	99	-	-	+	+	
			99		-	-	+	+	
		625	99	94	-	-	+	+	
			89		-	-	+	+	
		1250	99	94	-	-	+	+	
			89		-	-	+	+	
		2500	99	94	-	-	+	+	
			89		-	-	+	+	
		5000	89	84	-	-	+	+	
			79		-	-	+	+	
Concentration of 50% cell-growth inhibition : above 5000 µg/mL									

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

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

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 2-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)	
-	24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	9.77	125	119	-	-	+	+
				112		-	-	+	+
			19.5	112	113	-	-	+	+
				112		-	-	+	+
			39.1	125	113	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			78.1	112	106	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			156	112	113	-	-	+	+
				112		-	-	+	+
		313	112	106	-	-	+	+	
			99		-	-	+	+	
		625	112	113	-	-	+	+	
			112		-	-	+	+	
		1250	112	119	-	-	+	+	
			125		-	-	+	+	
		2500	112	106	+	-	+	+	
			99		+	-	+	+	
		5000	75	75	++	-	+	+	
			75		++	-	+	+	
Concentration of 50% cell-growth inhibition : above 5000 µg/mL									

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

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

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

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

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 2-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			104		-	-	-	-	
		Test article	9.77	100	95	-	-	+	+
				94		-	-	+	+
			19.5	94	92	-	-	+	+
				94		-	-	+	+
			39.1	94	92	-	-	+	+
				94		-	-	+	+
			78.1	89	87	-	-	+	+
				89		-	-	+	+
			156	104	102	-	-	+	+
				104		-	-	+	+
		313	100	100	-	-	+	+	
			104		-	-	+	+	
		625	94	95	-	-	+	+	
			100		-	-	+	+	
		1250	84	82	+	-	+	+	
			84		+	-	+	+	
		2500	64	65	++	-	+	+	
			69		++	-	+	+	
		5000	20	22	+++	-	+	+	
			24		+++	-	+	+	
Concentration of 50% cell-growth inhibition : 3372 µg/mL									

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

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

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

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

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

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 3-1

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)			Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}	
							1)
+	6-18	0 (NC)		-	-	-	-
				-	-	-	-
		Test article	1250	-	-	+	+
				-	-	+	+
			2500	-	-	+	+
				-	-	+	+
		5000	-	-	+	+	
			-	-	+	+	
		PC		-	-	-	-
				-	-	-	-

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

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

a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

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

c) - : No changes of color

d) - : Absence of precipitates

 + : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 3-2

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Short-term treatment: -S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)			Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}	
						1)	2)
-	6-18	0 (NC)		-	-	-	-
				-	-	-	-
		Test article	1250	-	-	+	+
				-	-	+	+
			2500	-	-	+	+
				-	-	+	+
			5000	-	-	+	+
				-	-	+	+
		PC		-	-	-	-
				-	-	-	-

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

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

a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

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

c) - : No changes of color

d) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 3-3

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Continuous treatment : 24hr]

Chromosome aberration test						
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)		Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}	
					1)	2)
-	24-0	0 (NC)	-	-	-	-
			-	-	-	-
		1480	-	-	+	+
			-	-	+	+
		2220	-	-	+	+
			-	-	+	+
		3330	+	-	+	+
			+	-	+	+
		5000	++	-	+	+
			++	-	+	+
		PC	-	-	-	-
			-	-	-	-

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

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

a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

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

c) - : No changes of color

d) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 3-4

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester

[Continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test						
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)		Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}	
					1)	2)
-	48-0	0 (NC)	-	-	-	-
			-	-	-	-
		Test article	-	-	+	+
			-	-	+	+
			+	-	+	+
			+	-	+	+
			++	-	+	+
			++	-	+	+
			+++	-	+	+
			+++	-	+	+
		PC	-	-	-	-
			-	-	-	-

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

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

a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates
 + : Presence of precipitates floating in the medium.

T-G024

信頼性保証書 (1/2)

試験番号 : T-G024

試験表題 : Octadecanoic acid, 1,2-ethanediyl ester のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

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

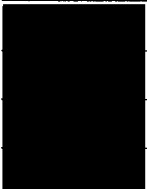
なお、調査は下記の通り実施致しました。

2012 年 3 月 23 日
株式会社ボゾリサーチセンター
信頼性保証部門

試験における調査

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		2011 年 10 月 25 日	2011 年 10 月 25 日
試験計画書変更書 (1)		2011 年 11 月 16 日	2011 年 11 月 17 日
細胞播種		2011 年 11 月 18 日	2011 年 11 月 18 日
調製・保存 (被験物質)、 被験物質の処理		2011 年 11 月 21 日	2011 年 11 月 21 日
染色体標本作製 (固定)		2011 年 11 月 22 日	2011 年 11 月 24 日
染色体標本作製 (染色)		2011 年 11 月 23 日	2011 年 11 月 24 日
染色体標本観察		2011 年 11 月 24 日	2011 年 11 月 24 日
染色体標本観察 (連続処理法)		2011 年 12 月 13 日	2011 年 12 月 13 日
被験物質の安定性測定		2012 年 1 月 6 日	2012 年 1 月 12 日
改善確認		2012 年 1 月 18 日	2012 年 1 月 18 日

信頼性保証書 (2/2)

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
生データ		2012 年 2 月 7 日	2012 年 2 月 8 日
最終報告書草案・図・表・付表		2012 年 2 月 7 日	2012 年 2 月 8 日
生データ（被験物質関係）		2012 年 3 月 22 日	2012 年 3 月 22 日
最終報告書		2012 年 3 月 23 日	2012 年 3 月 23 日

プロセス調査

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		2011 年 10 月 22 日	2011 年 10 月 24 日
陽性対照物質の管理		2011 年 11 月 28 日	2011 年 11 月 29 日