




# 最 終 報 告 書

イソオイゲニルメチ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 : 

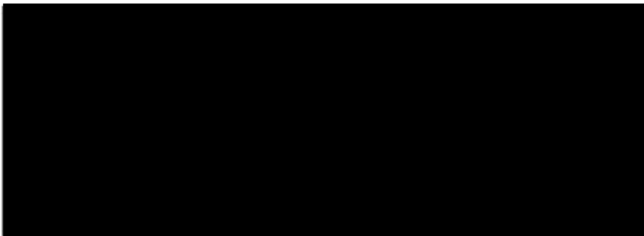
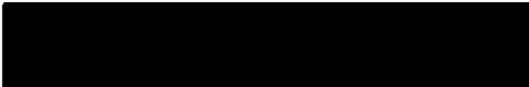
試験期間 : 

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 <sup>1)-5)</sup>	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 .....	21

図

Fig. 1	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL [Short-term treatment: -S9 mix] .....	22
Fig. 2	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL [Short-term treatment: +S9 mix] .....	23

表

Table 1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL [Short-term treatment: -S9 mix] .....	24
Table 2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL [Short-term treatment: +S9 mix] .....	25

付表

Appendix 1	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL .....	26
Appendix 2-1	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with	



METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment: -S9 mix] ..... 27

Appendix 2-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment: +S9 mix] ..... 28

Appendix 2-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

[Continuous treatment: 24hr] ..... 29

Appendix 3-1 Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment: -S9 mix] ..... 30

Appendix 3-2 Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment: +S9 mix] ..... 31

Appendix 3-3 Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

[Continuous treatment: 24hr] ..... 32

Appendix 4 Cell concentration and population doubling in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL ..... 33

Appendix 5 Cell survival ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL ..... 34



## 2. 試験実施概要

### 2.1 試験番号



### 2.2 試験表題

イソオイゲニルメチルエーテル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、イソオイゲニルメチルエーテル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	:	

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

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はなかつた。

2.11 資料保存

試験計画書原本（試験計画書変更書を含む）、記録文書、生データ、染色体標本及  
び報告書類（最終報告書の原本を含む）は [REDACTED]  
[REDACTED] の資料保存施設に最終報告書提出後 5 年間保存する。期間終了後の保存については、  
国立医薬品食品衛生研究所と [REDACTED] 間で協議し、その処置を  
決定する。

2.12 試験責任者の記名・押印及びその日付

[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]  
[REDACTED]

### 3. 要約


イソオイゲニルメチルエーテル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 1800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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、短時間処理法の代謝活性化では 113  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 225  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 67、185 及び 132  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と算出された。そのため、染色体異常試験における処理用量は、短時間処理法の代謝活性化では 88.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び連続処理法では 133  $\mu\text{g}/\text{mL}$  をそれぞれ最高用量とし、以下公比 1.5 で希釈した計 5 用量を設定し、試験を実施した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法の非代謝活性化では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。一方、代謝活性化では 39.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で TA 値が陽性の判定基準である 10%以上を示し、用量依存性も認められたことから陽性と判定した。

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、イソオイゲニルメチルエーテルは本試験条件下において染色体構造異常誘発能を有すると結論した。



#### 4. 緒言

国立医薬品食品衛生研究所の依頼により、イソオイゲニルメチルエーテル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。

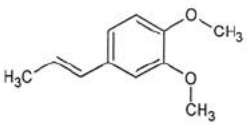
##### 1) 毒性試験ガイドライン

- 「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	:	イソオイゲニルメチルエーテル
英名	:	METHYL ISOEUGENOL
CAS 番号	:	93-16-3
構造式又は示性式	:	
分子式	:	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
分子量	:	178.22
性状	:	液体
ロット番号	:	██████████
融点	:	6°C
沸点	:	270°C
純度	:	98%
比重	:	1.051 (20°C/20°C)
入手量	:	37.1758 g (風袋込重量)
安定性	:	通常の条件下では、安定で自己集合性は無い
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180 mg/mLで溶解したことから、DMSOを溶媒として選択した。



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 : [REDACTED]

### 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 [REDACTED]) 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 [REDACTED]) 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 [REDACTED] 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 20 継代、染色体異常試験で 24 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

CO<sub>2</sub> インキュベータを用い、CO<sub>2</sub> 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]

#### 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]

#### 3) S9 mix の組成 (1 mL 中)

水 : 0.7 mL  
S9 : 0.3 mL  
MgCl<sub>2</sub> : 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 <sup>1)-5)</sup>

試験は以下に示したステージの順に実施した。なお、短時間処理法の代謝活性化において染色体構造異常の出現率に用量依存的な増加が認められ、陽性と判定されたため、連続処理法の標本観察は実施しなかった。

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 1800 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 900、450、225、113、56.3、28.1 及び 14.1 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	200, 133, 88.9, 59.3
短時間処理法 代謝活性化	88.9, 59.3, 39.5, 26.3
連続処理法 24 時間処理	133, 88.9, 59.3, 39.5

### 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  $2 \times 10^4$  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

- (1) 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。
- (2) PBS(-)を廃棄し、0.25% Trypsin 溶液を 1 mL 加え、約 5 分間静置した。
- (3) ピペ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。
- 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  $2 \times 10^4$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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 箇所へ滴下した。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<sup>1)</sup>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。

短時間処理法の代謝活性化では 113 µg/mL 以上、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 225 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 67、185 及び 132 µg/mL と算出された。

### 6.2 染色体異常試験

結果を Fig.1~2、Table 1~2、Appendix 3-1~3-3 及び Appendix 5 に示した。

#### 1) 析出の有無

##### (1) 処理直後

いずれの処理法もすべての用量で析出は認められなかった。

##### (2) 処理終了時

いずれの処理法もすべての用量で析出は認められなかった。

#### 2) 処理直後の培養液の色調確認

いずれの処理法もすべての用量で培養液の色調変化は認められなかった。

#### 3) 染色体異常の出現率

短時間処理法の非代謝活性化ではすべての用量で、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。一方、代謝活性化では 39.5 µg/mL 以上の用量で TA 値が陽性の判定基準である 10%以上を示した。なお、染色体構造異常を持つ細胞が 20%出現する推定被験物質濃度(SD<sub>20</sub>)及び交換型異常の頻度の比較値 (TR 値) は、SD<sub>20</sub>: 0.044 mg/mL、TR: 1000 と算出された。

染色体異常試験の結果、短時間処理法の非代謝活性化では TA 値及び倍数体の出現率に増加は認められなかったが、代謝活性化においては TA 値が 10%以上を示し、かつ用量依存的な TA 値の増加が認められたことから、総合的に陽性と判断した。


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、本被験物質の類縁物質である Isoeugenol は Ames 試験及び *In vivo* 小核試験でいずれも陰性、ヒトリンパ球を用いた姉妹染色体交換試験では 0.5 mM (82 µg/mL) で陽性と報告<sup>6)</sup>されている。

以上の結果から、イソオイゲニルメチルエーテルは本試験条件下において、代謝活



性化系存在下で染色体構造異常誘発能を有すると結論した。



## 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
- 6) <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1899.pdf>

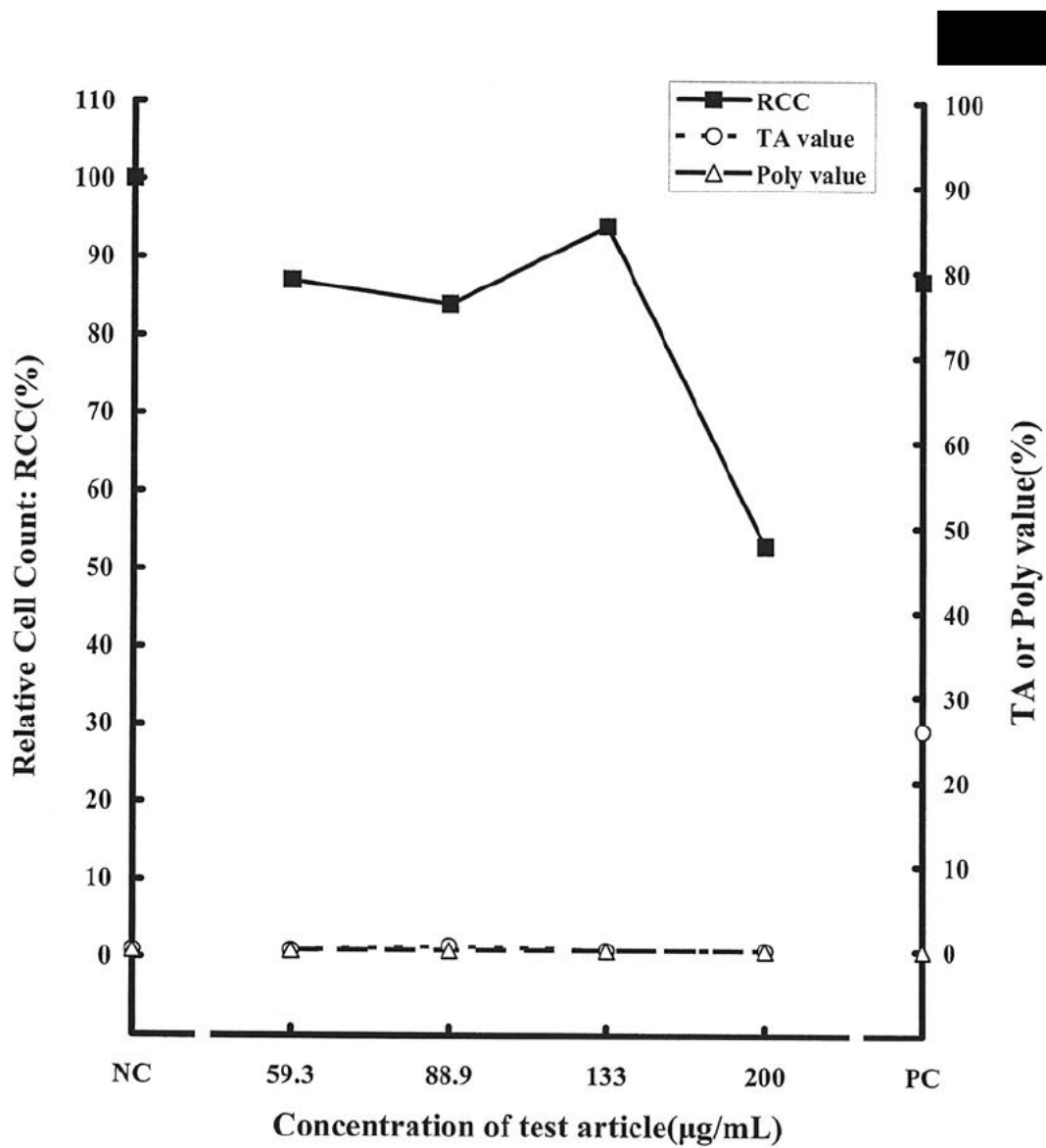


Fig. 1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment : -S9 mix]

NC : Negative Control (DMSO)

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

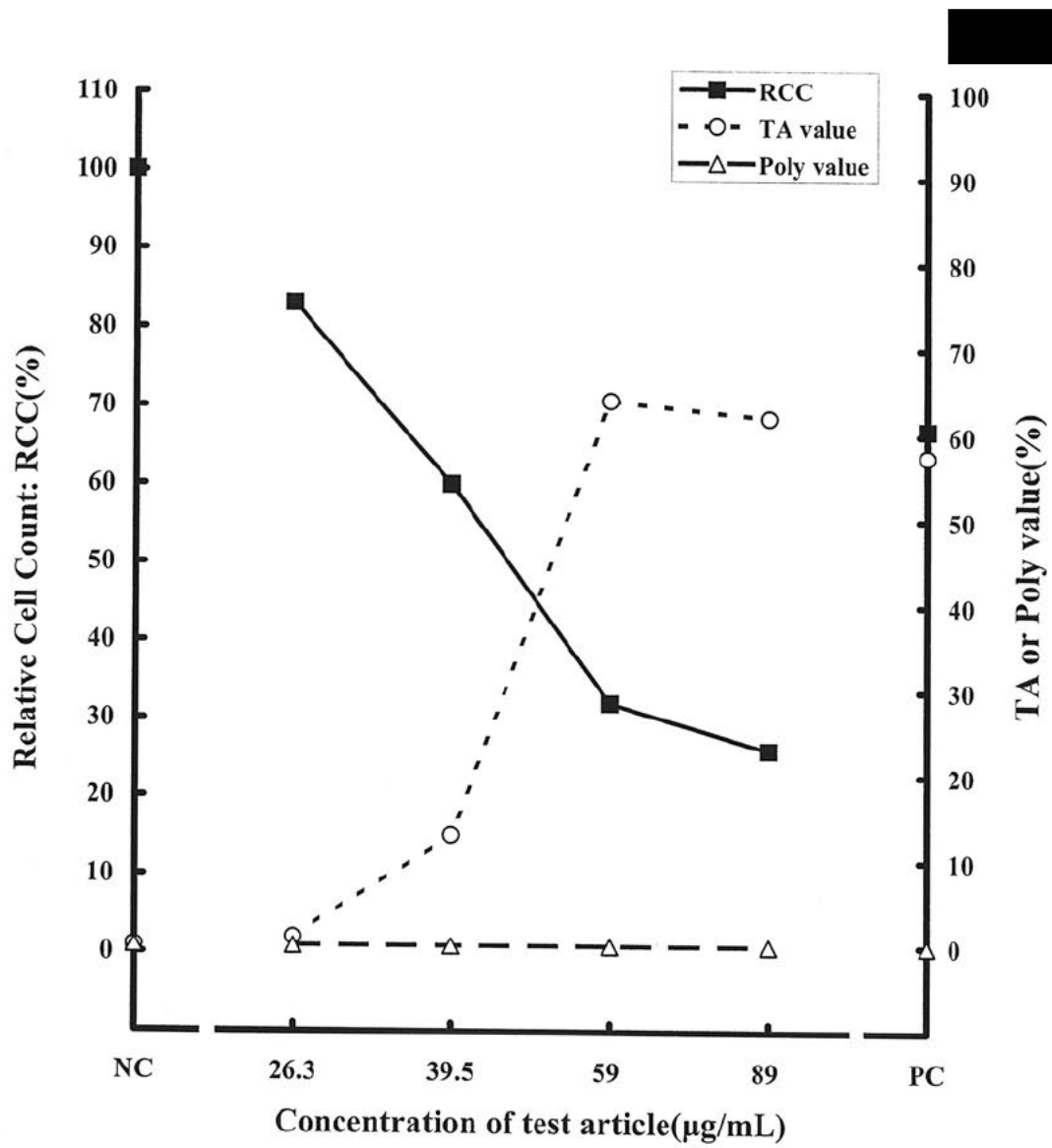


Fig. 2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

[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/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL  
[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	-	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)
		59.3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	87	100	0	0	0	-
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	87	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)	-	87	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
	88.9	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	84	100	0	0	0	-	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	84	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)	-	84	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	
	133	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	94	100	0	0	0	-	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	94	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)	-	94	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	
	200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	53	100	0	0	0	-	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	53	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)	-	53	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	
	PC	100	5	23	0	0	0	28	0	28	+	87	100	0	0	0	-	
	100	4	20	0	0	0	24	0	24	+	87	100	0	0	0	-		
	200	9(4.5)	43(21.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	52(26.0)	0(0.0)	52(26.0)	+	87	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, 0.075 µg/mL)

RCC: Relative Cell Count

Table 2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL  
[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 (%)				Judgement		
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)			
6-18	+	NC	100	0	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)	-
			100	0	2	0	0	0	2	0	2	0	-	83	100	0	0	0	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	83	100	0	0	0	-
			200	0(0.0)	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	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		26.3	100	2	14	0	0	0	16	0	16	+	60	100	0	0	0	-	
			100	0	10	0	0	0	10	0	10	+	60	100	0	0	0	-	
			200	2(1.0)	24(12.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	26(13.0)	0(0.0)	26(13.0)	+	60	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	
			100	6	63	0	0	0	66	0	66	+	32	100	0	0	0	-	
			76	14	40	0	0	0	45	0	45	+	32	76	0	0	0	-	
			24	2	16	0	0	0	17	0	17	+	32	24	0	0	0	-	
		39.5	200	22(11.0)	119(59.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	128(64.0)	0(0.0)	128(64.0)	+	32	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	
			52	4	29	0	0	0	30	0	30	+	26	52	0	0	0	-	
			48	4	29	0	0	0	32	0	32	+	26	48	0	0	0	-	
			77	5	47	0	0	0	48	0	48	+	26	77	0	0	0	-	
			23	0	14	0	0	0	14	0	14	+	26	23	0	0	0	-	
			200	13(6.5)	119(59.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	124(62.0)	0(0.0)	124(62.0)	+	26	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	
		59.3	100	2	54	0	0	0	55	0	55	+	67	100	0	0	0	-	
			100	8	55	0	0	0	60	0	60	+	67	100	0	0	0	-	
			200	10(5.0)	109(54.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	115(57.5)	0(0.0)	115(57.5)	+	67	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	
			100	2	54	0	0	0	55	0	55	+	67	100	0	0	0	-	
			100	8	55	0	0	0	60	0	60	+	67	100	0	0	0	-	
			200	10(5.0)	109(54.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	115(57.5)	0(0.0)	115(57.5)	+	67	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	
88.9	100	2	54	0	0	0	55	0	55	+	67	100	0	0	0	-			
	100	8	55	0	0	0	60	0	60	+	67	100	0	0	0	-			
	200	10(5.0)	109(54.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	115(57.5)	0(0.0)	115(57.5)	+	67	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-			
	100	2	54	0	0	0	55	0	55	+	67	100	0	0	0	-			
	100	8	55	0	0	0	60	0	60	+	67	100	0	0	0	-			
	200	10(5.0)	109(54.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	115(57.5)	0(0.0)	115(57.5)	+	67	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-			
PC	100	2	54	0	0	0	55	0	55	+	67	100	0	0	0	-			
	100	8	55	0	0	0	60	0	60	+	67	100	0	0	0	-			
	200	10(5.0)	109(54.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	115(57.5)	0(0.0)	115(57.5)	+	67	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-			
	100	2	54	0	0	0	55	0	55	+	67	100	0	0	0	-			
	100	8	55	0	0	0	60	0	60	+	67	100	0	0	0	-			
	200	10(5.0)	109(54.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	115(57.5)	0(0.0)	115(57.5)	+	67	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-			

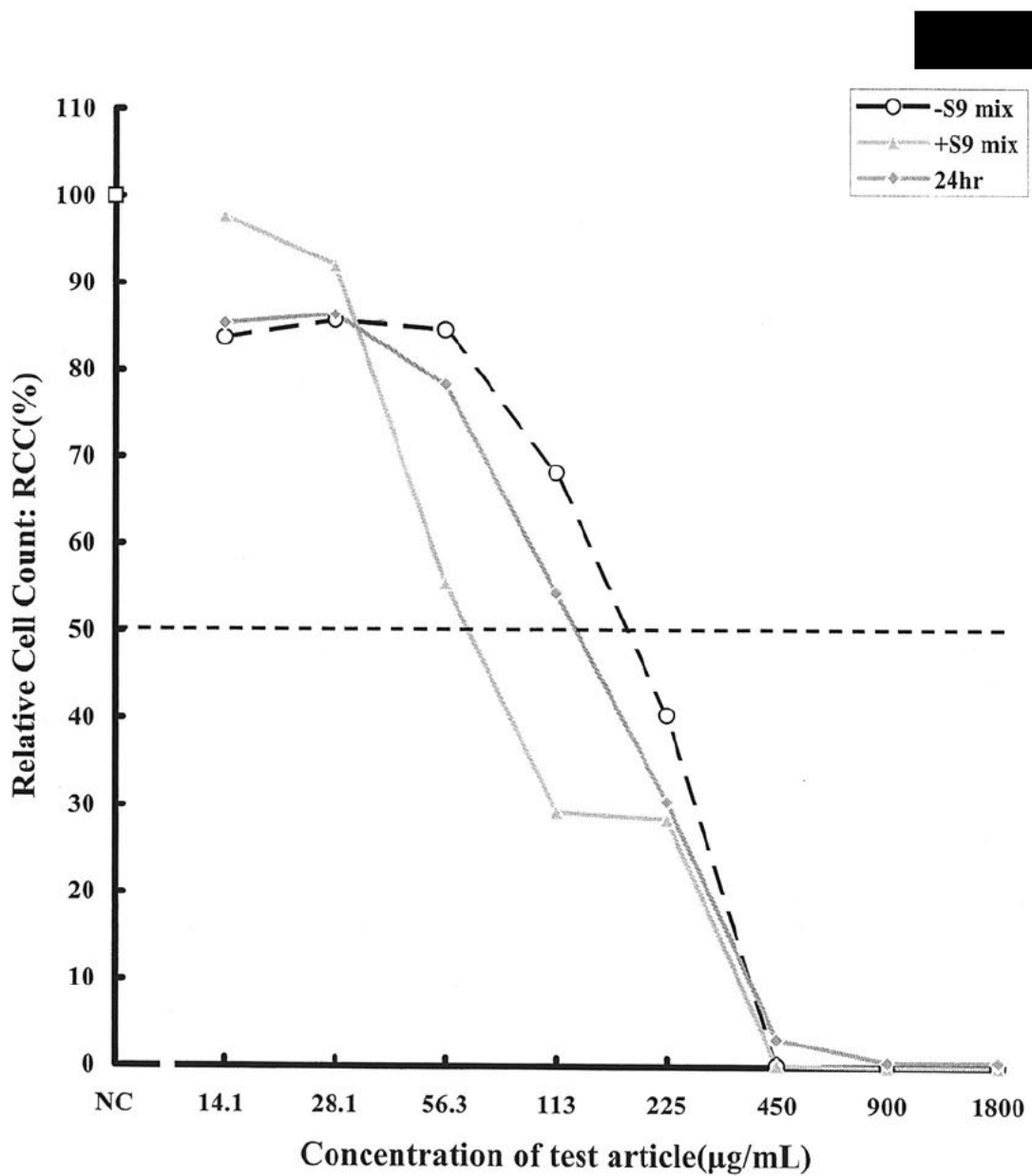
g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

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 (cyclophosphamide, 14 µg/mL)

RCC: Relative Cell Count



### Appendix 1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

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 METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment : -S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	RCC <sup>a)</sup> (%)	Cell-growth inhibition ratio(%) <sup>b)</sup>	Observation <sup>c)</sup>				
S9 mix	time (hr)				Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>f)</sup>		
							1)	2)	
		0 (NC)	100	0	-	-	-	-	
	6-18	Test article	14.1	84	16	-	-	-	-
			28.1	86	14	-	-	-	-
			56.3	85	15	+	-	-	-
			113	68	32	+	-	-	-
			225	40	60	++	-	-	-
			450	0	100	+++	-	+	+*
			900	0	100	+++	-	+	+*
			1800	0	100	+++	-	+	+*
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					<b>185</b>	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 <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>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.  
 +\* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

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 METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment : +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	RCC <sup>a)</sup> (%)	Cell-growth inhibition ratio(%) <sup>b)</sup>	Observation <sup>c)</sup>				
S9 mix	time (hr)				Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>f)</sup>		
							1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	100	0	-	-	-	-	
		Test article	14.1	98	2	-	-	-	-
			28.1	92	8	+	-	-	-
			56.3	55	45	++	-	-	-
			113	29	71	+++	-	-	-
			225	28	72	+++	-	-	-
			450	0	100	+++	-	+	+*
			900	0	100	+++	-	+	+*
			1800	0	100	+++	-	+	+*
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					<b>67</b>	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 <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>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.  
 +\* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

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 METHYL ISOEUGENOL

[Continuous treatment : 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	RCC <sup>a)</sup> (%)	Cell-growth inhibition ratio(%) <sup>b)</sup>	Observation <sup>c)</sup>				
S9 mix	time (hr)				Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>f)</sup>		
							1)	2)	
		0 (NC)	100	0	-	-	-	-	
	24-0	Test article	14.1	85	15	-	-	-	-
			28.1	86	14	-	-	-	-
			56.3	78	22	+	-	-	-
			113	54	46	++	-	-	-
			225	30	70	+++	-	-	-
			450	3	97	TOX	-	+	+*
			900	1	99	TOX	-	+	+*
			1800	1	99	TOX	-	+	+*
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					<b>132</b>	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 <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>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.

+\* : Presence of precipitates adhered to the bottom of the plate.

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 METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment : -S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation <sup>a)</sup>				
S9 mix	time (hr)		Condition of cells <sup>b)</sup>	Color of medium <sup>c)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>d)</sup>		
							1)
		0 (NC)	-	-	-	-	
-	6-18	Test article	59.3	+	-	-	-
			88.9	+	-	-	-
			133	++	-	-	-
			200	++	-	-	-
			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 <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>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

### Appendix 3-2

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment : +S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation <sup>a)</sup>				
S9 mix	time (hr)		Condition of cells <sup>b)</sup>	Color of medium <sup>c)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>d)</sup>		
							1)
		0 (NC)	-	-	-	-	
+	6-18	Test article	26.3	+	-	-	-
			39.5	++	-	-	-
			59.3	+++	-	-	-
			88.9	+++	-	-	-
		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 <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>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.  
 +++ : 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

### Appendix 3-3

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

[Continuous treatment : 24hr]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation <sup>a)</sup>				
S9 mix	time (hr)		Condition of cells <sup>b)</sup>	Color of medium <sup>c)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>d)</sup>		
							1)
		0 (NC)	-	-	-	-	
-	24-0	Test article	39.5	+	-	-	-
			59.3	+	-	-	-
			88.9	++	-	-	-
			133	++	-	-	-
		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 <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>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

#### Appendix 4

Cell concentration and population doubling in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment : -S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts <sup>a)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	Cell counts <sup>b)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	PD	RPD (%)	
S9 mix	time (hr)						
-	6-18	0 (NC)	0.132	0.443	1.75	100	
		Test article		14.1	0.371	1.49	85
				28.1	0.380	1.53	87
				56.3	0.375	1.51	86
				113	0.302	1.19	68
				225	0.179	0.44	25
				450	0.000648	-7.67	-438
				900	0.000	c)	c)
				1800	0.000	c)	c)

[Short-term treatment : +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts <sup>a)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	Cell counts <sup>b)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	PD	RPD (%)	
S9 mix	time (hr)						
+	6-18	0 (NC)	0.132	0.393	1.57	100	
		Test article		14.1	0.384	1.54	98
				28.1	0.362	1.46	93
				56.3	0.218	0.72	46
				113	0.115	-0.20	-13
				225	0.112	-0.24	-15
				450	0.000645	-7.68	-489
				900	0.000	c)	c)
				1800	0.000	c)	c)

[Continuous treatment : 24hr]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell counts <sup>a)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	Cell counts <sup>b)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	PD	RPD (%)	
S9 mix	time (hr)						
-	24-0	0 (NC)	0.132	0.466	1.82	100	
		Test article		14.1	0.398	1.59	87
				28.1	0.403	1.61	88
				56.3	0.365	1.47	81
				113	0.253	0.94	52
				225	0.142	0.11	6
				450	0.0148	-3.16	-174
				900	0.00257	-5.68	-312
				1800	0.00250	-5.72	-314

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 <sup>a)</sup> and end <sup>b)</sup> for treatment.

PD : Population Doubling was determined as;

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

c) There values were incalculable because of cytotoxicity.

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 METHYL ISOEUGENOL

[Short-term treatment : -S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell counts <sup>a)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	Cell counts <sup>b)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	RCC (%)	PD	RPD (%)
S9 mix	time (hr)							
-	6-18	0 (NC)		0.143	0.345	100	1.27	100
		Test article	59.3		0.299	87	1.06	83
			88.9		0.291	84	1.03	81
			133		0.324	94	1.18	93
			200		0.182	53	0.35	28
			PC		0.299	87	1.06	83

[Short-term treatment : +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell counts <sup>a)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	Cell counts <sup>b)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	RCC (%)	PD	RPD (%)
S9 mix	time (hr)							
+	6-18	0 (NC)		0.143	0.324	100	1.18	100
		Test article	26.3		0.268	83	0.91	77
			39.5		0.196	60	0.45	38
			59.3		0.103	32	-0.47	-40
			88.9		0.0857	26	-0.74	-63
			PC		0.216	67	0.60	51

[Continuous treatment : 24hr]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell counts <sup>a)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	Cell counts <sup>b)</sup> (×10 <sup>6</sup> cells/mL)	RCC (%)	PD	RPD (%)
S9 mix	time (hr)							
-	24-0	0 (NC)		0.143	0.396	100	1.47	100
		Test article	39.5		0.347	88	1.28	87
			59.3		0.366	92	1.36	93
			88.9		0.286	72	1.00	68
			133		0.132	33	-0.12	-8
			PC		0.358	90	1.32	90

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 <sup>a)</sup> and end <sup>b)</sup> 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