

—最終報告書—

表 題 : ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルのほ乳類培養細胞を用いる  
染色体異常試験

試験番号 : SBL 79-18

当該資料は原本の正式な複写で  
あり、原本と相違ないことを保証い  
たします。

2001 年 3 月 29 日

試験施設 : 株式会社 新日本科学 安全性研究所  
鹿児島県鹿児島郡吉田町宮之浦 2438 番地 (〒891-1394)  
電話 (099) 294-2600, ファクシミリ (099) 294-3619

## 最終報告書の作成

表 題: ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルのほ乳類培養細胞を用いる  
染色体異常試験

試験番号: SBL 79-18

本試験の最終報告書は, 私の責任の下に作成しました.

署 名



2001年 3月29日

## 陳 述 書

表 題 : ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルのほ乳類培養細胞を用いる  
染色体異常試験

試験番号: SBL 79-18

本試験は、OECD Principles of Good Laboratory Practice (revision in 1997)および OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (Updated Guideline 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, adopted 21st July 1997)に準拠して実施し、また、本試験の最終報告書は試験の方法を正確に記載し、生データを正確に反映したものに相違ありません。

試験責任者

(所 属) 株式会社 新日本科学 安全性研究所

署 名

# QAU 陳述書

表 題 : ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルのほ乳類培養細胞を用いる  
染色体異常試験

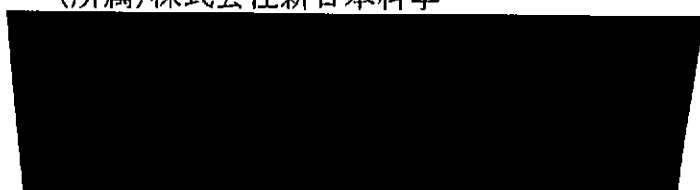
試験番号 : SBL 79-18

本試験は、OECD Principles of Good Laboratory Practice (revision in 1997)および OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (Updated Guideline 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, adopted 21st July 1997)に準拠して実施され、また、本試験の最終報告書は試験の方法を正確に記載し、生データを正確に反映したものに相違ありません。

査察項目	査察実施日	試験責任者 への報告日	運営管理者 への報告日
試験計画書	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日
試験スケジュール	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日
試験計画書変更確認書 (No. 1)	2001 年 1 月 25 日	2001 年 1 月 25 日	2001 年 1 月 29 日
被験物質保管状態	2001 年 1 月 29 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
被験物質溶液の調製	2001 年 1 月 29 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
被験物質溶液の濃度測定	2001 年 1 月 29 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
投与	2001 年 1 月 29 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
標本の作製	2001 年 1 月 30 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
染色体異常の観察	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
試験計画書変更確認書 (No. 2)	2001 年 2 月 23 日	2001 年 2 月 23 日	2001 年 2 月 26 日
試験計画書変更確認書 (No. 3)	2001 年 3 月 2 日	2001 年 3 月 2 日	2001 年 3 月 5 日
書類・生データ	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 9 日
最終報告書草案	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 9 日
最終報告書草案	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 9 日
最終報告書	2001 年 3 月 29 日	2001 年 3 月 29 日	2001 年 3 月 29 日

QAU 責任者

(所属) 株式会社新日本科学



2001 年 3 月 29 日

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

試験責任者, その他試験に従事した研究者全員の氏名および業務分担

・試験責任者

〒891-1394 鹿児島県鹿児島郡吉田町宮之浦 2438 番地

・最終報告書の作成

〒891-1394 鹿児島県鹿児島郡吉田町宮之浦 2438 番地

・被験物質溶液の調製

・被験物質溶液の分析

・染色体異常試験実施者

・統計解析

・試験物質管理責任者

記録・資料および標本の保管場所

株式会社新日本科学内のデータ資料室(記録・資料)および器官保管室(標本)

## 目 次

	頁
要 約	1
緒 言	2
材料および方法	3
1. 被験物質	3
2. 被験物質の調製法	3
3. 対照物質	4
4. 使用細胞	4
5. 培養液	4
6. S 9 Mix の調製	4
7. 培養条件	5
8. 試験条件	5
9. 用量設定の根拠	5
10. 染色体異常試験	6
1) 短時間処理法	6
2) 連続処理法	7
11. 染色体異常の観察と結果の表示	7
12. 統計学的手法	7
13. 結果の判定	8
14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 および試験計画書に従わなかったこと	8
結 果	9
1. 短時間処理法	9
2. 連続処理法	9
考 察	11
文 献	12
表 1, 2	
図 1, 2	
別紙 1, 2	

## 要 約

ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの染色体異常誘発性を哺乳類培養細胞 (CHL/IU) を用いて評価した。用量は、短時間処理法で 70.7, 100, 141.4, 200, 282.8, 400  $\mu\text{g/mL}$ , 連続処理法で 50, 70.7, 100, 141.4, 200, 282.8  $\mu\text{g/mL}$  の 6 用量とし、染色体の構造異常および数的異常を調べた。

染色体異常試験の結果、いずれの被験物質処理群においても、代謝活性化系の有無および処理時間の長短にかかわらず陰性対照と比較して、染色体の構造異常および数的異常を有する細胞の有意な増加はみられなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルは代謝活性化系の有無および処理時間の長短にかかわらず CHL/IU 細胞に対して染色体異常誘発性を示さないと結論した。

## 緒 言

本試験の目的は、ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を評価することである。本試験は、OECD Principles of Good Laboratory Practice (revision in 1997)および OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (Updated Guideline 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, adopted 21st July 1997)に準拠して実施した。

試験開始日:2000 年 12 月 6 日

実験開始日:2001 年 1 月 23 日

実験終了日:2001 年 2 月 9 日

試験終了日:2001 年 3 月 29 日

試験委託者:経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター  
化学物質安全管理センター

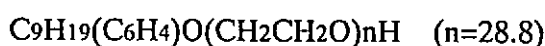
〒151-0066 東京都渋谷区西原 2-49-10



## 材料および方法

## 1. 被験物質

被験物質は、経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター 化学物質安全管理センターから2000年9月25日に提供を受けたポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテル(ロット [REDACTED] を使用した。ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルは、分子量 1488, 純度 100 wt%, 融点 29.0°Cの白色固体で、下記に示す示性式を有している。被験物質は、水およびイソプロパノールに可溶である。被験物質の安定性は、実験終了後に株式会社新日本科学で純度を測定し、安定性を確認した(Stability of the Test Article, Certificate No.:790210-3, 別紙1)。被験物質は株式会社新日本科学試験物質保管所内の温度 20±4°Cに設定した常温室[受領日～最終調製日(2000年9月25日～2001年1月29日):温度 18.5～23.9°C]に遮光下で密封容器内で保存した。なお、残余被験物質は、SBL79-02での保存用被験物質(約1g)を除き、全て試験委託者に返却した。



ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの示性式

## 2. 被験物質の調製法

溶媒は、注射用水(ロット番号:0J86, 株式会社大塚製薬工場)を使用した。被験物質を注射用水に溶解し、最高濃度溶液(4.4 mg/mL)を調製し、以下注射用水で順次希釈により各濃度溶液を調製した。なお、調製は用時に行った。ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの0.1および200 mg/mL濃度の調製液は、室温、遮光下で7日間の安定性があることが株式会社新日本科学で確認されている(Stability of the Test Article in the Dosing Preparation, Certificate No.:790210-2, 別紙2)。また、本試験の最高および最低濃度である4.4および0.55 mg/mL調製液について、被験物質濃度を株式会社新日本科学においてHPLCを用いて測定した結果、表示濃度の±5%の範囲内であったことを確認した(Concentration of the Test Article in the Dosing Preparation, Certificate No.:7918-1, 別紙3)。

### 3. 対照物質<sup>1)</sup>

陰性対照は、注射用水を使用した。陽性対照は、短時間処理法の代謝活性化法によらない場合、連続処理法の 24 および 48 時間処理試験ではマイトマイシン C(MMC, ロット番号: ELQ2964, 生化学用, 和光純薬工業株式会社)を局方生理食塩液(ロット番号: 0J73, 株式会社大塚製薬工場)で所定の濃度に溶解後、少量ずつ分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存したものを、また、短時間処理法の代謝活性化法による場合ではベンゾ(a)ピレン[B(a)P, ロット番号: TPF7787, 純度 98%, 特級, 和光純薬工業株式会社]をジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号: 129H0068, 99.5%以上, GC 分析用, シグマアルドリッチジャパン株式会社)で所定の濃度に溶解後、少量ずつ分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存したものを用時に解凍して使用した。

### 4. 使用細胞

新生チャイニーズ・ハムスターの雌肺由来線維芽細胞株である CHL/IU 細胞(細胞倍加時間 15.1 時間, 染色体数 25 本, 継代数 14, mycoplasma free)を大日本製薬株式会社ラボラトリープロダクツ部から 2000 年 9 月 19 日に入手し、継代培養(継代数 15)後、細胞懸濁液をサンプルストックチューブに 1.0 mL ずつ分注し、 $-80^{\circ}\text{C}$ の超低温フリーザー(MDF-290AT, サンヨー電機特機株式会社)中で凍結保存したものを用時に解凍して使用した。

### 5. 培養液

イーグル MEM 粉末(ロット番号: 1077941, GIBCO BRL)9.5 g を蒸留水で溶解し、 $\text{NaHCO}_3$  2.2 g を加え、0.1 N HCl で pH 7.2 に調整した後、全量を 1000 mL とした。その後、 $0.22\ \mu\text{m}$  ボトルトップフィルターで 900 mL を濾過滅菌し、 $56^{\circ}\text{C}$ で 30 分間非働化处理した仔牛血清(CS, ロット番号: 1026097, GIBCO BRL)を 100 mL 加えて 10%CS-MEM 液を調製した。

### 6. S 9 Mix の調製

S 9 Mix は次頁に示した表の組成に用時調製した。なお、S 9 は、薬物代謝酵素系の誘導剤としてフェノバルビタールおよび 5, 6 - ベンゾフラボンを経口投与した雄性ラット(Slc:SD 系, 7 週齢, 体重 213~252 g)の肝臓より 2000 年 11 月 10 日に調製した市販の S 9(ロット番号: RAA-435, キッコーマン株式会社)を使用した。

[S 9 Mix 10 mL あたりの組成]	添加量
S 9	3.0 mL
20mM HEPES 緩衝液 (pH7.2)	2.0 mL
50mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0 mL
330mM KCl	1.0 mL
G-6-P (ロット番号:115002, オリエンタル酵母工業株式会社)	17.0 mg
NADP (ロット番号:040008, オリエンタル酵母工業株式会社)	33.5 mg
蒸留水	3.0 mL

G-6-P: D-Glucose 6-phosphate, disodium salt

NADP:  $\beta$ -Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidized form

調製方法は、G-6-P および NADP を蒸留水に溶解し、20 mM HEPES 緩衝液、50 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O および 330 mM KCl を加え補酵素溶液とした。補酵素溶液を 0.22  $\mu$ m シリンジフィルターで濾過滅菌した後、S 9 を加え S 9 Mix とした。

## 7. 培養条件

細胞の培養は、温度 37°C, CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 加湿条件下に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター内で行った。なお、培養器は、細胞の前培養は 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ (Corning), 6 cm プラスチックシャーレ (Corning) をそれぞれ用いた。

## 8. 試験条件

試験は祖父尼らの方法<sup>1)</sup>および OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (Updated Guideline 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, adopted 21st July 1997) に従い、短時間処理法と連続処理法で行った。培養液 1 mL あたりの添加量は、被験物質溶液、溶媒および陽性対照の MMC は 0.1 mL (10%), 陽性対照の B(a)P は 0.005 mL (0.5%) とした。

## 9. 用量設定の根拠

染色体異常試験における被験物質の用量設定のために、先に株式会社新日本科学で実施した用量設定試験 (試験番号: SBL79-15, 用量: 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000  $\mu$ g/mL) において、細胞毒性を指標とした細胞増殖抑制試験<sup>2), 3)</sup>を行った。その結果、50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法の代謝活性化法によらない場合で 357  $\mu$ g/mL, 代謝活性化法による場合で 348  $\mu$ g/mL, 連続処理法の 24 時間処理試験で 244  $\mu$ g/mL, 48 時間処理試験で 237  $\mu$ g/mL と推定した<sup>4)</sup>。従って、染色体異常試験の用量は 50%細胞増殖抑制濃度を指標とし、公比 $\sqrt{2}$ で以下の 6 段階を設定することとした。

短時間処理法: 70.7, 100, 141.4, 200, 282.8, 400  $\mu\text{g/mL}$

連続処理法: 50, 70.7, 100, 141.4, 200, 282.8  $\mu\text{g/mL}$

#### 10. 染色体異常試験<sup>2), 3)</sup>

染色体異常試験の群構成は、陰性対照群(注射用水処理群)、被験物質処理群および陽性対照群とした。

凍結保存しておいたサンプルストックチューブ入りの細胞懸濁液をすばやく解凍し、約 5 mL の培養液に懸濁させ、培養フラスコで 72 時間培養した。培養終了後、0.25%トリプシン液で細胞をはがし、培養液で  $1 \times 10^4$  個/mL の細胞懸濁液を調製した。1 群あたり 2 枚の 6 cm プラスチックシャーレに 5 mL ずつ播種し、72 時間培養して次の操作を行った。

##### 1) 短時間処理法<sup>5), 6)</sup>

培養開始 72 時間後に各シャーレから培養液を 2.5 mL ずつ除去した後、代謝活性化法によらない場合は培養液 0.5 mL を、また、代謝活性化法による場合は S 9 Mix 0.5 mL (S 9 の最終濃度 5%) を加えた。これに被験物質溶液あるいは陰性対照液を 0.3 mL、または陽性対照液 [B(a)P: 0.015 mL 最終濃度 20  $\mu\text{g/mL}$ , MMC: 0.3 mL 最終濃度 0.15  $\mu\text{g/mL}$ ] を加えて 6 時間培養した。その後、試験物質を含む培養液を捨て、生理食塩液で 1 回細胞を洗浄し、新鮮な培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。培養終了 2 時間前に 0.1  $\mu\text{g/mL}$  (最終濃度) のコルセミド (ロット番号: 1081687, GIBCO BRL) を各シャーレに添加後、さらに、それぞれ 2 時間培養した。

培養終了後、0.25%トリプシン溶液 (37°C) で細胞を剥離した。細胞懸濁液 10  $\mu\text{L}$  に 0.4%トリパンブルー 10  $\mu\text{L}$  を添加し、生細胞数を測定した。その後、遠心分離 (1000 r.p.m., 5 分間) して上清を除き、0.075 M KCl 溶液 (37°C) 5 mL を加え、37°C の温水中で 30 分間低張処理した。次に冷却したカルノア固定液 (メタノール: 氷酢酸 = 3:1 の混合液) を 0.5 mL 加えて半固定した後、遠心分離 (1000 r.p.m., 5 分間) し、上清を除き約 4 mL の固定液を加え、遠心分離を行った。この固定—遠心—上清除去の操作を 3 回行い、固定液で適当な懸濁状態の細胞浮遊液を作製し、清浄なスライドガラス上に固定した細胞浮遊液を 2 滴ずつ滴下した。標本は室内で乾燥し、3.0%ギムザ染色液 (Merck, pH 6.8) で 15 分間染色後、水洗・乾燥させた。

## 2) 連続処理法

培養開始 72 時間後に、被験物質溶液あるいは陰性対照液を 0.5 mL, または陽性対照液 (MMC: 最終濃度 0.05  $\mu\text{g/mL}$ ) を 0.5 mL 加え, 24 あるいは 48 時間培養した. 培養終了 2 時間前に 0.1  $\mu\text{g/mL}$  (最終濃度) のコルセミドを加え, 以下短時間処理法と同様の操作によりスライド標本を作製した.

## 11. 染色体異常の観察と結果の表示

盲検法によりコード化したスライド標本 1 枚あたり 100 個の染色体中期分裂像を最終倍率 600 倍で観察した. 染色体の異常は, 染色体数  $25 \pm 2$  の細胞を観察対象とし, 構造異常と数的異常を記録した. 構造異常については, 染色体異常アトラス<sup>7)</sup>に準じて, 染色分体切断 (chromatid break: ctb), 染色分体交換 (chromatid exchange: cte), 染色体切断 (chromosome break: csb), 染色体交換 (chromosome exchange: cse), その他 (others: o) に分類した. 染色体間交換 (三放射状, 四放射状) および染色体内交換 (環状染色分体) は染色分体交換に, 二動原体と環状染色体は染色体交換に含めて分類することとした. 中期分裂像中に多数のギャップ (chromatid gap and chromosome gap: gap) あるいは切断がみられる場合は断片化 (fragmentation: frg) とし, 10 個以上の切断や交換がみられた場合は多種多様な異常 (multiple aberration: mul) としてその他 (o) に分類することとした. 1 個の細胞に 2 か所以上の異常がみられた場合, それぞれ 1 個の異常細胞として計測した. また, ギャップは他の異常と区別して記録したが, 構造異常には含めなかった. ギャップと切断の判定基準は, ギャップは, 染色分体幅よりも狭い非染色部位とし, 切断は, 染色分体幅よりも広い非染色部位と定義した. 数的異常については, 38 本以上の染色体数を有するものを倍数体 (polyploidy: poly) とし, 核内倍加 (endoreduplication: endo) と分けて記録した.

## 12. 統計学的手法<sup>8)</sup>

染色体異常細胞の出現頻度について, 陰性対照群と各被験物質処理群との間でカイ 2 乗検定 (片側,  $p < 0.05$ ) を行った.

### 13. 結果の判定

染色体異常細胞の出現頻度について、陰性対照群と比較し、被験物質処理群で有意な増加がみられ、用量依存性または再現性が認められた場合に陽性と判定し、それ以外の場合は陰性と判定することとした。

### 14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因および試験計画書に従わなかったこと

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因および試験計画書に従わなかったことはなかった。

## 結 果

染色体異常試験における短時間処理法の成績を表1に、連続処理法の成績を表2に示した。また、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度について図1, 2に用量-反応曲線を示した。

### 1. 短時間処理法

用量は、代謝活性化法によらない場合、代謝活性化法による場合ともに70.7, 100, 141.4, 200, 282.8, 400  $\mu\text{g/mL}$ とした。

構造異常細胞の出現頻度は、代謝活性化法によらない場合で0.0~2.0%, 代謝活性化法による場合で0.0~1.0%であり、陰性対照(それぞれ0.5%)との間に有意差はみられなかった。数的異常細胞の出現頻度についても、代謝活性化法によらない場合、代謝活性化法による場合ともに0.0~1.5%であり、陰性対照(それぞれ1.0%)との間に有意差はみられなかった。

生細胞数を指標として求めた細胞増殖率は、代謝活性化法によらない場合の400  $\mu\text{g/mL}$ で39.5%, 代謝活性化法による場合の400  $\mu\text{g/mL}$ で41.5%であり、いずれも細胞毒性がみられた。

陽性対照として用いたMMC 0.15  $\mu\text{g/mL}$ 処理群(代謝活性化法によらない場合)の構造異常細胞の出現頻度は25.5%, B(a)P 20  $\mu\text{g/mL}$ 処理群(代謝活性化法による場合)の構造異常細胞の出現頻度は25.5%と高値を示した。数的異常細胞の出現頻度は、代謝活性化法によらない場合、代謝活性化法による場合ともに0.0%であった。

### 2. 連続処理法

用量は、24 および 48 時間処理試験ともに50, 70.7, 100, 141.4, 200, 282.8  $\mu\text{g/mL}$ とした。

構造異常細胞の出現頻度は、24 時間処理試験で0.0~1.0%, 48 時間処理試験で0.5~1.5%であり、陰性対照(それぞれ0.5%)との間に有意差はみられなかった。数的異常細胞の出現頻度についても、24 時間処理試験で0.0~1.5%, 48 時間処理試験で0.5~1.5%であり、陰性対照(それぞれ0.5%)との間に有意差はみられなかった。

生細胞数を指標として求めた細胞増殖率は、24 時間処理試験の 282.8  $\mu\text{g/mL}$  で 41.9%, 48 時間処理試験の 200  $\mu\text{g/mL}$  で 54.7%であり、いずれも細胞毒性がみられた。

なお、48 時間処理試験の 282.8  $\mu\text{g/mL}$  では、細胞毒性のため中期分裂像が観察されなかった。

陽性対照として用いた MMC 0.05  $\mu\text{g/mL}$  処理群の構造異常細胞の出現頻度は 24 時間処理試験では 20.0%, 48 時間処理試験では 28.5%と高値を示した。また、数的異常細胞の出現頻度は、24 および 48 時間処理試験ともに 0.5%であった。



## 考 察

ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの染色体異常誘発性を哺乳類培養細胞 (CHL/IU)を用いて評価した。用量は、短時間処理法の代謝活性化法によらない場合、代謝活性化法による場合で 70.7, 100, 141.4, 200, 282.8, 400  $\mu\text{g/mL}$ , 連続処理法の 24 および 48 時間処理試験で 50, 70.7, 100, 141.4, 200, 282.8  $\mu\text{g/mL}$  の 6 用量とし、染色体の構造異常および数的異常を調べた。

ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルのいずれの処理群においても、代謝活性化系の有無および処理時間の長短にかかわらず陰性対照と比較して、細胞毒性がみられる用量においても染色体の構造異常および数的異常を有する細胞の有意な増加はみられなかったことから、ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判断した。

なお、いずれの試験系列においても、陰性対照および陽性対照の染色体異常細胞の出現頻度は背景データ<sup>9)</sup>の範囲内にあったことから、試験が適切な条件で実施されたものと判断した。

以上の結果から、本試験条件下では、ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルは代謝活性化系の有無および処理時間の長短にかかわらず CHL/IU 細胞に対して染色体異常誘発性を示さないと結論した。

## 文 献

- 1 祖父尼俊雄監修「染色体異常試験データ集」, 改訂 1998 年版, LIC, 1999
- 2 祖父尼俊雄: 染色体異常試験, 細胞トキシコロジー試験法(日本組織培養学会編), p.199～209, 朝倉書店, 東京, 1991
- 3 石館基(責任編集): 毒性試験講座, 第 12 巻, 変異原性・遺伝毒性, p.79～87, 地人書館, 東京, 1991
- 4 ベンゾニトリル, N, N-ジエチルヒドロキシアミン, ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(予備試験), 株式会社新日本科学社内資料
- 5 A.Matuoka, M.Hayashi and M. Ishidate Jr.: Chromosomal aberration test on 29 chemicals combined with S 9 mix in vitro., Mutation Res., 66, 277-290, 1979
- 6 祖父尼俊雄, 松岡厚子: 染色体異常誘発試験における代謝活性化法について, 変異原研究, 5(2), p.4～6, 1983
- 7 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編: 化学物質による染色体異常アトラス, p.16～147, 朝倉書店, 東京, 1988
- 8 吉村功, 大橋靖雄(責任編集): 毒性試験講座, 第 14 巻, 毒性試験データの統計解析, p.147～166, 地人書館, 東京, 1992
- 9 染色体異常試験—対照群背景データ(1995～2000 年), 株式会社新日本科学社内資料

表1 染色体異常試験結果(短時間処理法)

SBL79-18

被験物質の名称: ポリオキシエチレンp-ノニルフェニルエーテル

処理時間 (h)	S9 Mix	被験物質の用量 ( $\mu$ g/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度 %)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 #	染色体数異常の細胞数 (出現頻度 %)			
			観察細胞数	染色体分断	染色体分断交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍染色体	核内倍加	総異常細胞数
6-18	-	陰性対照 [注射用水]	100	0	0	0	0	0	0	1	100	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	1	0	1
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	-	70.7	100	1	0	0	0	0	1	1	100.6	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	-	100	100	0	0	0	0	0	0	1	96.0	100	1	1	2
			100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	1	1	2 ( 1.0 )
6-18	-	141.4	100	1	0	0	0	0	1	0	93.8	100	1	0	1
			100	0	0	1	0	0	1	0		100	1	0	1
			200	1	0	1	0	0	2 ( 1.0 )	0		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	-	200	100	0	0	0	0	0	0	0	88.7	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	2	0	2
			200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	-	282.8	100	1	0	0	0	0	1	0	67.2	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	0		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	-	400	100	1	0	1	0	0	2	0	39.5	100	1	0	1
			100	2	0	0	0	0	2	0		100	1	1	2
			200	3	0	1	0	0	4 ( 2.0 )	0		200	2	1	3 ( 1.5 )
6-18	-	陽性対照 [MMC] 0.15	100	9	20	0	0	0	25	0	62.1	100	0	0	0
			100	9	22	0	0	0	26	0		100	0	0	0
			200	18	42	0	0	0	51 ( 25.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	陰性対照 [注射用水]	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	1		100	1	0	1
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	+	70.7	100	0	0	1	0	0	1	0	96.8	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
			200	0	0	1	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	+	100	100	0	1	0	0	0	1	0	97.6	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1 ( 0.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	141.4	100	1	0	0	0	0	1	0	94.1	100	1	0	1
			100	0	1	0	0	0	1	1		100	1	0	1
			200	1	1	0	0	0	2 ( 1.0 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	+	200	100	0	0	0	0	0	0	0	95.3	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	1		100	2	0	2
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	3	0	3 ( 1.5 )
6-18	+	282.8	100	0	0	0	0	0	0	0	68.4	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
			200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
6-18	+	400	100	0	0	1	0	0	1	0	41.5	100	2	0	2
			100	0	0	0	1	0	1	0		100	1	0	1
			200	0	0	1	1	0	2 ( 1.0 )	0		200	3	0	3 ( 1.5 )
6-18	+	陽性対照 [B(a)P] 20	100	2	23	0	0	0	24	0	61.3	100	0	0	0
			100	4	23	0	0	0	27	0		100	0	0	0
			200	6	46	0	0	0	51 ( 25.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )

備考: S9の最終濃度5%, ギャップには染色体分断と染色体型の両方を含める。処理時間の欄は、処理時間一回復時間を記入。

各群のプレートごとのデータを1および2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。#: 生細胞の割合%

MMC: マイトマイシンC, B(a)P: ベンゾ(a)ピレン, - S9 Mix: 代謝活性化法によらない場合 + S9 Mix: 代謝活性化法による場合

統計処理結果および判定: 陰性対照と各被験物質処理群との間でカイ2乗検定 ( $p < 0.05$ )

を行った結果、いずれの被験物質処理群においても有意差が認められなかったため、

陰性と判定した。試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

表2 染色体異常試験結果(連続処理法)

SBL79-18

被験物質の名称: ポリオキシエチレンp-ノニルフェニルエーテル

処理時間 (h)	被験物質の用量 ( $\mu$ g/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度 %)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 #	染色体数異常の細胞数 (出現頻度 %)			
		観察細胞数	染色体分断	染色体分断交換	染色体分断	染色体分断交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍染色体	核内倍加	総異常細胞数
24 - 0	陰性対照 (注射用水)	100	0	0	0	0	0	0	1	100	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	1	0	1
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
24 - 0	50	100	0	0	0	0	0	0	0	96.3	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
24 - 0	70.7	100	0	1	0	0	0	1	1	91.9	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	1	0	1
		200	1	1	0	0	0	2 ( 1.0 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
24 - 0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	83.1	100	0	0	0
		100	2	0	0	0	0	2	0		100	1	0	1
		200	2	0	0	0	0	2 ( 1.0 )	0		200	1	0	1 ( 0.5 )
24 - 0	141.4	100	0	0	0	0	0	0	1	74.4	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
24 - 0	200	100	1	0	0	0	0	1	1	59.4	100	2	0	2
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	3	0	3 ( 1.5 )
24 - 0	282.8	100	1	0	0	0	0	1	1	41.9	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	2	0	2
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	3	0	3 ( 1.5 )
24 - 0	陽性対照 [MMC] 0.05	100	9	16	0	0	0	21	0	63.8	100	0	0	0
		100	7	14	0	0	0	19	0		100	1	0	1
		200	16	30	0	0	0	40 ( 20.0 )	0		200	1	0	1 ( 0.5 )
48 - 0	陰性対照 (注射用水)	100	1	0	0	0	0	1	1	100	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
48 - 0	50	100	0	0	0	1	0	1	0	101.9	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0		200	1	0	1 ( 0.5 )
48 - 0	70.7	100	2	0	0	0	0	2	0	91.0	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	1		100	1	0	1
		200	2	1	0	0	0	3 ( 1.5 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
48 - 0	100	100	0	0	0	0	0	0	1	89.2	100	0	1	1
		100	1	0	0	0	0	1	1		100	0	0	0
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	2		200	0	1	1 ( 0.5 )
48 - 0	141.4	100	0	0	1	0	0	1	0	74.1	100	2	0	2
		100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
		200	0	0	1	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	3	0	3 ( 1.5 )
48 - 0	200	100	0	1	0	0	0	1	0	54.7	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	1		100	1	0	1
		200	1	1	0	0	0	2 ( 1.0 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
48 - 0	282.8	TOX	—	—	—	—	—	—	—	31.1	TOX	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	— ( — )	—		—	—	—	— ( — )
48 - 0	陽性対照 [MMC] 0.05	100	11	22	0	0	0	29	0	56.6	100	0	0	0
		100	7	24	0	0	0	28	0		100	1	0	1
		200	18	46	0	0	0	57 ( 28.5 )	0		200	1	0	1 ( 0.5 )

備考: ギャップには染色体分断と染色体型の両方を含める。処理時間の欄は、処理時間一回復時間を記入。  
各群のプレートごとのデータを1および2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。#: 生細胞の割合%  
MMC: マイトマイシンC, TOX: 細胞毒性により中期分裂像が観察されなかった用量

統計処理結果および判定: 陰性対照と各被験物質処理群との間でカイ2乗検定 ( $p < 0.05$ )  
を行った結果、いずれの被験物質処理群においても有意差が認められなかったため、  
陰性と判定した。

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

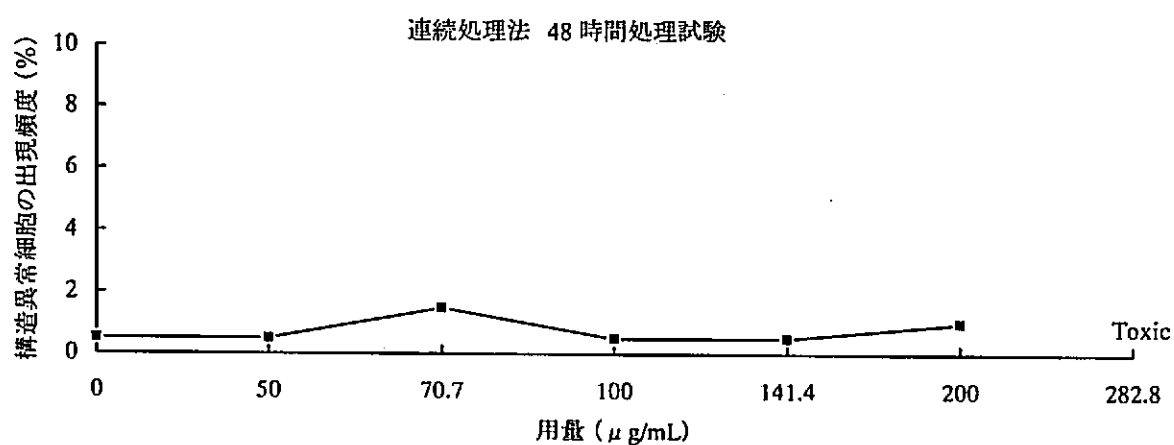
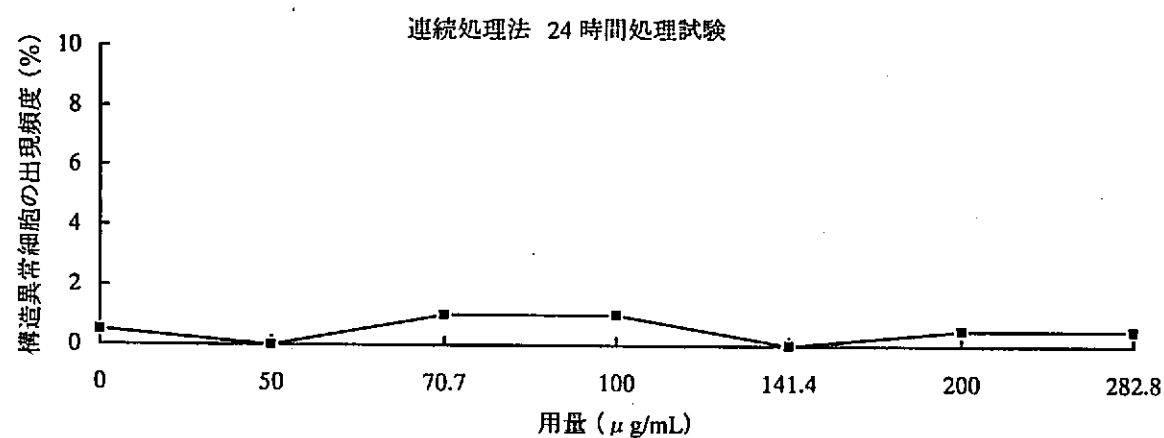
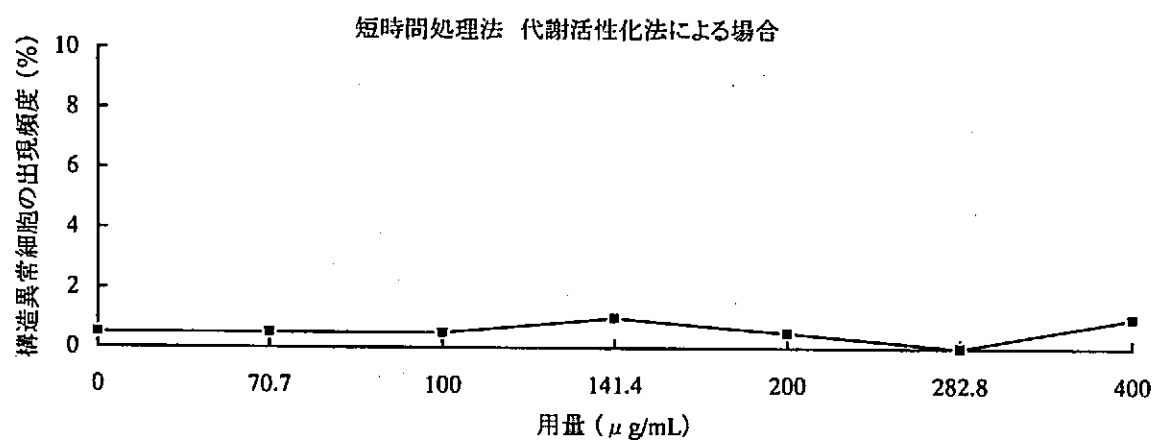
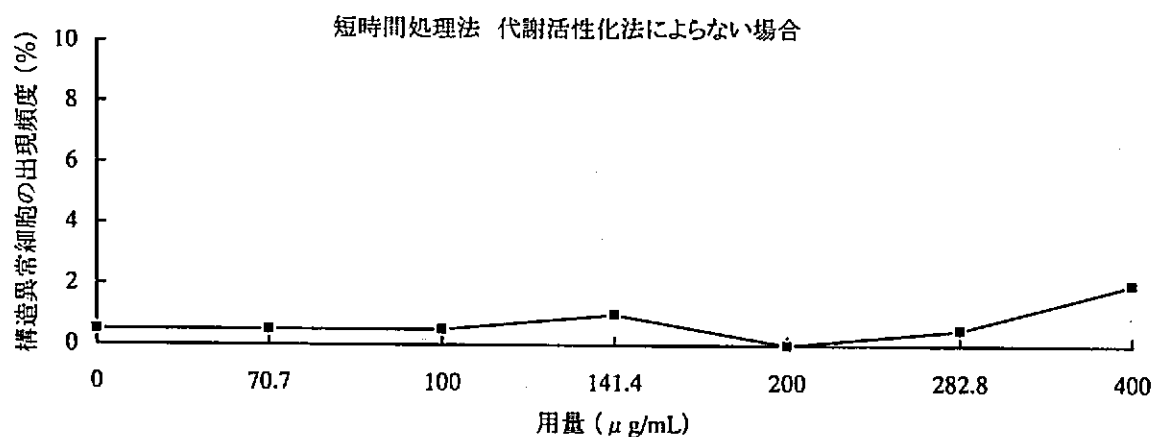


図 1 用量-反応曲線 (構造異常細胞)

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

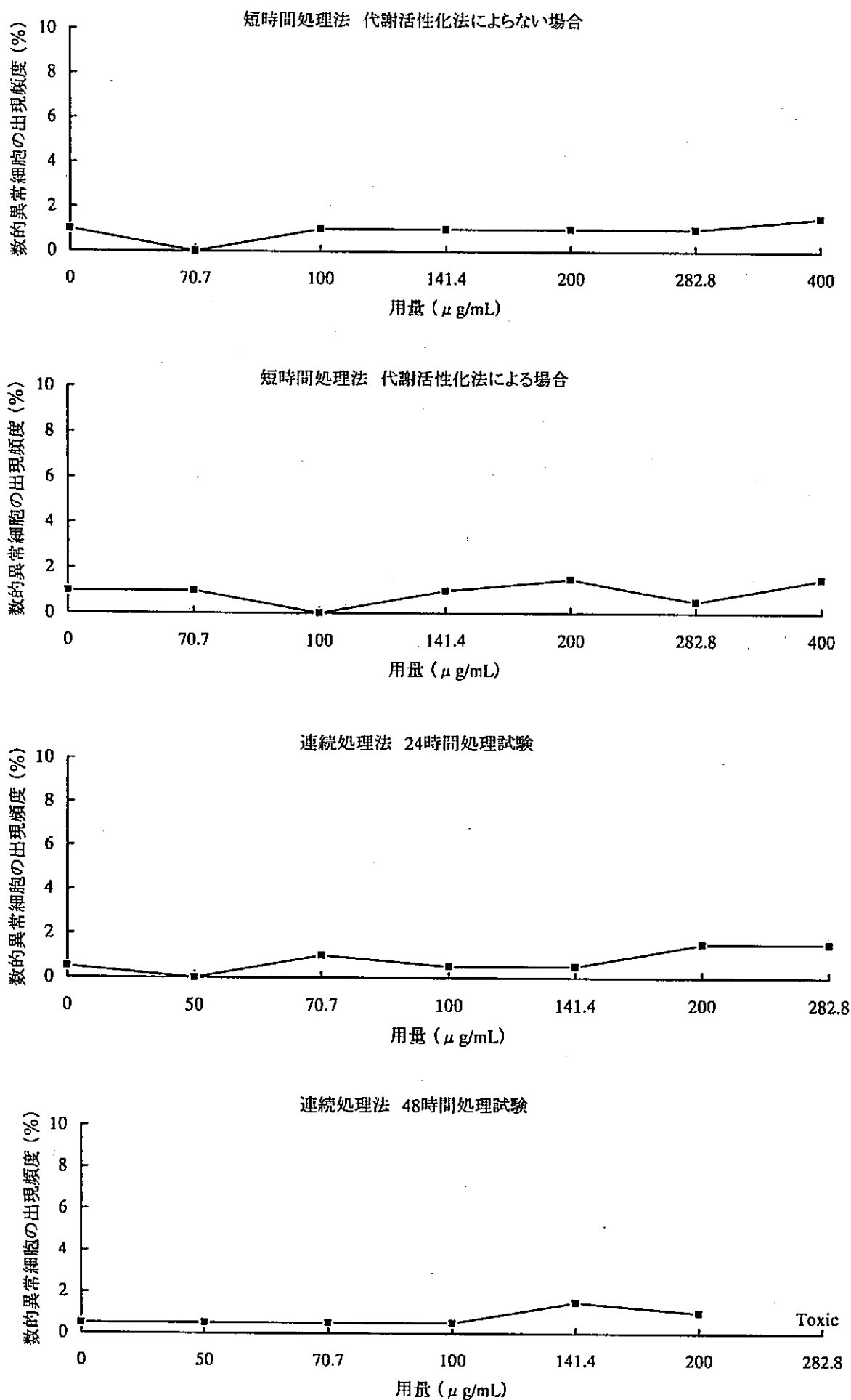


図2 用量-反応曲線 (数的異常細胞)

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

## Stability of the Test Article

## (1) Experimental

Test Article (Lot No.) : Polyoxyethylene *p*-nonylphenyl ether [REDACTED]  
Appearance : White solid  
Sampling Size : 20 mg  
Storage Conditions : Airtight container at room temperature under light protected conditions

## (2) Results

Container	Time Point	Assay * (%)
Glass bottle (amber)	Initial	99.26
	End of Study	99.14

\* % of total area (mean of 2 values).

Dates of analysis : October 10, 2000 and February 9, 2001

Analyst : [REDACTED]

Date : February 13, 2001

Analyst : [REDACTED]

Date : February 13, 2001

Supervisor :  
(Responsible) [REDACTED]

Date : February 22, 2001

## Stability of the Test Article in the Dosing Preparation

## (1) Experimental

Test Article (Lot No.) : Polyoxyethylene *p*-nonylphenyl ether [REDACTED]  
Vehicle : Water for injection  
Form : Solution  
Sampling Size : 2.5 mL

## (2) Results

Storage Conditions		Stability*	
Container	Temperature and Duration	Conc. of Analyte (mg/mL)	
		0.1	200
Glass bottle (amber)	Initial	100.0	100.0
	After 24 hours at room temperature	101.1	97.5
	After 7 days at room temperature	102.4	99.9

Remaining % (mean of 2 values). Acceptable range:  $100 \pm 5\%$ 

Data of analysis : October 10, 2000 - October 17, 2000

Analyst: [REDACTED]

Date: October 18, 2000

Analyst: [REDACTED]

Date: October 18, 2000

Supervisor:  
(Responsible for [REDACTED])

Date: November 6, 2000

(Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.)

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。



## Concentration of the Test Article in the Dosing Preparation

## (1) Experimental

Test Article (Lot No.) : Polyoxyethylene *p*-nonylphenyl ether [REDACTED]  
Vehicle : Water for injection  
Form : Solution  
Sampling Size : 1 mL

## (2) Results

Date of Preparation	Date of Analysis	Target Conc. (mg/mL)	Found Conc. (mg/mL)	Found/Target* (%)
January 29, 2001	January 29, 2001	0.55	0.550	100.0
		4.4	4.448	101.1

Data are the mean values of 2 injections of 1 determination.

\*Acceptable range :  $100 \pm 5\%$ .

Analyst

Date : January 29, 2001


Supervisor  
(Responsible)

Date : February 2, 2001

ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテル  
のは乳類培養細胞を用いる  
染色体異常試験結果報告書

## ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

## 1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	ポリオキシエチレンp-ノニルフェニルエーテル					
別 名	—					
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	$C_9H_{19}(C_6H_4)O(CH_2CH_2O)_nH$ (n=28.8)					
試験に供した新規 化学物質の純度	100 wt%		試験に供した新規 化学物質の Lot No.			
不純物の名称及び濃度	—					
C A S 番 号	9016-45-9		蒸 気 圧	—		
分 子 量	1488		分 配 係 数	—		
融 点	29.0℃		常温における性状	白色固体		
沸 点	—					
安 定 性	常温, 遮光下で安定					
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶解度	溶媒中の安定性	溶 媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	可溶	0.1, 200 mg/mL濃度: 室温, 遮光下で7日間安定	DMSO	—	—
	アセトン	—	—	イソプロパノール	可溶	—

## 2. 細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL／IU	入手先	大日本製薬株式会社	
種	チャイニーズ・ハムスター	入手年月日	平成 12 年 9 月 19 日	
培養液	イーグルのMEM	製造元	Gibco Laboratories	
血清の種類と添加量	仔牛 10 %	製造元 (Lot No.)	Gibco Laboratories (1026097)	
細胞周期	約 15.1 h	凍結条件	－ 80 ℃	
継代数	15(入手時 14 代)	培養 条件	容器	プラスチックシャーレ
染色体数 (モード)	25 本		温度	37 ℃
			CO <sub>2</sub> 濃度	5 %
備考	—			

## 3. S9 Mix

## (1) S9 の入手方法等

自製・購入の別	1. 自製 (2) 購入(製造元キッコーマン株式会社)
製造年月日	2000 年 11 月 10 日製造
購入の場合の Lot No.	RAA-435
保存温度	－ 80 °C

## (2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	SD 系ラット (Slc: SD)	名称	フェノバルビタール (PB) と 5,6-ヘンゾフラボン (BF)
性	雄	投与方法	腹腔内
週令	7 週	投与期間及び投与量 (mg/kg 体重)	1 日目 PB30, 2 日目 PB60, 3 日
体重	213 ~ 252 g		目 PB60+BF80, 4 日目 PB60

## (3) S 9 Mix の組成

成 分	S 9 Mix1mL 中の量	成 分	S 9 Mix1mL 中の量
S 9	0.3 mL	N A D P	4 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ mol	緩衝液 (H E P E S)	4 $\mu$ mol
KCl	33 $\mu$ mol	その他 (蒸留水)	残量
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol	—	—

## (4) S 9 Mix の処理条件

① プレート法	2. 浮遊細胞法	3. その他 ( — )
S 9 量 (最終濃度)	5 %	
S 9 蛋白量 (最終濃度)	1.26 mg/mL	
処理時間	6 h	
回復時間	18 h	
備 考	—	

## 4. 被験物質溶液の調製

使 用 溶 媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グレード	純度(%)
	注射用水	株式会社大塚製薬工場	0J86	—	—
溶媒選択の理由	被験物質が水に可溶であったため。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="radio"/> 溶解 <input type="radio"/> 懸濁 <input type="radio"/> その他(    —    )				
被験物質が難溶性の場合 における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用ま での保存時間と温度	1 時間以内, 約 25 °C				
純度換算の有無	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無				

## 5. 短時間処理法における試験

## (1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
用量設定試験実施期間		平成 12 年 11 月 14 日から 平成 12 年 11 月 23 日	平成 12 年 11 月 14 日から 平成 12 年 11 月 23 日
培養器	形 状 大 き さ 培 養 液 量 用量当たりの培養器数	円形プラスチック製シャーレ 直径 35 mm 2 mL／培養器 2 枚	円形プラスチック製シャーレ 直径 35 mm 2 mL／培養器 2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	1×10 <sup>4</sup> 個／mL	1×10 <sup>4</sup> 個／mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.12 mL／培養器	0.12 mL／培養器
	S 9 Mix 添加量		0.2 mL／培養器
	S 9 の最終濃度		5 %
	S 9 蛋白の最終濃度		1.26 mg／mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
細胞増殖 抑制測定法	培養終了後、培養液を捨て、細胞を生理食塩液で1回洗浄し、10%ホルマリンで 10 分間固定した。 その後、0.1%クリスタルバイオレットで10分間染色し、水洗・乾燥後、モノセレーターで細胞密度を測定した。		
備 考： 染色体異常試験における被験物質の用量設定のために、先に株式会社新日本科学で実施した用量設定試験（試験番号:SBL79-15）の結果を記載した。			

## (2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合(6-18 h)*		代謝活性化法による場合(6-18 h)*	
用量( $\mu$ g/mL)	細胞増殖率(%)	用量( $\mu$ g/mL)	細胞増殖率(%)
0(溶媒)	100	0(溶媒)	100
100	99.0	100	95.0
200	93.0	200	99.0
400	22.5	400	25.0
600	19.0	600	16.0
800	19.0	800	16.0
1000	22.5	1000	16.0

[備考]\*: 処理時間および回復時間を記入.

最高用量: 10 mM



## (3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		平成 13 年 1 月 23 日から 平成 13 年 2 月 9 日	平成 13 年 1 月 23 日から 平成 13 年 2 月 9 日
培養器	形 状 大 き さ 培 養 液 量 用量当たりの培養器数	円形プラスチック製シャーレ 直径 60 mm 5 mL／培養器 2 枚	円形プラスチック製シャーレ 直径 60 mm 5 mL／培養器 2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	$1 \times 10^4$ 個／mL	$1 \times 10^4$ 個／mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.3 mL／培養器	0.3 mL／培養器
	S 9 Mix 添加量		0.5 mL／培養器
	S 9 の最終濃度		5 %
	S 9 蛋白の最終濃度		1.26 mg／mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備 考:なし			

## (4) 染色体異常試験結果(別表 1 による。)

## 6. 連続処理法における試験

## (1) 細胞増殖抑制試験の条件

用量設定試験実施期間		平成 12 年 11 月 14 日から 平成 12 年 11 月 23 日	平成 12 年 11 月 14 日から 平成 12 年 11 月 23 日
培養器	形 状	円形プラスチック製シャーレ	円形プラスチック製シャーレ
	大 き さ	直径 35 mm	直径 35 mm
	培 養 液 量	2 mL／培養器	2 mL／培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	1×10 <sup>4</sup> 個／mL	1×10 <sup>4</sup> 個／mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.2 mL／培養器	0.2 mL／培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
細胞増殖 抑制測定法	培養終了後、培養液を捨て、細胞を生理食塩液で1回洗浄し、10%ホルマリンで 10 分間固定した。 その後、0.1%クリスタルバイオレットで10分間染色し、水洗・乾燥後、モノセレーターで細胞密度を測定した。		
備 考： 染色体異常試験における被験物質の用量設定のために、先に株式会社新日本科学で実施した用量設定試験(試験番号:SBL79-15)の結果を記載した。			

## (2) 細胞増殖抑制試験結果

(24-0 h) * 処理による場合		(48-0 h) * 処理による場合	
用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)	用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100	0 (溶媒)	100
100	74.5	100	91.5
200	64.0	200	57.0
400	0.0	400	10.0
600	0.0	600	7.5
800	0.0	800	7.5
1000	0.0	1000	10.0

[備考]\*: 処理時間および回復時間を記入.

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による.

最高用量: 10 mM

## (3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		平成 13 年 1 月 23 日から 平成 13 年 2 月 9 日	平成 13 年 1 月 23 日から 平成 13 年 2 月 9 日
培養器	形 状	円形プラスチック製シャーレ	円形プラスチック製シャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	5 mL／培養器	5 mL／培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	$1 \times 10^4$ 個／mL	$1 \times 10^4$ 個／mL
	前培養日数	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.5 mL／培養器	0.5 mL／培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
備 考:なし			

## (4) 染色体異常試験結果(別表 2 による.)

## 7. 結果の判定及び参考事項

## (1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと)		陽性				陰性	
判定の理由							
ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルのいずれの処理群においても、代謝活性化系の有無および処理時間の長短にかかわらず陰性対照と比較して、細胞毒性がみられる用量においても染色体の構造異常および数的異常を有する細胞の有意な増加はみられなかったことから、ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判断した。							
D20値	構造異常	短時間処理法	－ S 9 Mix	6－18 h 処理	－ $\mu\text{g/mL}$		
			＋ S 9 Mix	6－18 h 処理	－ $\mu\text{g/mL}$		
		連続処理法		24－0 h 処理	－ $\mu\text{g/mL}$		
				48－0 h 処理	－ $\mu\text{g/mL}$		
	数的異常	短時間処理法	－ S 9 Mix	6－18 h 処理	－ $\mu\text{g/mL}$		
			＋ S 9 Mix	6－18 h 処理	－ $\mu\text{g/mL}$		
		連続処理法		24－0 h 処理	－ $\mu\text{g/mL}$		
				48－0 h 処理	－ $\mu\text{g/mL}$		

【備考】 D20値は分裂中期像 20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判断した試験系列について、異常のタイプ別に記入する。

## (2) 参考事項

## 1) 用量設定の根拠

用量設定試験の結果, 50%細胞増殖抑制濃度は, 短時間処理法の代謝活性化法によらない場合で  $357 \mu\text{g/mL}$ , 代謝活性化法による場合で  $348 \mu\text{g/mL}$ , 連続処理法の 24 時間処理試験で  $244 \mu\text{g/mL}$ , 48 時間処理試験で  $237 \mu\text{g/mL}$  と推定した. 従って, 染色体異常試験の用量は 50%細胞増殖抑制濃度を指標とし, 公比  $\sqrt{2}$  で以下の 6 段階を設定することとした.

短時間処理法: 70.7, 100, 141.4, 200, 282.8,  $400 \mu\text{g/mL}$ , 連続処理法: 50, 70.7, 100, 141.4, 200,  $282.8 \mu\text{g/mL}$

## 2) 統計学的手法と結果の判定

染色体異常細胞の出現頻度について, 陰性対照群と各被験物質処理群との間でカイ2乗検定 (片側,  $p < 0.05$ ) を行った.

結果の判定は, 染色体異常細胞の出現頻度について, 陰性対照群と比較し, 被験物質処理群で有意な増加がみられ, 用量依存性または再現性が認められた場合に陽性と判定し, それ以外の場合は陰性と判定することとした.

## 8. その他

試験実施施設	名 称	株式会社新日本科学
	所在地	鹿児島県鹿児島郡吉田町宮之浦 2438 番地 電話 099 ( 294 ) 2600 FAX 099 ( 294 ) 3619
試験責任者	職氏名	
	経験年数	
試験期間	2000 年 12 月 6 日 より 2001 年 3 月 29 日	
試験番号	SBL 79-18	

別表 1 染色体異常試験結果(短時間処理法)

SBL79-18

被験物質の名称: ポリオキシエチレンp-ノニルフェニルエーテル

処理時間 (h)	S9 Mix	被験物質の用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度 %)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 #	染色体数異常の細胞数 (出現頻度 %)			
			観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍染色体	核内倍加	総異常細胞数
6-18	-	陰性対照 [注射用水]	100	0	0	0	0	0	0	1	100	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	1	0	1
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	-	70.7	100	1	0	0	0	0	1	1	100.6	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	-	100	100	0	0	0	0	0	0	1	96.0	100	1	1	2
			100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	1	1	2 ( 1.0 )
6-18	-	141.4	100	1	0	0	0	0	1	0	93.8	100	1	0	1
			100	0	0	1	0	0	1	0		100	1	0	1
			200	1	0	1	0	0	2 ( 1.0 )	0		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	-	200	100	0	0	0	0	0	0	0	88.7	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	2	0	2
			200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	-	282.8	100	1	0	0	0	0	1	0	67.2	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	0		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	-	400	100	1	0	1	0	0	2	0	39.5	100	1	0	1
			100	2	0	0	0	0	2	0		100	1	1	2
			200	3	0	1	0	0	4 ( 2.0 )	0		200	2	1	3 ( 1.5 )
6-18	-	陽性対照 [MMC] 0.15	100	9	20	0	0	0	25	0	62.1	100	0	0	0
			100	9	22	0	0	0	26	0		100	0	0	0
			200	18	42	0	0	0	51 ( 25.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	陰性対照 [注射用水]	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	1		100	1	0	1
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	+	70.7	100	0	0	1	0	0	1	0	96.8	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
			200	0	0	1	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	+	100	100	0	1	0	0	0	1	0	97.6	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1 ( 0.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
6-18	+	141.4	100	1	0	0	0	0	1	0	94.1	100	1	0	1
			100	0	1	0	0	0	1	1		100	1	0	1
			200	1	1	0	0	0	2 ( 1.0 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
6-18	+	200	100	0	0	0	0	0	0	0	95.3	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	1		100	2	0	2
			200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	3	0	3 ( 1.5 )
6-18	+	282.8	100	0	0	0	0	0	0	0	68.4	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
			200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
6-18	+	400	100	0	0	1	0	0	1	0	41.5	100	2	0	2
			100	0	0	0	1	0	1	0		100	1	0	1
			200	0	0	1	1	0	2 ( 1.0 )	0		200	3	0	3 ( 1.5 )
6-18	+	陽性対照 [B(a)P] 20	100	2	23	0	0	0	24	0	61.3	100	0	0	0
			100	4	23	0	0	0	27	0		100	0	0	0
			200	6	46	0	0	0	51 ( 25.5 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )

備考: S9の最終濃度5%, ギャップには染色分体型と染色体型の両方を含める。処理時間の欄は、処理時間一回復時間を記入。

各群のプレートごとのデータを1および2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。#: 生細胞の割合%

MMC: マイトマイシンC, B(a)P: ベンゾ(a)ピレン、- S9 Mix: 代謝活性化法によらない場合 + S9 Mix: 代謝活性化法による場合

統計処理結果および判定: 陰性対照と各被験物質処理群との間でカイ2乗検定 ( $p < 0.05$ )

を行った結果、いずれの被験物質処理群においても有意差が認められなかったため、

陰性判定し、

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

別表 2 染色体異常試験結果(連続処理法)

SBL79-18

被験物質の名称: ポリオキシエチレンp-ノニルフェニルエーテル

処理時間 (h)	被験物質の用量 ( $\mu$ g/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度 %)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 #	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度 %)			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数
24 - 0	陰性対照 [注射用水]	100	0	0	0	0	0	0	1	100	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	1	0	1
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
24 - 0	50	100	0	0	0	0	0	0	0	96.3	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0		200	0	0	0 ( 0.0 )
24 - 0	70.7	100	0	1	0	0	0	1	1	91.9	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	1	0	1
		200	1	1	0	0	0	2 ( 1.0 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
24 - 0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	83.1	100	0	0	0
		100	2	0	0	0	0	2	0		100	1	0	1
		200	2	0	0	0	0	2 ( 1.0 )	0		200	1	0	1 ( 0.5 )
24 - 0	141.4	100	0	0	0	0	0	0	1	74.4	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
24 - 0	200	100	1	0	0	0	0	1	1	59.4	100	2	0	2
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	3	0	3 ( 1.5 )
24 - 0	282.8	100	1	0	0	0	0	1	1	41.9	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	2	0	2
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	3	0	3 ( 1.5 )
24 - 0	陽性対照 [MMC] 0.05	100	9	16	0	0	0	21	0	63.8	100	0	0	0
		100	7	14	0	0	0	19	0		100	1	0	1
		200	16	30	0	0	0	40 ( 20.0 )	0		200	1	0	1 ( 0.5 )
48 - 0	陰性対照 [注射用水]	100	1	0	0	0	0	1	1	100	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
48 - 0	50	100	0	0	0	1	0	1	0	101.9	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0		200	1	0	1 ( 0.5 )
48 - 0	70.7	100	2	0	0	0	0	2	0	91.0	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	1		100	1	0	1
		200	2	1	0	0	0	3 ( 1.5 )	1		200	1	0	1 ( 0.5 )
48 - 0	100	100	0	0	0	0	0	0	1	89.2	100	0	1	1
		100	1	0	0	0	0	1	1		100	0	0	0
		200	1	0	0	0	0	1 ( 0.5 )	2		200	0	1	1 ( 0.5 )
48 - 0	141.4	100	0	0	1	0	0	1	0	74.1	100	2	0	2
		100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
		200	0	0	1	0	0	1 ( 0.5 )	1		200	3	0	3 ( 1.5 )
48 - 0	200	100	0	1	0	0	0	1	0	54.7	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	1		100	1	0	1
		200	1	1	0	0	0	2 ( 1.0 )	1		200	2	0	2 ( 1.0 )
48 - 0	282.8	TOX	—	—	—	—	—	—	—	31.1	TOX	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	— ( — )	—		—	—	—	— ( — )
48 - 0	陽性対照 [MMC] 0.05	100	11	22	0	0	0	29	0	56.6	100	0	0	0
		100	7	24	0	0	0	28	0		100	1	0	1
		200	18	46	0	0	0	57 ( 28.5 )	0		200	1	0	1 ( 0.5 )

備考: ギャップには染色分体型と染色体型の両方を含める。処理時間の欄は、処理時間-回復時間を記入。  
各群のプレートごとのデータを1および2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。#: 生細胞の割合%  
MMC: マイトマイシンC, TOX: 細胞毒性により中期分裂像が観察されなかった用量

統計処理結果および判定: 陰性対照と各被験物質処理群との間でカイ2乗検定 ( $p < 0.05$ )  
を行った結果、いずれの被験物質処理群においても有意差が認められなかったため、  
陰性と判定した。

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。



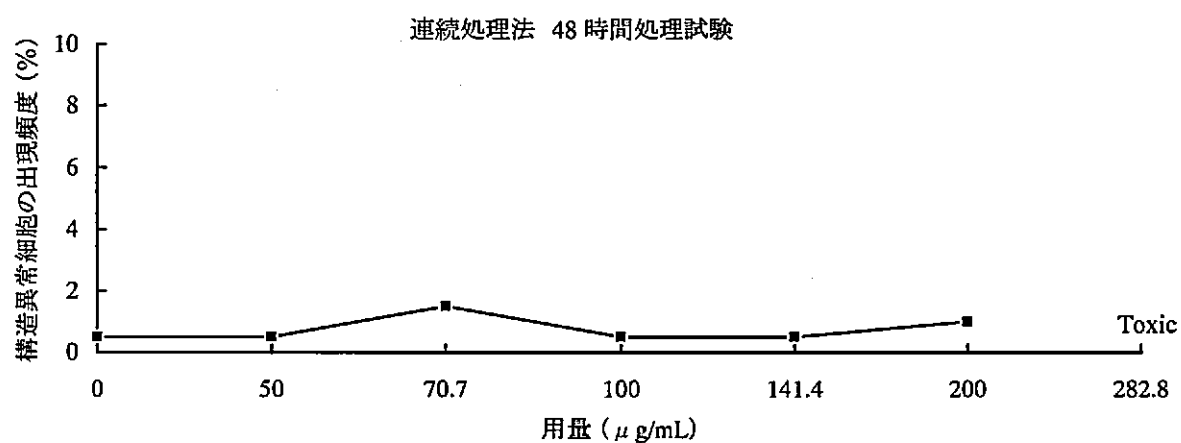
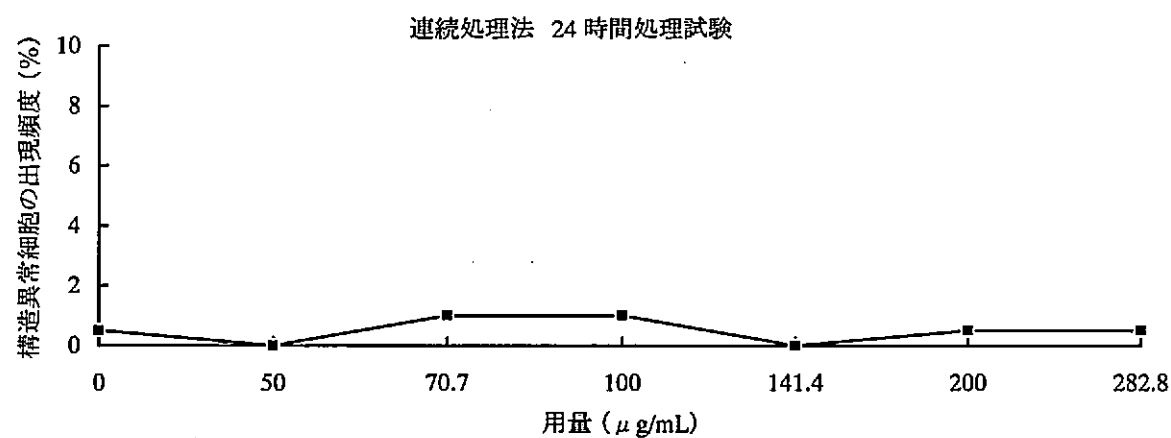
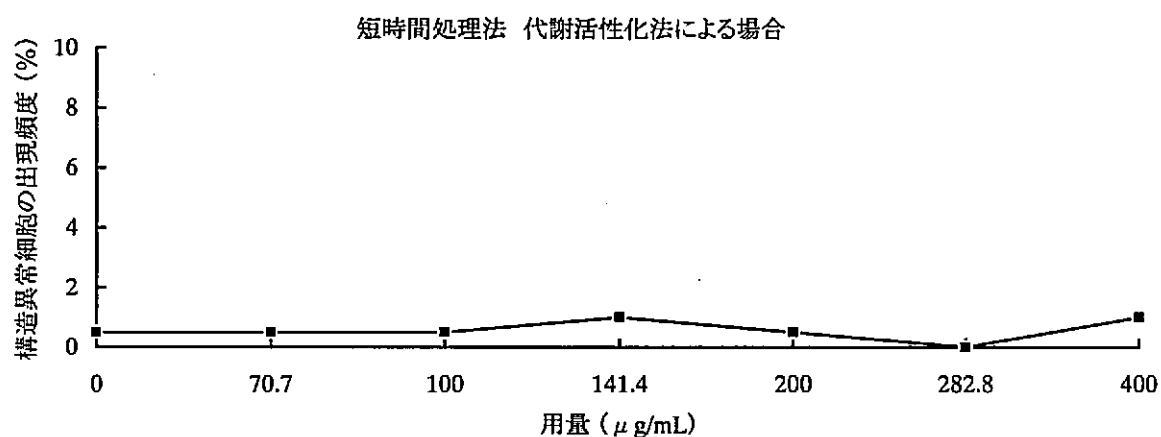
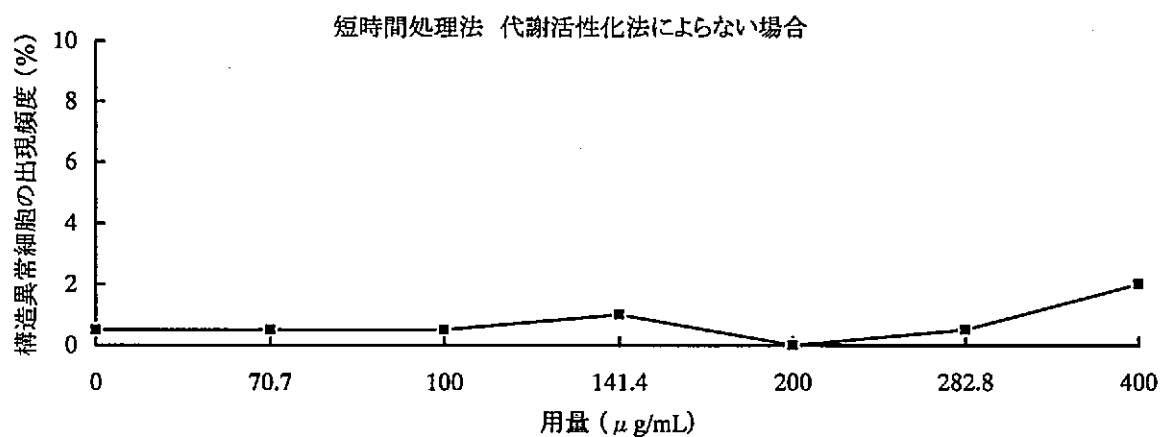


図 1 用量－反応曲線（構造異常細胞）

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

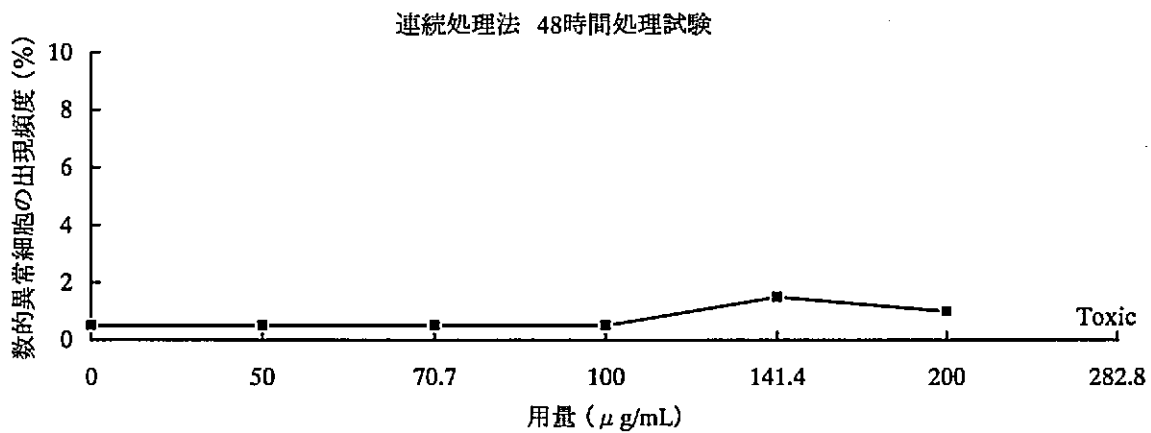
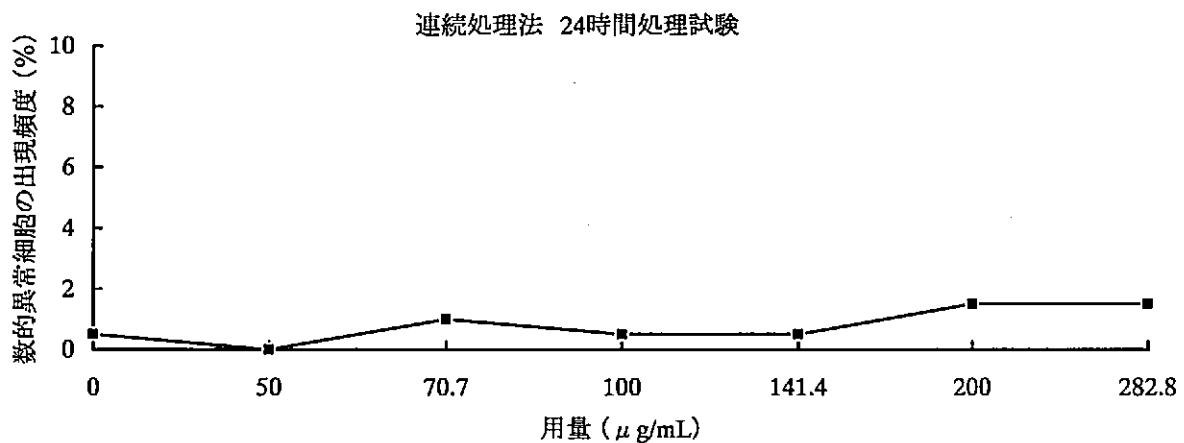
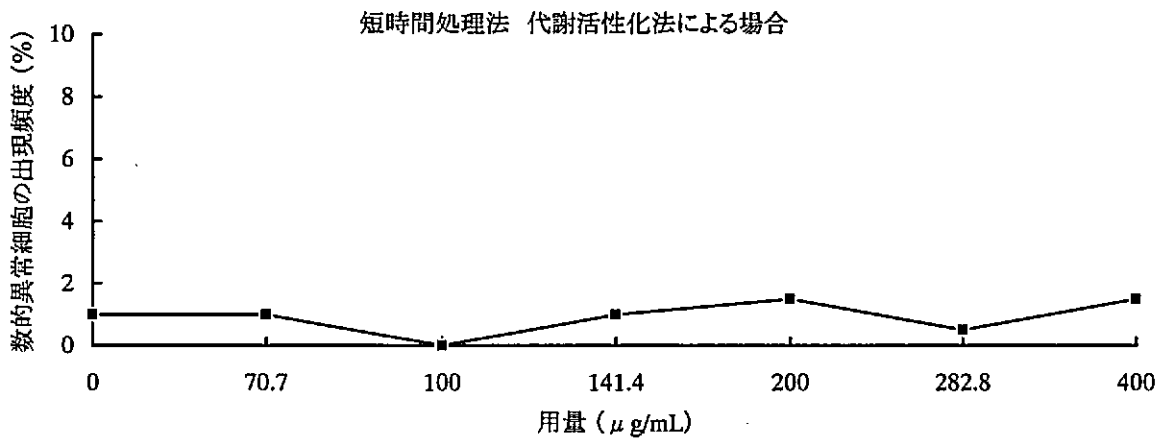
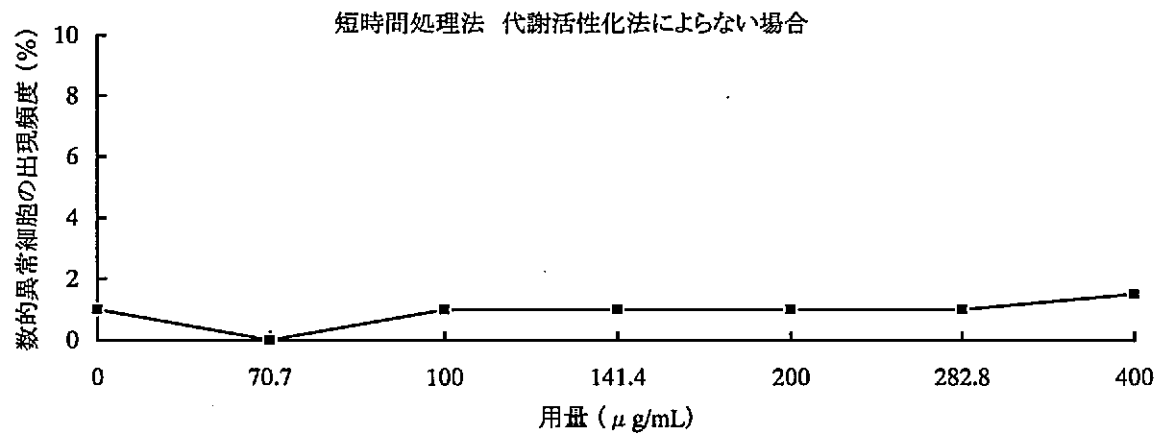


図2 用量-反応曲線 (数的異常細胞)

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

陳 述 書

表 題 : ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルのは乳類培養細胞を用いる  
染色体異常試験

試験番号 : SBL79-18

本試験は、OECD Principles of Good Laboratory Practice (revision in 1997)および OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (Updated Guideline 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, adopted 21st July 1997)に準拠して実施し、また、報告書は試験の方法を正確に記載し、生データを正確に反映したものに相違ありません。

試験責任者

(所 属) 株式会社 新日本科学

署 名

2001年 3月29日

運営管理者

(所 属) 株式会社 新日本科学

署 名

2001年 3月29日

## 信 頼 性 保 証 書

試験委託者 : 経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター  
化学物質安全管理センター

試験の表題 : ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルのほ乳類培養細胞を用いる  
染色体異常試験

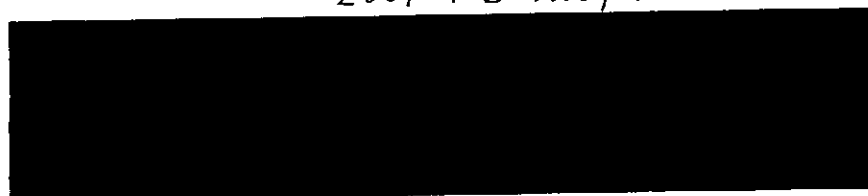
試験番号 : SBL 79-18

当試験は、株式会社新日本科学の信頼性保証部門が定期的に査察を実施しており、査察を行った日付、運営管理者および試験責任者に報告を行った日付は以下の通りである。

査察項目	査察実施日	試験責任者 への報告日	運営管理者 への報告日
試験計画書	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日
試験スケジュール	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日
試験計画書変更確認書(No. 1)	2001 年 1 月 25 日	2001 年 1 月 25 日	2001 年 1 月 29 日
被験物質保管状態	2001 年 1 月 29 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
被験物質溶液の調製	2001 年 1 月 29 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
被験物質溶液の濃度測定	2001 年 1 月 29 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
投与	2001 年 1 月 29 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
標本の作製	2001 年 1 月 30 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
染色体異常の観察	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日	2001 年 2 月 5 日
試験計画書変更確認書(No. 2)	2001 年 2 月 23 日	2001 年 2 月 23 日	2001 年 2 月 26 日
試験計画書変更確認書(No. 3)	2001 年 3 月 2 日	2001 年 3 月 2 日	2001 年 3 月 5 日
書類・生データ	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 9 日
最終報告書草案	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 9 日
最終報告書草案	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 9 日
最終報告書	2001 年 3 月 29 日	2001 年 3 月 29 日	2001 年 3 月 29 日


本試験報告書には、試験で使用方法、手順が記載されており、報告書は試験の生データを正確に反映している。

2001 年 3 月 29 日



試験実施者

署名



2001年 3月 29日

資料保管責任者



月 29 日

記録(生データ, 最終報告書), 試料および標本の保管場所

株式会社新日本科学内のデータ資料室(記録・資料),  
冷蔵室内試験物質保管庫(保管用被験物質)および器官保管室(標本)

## GENETIC TOXICITY IN VITRO (NONE-BACTERIAL IN VITRO TEST)

### TEST SUBSTANCE

- **Identity:** Polyoxyethylene p-nonylphenylether (CAS No. 9016-45-9)
- **Remarks:** Source: Chemical Substances Safety Management Center  
National Institute of Technology and Evaluation Ministry of  
Economy, Trade and Industry. Purity: 100 wt%. Stability during  
use confirmed by high performance liquid chromatography.

### METHOD

- **Method/guideline:** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (Updated  
Guideline 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration  
Test, adopted 21st July 1997).
- **Test type:** A Chromosomal Aberration Test
- **GLP:** OECD Principles of Good Laboratory Practice (revision in 1997)
- **Year:** December 6, 2000 to March 29, 2001.
- **Species/Strain:** CHL/IU cell
- **Metabolic activation:** With and without S9 mix (S9 was prepared from the livers of  
male rats (SD strain, 7 weeks old) that had been given  
Phenobarbital and 5,6-benzoflavone intraperitoneally to induce  
drug-metabolizing enzymes.)
- **Statistical methods:** Chi-square test ( $p < 0.05$ ).

### REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- **Study Design:**

For continuous treatment, cells were treated for 24 or 48 hrs  
without S9 mix. For pulse treatment, cells were treated for 6 hrs

with and without S9 mix and cultivated with fresh media for 18 hrs.

Concentration: Continuous treatment: 0, 50, 70.7, 100 141.4, 200 and 282.8  $\mu\text{g/mL}$   
Pulse treatment: 0, 70.7, 100, 141.4, 200, 282.8 and 400  $\mu\text{g/mL}$   
Plates/test: 2 plates/dose/test  
Solvent: Water for injection  
Positive controls: Mitomycin C; -S9 mix (continuous treatment, pulse treatment)  
Benzo (a) pyrene (B(a)P); +S9 mix (pulse treatment)

## RESULTS

### • Cytotoxic concentration:

Continuous treatment (24 hrs); 282.8  $\mu\text{g/mL}$   
Continuous treatment (48 hrs) ; 200, 282.8  $\mu\text{g/mL}$   
Pulse treatment (-S9 mix); 400  $\mu\text{g/mL}$   
Pulse treatment (+S9 mix); 400  $\mu\text{g/mL}$

### • Genotoxic effects:

	Clastogenicity			polyploidy		
	+	?	-	+	?	-
With metabolic activation	[ ]	[ ]	[X]	[ ]	[ ]	[X]
Without metabolic activation	[ ]	[ ]	[X]	[ ]	[ ]	[X]

## REMARKS FIELD FOR RESULTS

No statistically significant differences were noted, between the test article treatment groups and the negative control group in the frequency of cells having structural aberrations or numerical aberrations, irrespective of the presence or absence of a metabolic activation system or treatment time.

## CONCLUTIONS

The clastogenicity of Polyoxyethylene p-nonylphenylether in the CHL/IU cells was judged to be negative irrespective of the presence or absence of a metabolic activation system or treatment time.

## DATE QUALITY

- **Reliabilities:** Valid without restriction.

## Remarks field for Data Reliability

Well conducted study, carried out by Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.  
(Kagoshima, Japan)

## REFERENCES

T. Sufuni : Data Book of Chromosomal Aberration Test *In Vitro*; Life-science Information Center, Tokyo, Japan, 1998 Revised edition.

T. Sofuni: The Testing Method of Cell Toxicology; 199 - 209, Japanese Society for Tissue Culture. Asakura shoten, Tokyo, Japan, 1991.

M. Ishidate Jr.: Chromosomal aberration test in cultured cells, Mutagenicity and Genetic Toxicology 79 - 87, Tijin Shokan, Tokyo, 1991.

A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr.: Chromosomal aberration test on 29 chemicals combined with S 9 mix *in vitro*. Mutation Res. 66, 277 - 290, 1979.

T. Sofuni and A. Matsuoka: Metabolic activation method in chromosomal aberration test, Environmental mutagen research communications. 5(2), 4 - 6, 1983.

Environmental Mutagen Society of Japan, Mammalian Mutagenicity Study Group: The Atlas of Chromosomal Aberration on Chemical Compounds; 16 - 147, Asakura shoten, Tokyo, Japan, 1988.

I. Yoshimura, Y. Ohashi. : Statistical Analysis of Toxicology Data. 147 - 166, Tijin Shokan, Tokyo, 1992.

## GENERAL REMAERKS

None.