最 終 報 告 書

試験表題：２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナール
のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：17K5248G

試験期間：2017 年 11 月 16 日　～　2018 年 3 月 20 日

シミックファーマサイエンス株式会社

試験責任者署名：

[redacted]

2018 年 3 月 20 日

本報告書は表紙を含む 29 枚

目　次

（頁）

1. 要約 4
2. 試験表題 5
3. 試験番号 5
4. 試験目的 5
5. 試験委託者 5
6. 試験施設 5
7. 試験責任者 5
8. 担当責任者 5
9. 試験実施 5
10. GLP 及びガイドライン 6
11. 試験関係資料の保存 6
12. 被験物質及び対照物質 7
    12.1. 被験物質 7
    12.2. 陰性対照物質 7
    12.3. 陽性対照物質 8
13. 被験物質液の調製 8
    13.1. 溶媒 8
    13.2. 調製方法 8
14. 陽性対照物質の調製 9
15. 使用細胞 9
16. 培養液及び培養条件 9
17. S9 mix 10
    17.1. S9 10
    17.2. コファクター溶液の調製 10
    17.3. S9 mix の調製 10
18. 試験方法 10
    18.1. 試験構成 10
    18.2. 細胞増殖率 11
    18.3. 細胞増殖抑制試験 11
    18.4. 染色体異常試験 12
    18.5. 識別 13
    18.6. 統計学的処理 13
    18.7. 試験の成立条件 14
    18.8. 結果の評価 14
19. 試験結果及び考察 14
20. 結論 15
21. 試験の信頼性に影響をおよぼした要素 15

表 1　細胞増殖抑制試験結果表
表 2　細胞増殖抑制試験結果表（再試験）
表 3　染色体異常試験結果表（細胞増殖率）
表 4　染色体異常試験結果表（再試験，細胞増殖率）
表 5　細胞増殖抑制試験結果表（再々試験）
表 6　染色体異常試験結果表（再々試験，細胞増殖率）
表 7　染色体異常試験結果表（短時間処理法）
表 8　染色体異常試験結果表（連続処理法）

図 1　用量反応曲線（染色体異常試験）

写真 1，2　短時間処理法　代謝活性化存在下（陰性対照／被験物質，675 μg/mL）
写真 3，4　短時間処理法　代謝活性化非存在下（陰性対照／被験物質，483 μg/mL）
写真 5，6　短時間処理法　代謝活性化存在下（陰性対照／被験物質，650 μg/mL）

添付資料　陰性対照値及び陽性対照値の背景データから算出した基準値

1. 要約

２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナールの染色体異常誘発性を，雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞を用い，短時間処理法の代謝活性化非存在下，代謝活性化存在下及び連続処理法 24 時間処理により検討した．

細胞増殖抑制試験にて，本被験物質は短時間処理法の代謝活性化非存在下において 483 μg/mL の用量で，連続処理法 24 時間処理において 121～241 μg/mL の間で RPD が 50%付近となる増殖抑制が認められた．また本被験物質は，細胞増殖抑制試験，細胞増殖抑制試験（再試験）及び細胞増殖抑制試験（再々試験）にて，短時間処理法の代謝活性化存在下において 600～700 μg/mL の狭い濃度範囲で急激な細胞毒性を示した．染色体異常試験の用量段階は，短時間処理法の代謝活性化非存在下では 483 μg/mL を最高用量とした以下公比 2 の計 4 用量，短時間処理法の代謝活性化存在下では 700 μg/mL を最高用量とした以下等差 25 μg/mL の計 10 用量，連続処理法 24 時間処理では 201 μg/mL を最高用量とした以下公比 1.4 の計 5 用量にて実施した．

染色体の観察は，染色体異常試験において短時間処理法の代謝活性化非存在下では RPD が 50%付近となる最高用量 483 μg/mL から連続した 4 用量，短時間処理法の代謝活性化存在下及び連続処理法 24 時間処理では RPD が 50%付近となる用量を参考にそれぞれ 675 μg/mL から連続した 4 用量，144 μg/mL から連続した 4 用量で行った．また対照として，すべての処理条件に陰性対照及び陽性対照を設けた．その結果を以下に要約する．

1. 被験物質処理による染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は，短時間処理法の代謝活性化存在下において，RPD が 50%付近の用量 675 μg/mL で背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超え，陰性対照との差に有意性も認められた．またその増加に用量依存性が確認された．D_{20} 値は 0.957 mg/mL，TR 値は 8.4 を示した．連続処理法 24 時間処理において倍数体の出現頻度に有意な用量依存性が認められた．しかし，倍数体の出現頻度が 0～0.8%と背景データから算出した陰性対照の変動範囲内であること，陰性対照の倍数体の出現頻度が 0%と低いことから，この増加は偶発的なものであり生物学的に意味のある増加ではないと判断した．一方，短時間処理法の代謝活性化非存在下の 241 及び 483 μg/mL の用量，代謝活性化存在下の 650 μg/mL の用量にて，倍数体の出現頻度が，背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超え，陰性対照との差に有意性も認められた．また，代謝活性化非存在下では，その増加に用量依存性が確認された．以上のことから本被験物質は，染色体の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度について，生物学的に意味のある増加を示していると判断した．
2. 陰性対照の染色体の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は，すべての処理条件において，背景データから算出した陰性対照の変動範囲内を示した．
3. 陽性対照の染色体の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は，すべての処理条件において背景データから算出した陽性対照の変動範囲内を示した．また，陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を示した．これらの結果は，試験が適切に実施されたことを示す．

以上の結果より，本試験条件下において本被験物質は染色体異常誘発性は陽性と判定した．

2. 試験表題

２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験番号

17K5248G

4. 試験目的

２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナールの染色体異常誘発性を，雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞を用いて検討した.

5. 試験委託者

厚生労働省
医薬・生活衛生局医薬品審査管理課　化学物質安全対策室
〒100-8916　東京都千代田区霞が関 1-2-2
TEL 03-5253-1111　FAX 03-3593-8913

6. 試験施設

シミックファーマサイエンス株式会社　シミックバイオリサーチセンター
〒408-0044　山梨県北杜市小淵沢町 10221 番地
TEL 0551-36-2455　FAX 0551-36-3895

7. 試験責任者

[redacted]
非臨床事業部，研究本部，シミックファーマサイエンス株式会社

8. 担当責任者

試験操作
統計解析
被験物質管理　[redacted]

9. 試験実施

試験期間	2017 年 11 月 16 日　～　2018 年 3 月 20 日
試験開始日	2017 年 11 月 16 日
実験開始日	2017 年 11 月 16 日
実験終了日	2018 年 2 月 26 日
細胞解凍日	2017 年 11 月 16 日，2018 年 1 月 4 日，2018 年 1 月 25 日
溶解性試験実施日	2017 年 11 月 22 日
細胞増殖抑制試験	
細胞播種日	2017 年 11 月 24 日，2017 年 12 月 4 日，2018 年 2 月 9 日

被験物質処理日	2017年11月27日，2017年12月7日，2018年2月12日
毒性評価日	2017年11月28日，2017年12月8日，2018年2月13日

染色体異常試験

細胞播種日	2018年1月12日，2018年2月2日，2018年2月14日
被験物質処理日	2018年1月15日，2018年2月5日，2018年2月17日
標本作製日	2018年1月16, 17日，2018年2月6, 7日，2018年2月18, 19日
試験終了日	2018年3月20日

10. GLP及びガイドライン

遵守したGLP：

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

適用したガイドライン：

「新規化学物質等に係る試験の方法について」（薬食発0331第7号，平成23･03･29製局第5号，環保企発第110331009号，平成23年3月31日，薬生発1221第1号，20151209製局第1号，環保企発第1512211号，平成27年12月21日による一部改正）

11. 試験関係資料の保存

保存場所： 当試験施設，資料保存施設

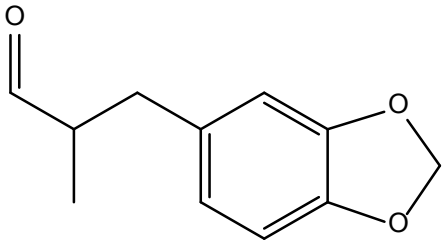
保存資料： 試験計画書（原本）
被験物質の受領，廃棄，管理に関する記録
被験物質の使用に関する記録
細胞の管理に関する記録
試験の実施に関する記録
最終報告書（原本）
その他GLPに規定される記録文書

保存期間： 試験終了後10年間保存

12. 被験物質及び対照物質

12.1. 被験物質

名称：２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナール
別名：2-Methyl-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionaldehyde
CAS 番号：1205-17-0
化審法官報公示整理番号：(5)-3560
示性式：$C_7H_5O_2CH_2CH(CH_3)CHO$
構造式：



ロット番号：NXYUL
製造元及び入手日：[redacted] 2017 年 10 月 26 日
使用量：1319.73 mg
純度：97.0%
不純物の名称及び濃度： 不明
分子量：192.21
沸点：154℃/0.8 kPa
常温における性状：わずかにうすい黄色～黄色の透明液体
安定性：保管条件下で安定
溶解性：水に不溶，ジメチルスルホキシドに可溶 [1)]
溶媒中での安定性：水及びジメチルスルホキシドに安定 [1)]
取扱い上の注意：刺激性
保存条件：密封，冷蔵（2～8℃）
保存場所：第 3 動物実験棟，検体調製室，低温保管庫（許容範囲：2～8℃）
保存期間：2017 年 10 月 26 日～2018 年 2 月 17 日
保存期間中の温度（実測値）：5～7℃
残余被験物質の管理：試験操作終了後，被験物質管理責任者に移管

1) 溶解性試験の結果による

12.2. 陰性対照物質

陰性対照物質は，被験物質液の調製に使用した下記の溶媒とした.

名称：日本薬局方注射用水
ロット番号：61101D（細胞増殖抑制試験，細胞増殖抑制再試験），70201D（細胞増殖抑制再々試験，染色体異常試験，染色体異常再試験，染色体異常再々試験）
供給元：扶桑薬品工業株式会社

12.3. 陽性対照物質

陽性対照物質は，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に汎用されている下記のものを使用した.

名称：Mitomycin C（以下 MMC と略す）
ロット番号：577AEE
供給元：協和発酵キリン株式会社

名称：Cyclophosphamide（以下 CP と略す）
ロット番号：4427
供給元：塩野義製薬株式会社

13. 被験物質液の調製

13.1. 溶媒

本被験物質の溶媒は，溶解性試験の結果より設定した．溶解性試験は，日本薬局方注射用水及びジメチルスルホキシド(以下 DMSO と略す) を溶媒に実施した. 溶解性試験の調製濃度は，本被験物質の分子量が 192.21 であることから，日本薬局方注射用水の場合は約 0.1 M に相当する 19.3 mg/mL，DMSO の場合は約 1.0 M に相当する 193 mg/mL とした.

所定量の被験物質を用時秤量した．これに 19.3 または 193 mg/mL の濃度になるよう各溶媒を加え，目視により発熱，発煙等の反応性の有無及び溶解性を確認した．その結果，本被験物質は日本薬局方注射用水に対して，超音波による分散により一様に懸濁し，懸濁液の培養液への添加でも一様に分散した．一方，本被験物質は DMSO に対して溶解したが，培養液への添加で一様に分散しなかった．また，被験物質と溶媒との反応性については，いずれの溶媒においても 認められなかった．従って，本被験物質はこれらの溶媒に対して安定であると判断した.

以上の結果より，被験物質の溶媒は一様な懸濁液が得られること，培養液への添加でも一様に分散すること，また反応が認められず本被験物質が安定であると判断されることから日本薬局方注射用水とした.

13.2. 調製方法

調製時期： 用時調製した.
純度換算： 純度換算を行った（秤量値×0.970）.
液量換算： 秤量した被験物質の液量を添加する溶媒の液量から除いた.
調製方法： 所定量の被験物質を秤量し，これに日本薬局方注射用水を加えて懸濁させ，超音波処理を 12 分間行い 19.3 mg/mL 液を調製した．低用量の被験物質液は，最高濃度の被験物質液を同様の日本薬局方注射用水を使用して段階希釈し調製した．使用後の残余被験物質液は，感染性廃棄物として廃棄した.

試験ごとの被験物質の秤量値，液量及び溶媒の添加量を下記に示す.

試験区分	秤量値(mg)	液量(mL)	添加量(mL)
細胞増殖抑制試験	141.80	0.120	7.007
細胞増殖抑制試験（再試験）	93.26	0.080	4.607
細胞増殖抑制試験（再々試験）	236.56	0.200	11.689

染色体異常試験	237.19	0.200	11.721
染色体異常試験（再試験）	252.33	0.200	12.482
染色体異常試験（再々試験）	237.69	0.200	11.746

14. 陽性対照物質の調製

陽性対照物質は，あらかじめ日本薬局方生理食塩液（Lot No. 60215D または Lot No. 7D261A，扶桑薬品工業株式会社）に MMC の場合は 5 μg/mL，CP の場合は 0.5 mg/mL の濃度で溶解させ-80℃に凍結保存したものを，用時に解凍して使用した．陽性対照物質液の培養液への添加量は1%の割合とし，処理濃度は，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に汎用されている下記の濃度とした．使用後の残余陽性対照物質液は，感染性廃棄物として廃棄した．

処　理　条　件	陽性対照物質	処理濃度（μg/mL）
短時間処理法の代謝活性化非存在下	MMC	0.05
短時間処理法の代謝活性化存在下	CP	5.0
連続処理法の代謝活性化非存在下（24 時間処理）	MMC	0.05

15. 使用細胞

試験には，自然発生の染色体異常発現率が低く，細胞の安定性及び再現性が良く，染色体が比較的大きく数も少なく（染色体数モード 25 本），多くの化学物質に対して感受性が高く，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に汎用されている下記の細胞を使用した．

細胞：雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞
購入先：DS ファーマバイオメディカル株式会社
受領日： 2017 年 8 月 22 日
細胞周期：11.2 時間
マイコプラズマ：陰性
染色体数モード：25 本
継代数： 21（細胞増殖抑制試験，染色体異常試験，染色体異常試験　再試験），
22（細胞増殖抑制試験　再試験），23（細胞増殖抑制試験　再々試験），
25（染色体異常試験　再々試験）

16. 培養液及び培養条件

試験に使用した培養液の組成を，下記に示す．細胞は，60 mm プレートを用い 37℃，CO_2 濃度 5%の炭酸ガス培養器（BAN-111，タバイエスペック）で培養した．

Eagle の MEM 液体培地, Lot No. TWL7005，TWJ7025，TWG7010（和光純薬工業株式会社）	445 mL
ペニシリン（5000 units/mL）及びストレプトマイシン（5000 μg/mL） Lot No. 1864851，1881461（Gibco）	5 mL
牛胎児血清，非働化済 Lot No. AZM197211（Hyclone）	50 mL

17. S9 mix

17.1. S9

S9 は，オリエンタル酵母工業株式会社より購入した下記のラット肝 S9 を用いた．S9 は，使用するまで-80℃に保存した．

使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系
性，週齢／体重範囲	雄，7 週齢／204.4 ± 8.2 g, 208.4 ± 9.6 g, 210.8 ± 10.1 g
ロット番号	17080405, 17112409, 17121510
製造日	2017 年 8 月 4 日, 2017 年 11 月 24 日, 2017 年 12 月 15 日
誘導物質	Phenobarbital (PB) 及び 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量及び投与回数	PB: 30 mg/kg 1 回（1 日目） 60 mg/kg 3 回（2～4 日目） BF: 80 mg/kg 1 回（3 日目）
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	19.8 mg/mL S9, 22.2 mg/mL S9, 19.6 mg/mL S9

17.2. コファクター溶液の調製

コファクターは，グルコース-6-リン酸（G-6-P）及び NADP（オリエンタル酵母工業株式会社）を使用した．所定量のコファクターを用時に秤量し，それぞれ日本薬局方注射用水に溶解して $MgCl_2$ 溶液，KCl 溶液及び HEPES 緩衝液（pH 7.2）と下記の割合で混合し，濾過滅菌（φ 0.22 µm, Millipore）した．調製したコファクター溶液は，使用するまで冷蔵下で保存した．

20 mmol/L HEPES 緩衝液（pH 7.2）	2 mL
50 mmol/L $MgCl_2$	1 mL
330 mmol/L KCl	1 mL
50 mmol/L G-6-P	1 mL
40 mmol/L NADP	1 mL
日本薬局方注射用水	1 mL

17.3. S9 mixの調製

-80℃に凍結保存した S9 を用時に解凍し，コファクターと 3：7 の割合で混合し S9 mix とした．S9 mix 1 mL 中の組成を以下に示す．調製した S9 mix は，使用するまで冷蔵下で保存した．

S9	0.3 mL
$MgCl_2$	5 µmol
KCl	33 µmol
G-6-P	5 µmol
NADP	4 µmol
HEPES 緩衝液（pH 7.2）	4 µmol

18. 試験方法

18.1. 試験構成

試験は，細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験により実施し，染色体異常試験の用量段階は，細胞増殖抑制試験の結果より設定した．

細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験は，短時間処理法の代謝活性化非存在下，代謝活性化存在下及び連続処理法24時間処理により実施した．細胞増殖抑制試験では，被験物質処理の用量あたりのプレート数は 1 枚とし，対照として陰性対照を設けた．染色体異常試験では，被験物質処理の用量あたりのプレート数は3枚とし，2枚を染色体標本の作製に，1枚を細胞増殖率の算出に用いた．対照として，すべての処理条件に陰性対照及び陽性対照を設けた．陰性対照及び陽性対照のプレート数は，被験物質処理と同様とした．なお，陽性対照は，同日に実施した試験と共有した．

18.2. 細胞増殖率

細胞増殖率は，被験物質処理開始時及び被験物質処理後の培養終了時の細胞数から算出する相対的細胞集団倍加指数（RPD）とした．被験物質処理開始時の細胞数は，陰性対照，被験物質及び陽性対照とは異なる，被験物質処理開始時の細胞数測定用に用意した 1 プレートで計測した．

RPD＝ (細胞集団倍加数 T÷細胞集団倍加数 C)×100
細胞集団倍加数：[log (培養終了時細胞数÷処理開始時細胞数)]／log2
細胞集団倍加数 T：被験物質処理群の細胞集団倍加数
細胞集団倍加数 C：陰性対照の細胞集団倍加数

18.3. 細胞増殖抑制試験

18.3.1. 用量段階

細胞増殖抑制試験の用量段階は，10 mM に相当する 1930 μg/mL を最高用量とした以下公比 2 の計 10 用量とした．陰性対照及び被験物質液の添加量は，培養液の 10%とした．

18.3.2. 被験物質処理

4×10^3 細胞/mL の細胞浮遊液 5 mL を播種し，3 日間培養した．培養後，用意した細胞数計測用のプレートの細胞数を計測した．短時間処理法の代謝活性化非存在下では培養液を抜き取り 2.7 mL とし，これに被験物質液を 0.3 mL 添加した．短時間処理法の代謝活性化存在下では，培養液を抜き取り 2.2 mL とし，これに S9 mix 0.5 mL 及び被験物質液を 0.3 mL 添加した．被験物質添加後細胞を 6 時間培養し，6 時間後に細胞をダルベッコリン酸緩衝液（pH 7.1）で洗い，新鮮な培養液 5 mL を加え，さらに約 18 時間培養した後細胞数を計測した．連続処理法 24 時間処理では，培養液を 4.5 mL とした後に被験物質液を 0.5 mL 添加し，24 時間培養した後細胞数を計測した．被験物質の析出の有無は被験物質添加時及び培養終了時に観察し，培養終了時の観察を析出の評価とした．

18.3.3. 細胞増殖率の算出

0.1%EDTA-1.25%トリプシンで細胞を回収し，細胞数を計測した．得られた細胞数より，各用量の RPD を算出した．50%以下の RPD が観察された場合は，50%の RPD を挟む 2 点間を結ぶ直線から概略の 50%細胞増殖抑制濃度（IC_{50}）を算出した．

18.4. 染色体異常試験

18.4.1. 用量段階

細胞増殖抑制試験の結果を表 1，細胞増殖抑制試験（再試験）の結果を表 2，染色体異常試験の細胞増殖率を表 3，染色体異常試験（再試験）の細胞増殖率を表 4，細胞増殖抑制試験（再々試験）の結果を表 5 に示した．

本被験物質は，いずれの処理条件においても析出は観察されなかった．細胞増殖抑制試験の結果，短時間処理法の代謝活性化非存在下及び連続処理法 24 時間処理では 965 μg/mL 以上の用量において細胞が認められなかった. また短時間処理法の代謝活性化非存在下において 483 μg/mL の用量で，連続処理法 24 時間処理において 121～241 μg/mL の間で RPD が 50%付近となる増殖抑制が認められた．IC_{50} は短時間処理法の代謝活性化非存在下では 366 μg/mL，連続処理法 24 時間処理では 164 μg/mL であった．

一方，短時間処理法の代謝活性化存在下において 1930 μg/mL の用量で急激な細胞毒性が認められ，RPD が 50%付近の増殖抑制となる用量の予測が難しいことから，1608 μg/mL を最高用量とした以下公比 1.2 の計 4 用量で細胞増殖抑制試験（再試験）を実施した．その結果，最高用量 1608 μg/mL でも RPD が 50%以下となる増殖抑制は認められず，より狭い範囲での急激な細胞毒性が予想された．このことから短時間処理法の代謝活性化存在下の染色体異常試験の用量段階は RPD が 50%付近の増殖抑制となる用量を含むよう 1830 μg/mL を最高用量とした以下等差 100 μg/mL の計 5 用量で行ったが，強い細胞毒性が認められ，染色体観察の用量を確保できなかった. 次に 1700 μg/mL を最高用量とした以下等差 50 μg/mL の計 8 用量で染色体異常試験（再試験）を実施したところ，全用量で細胞が認められなかった．このように，代謝活性化存在下の細胞増殖抑制試験と染色体異常試験で再現性が得られないこと，狭い濃度範囲での急激な細胞毒性により RPD が 50%付近の増殖抑制となる用量の予測が困難であることから, 再度用量段階を変更し，1300 μg/mL を最高用量とした以下等差 100 μg/mL の計 10 用量で細胞増殖抑制試験（再々試験）を実施した. その結果, 700 μg/mL 以上の用量において細胞が認められず, 600 μg/mL にて RPD が 50%以下となる増殖抑制は認められなかったが, 用量設定の範囲を狭めることができた．IC_{50} は 629.9 μg/mL であった．

以上の結果より，染色体異常試験の用量段階は，短時間処理法の代謝活性化非存在下では 483 μg/mL を最高用量とした以下公比 2 の計 4 用量, 短時間処理法の代謝活性化存在下では RPD が 50%付近となる用量を含むように 700 μg/mL を最高用量とした以下等差 25 μg/mL の計 10 用量，連続処理法 24 時間処理では RPD が 50%付近となる用量を含むよう 201 μg/mL を最高用量とした以下公比 1.4 の計 5 用量にて実施した．

18.4.2. 試験操作

被験物質処理及び細胞増殖率の算出は，18.3.2. 項及び18.3.3. 項と同様に行った．

18.4.3. 染色体標本の作製

細胞の回収約 2 時間前に，コルセミド（Gibco）を 0.2 μg/mL の濃度で添加した．約 2 時間後 0.1% EDTA 添加 1.25%トリプシン処理で細胞を回収し，1000 rpm で 5 分間遠心して上清を取り除いた．0.075 mol/L 塩化カリウム液を加えて 10 分低張処理し，カルノア固定液（メタノール 3：酢酸 1）で固定した．固定した細胞をスライドグラス上に滴下し，空気乾燥させた．プレート

当たり 2 枚の染色体標本を作製した．スライドグラスには，プレート番号を記入し, 乾燥後 2%ギムザ液で 20 分間染色した.

18.4.4. 観察対象

染色体の観察は，短時間処理法の代謝活性化非存在下では 483 μg/mL にて RPD が 48.2%となる増殖抑制を示したことから 483 μg/mL を最高用量とした連続した 4 用量（60.3, 121, 241, 483 μg/mL），短時間処理法の代謝活性化存在下では 675 μg/mL にて RPD が 49.0%となる増殖抑制を示したことから 675 μg/mL を最高用量とした連続した 4 用量（600, 625, 650, 675 μg/mL），連続処理法 24 時間処理では 144 μg/mL にて RPD が 42.7%となる増殖抑制を示したことから 144 μg/mL から連続した 4 用量（52.3, 73.3, 103, 144 μg/mL）で行った.

18.4.5. 染色体観察

染色体の観察は，乱数を用いたコード番号を付した盲検法で行った．また，染色体の観察は短時間処理法を先に，次に連続処理法の順で行った．染色体の構造異常は，1 プレート当たり 150 個，1 用量あたり 300 個の良く拡がった分裂中期細胞（染色体数：23～27 本）を倍率 1000 倍の顕微鏡下で観察した．数的異常は，倍率 200 倍の顕微鏡下でプレートあたり 200 個，1 用量あたり 400 個を観察した．染色体異常の分類及び型を以下に示す．構造異常を持つ細胞は，ギャップのみを有する細胞を含めた場合（+gap）と，含めない場合（-gap）に区別して集計し，染色体観察結果の評価は，ギャップのみを有する細胞を含めない染色体異常を有する細胞の出現頻度（-gap）により行った.

染色体異常の分類		異常の型
構造異常	染色分体型異常	染色分体型切断（ctb），染色分体型交換（cte）
	染色体型異常	染色体型切断（csb），染色体型交換（cse）
	その他の異常	断片化（frg），多数の異常（mul）
数的異常（モード数が 38 本以上）		倍数体（pol），核内倍加（end）

18.5. 識別

プレートには，外側面に油性インキペンを用いてプレート番号を表示した．スライドグラスには試験番号，処理条件，スライド番号及び標本作製日を表示したラベルを貼付した．また，観察対象のスライドには，試験番号，処理条件，コード番号及び標本作製日を表示したラベルを貼付した．コード番号は，乱数（Microsoft® Excel）を用いて無作為に割り付けた.

18.6. 統計学的処理

被験物質処理及び陽性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度について，用量ごとに Yates の補正を伴う χ^2 検定を使用し，陰性対照との差の有意性を有意水準片側 5%で解析した．被験物質処理については，用量反応性を Cochran-Armitage trend test（有意水準片側 5%，陰性対照を含む）で解析した.

18.7. 試験の成立条件

下記の条件を満たしている場合に，試験は成立とした.

1) 陰性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度が，背景データの陰性対照（添付資料）の変動範囲内にある.
2) 陽性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度が，背景データの陽性対照（添付資料）の変動範囲内にある.
3) 陽性対照の構造異常を有する細胞の出現頻度が，陰性対照と比較して統計学的に有意に増加している.
4) 被験物質処理において，分裂中期細胞 300 個を観察した用量が 3 用量以上ある.

18.8. 結果の評価

構造異常及び数的異常は，構造異常を有する細胞または倍数体の出現頻度が背景データの陰性対照の変動範囲を超え，かつ陰性対照と比較して統計学的に有意に増加し，その増加に用量依存性が認められた場合に陽性と判定した．構造異常を有する細胞または倍数体の出現頻度が背景データの陰性対照の変動範囲内で，かつ陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められず，用量反応性も認められない場合は陰性と判定した．構造異常において陽性と判定した場合は，20%の細胞に構造異常が出現する濃度（mg/mL）を示す D_{20} 値及び 1 mg/mL あたりの染色分体型交換異常の出現頻度を示す TR 値を算出した.

19. 試験結果及び考察

２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナールの染色体異常誘発性を，雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞を用い，短時間処理法の代謝活性化非存在下，代謝活性化存在下及び連続処理法 24 時間処理により検討した.

本被験物質は, 染色体異常試験においてすべての処理条件で RPD が 50%以下となる増殖抑制が認められた．また，いずれの処理条件においても被験物質の析出は観察されなかった.

染色体の観察は, 短時間処理法の代謝活性化非存在下では RPD が 50%付近となる増殖抑制が認められた最高用量 483 μg/mL から連続した 4 用量（60.3, 121, 241, 483 μg/mL），短時間処理法の代謝活性化存在下及び連続処理法 24 時間処理では RPD が 50%付近となる増殖抑制が認められたそれぞれ 675 μg/mL から連続した 4 用量（600, 625, 650, 675 μg/mL），144 μg/mL から連続した 4 用量（52.3, 73.3, 103, 144 μg/mL）で行った．またすべての処理条件に陰性対照及び陽性対照を設けた．染色体異常試験の細胞増殖率を表 3 に，染色体異常試験（再々試験）の細胞増殖率を表 6 に，染色体異常試験の結果を表 7, 8 及び図 1 に示す.

染色体の観察において，染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度では，短時間処理法の代謝活性化存在下において RPD が 49.0%となる増殖抑制を示す用量（675 μg/mL）で 5.7%と背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えて増加し，陰性対照との差に有意性も認められた．またその増加に用量依存性が確認された. D_{20} 値は短時間処理法の代謝活性化存在下で 0.957 mg/mL，TR 値は 8.4 を示した.

連続処理法24時間処理において倍数体の出現頻度に有意な用量依存性が認められたが，倍数体の出現頻度が 0～0.8%と背景データから算出した陰性対照の変動範囲内であること，陰性対照の倍数体の出現頻度が 0%と低いことから，この増加は偶発的なものであり生物学的に意味

のある増加ではないと判断した．一方，短時間処理法の代謝活性化非存在下では RPD が 48..2～52.0%となる増殖抑制を示す用量（241～483 μg/mL），代謝活性化存在下では RPD が 73.4%となる増殖抑制を示す用量（650 μg/mL）にて，倍数体の出現頻度が背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超え，陰性対照との差に有意性も認められた．また，短時間処理法の代謝活性化非存在下ではその増加に用量依存性が確認された．なお，代謝活性化存在下で観察された倍数体は核内倍加であった．以上のことから本被験物質は，染色体の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度について，生物学的に意味のある増加を示していると判断した．また染色体異常の代表例及び陰性対照の染色体の写真を写真 1～6 に示した．

陰性対照の構造異常出現頻度は 0.3%～1.0%，数的異常出現頻度は 0%を示し，いずれの処理条件においても背景データから算出した陰性対照の変動範囲内であった．陽性対照の構造異常出現頻度は，13.3%～29.7%を示し，いずれの処理条件においても背景データの陽性対照の変動範囲内であった．また，陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を示した．これらの結果は，試験が適切に実施されたことを示す．

20. 結論

２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナールの雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した．

21. 試験の信頼性に影響をおよぼした要素

該当する事項はなかった．

表１　　２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナールの細胞増殖抑制試験

Study No. 17K5248G

用量 (μg/mL)	短時間処理法						連続処理法24時間処理		
	S9 mix (-)			S9 mix (+)					
	細胞増加数 ($\times 10^4$cells)	RPD (%)	IC_{50} (μg/mL)	細胞増加数 ($\times 10^4$cells)	RPD (%)	IC_{50} (μg/mL)	細胞増加数 ($\times 10^4$cells)	RPD (%)	IC_{50} (μg/mL)
陰性対照	163.8	100	366	102.5	100	1177	133.8	100	164
3.77	181.3	106.2		78.8	83.1		117.5	92.0	
7.54	113.8	79.5		113.8	107.2		147.5	106.4	
15.1	125.0	84.5		106.3	102.4		106.3	86.0	
30.2	115.0	80.0		106.3	102.4		133.8	100.0	
60.3	97.5	71.6		111.3	105.7		110.0	88.1	
121	102.5	74.1		116.3	108.7		82.5	72.2	
241	75.0	59.5		96.3	95.8		18.8	21.5	
483	50.0	43.7		65.0	72.2		11.3	13.5	
965	0.0	---		62.5	70.1		0.0	---	
1930	0.0	---		0.0	---		0.0	---	

陰性対照: 日本薬局方注射用水
RPD: 相対的細胞集団倍加指数

表 2　　２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナールの細胞増殖抑制試験（再試験）

Study No. 17K5248G

用量 (μg/mL)	短時間処理法		
	S9 mix (+)		
	細胞増加数 ($\times 10^4$cells)	RPD (%)	IC_{50} (μg/mL)
陰性対照	130.0	100	---
931	96.3	82.1	
1117	127.5	98.8	
1340	80.0	72.2	
1608	105.0	87.0	

陰性対照: 日本薬局方注射用水

RPD: 相対的細胞集団倍加指

表 3　２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナールの染色体異常試験（細胞増殖率）

Study No. 17K5248G

短時間処理法								連続処理法24時間処理			
S9 mix (-)				S9 mix (+)							
用量 (μg/mL)	細胞増加数 ($\times 10^4$cells)	RPD (%)	IC_{50} (μg/mL)	用量 (μg/mL)	細胞増加数 ($\times 10^4$cells)	RPD (%)	IC_{50} (μg/mL)	用量 (μg/mL)	細胞増加数 ($\times 10^4$cells)	RPD (%)	IC_{50} (μg/mL)
陰性対照	68.8	100	347.5	陰性対照	72.5	100	1480.4	陰性対照	100.0	100	114.1
60.3	65.0	95.9		1430	75.0	102.5		52.3	100.0	100.0	
121	50.0	78.7		1530	0.0	---		73.3	62.5	71.7	
241	30.0	52.0		1630	0.0	---		103	42.5	53.2	
483	27.5	48.2		1730	0.0	---		144	32.5	42.7	
				1830	0.0	---		201	22.5	31.2	

陰性対照: 日本薬局方注射用水
RPD: 相対的細胞集団倍加指数

表 4　　2－メチル－3－(3, 4－ジオキシフェニル)－プロパナールの染色体異常試験(再試験, 細胞増殖率)

Study No. 17K5248G

用量 (μg/mL)	短時間処理法		
	S9 mix (+)		
	細胞増加数 ($\times 10^4$cells)	RPD (%)	IC_{50} (μg/mL)
陰性対照	110.0	100	---
1350	0.0	---	
1400	0.0	---	
1450	0.0	---	
1500	0.0	---	
1550	0.0	---	
1600	0.0	---	
1650	0.0	---	
1700	0.0	---	

陰性対照: 日本薬局方注射用水
RPD: 相対的細胞集団倍加指数

表 5　　２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナールの細胞増殖抑制試験（再々試験）

Study No. 17K5248G

用量 (μg/mL)	短時間処理法		
	S9 mix (+)		
	細胞増加数 ($\times 10^4$cells)	RPD (%)	IC_{50} (μg/mL)
陰性対照	128.8	100	629.9
400	122.5	96.9	
500	121.3	96.3	
600	80.0	73.0	
700	0.0	---	
800	0.0	---	
900	0.0	---	
1000	0.0	---	
1100	0.0	---	
1200	0.0	---	
1300	0.0	---	

陰性対照: 日本薬局方注射用水
RPD: 相対的細胞集団倍加指数

表 6　　2－メチル－3－(3, 4－ジオキシフェニル)－プロパナールの染色体異常試験(再々試験, 細胞増殖率)

Study No. 17K5248G

用量 (μg/mL)	短時間処理法		
	S9 mix (+)		
	細胞増加数 ($\times 10^4$cells)	RPD (%)	IC_{50} (μg/mL)
陰性対照	128.8	100	674.5
475	105.0	87.2	
500	127.5	99.3	
525	97.5	82.8	
550	112.5	91.4	
575	103.8	86.4	
600	108.8	89.3	
625	87.5	76.6	
650	82.5	73.4	
675	48.8	49.0	
700	0.0	---	

陰性対照: 日本薬局方注射用水
RPD: 相対的細胞集団倍加指数

表 7　　染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称　2－メチル－3－（3，4－ジオキシフェニル）－プロパナール　　Study No. 17K5248G

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質の用量 (μg/mL)		染色体構造異常の細胞数（出現頻度%） 観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数（%）		ギャップの出現数	細胞増殖率 RPD(%)	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度%） 観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)	
				150	2	0	1	0	0	2		0		200	0	0	0	
6-18	-	陰性対照（日本薬局方注射用水）		150	1	0	0	0	0	1		0	100	200	0	0	0	
			合計	300	3	0	1	0	0	3	(1.0)	0		400	0	0	0	(0.0)
				150	2	0	1	0	0	3		1		200	2	0	2	
6-18	-	60.3		150	1	1	0	0	0	2		0	95.9	200	0	0	0	
			合計	300	3	1	1	0	0	5	(1.7)	1		400	2	0	2	(0.5)
				150	2	0	0	0	0	2		0		200	2	0	2	
6-18	-	121		150	0	0	0	0	0	0		1	78.7	200	1	0	1	
			合計	300	2	0	0	0	0	2	(0.7)	1		400	3	0	3	(0.8)
				150	2	0	1	0	0	3		0		200	4	0	4	
6-18	-	241		150	2	0	0	0	0	2		0	52.0	200	1	0	1	
			合計	300	4	0	1	0	0	5	(1.7)	0		400	5	0	5	(1.3)*
				150	1	0	0	0	0	1		0		200	2	0	2	
6-18	-	483		150	0	0	0	0	0	0		1	48.2	200	3	0	3	
			合計	300	1	0	0	0	0	1	(0.3)	1		400	5	0	5	(1.3)*
		陽性対照		150	9	14	0	0	0	21		0		200	0	0	0	
6-18	-	（MMC）		150	13	7	2	0	0	19		0	62.8	200	0	0	0	
		0.05	合計	300	22	21	2	0	0	40	(13.3) *	0		400	0	0	0	(0.0)
		陰性対照		150	2	0	0	0	0	2		0		200	0	0	0	
6-18	+	（日本薬局方		150	0	1	0	0	0	1		0	100	200	0	0	0	
		注射用水）	合計	300	2	1	0	0	0	3	(1.0)	0		400	0	0	0	(0.0)
				150	4	0	0	0	0	4		1		200	0	2	2	
6-18	+	600		150	1	0	0	0	0	1		0	89.3	200	0	0	0	
			合計	300	5	0	0	0	0	5	(1.7)	1		400	0	2	2	(0.5)
				150	1	0	0	0	0	1		1		200	0	2	2	
6-18	+	625		150	1	0	0	0	0	1		1	76.6	200	0	0	0	
			合計	300	2	0	0	0	0	2	(0.7)	2		400	0	2	2	(0.5)
				150	3	0	0	0	0	3		0		200	0	5	5	
6-18	+	650		150	3	3	0	0	0	4		0	73.4	200	0	5	5	
			合計	300	6	3	0	0	0	7	(2.3)	0		400	0	10	10	(2.5)*
				150	1	10	0	0	0	10		1		200	0	0	0	
6-18	+	675		150	0	7	0	0	0	7		0	49.0	200	0	0	0	
			合計	300	1	17	0	0	0	17	(5.7) *	1		400	0	0	0	(0.0)
				150														
6-18	+	700		150				TOX					---					
			合計	300														
		陽性対照		150	20	37	0	1	0	46		0		200	0	0	0	
6-18	+	（CP）		150	7	42	0	0	0	43		0	65.9	200	0	0	0	
		5.0	合計	300	27	79	0	1	0	89	(29.7) *	0		400	0	0	0	(0.0)

陰性対照: 日本薬局方注射用水

RPD: 相対的細胞集団倍加指数

MMC: Mitomycin C, CP: Cyclophosphamide

*: $p < 0.05$

表 8　　染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称　2－メチル－3－（3, 4－ジオキシフェニル）－プロパナール　　Study No. 17K5248G

処理時間 (h)	被験物質の用量 (μg/mL)		染色体構造異常の細胞数（出現頻度%） 観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数（%）		ギャップの出現数	細胞増殖率 RPD(%)	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度%） 観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)	
	陰性対照		150	0	0	0	0	0	0		0		200	0	0	0	
24-0	（日本薬局方		150	0	0	1	0	0	1		0	100	200	0	0	0	
	注射用水）	合計	300	0	0	1	0	0	1	(0.3)	0		400	0	0	0	(0.0)
			150	0	0	0	0	0	0		0		200	0	0	0	
24-0	52.3		150	1	0	0	0	0	1		0	100.0	200	0	0	0	
		合計	300	1	0	0	0	0	1	(0.3)	0		400	0	0	0	(0.0)
			150	0	0	0	0	0	0		1		200	0	0	0	
24-0	73.3		150	1	0	0	0	0	1		0	71.7	200	0	0	0	
		合計	300	1	0	0	0	0	1	(0.3)	1		400	0	0	0	(0.0)
			150	1	0	0	0	0	1		0		200	1	0	1	
24-0	103		150	0	0	0	0	0	0		0	53.2	200	0	0	0	
		合計	300	1	0	0	0	0	1	(0.3)	0		400	1	0	1	(0.3)
			150	0	1	0	0	0	1		0		200	1	0	1	
24-0	144		150	0	1	0	0	0	1		0	42.7	200	2	0	2	
		合計	300	0	2	0	0	0	2	(0.7)	0		400	3	0	3	(0.8)
			150														
24-0	201		150				TOX					---					
		合計	300														
	陽性対照		150	13	27	0	0	0	37		2		200	0	0	0	
24-0	（MMC）		150	16	27	0	0	0	37		1	60.9	200	0	0	0	
	0.05	合計	300	29	54	0	0	0	74	(24.7) *	3		400	0	0	0	(0.0)

陰性対照: 日本薬局方注射用水

RPD: 相対的細胞集団倍加指数

MMC: Mitomycin C

*: $p < 0.05$

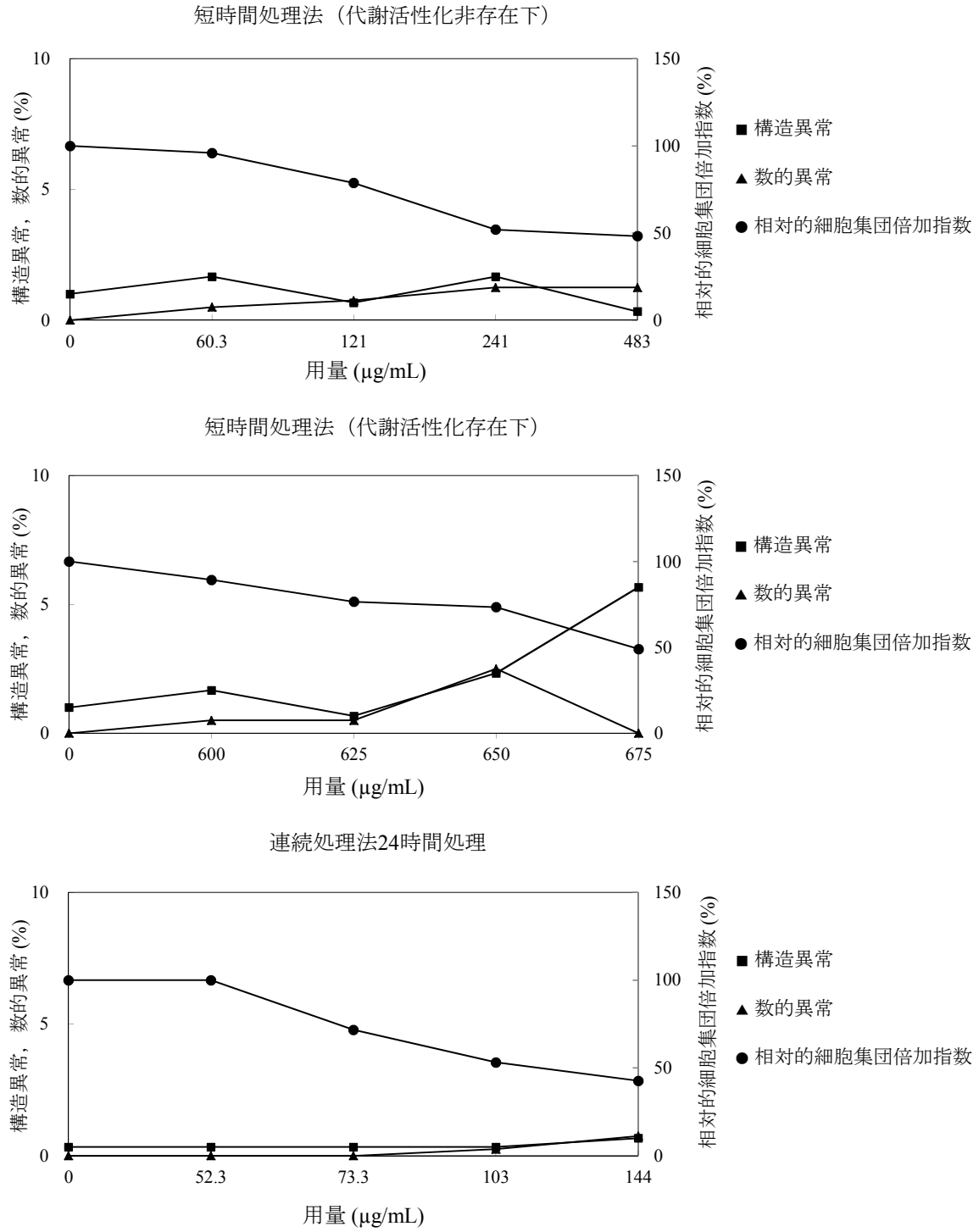


図１　２－メチル－３－（3, 4－ジオキシフェニル）－プロパナールの染色体異常試験
（Study No. 17K5248G）

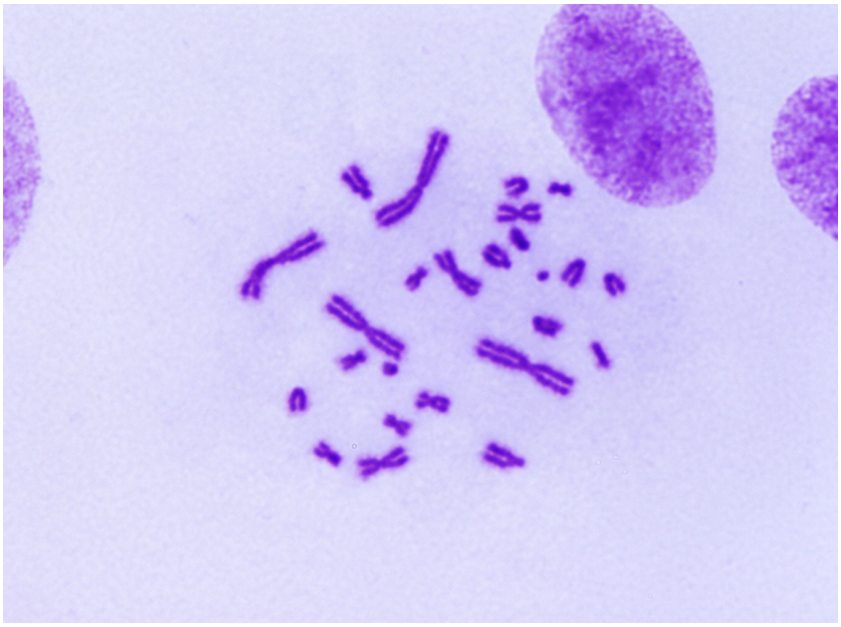


写真 1　　短時間処理法　代謝活性化存在下（陰性対照）

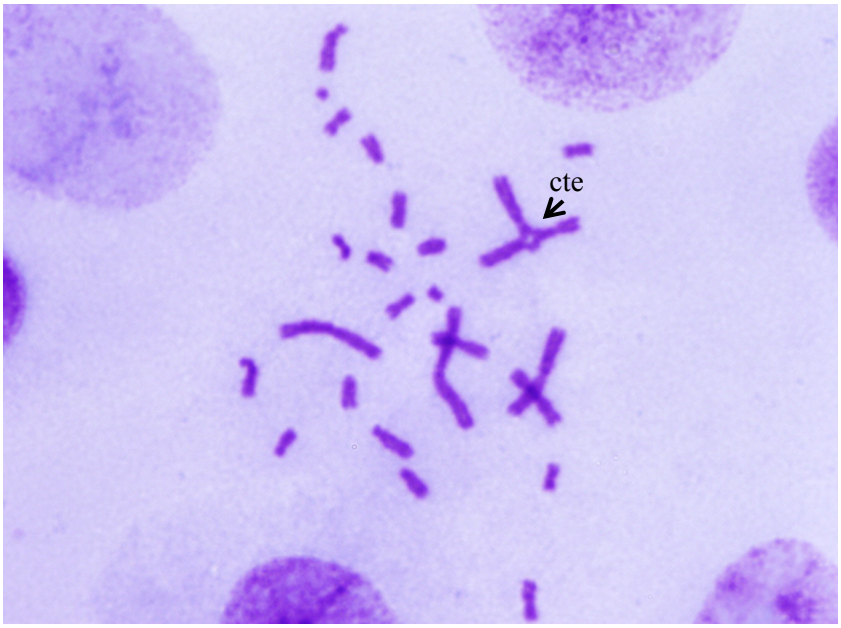


写真 2　　短時間処理法　代謝活性化存在下（被験物質，675 μg/mL）

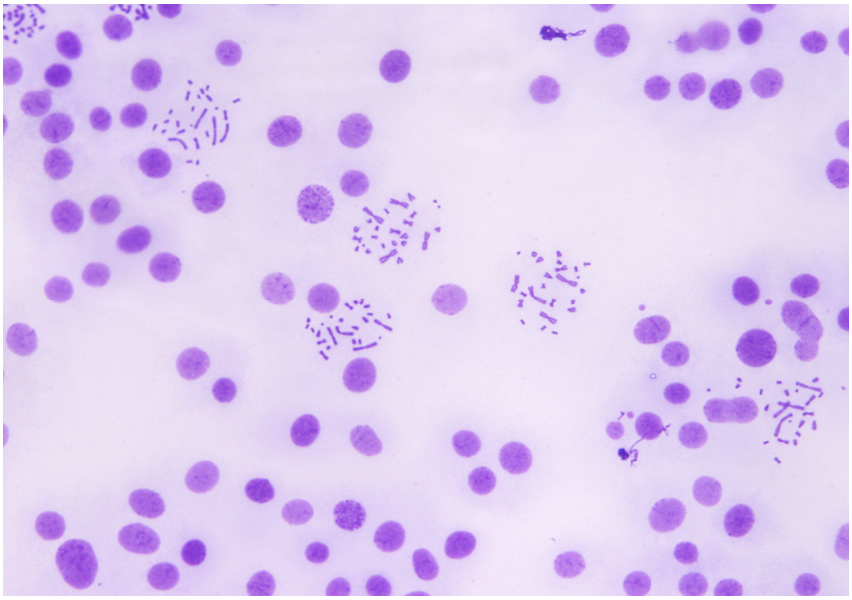


写真 3　　短時間処理法　代謝活性化非存在下（陰性対照）

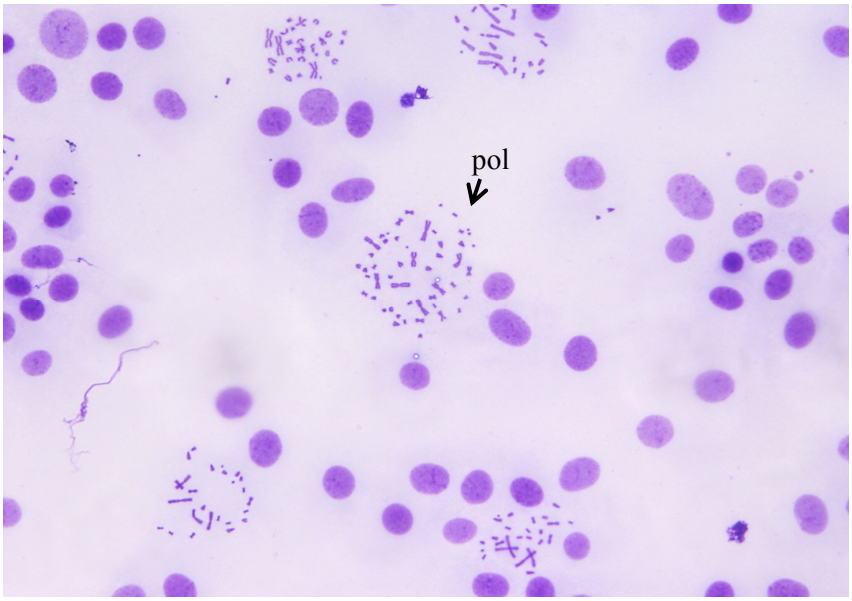


写真 4　　短時間処理法　代謝活性化非存在下（被験物質，483 μg/mL）

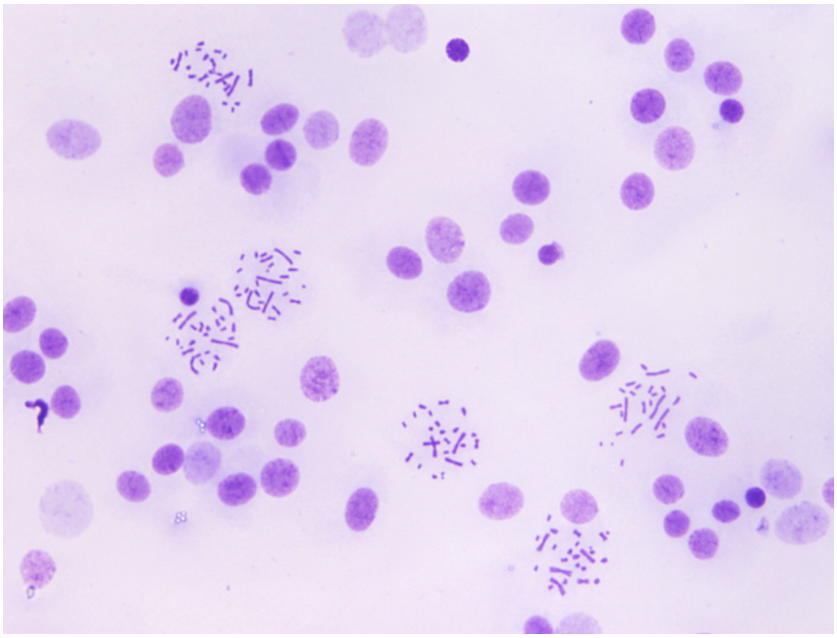


写真 5　　短時間処理法　代謝活性化存在下（陰性対照）

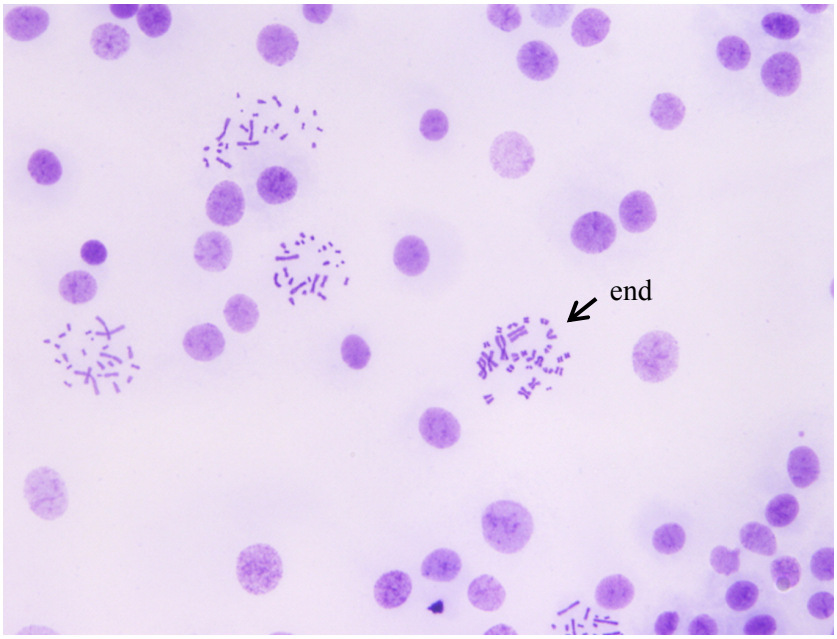


写真 6　　短時間処理法　代謝活性化存在下（被験物質，650 μg/mL）

添付資料

陰性対照値及び陽性対照値の背景データから算出した基準値

データ集計期間: 2007年10月～2017年3月

構造異常出現頻度 (%)

処理方法	陽性対照物質	濃度 (μg/mL)	背景データ					変動範囲(%)
			試験数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	
短時間処理法 (-S9 mix)	MMC	0	100	0.0	2.5	0.9	0.6	0.0 ～ 2.1
		0.05	73	11.0	59.0	23.0	8.3	6.4 ～ 39.6
短時間処理法 (+S9 mix)	CP	0	129	0.0	2.5	0.7	0.6	0.0 ～ 1.9
		5.0	97	16.0	59.5	31.9	8.8	14.3 ～ 49.5
連続処理 (-S9 mix) 24hrs	MMC	0	119	0.0	2.5	0.9	0.6	0.0 ～ 2.1
		0.05	63	19.3	68.0	32.2	9.3	13.6 ～ 50.8

数的異常出現頻度 (%)

処理方法	陽性対照物質	濃度 (μg/mL)	背景データ					変動範囲(%)
			試験数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	
短時間処理法 (-S9 mix)	MMC	0	100	0.0	1.8	0.4	0.4	0.0 ～ 1.2
		0.05	73	0.0	1.8	0.5	0.4	0.0 ～ 1.3
短時間処理法 (+S9 mix)	CP	0	129	0.0	2.0	0.5	0.4	0.0 ～ 1.3
		5.0	97	0.0	2.3	0.5	0.5	0.0 ～ 1.5
連続処理 (-S9 mix) 24hrs	MMC	0	119	0.0	2.0	0.4	0.4	0.0 ～ 1.2
		0.05	63	0.0	1.3	0.4	0.4	0.0 ～ 1.2

処理条件ごとに,平均値(M), 標準偏差(S.D.)を算出し, 変動範囲(M±2S.D.)を設定した.
ただし, 変動範囲の下限値が0以下になった場合は, 最小値を下限値とした.
陽性対照　MMC : Mitomycin C , CP : Cyclophosphamide

信頼性保証陳述書

試験表題：２－メチル－３－（３，４－ジオキシフェニル）－プロパナールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：17K5248G

標記試験は下記 GLP を適用して実施され、最終報告書に試験の実施方法が正確に記載され、かつ生データが正確に反映されていることを確認した。
信頼性保証部門による調査及び報告は、下表の日程で実施した。

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

調査項目	調査日	試験責任者 報告日	運営管理者 報告日
試験計画書	2017 年 11 月 16 日	2017 年 11 月 16 日	2017 年 11 月 16 日
細胞解凍	2017 年 11 月 16 日	2017 年 11 月 16 日	2017 年 11 月 16 日
細胞播種	2017 年 11 月 24 日	2017 年 11 月 24 日	2017 年 11 月 24 日
被験物質の配布・秤量	2017 年 11 月 27 日	2017 年 11 月 27 日	2017 年 11 月 27 日
検体調製/検体添加・培養	2017 年 11 月 27 日	2017 年 11 月 27 日	2017 年 11 月 27 日
毒性評価/染色体標本作製	2018 年 1 月 16 日	2018 年 1 月 18 日	2018 年 1 月 18 日
染色体標本作製(コード化)	2018 年 1 月 17 日	2018 年 1 月 18 日	2018 年 1 月 18 日
染色体標本観察	2018 年 1 月 30 日	2018 年 1 月 30 日	2018 年 1 月 30 日
報告書第 1 稿及び生データ	2018 年 3 月 5 日～ 3 月 6 日	2018 年 3 月 6 日	2018 年 3 月 6 日
最終報告書	2018 年 3 月 20 日	2018 年 3 月 20 日	2018 年 3 月 20 日

（信頼性保証部門責任者）

[redacted]

2018 年 3 月 20 日

シミックファーマサイエンス株式会社 シミックバイオリサーチセンター