




最終報告書

(5 or 6)-デセノイック アシドのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : 

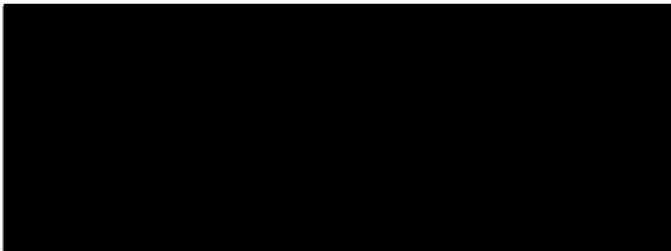
試験期間 : 

試験施設



試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所





1. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	5
2.1	試験番号	5
2.2	試験表題	5
2.3	試験目的	5
2.4	試験委託者	5
2.5	試験受託者	5
2.6	試験実施施設	5
2.7	試験日程	5
2.8	試験責任者	5
2.9	試験担当者	5
2.10	予見することができなかつ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つたこと	6
2.11	資料保存	6
2.12	試験責任者の記名・押印及びその日付	6
3.	要約	7
4.	緒言	8
5.	試験材料及び方法	9
5.1	被験物質及び溶媒	9
5.1.1	被験物質	9
5.1.2	溶媒	9
5.2	被験液の調製	10
5.2.1	調製方法	10
5.2.2	調製頻度	10
5.2.3	安定性	10
5.3	対照物質	10
5.3.1	陰性対照	10
5.3.2	陽性対照	10
5.4	使用細胞株	11
5.4.1	細胞株	11
5.4.2	細胞株の選択理由	11
5.4.3	培養条件	11
5.5	S9 mix 及び培養液の調製	12
5.5.1	S9 mix	12
5.5.2	培養液	13
5.6	試験方法 ¹⁾⁻⁵⁾	13

5.6.1	識別方法	13
5.6.2	用量の設定	14
5.6.3	細胞増殖抑制試験	14
5.6.4	染色体異常試験	15
5.6.5	試験結果の取り扱い	16
5.6.6	標本の観察	17
5.6.7	判定基準	17
5.6.8	再試験又は確認試験	18
6.	試験結果及び考察	19
6.1	細胞増殖抑制試験	19
6.2	染色体異常試験	19
7.	参考文献	20

図

Fig. 1	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Short-term treatment: -S9 mix].....	21
Fig. 2	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Short-term treatment: +S9 mix].....	22
Fig. 3	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Continuous treatment: 24hr]	23

表

Table 1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Short-term treatment: -S9 mix]	24
Table 2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Short-term treatment: +S9 mix]	25
Table 3	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Continuous treatment: 24hr]	26



附表

Appendix 1	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID 27
Appendix 2-1	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Short-term treatment: -S9 mix]..... 28
Appendix 2-2	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Short-term treatment: +S9 mix]..... 29
Appendix 2-3	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Continuous treatment: 24hr] 30
Appendix 3-1	Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Short-term treatment: -S9 mix].... 31
Appendix 3-2	Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Short-term treatment: +S9 mix] ... 32
Appendix 3-3	Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Continuous treatment: 24hr] 33
Appendix 4	Cell concentration and population doubling in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID 34
Appendix 5	Cell survival ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID 35

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

2.2 試験表題

(5 or 6)-デセノイック アシドのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2.3 試験目的

ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いて、(5 or 6)-デセノイック アシドの染色体異常誘発能を検討した。

2.4 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

2.5 試験受託者

2.6 試験実施施設

2.7 試験日程

試験開始日 :
被験物質受領日 :
実験開始日 :
実験終了日 :
試験終了日 :

2.8 試験責任者

2.9 試験担当者

被験物質保存責任者 :
試験担当者 :



3. 要約

(5 or 6)-デセノイック アシドの染色体異常誘発能の有無を検討するため、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いた染色体異常試験を実施した。

初めに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、最高用量を 1710 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で計 8 用量を設定した細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の非代謝活性化及び代謝活性化では 855 $\mu\text{g/mL}$ 以上、連続処理法では 428 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）はそれぞれ 461、830 及び 290 $\mu\text{g/mL}$ であった。そのため、染色体異常試験における処理用量は、短時間処理法の非代謝活性化では 450 $\mu\text{g/mL}$ 、代謝活性化では 900 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法では 450 $\mu\text{g/mL}$ をそれぞれ最高用量とし、以下公比 2 で希釈した計 4 用量を設定し、試験を実施した。

染色体異常試験の結果、いずれの処理法もすべての用量で、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、陰性の判定基準である 5%未満を示したことから、陰性と判定した。

なお、いずれの処理法においても、陰性対照群における TA 値及び倍数体の出現率は 5%未満を示し、陽性対照群においては TA 値の顕著な増加が認められたことから、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、(5 or 6)-デセノイック アシドは本試験条件下において染色体異常誘発能を有しないと結論した。



4. 緒言

国立医薬品食品衛生研究所の依頼により、(5 or 6)-デセノイック アシドの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（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、本試験は以下のガイドラインに準拠して実施した。

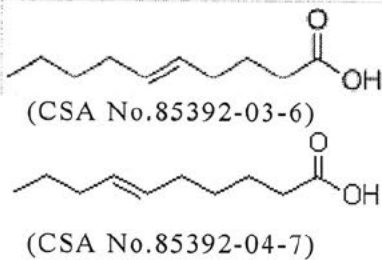
1) 毒性試験ガイドライン

- 「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)
- 「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」
(平成 8 年 3 月 22 日：衛化第 29 号)

5. 試験材料及び方法

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

供給者	:	██████████
名称	:	(5 or 6)-デセノイック アシド
英名	:	(5 or 6)-DECENOIC ACID
CAS 番号	:	72881-27-7 (85392-03-6, 85392-04-7)
構造式又は示性式	:	 <p>(CSA No.85392-03-6)</p> <p>(CSA No.85392-04-7)</p>
分子式	:	C ₁₀ H ₁₈ O ₂
分子量	:	170.25
性状	:	透明な液体
ロット番号	:	██████████
比重	:	0.928(d20/20)
純度	:	85.12%
不純物	:	γ-Decalactone : 2.0%、δ-Decalactone : 11.7%
入手量	:	91.1290 g (風袋込重量)
品質保証期限	:	██████████
保存条件	:	冷暗所 (保存期間中の実測温度 : 3.7~5.2°C)
保存場所	:	██████████
残余被験物質の処理	:	実験終了後の被験物質の残量は、すべて廃棄した。

5.1.2 溶媒

名称	:	DMSO
規格	:	試薬特級
製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	██████████
保存条件	:	室温
保存場所	:	██████████
溶媒の選択理由	:	溶媒検討を実施した結果、DMSO に 500 mg/mL で溶解したことから、DMSO を溶媒として選択した。

5.2 被験液の調製

5.2.1 調製方法

調製は無菌環境下において、滅菌済みの器具を用いて無菌操作によって実施した。

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3420 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を加えてメスアップし、最高濃度の 171 mg/mL 被験液 (プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度: 1710 µg/mL) を調製した。次いで、171 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL : 溶媒 1 mL) で順次 7 段階希釈し、85.5、42.8、21.4、10.7、5.34、2.67 及び 1.34 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験

被験物質 0.1800 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を加えてメスアップし、最高濃度の 90.0 mg/mL 被験液 (プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度: 900 µg/mL) を調製した。次いで、90.0 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL : 溶媒 1 mL) で順次 4 段階希釈し、45.5、22.5、11.3 及び 5.63 mg/mL の計 5 濃度段階の被験液を調製した。

5.2.2 調製頻度

用時に調製した。

5.2.3 安定性

用時調製のため、安定性確認は実施しない。

5.3 対照物質

5.3.1 陰性対照

溶媒として用いた DMSO を陰性対照とした。

5.3.2 陽性対照

1) 非代謝活性化系

名称	:	マイトマイシン C (MMC)
ロット番号	:	██████████
製造元	:	協和発酵キリン株式会社
力価	:	2 mg (力価) / 瓶
保存方法	:	室温、遮光
保存場所	:	██

2) 代謝活性化系

名称	:	シクロフォスファミド (CP)
ロット番号	:	██████████

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 (許容範囲: 1~10°C)、遮光
保存場所 :

3) 調製方法

調製は用時に行った。

(1) MMC

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) を 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 (短時間処理法の非代謝活性化では培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。連続処理法では培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は、それぞれ 0.075 µg/mL 及び 0.050 µg/mL)。

(2) CP

γ線滅菌済プラスチック遠沈管に CP を 0.0140 g を秤取した。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) 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)。

4) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験ガイドラインに使用が推奨されているため。

5.4 使用細胞株

5.4.1 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。独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから 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。

使用時の細胞継代数は細胞増殖抑制試験で 19 継代、染色体異常試験で 22 継代であった。

5.4.2 細胞株の選択理由

毒性試験ガイドラインに使用が推奨されているため。

5.4.3 培養条件

CO₂ インキュベータを用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で 1~4 日ごとに継代培養を行った。

5.5 S9 mix 及び培養液の調製

5.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素 (S9/コファクターC セット、ロット番号 : [REDACTED]) を混合し、S9 mix を調製した。調製は用時に行った。

1) S9

名称 : S9
製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号 : [REDACTED]
製造日 : [REDACTED]
種・系統 : ラット・SD 系
週齢・性 : 7 週齢・雄性
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 : PB4 日間連続投与 30+60+60+60 (mg/kg 体重)
PB 投与 3 日目 BF 投与 80 (mg/kg 体重)
使用期限 : [REDACTED]
保存方法 : 冷凍 (-70°C 以下)
保存場所 : [REDACTED] 超低温フリーザ

2) 補酵素

名称 : コファクターC
製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号 : [REDACTED]
製造日 : [REDACTED]
保存方法 : 冷凍 (-70°C 以下)
使用期限 : [REDACTED]
保存場所 : [REDACTED] 超低温フリーザ

3) S9 mix の組成 (1 mL 中)

水 : 0.7 mL
S9 : 0.3 mL
MgCl₂ : 5 µmol/mL
KCl : 33 µmol/mL
グルコース-6-リン酸 : 5 µmol/mL
酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP) : 4 µmol/mL
HEPES 緩衝液 (pH7.2) : 4 µmol/mL

5.5.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM)(GIBCO™、Cat.No. [REDACTED] 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 : [REDACTED]
 製造元 : Life Technologies Corporation
 保存方法 : 冷凍 (-20°C 以下)
 保存場所 : [REDACTED]

2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号 : [REDACTED]
 製造元 : Life Technologies Corporation
 保存方法 : 冷蔵 (許容範囲: 1~10°C)
 保存場所 : [REDACTED]

5.6 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	非代謝活性化 代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	非代謝活性化 代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理

5.6.1 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グ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 非代謝活性化	-
	短時間処理法 代謝活性化	+
	連続処理法 24 時間処理	24-
	陰性対照群 (Negative Control)	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 (Positive Control)	PC
同一処理群内での識別		1、2
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

5.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1710 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 855、428、214、107、53.4、26.7 及び 13.4 µg/mL の計 8 用量を設定した。これに加えて陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

各処理法における用量を以下に示した。これに加えて陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

処理方法	用量 (µg/mL)
短時間処理法 非代謝活性化	450, 225, 113, 56.3
短時間処理法 代謝活性化	900, 450, 225, 113
連続処理法 24 時間処理	450, 225, 113, 56.3

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

- 短時間処理法の非代謝活性化と代謝活性化、連続処理法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(プレート)はプラスチックプレート(直径 60 mm)を用い、各群 1 枚とした。また、相対細胞集団倍加数 (Relative Cell Population Doubling Number: RPD)を算出するための開始時測定用にプレートを 1 枚設けた。
- 対数増殖期にある継代細胞を、プレート当たり約 2×10^4 個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種した。
- 播種 3 日後、倒立位相差顕微鏡下で細胞に異常がないことを確認後、下表に従い、培養液の除去及び処理を行い、処理開始時細胞数測定用のプレート 1 枚については、以下の方法に従い細胞濃度を測定し、処理開始時の細胞濃度とした。

処理内容	短時間処理法		連続処理法
	非代謝活性化	代謝活性化	
培養液除去量	0.050 mL	0.883 mL	0.050 mL
S9 mix 添加量	0.833 mL		
溶媒・被験液添加量	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL

- 当該プレートの培養液を廃棄し、Phosphate-Buffered Saline(-): PBS(-)を適量加え、プレートを洗浄した。
- PBS(-)を廃棄し、0.25% Trypsin 溶液を 1 mL 加え、約 5 分間静置した。
- ピペッティングで細胞を剥離・分散させた後、プレートに新しい 10%BS-MEM 培養液を 1 mL 添加し、細胞濃度を測定した。
- 肉眼で培養液の色調及び析出の有無を確認し、短時間処理法では 6 時間、連続処

理法では 24 時間培養した。

- 5) 6 時間培養後、短時間処理法については、4) 同様に析出の有無を確認するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、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 時間培養した。
- 6) 培養終了後、4) 同様に析出の有無及び細胞の状態を確認した（短時間処理法の培養終了時の結果は、参考データとした）。
- 7) 次いで、3) の方法に従い、各プレートの細胞濃度を測定し、終了時の細胞濃度とした。
- 8) 得られた細胞濃度から、式 1 に従い、陰性対照群を 100% とした各群の相対細胞数(Relative Cell Count: RCC)を算出した（小数点以下第 1 位を四捨五入した）。また、式 2 及び 3 に従い、相対細胞集団倍加数(RPD)を算出した（小数点以下第 1 位を四捨五入した）。

$$\text{RCC}(\%) = \frac{\text{被験物質処理群における処理(培養)終了時の細胞数} \times 100}{\text{陰性対照群における処理(培養)終了時の細胞数}} \quad \text{〔式 1〕}$$

$$\text{細胞集団倍加数(PD)} = \frac{\log(\text{処理(培養)終了時の細胞数} \div \text{処理開始時の細胞数})}{\log 2} \quad \text{〔式 2〕}$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{\text{被験物質処理群における細胞集団倍加数} \times 100}{\text{陰性対照群における細胞集団倍加数}} \quad \text{〔式 3〕}$$

- 9) 細胞増殖抑制率 (=100-RCC)*を算出し、50%を挟む 2 点の直線式から 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を算出した。
*計算値が 0 以下の場合は 0 として扱った。

5.6.4 染色体異常試験

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

- 1) 短時間処理法の非代謝活性化と代謝活性化、連続処理法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、各群 2 枚とした。また、相対細胞集団倍加数 (RPD) を算出するための開始時測定用にプレートを 1 枚設けた。
- 2) 対数増殖期にある継代細胞を、プレート当たり約 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。
- 3) 播種 3 日後、倒立位相差顕微鏡下で細胞に異常がないことを確認後、下表に従い、

培養液の除去及び処理を行い、処理開始時細胞数測定用のプレート1枚については、細胞増殖抑制試験に準じて細胞濃度を測定し、処理開始時の細胞濃度とした。

	短時間処理法		連続処理法
	非代謝活性化	代謝活性化	
培養液除去量	0.050 mL (0.150 mL)*	0.883 mL (0.933 mL)*	0.050 mL (0.100 mL)*
S9 mix 添加量		0.833 mL	
溶媒・被験液・陽性対照物質液添加量	0.050 mL (0.150 mL)*	0.050 mL (CP: 0.100 mL)*	0.050 mL (0.100 mL)*

*：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) 肉眼で培養液の色調及び析出の有無を確認し、短時間処理法では6時間、連続処理法では24時間培養した。
- 5) 6時間培養後、短時間処理法については、4)同様に析出の有無を確認するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、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時間培養した。
- 6) 培養終了の約2時間前に4)同様に析出の有無を確認するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した（短時間処理法の培養終了時の結果は、参考データとした）。次いで各群2枚のプレートにコルセミド（デメコルシン溶液、10 µg/mL）を0.1 mL加え、再度培養した。
- 7) 培養終了後、プレートの培養液を廃棄し、0.25%Trypsin 溶液1 mLで細胞を剥がした後、プレートに新しい10%BS-MEM 培養液を1 mL添加した。このうち各群1枚のプレート（枝番号-2）についてはその一部を採取し、細胞増殖抑制試験に準じて細胞濃度を測定し、RCC、PD及びRPDを算出した。
- 8) 7)の残液を遠心し、集めた細胞を0.075M 塩化カリウム溶液で約15分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1液で固定した。固定した細胞をスライドガラス1枚につき2箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり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。

5.6.5 試験結果の取り扱い

RCC、PD及びRPD算出には表示値を用い、下記の桁数に従って計算した。

- 1) 細胞濃度について、細胞濃度測定機器を使用したため機器の表示値とした。
- 2) PDについては、1)の表示値を用いて計算し、小数点以下第3位を四捨五入し、小数点以下第2位まで表示した。
- 3) RPDについては2)の表示値を用い、小数点以下第1位を四捨五入し、整数で表示した。

5.6.6 標本の観察

5.6.6.1 観察手順

顕微鏡下でプレート当たり 100 個の染色体が良く展開した分裂中期像を観察し、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も記録した。染色体標本の観察はすべてブラインド下で行った。

5.6.6.2 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。

1) 構造異常

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、倍加したものの。

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

5.6.7 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。

5.6.8 再試験又は確認試験

以下の項目に1項目以上該当する結果は得られなかったため、再試験又は確認試験は実施しなかった。

- 1) 最終判定が疑陽性の場合。
- 2) 被験液の中間用量で陽性を示すが、被験物質の用量に伴う染色体異常の出現率の増加が認められない場合。
- 3) 被験液の最高用量のみが陽性を示す場合。
- 4) 陽性対照群の染色体構造異常出現率が10%未満の場合。
- 5) 同一群内のプレート間で染色体異常出現率が著しく異なる場合。
- 6) 短時間処理法及び連続処理法の24時間処理の判定がいずれも陰性であり、染色体数的異常（倍数体）等の細胞周期の遅延を示唆する兆候が認められた場合。

6. 試験結果及び考察

6.1 細胞増殖抑制試験

結果を Appendix 1、Appendix 2-1~2-3 及び Appendix 4 に示した。

短時間処理法の非代謝活性化及び代謝活性化では 855 µg/mL 以上、連続処理法では 428 µg/mL 以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）はそれぞれ 461、830 及び 290 µg/mL と算出された。

6.2 染色体異常試験

結果を Fig.1~3、Table 1~3、Appendix 3-1~3-3 及び Appendix 5 に示した。

1) 析出の有無

(1) 処理直後

いずれの処理法も 450 µg/mL 以上の用量で析出が認められた。

(2) 処理終了時

いずれの処理法も 450 µg/mL 以上の用量で析出が認められた。

2) 処理直後の培養液の色調確認

いずれの処理法も、450 µg/mL 以上の用量で培養液の色調が淡橙色を示した。

3) 染色体異常の出現率


いずれの処理法もすべての用量で、染色体構造異常の出現率（TA 値）及び染色体数的異常（倍数体）の出現率は陰性の判定基準である 5%未満を示した。

染色体異常試験の結果、TA 値及び倍数体の出現率は、いずれの処理法もすべての用量で 5%未満を示したことから、総合的に陰性と判断した。

また、いずれの処理法においても、陰性対照群における TA 値及び倍数体の出現率は 5%未満を示し、陽性対照群においては TA 値の顕著な増加が認められたことから、試験は適切に実施されたと考えられた。

なお、本被験物質、5-デセノイック アシド及び 6-デセノイック アシドの遺伝毒性試験に関する文献を検索したが、情報は得られなかった。

以上の結果から、(5 or 6)-デセノイック アシドは本試験条件下において染色体異常誘発能を有しないと結論した。



7. 参考文献

- 1) 祖父尼俊雄監修 (1999) : 染色体異常試験データ集 改訂 1998 年版、pp. 11-23、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) , 日本化粧品科学会誌, 6, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989) : Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271

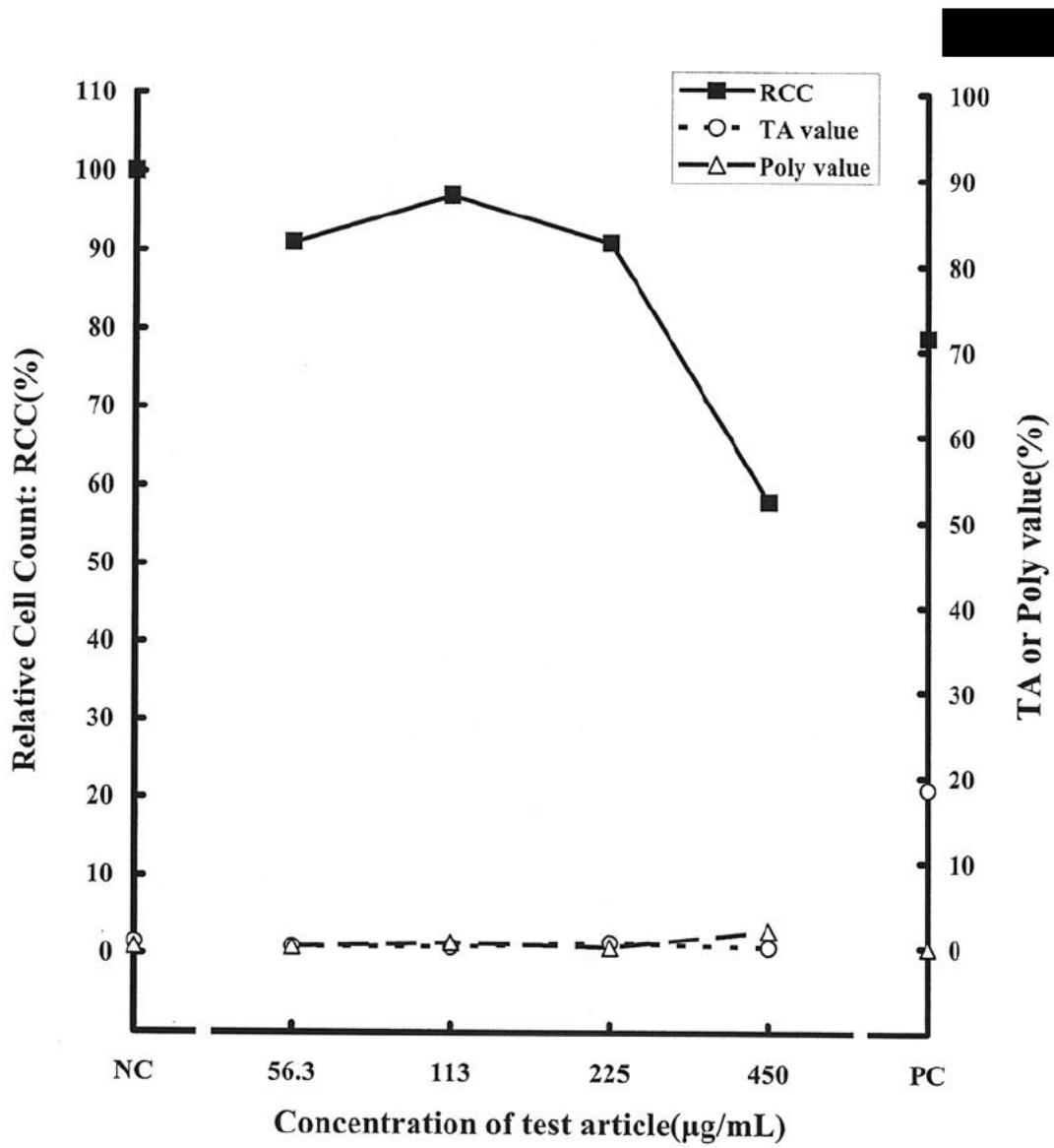


Fig. 1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

[Short-term treatment : -S9 mix]

NC : Negative Control (DMSO)

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

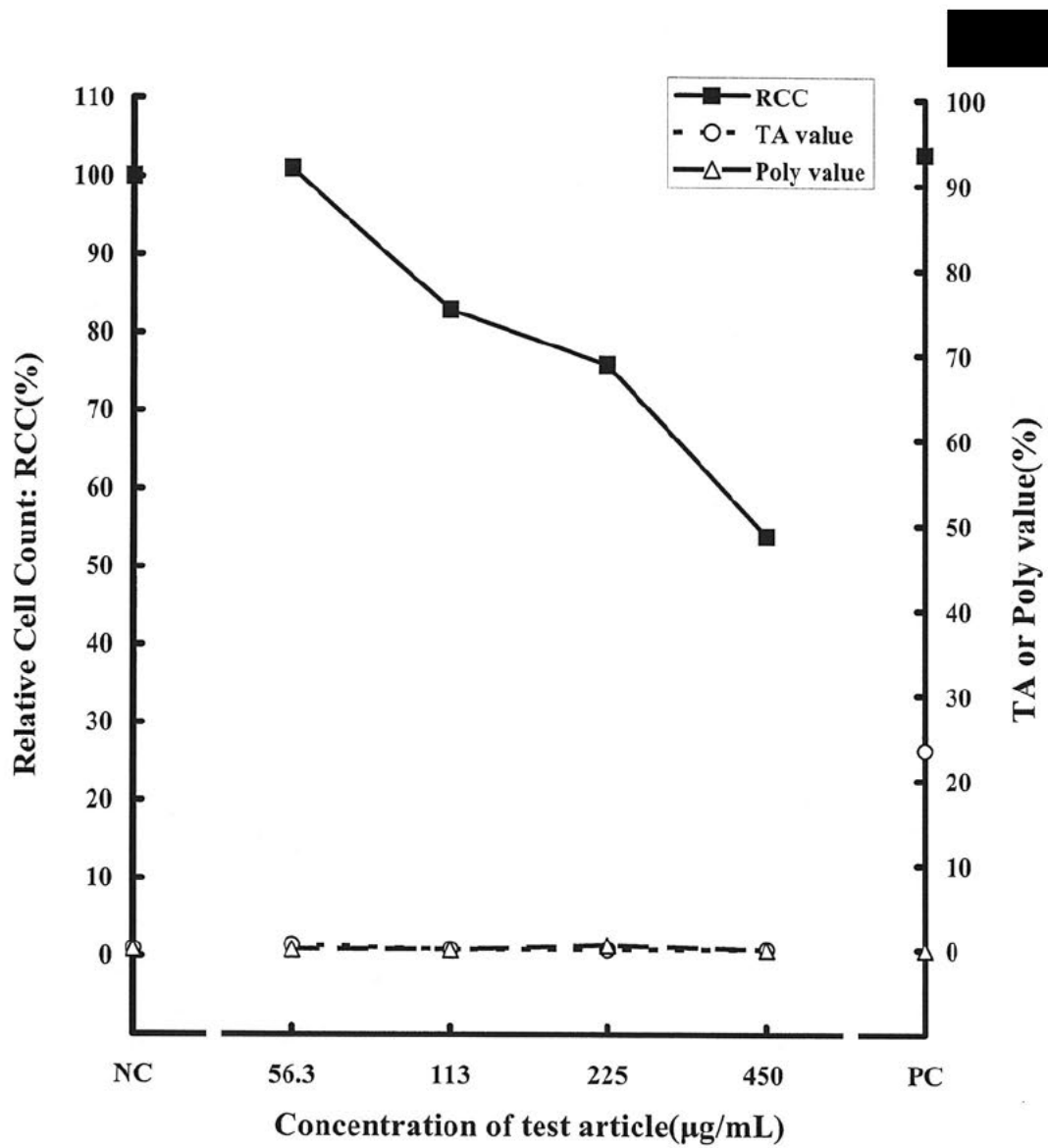


Fig. 3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

[Continuous treatment : 24hr]

NC : Negative Control (DMSO)

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

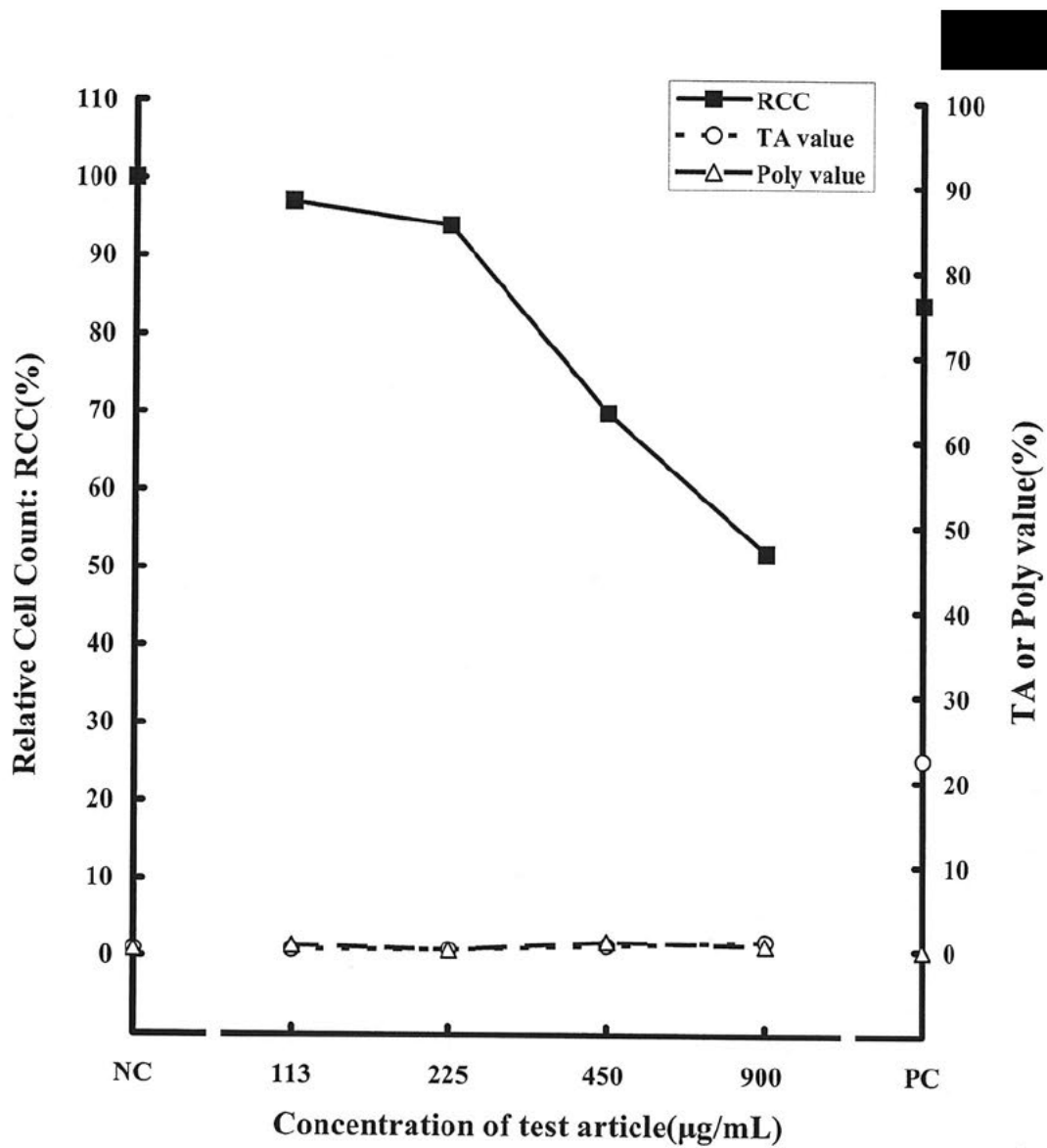


Fig. 2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

[Short-term treatment : +S9 mix]

NC : Negative Control (DMSO)

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



Table 1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IIU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID [Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									RCC (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge-ment
6-18	-	NC	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	100	100	0	0	0	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		56.3		100	0	0	0	0	0	0	0	0	91	100	0	0	0	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	0	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)		0(0.0)	200	0(0.0)	0(0.0)	
		113		100	0	0	0	0	0	0	0	0	97	100	1	0	1	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	0	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)		0(0.0)	200	1(0.5)	0(0.0)	
		225		100	0	0	0	0	0	0	0	0	91	100	0	0	0	-
				100	0	1	0	0	0	1	0	1		100	0	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)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		450		100	0	0	0	0	0	0	0	0	58	100	3	0	3	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1	
				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)		0(0.0)	200	4(2.0)	0(0.0)	
		PC		100	0	17	0	0	0	17	0	17	79	100	0	0	0	-
				100	3	17	0	0	0	20	0	20		100	0	0	0	
				200	3(1.5)	34(17.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	37(18.5)	0(0.0)	37(18.5)		200	0(0.0)	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 (DMSO)

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

RCC: Relative Cell Count

Table 2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IIU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID
[Short-term treatment:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								RCC (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)							
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g		TAG(%)	Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge-ment	
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		0	100	100	0	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)		0(0.0)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		0(0.0)
		113	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	97	100	1	0	1	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	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)	0(0.0)		200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		225	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	94	100	0	0	0	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	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)	0(0.0)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		450	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	70	100	1	0	1	-
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	1		100	1	0	1		
			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)	1(0.5)		200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		900	100	0	2	0	0	0	2	1	3	3	-	52	100	1	0	1	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	0	
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)	3(1.5)		200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		PC	100	1	21	0	0	0	22	0	22	22	+	84	100	0	0	0	-
			100	6	18	0	0	0	23	0	23	23		100	0	0	0	0	
			200	7(3.5)	39(19.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	45(22.5)	0(0.0)	45(22.5)	45(22.5)		200	0(0.0)	0(0.0)	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 (DMSO)

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

RCC: Relative Cell Count



Table 3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IIU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID
[Continuous treatment:24hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									RCC (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)						
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge-ment	Cells observed	Polyloid cells	other	Total (%)	Judge-ment	
24-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	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)	0(0.0)	-	100	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		56.3		100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	101	100	0	0	0	-
				100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	101	100	0	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)	-	101	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		113		100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	83	100	0	0	0	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	83	100	0	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)	-	83	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		225		100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	76	100	1	0	1	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	76	100	0	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)	-	76	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-
		450		100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	54	100	0	0	0	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	54	100	0	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)	-	54	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		PC		100	0	23	0	0	0	23	0	23	+	103	100	0	0	0	-
				100	3	23	0	0	0	24	0	24	+	103	100	0	0	0	-
				200	3(1.5)	46(23.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	47(23.5)	0(0.0)	47(23.5)	+	103	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-

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

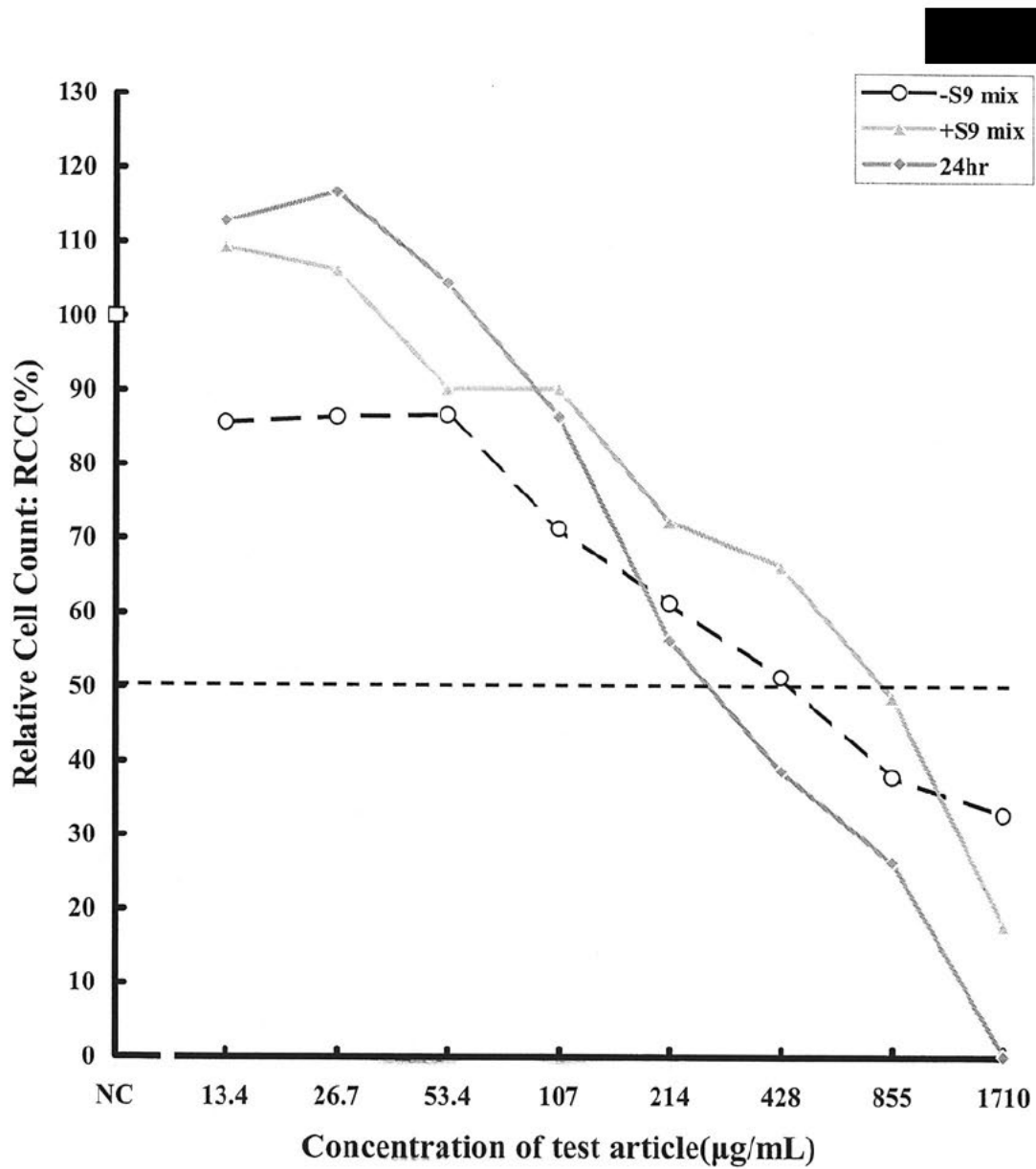
other: including fragmentation

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

NC: Negative control (DMSO)

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

RCC: Relative Cell Count



Appendix 1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

NC : Negative Control (DMSO)

Appendix 2-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

[Short-term treatment : -S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	RCC ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition ratio(%) ^{b)}	Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)				Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
		0 (NC)	100	0	-	-	-	-	
	6-18	Test article	13.4	86	14	-	-	-	-
			26.7	87	13	-	-	-	-
			53.4	87	13	+	-	-	-
			107	71	29	+	-	-	-
			214	61	39	+	-	-	-
			428	51	49	++	Light-orange	+	+
			855	38	62	+++	Light-orange	+	+
			1710	33	67	+++	Light-orange	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					461	µg/mL			

NC : Negative Control (DMSO)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) Cell-growth inhibition ratio was shown as 100 - RCC.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions 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.

All calculations were carried out using Excel 2010

Appendix 2-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

[Short-term treatment : +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	RCC ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition ratio(%) ^{b)}	Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)				Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
		0 (NC)	100	0	-	-	-	-	
+	6-18	Test article	13.4	109	0	-	-	-	-
			26.7	106	0	-	-	-	-
			53.4	90	10	+	-	-	-
			107	90	10	+	-	-	-
			214	72	28	+	-	-	-
			428	66	34	++	Light-orange	+	+
			855	49	51	+++	Light-orange	+	+
			1710	18	82	+++	Light-orange	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					830	µg/mL			

NC : Negative Control (DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) Cell-growth inhibition ratio was shown as 100 - RCC. The value was regarded as 0%, when value was less than or equal to zero.

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

All calculations were carried out using Excel 2010

Appendix 2-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

[Continuous treatment : 24hr]

Cell-growth inhibition test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	RCC ^{a)} (%)	Cell-growth inhibition ratio(% ^{b)}	Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)				Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)
		0 (NC)	100	0	-	-	-	-
		13.4	113	0	-	-	-	-
		26.7	117	0	-	-	-	-
		53.4	105	0	+	-	-	-
		107	87	13	+	-	-	-
		214	56	44	++	-	-	-
		428	39	61	++	Light-orange	+	+
		855	26	74	+++	Light-orange	+	+
		1710	0	100	TOX	Light-orange	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					290 µg/mL			

NC : Negative Control (DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) Cell-growth inhibition ratio was shown as 100 - RCC. The value was regarded as 0%, when value was less than or equal to zero.

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

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

+ : Presence of precipitates floating in the medium.

All calculations were carried out using Excel 2010

Appendix 3-1

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

[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	56.3	-	-	-	-
			113	-	-	-	-
			225	+	-	-	-
			450	+	Light-orange	+	+
		PC	-	-	-	-	

NC : Negative Control (DMSO)

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 solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.
- 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.
- 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 (5 or 6)-DECENOIC ACID

[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	113	-	-	-	-
			225	-	-	-	-
			450	++	Light-orange	+	+
			900	+++	Light-orange	+	+
		PC	-	-	-	-	

NC : Negative Control (DMSO)

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 solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.
- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 ++ : 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.

Appendix 3-3

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

[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)
		0 (NC)	-	-	-	-	
	24-0	Test article	56.3	-	-	-	
			113	-	-	-	-
			225	+	-	-	-
			450	++	Light-orange	+	+
		PC	-	-	-	-	

NC : Negative Control (DMSO)

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 solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.

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 4

Cell concentration and population doubling in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

[Short-term treatment : -S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts ^{a)} (×10 ⁶ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁶ cells/mL)	PD	RPD (%)	
S9 mix	time (hr)						
-	6-18	0 (NC)	0.148	0.371	1.33	100	
		Test article		13.4	0.318	1.10	83
				26.7	0.321	1.12	84
				53.4	0.322	1.12	84
				107	0.265	0.84	63
				214	0.228	0.62	47
				428	0.191	0.37	28
				855	0.141	-0.07	-5
				1710	0.122	-0.28	-21

[Short-term treatment : +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts ^{a)} (×10 ⁶ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁶ cells/mL)	PD	RPD (%)	
S9 mix	time (hr)						
+	6-18	0 (NC)	0.148	0.301	1.02	100	
		Test article		13.4	0.329	1.15	113
				26.7	0.320	1.11	109
				53.4	0.272	0.88	86
				107	0.272	0.88	86
				214	0.218	0.56	55
				428	0.200	0.43	42
				855	0.147	-0.01	-1
				1710	0.0537	-1.46	-143

[Continuous treatment : 24hr]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts ^{a)} (×10 ⁶ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁶ cells/mL)	PD	RPD (%)	
S9 mix	time (hr)						
-	24-0	0 (NC)	0.148	0.351	1.25	100	
		Test article		13.4	0.396	1.42	114
				26.7	0.410	1.47	118
				53.4	0.367	1.31	105
				107	0.304	1.04	83
				214	0.198	0.42	34
				428	0.136	-0.12	-10
				855	0.0928	-0.67	-54
				1710	0.000648	-7.84	-627

NC : Negative Control (DMSO)

The number of cells on the plate of each dose was measured using the auto cell counter at the time of start ^{a)} and end ^{b)} for treatment.

PD : Population Doubling was determined as;

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

All calculations were carried out using Excel 2010

Appendix 5

Cell survival ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with (5 or 6)-DECENOIC ACID

[Short-term treatment : -S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell counts ^{a)} (×10 ⁶ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁶ cells/mL)	RCC (%)	PD	RPD (%)
S9 mix	time (hr)							
-	6-18	0 (NC)		0.158	0.383	100	1.28	100
		Test article	56.3		0.349	91	1.14	89
			113		0.371	97	1.23	96
			225		0.347	91	1.14	89
			450		0.224	58	0.50	39
			PC		0.303	79	0.94	73

[Short-term treatment : +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell counts ^{a)} (×10 ⁶ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁶ cells/mL)	RCC (%)	PD	RPD (%)
S9 mix	time (hr)							
+	6-18	0 (NC)		0.158	0.395	100	1.32	100
		Test article	113		0.384	97	1.28	97
			225		0.372	94	1.24	94
			450		0.277	70	0.81	61
			900		0.206	52	0.38	29
			PC		0.331	84	1.07	81

[Continuous treatment : 24hr]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell counts ^{a)} (×10 ⁶ cells/mL)	Cell counts ^{b)} (×10 ⁶ cells/mL)	RCC (%)	PD	RPD (%)
S9 mix	time (hr)							
-	24-0	0 (NC)		0.158	0.400	100	1.34	100
		Test article	56.3		0.402	101	1.35	101
			113		0.332	83	1.07	80
			225		0.302	76	0.93	69
			450		0.215	54	0.44	33
			PC		0.410	103	1.38	103

NC : Negative Control (DMSO)

The number of cells on the plate of each dose was measured using the auto cell counter at the time of start ^{a)} and end ^{b)} for treatment. Cell counts were displayed as the mean of measured values.

PD : Population Doubling was determined as;

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

All calculations were carried out using Excel 2010