試験番号 G-15-028

最終報告書

2-アミノ-2-メチルプロパノールの

チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課　化学物質安全対策室　委託

試験施設

一般財団法人食品薬品安全センター　秦野研[redacted]

〒257-8523　神奈川県秦野市落合 729 番地の 5

TEL 0463-82-4751

試験委託者	厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課 化学物質安全対策室 (東京都千代田区霞が関 1-2-2)
試験番号	G-15-028
被験物質	2-アミノ-2-メチルプロパノール
試験項目	チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験
試験開始日	2015 年 11 月 12 日
実験開始日	2015 年 11 月 30 日
実験終了日	2016 年 2 月 8 日
試験終了日	試験責任者の押印日
試資料保管場所	秦野研究所資料保存施設
保管期間	試験終了後 10 年間 その後の保管については試験委託者と協議する。
運営管理者	一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 所長 [redacted]

本試験は、「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 日付、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日付、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施したものである。

2016 年 3 月 25 日

試験責任者 [redacted]

試験従事者

試験責任者

試験担当主任者

試験担当者

　培養

　検体調製および細胞処理

　細胞数測定用サンプル作製

　細胞数測定

　染色体標本作製

　染色体分析

被験物質管理

[redacted]

目次

要約 5
試験目的 5
試験ガイドラインと GLP 5
材料と方法 6
1. 被験物質 6
2. 陽性対照物質 6
3. 細胞と培養条件 7
4. S9 反応液 7
5. 被験物質調製液の調製 7
6. 細胞毒性試験 8
7. 染色体異常試験 8
8. 染色体分析 9
9. 試験成立条件 9
10. 判定 10
予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと 10
試験成績および考察 10
参考文献 11
Figure 12
Tables 13
Appendices 16

(最終ページ:17 ページ)

信頼性保証書

要約

2-アミノ-2-メチルプロパノールの CHL/IU 細胞(チャイニーズ・ハムスター、雌肺由来)を用いる染色体異常試験を実施し、その染色体異常誘発性を調べた。

用量設定のために細胞毒性試験を行った結果、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合および 24 時間連続処理した場合、24 時間連続処理した 10 mmol/L(0.90 mg/mL)の濃度で約 50%の細胞毒性作用を示したが、いずれの処理条件においても 50%を超える細胞毒性作用は認められなかった。なお、濃度に依存して培養液の色が赤色となったが、いずれも培養液中に沈殿は認められなかった。

以上の結果をもとに、すべての処理条件において 0.90 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、公比 1.5 で 5 濃度群(0.18、0.27、0.40、0.60、0.90 mg/mL)を設定して染色体異常試験を実施した。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析の結果、分析可能な最高濃度は S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではともに 0.90 mg/mL、24 時間連続処理では 0.40 mg/mL となったことから、分析可能な最高濃度とそれより低い 2 濃度を含む以下の 3 濃度を観察対象群とし、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.40、0.60、0.90 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.40、0.60、0.90 mg/mL

24 時間連続処理:0.18、0.27、0.40 mg/mL

染色体分析の結果、すべての処理条件で被験物質処理群に構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。一方、倍数性細胞については、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した 0.90 mg/mL の濃度で統計学的有意差(出現率:それぞれ 1.6%および 3.6%)が認められ、傾向性検定でも有意となった。

以上の結果より、2-アミノ-2-メチルプロパノールは本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体の構造異常を誘発しないが、倍数性細胞を誘発すると結論した。

試験目的

2-アミノ-2-メチルプロパノールの染色体異常誘発作用を調べるため、その CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

試験ガイドラインと GLP

本試験は、「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 日付、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日付、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質の情報を、下記および Appendix 1、Appendix 2 に示す。

1) 名称　2-アミノ-2-メチルプロパノール

2) 化学名（IUPAC 名）　2-アミノ-2-メチルプロパン-1-オル

3) 別名　2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール

4) 英名　2-Amino-2-methyl-1-propanol

5) 略称　AMP

6) CAS 番号　124-68-5

7) 分子式　$C_4H_{11}NO$

8) 分子量　89.14

9) 物理化学的性質　性状: 白～ほとんど白、または無色～ほとんど無色の凝固物または液体

融点: 約 25 ℃

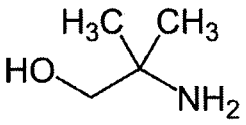
沸点: 165 ℃

1-オクタノール/水分配係数: -0.74

蒸気圧: 購入元からのデータなし

溶解性: 水およびエタノールに溶ける。

10) 構造式



11) ロット番号　M5N2028

12) 純度　99.8%

13) 不純物　情報なし

14) 安定性　通常の保管および取扱いの条件において安定（購入元からのデータより）。なお、当試験施設において、本被験物質を用いる各種毒性試験の実験開始前と終了後に性状の確認および赤外吸収スペクトルを測定し、色調や性状、スペクトルに変化がないことを確認した（試験番号: Q-15-006）。

15) 保管条件　冷蔵（1-15 ℃、実測値: 3-6 ℃）、遮光、密閉

16) 購入元　[redacted]

2. 陽性対照物質

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理用の陽性対照物質としてマイトマイシン C（MMC、ロット番号:572ADD、協和発酵キリン）を用いた。また、S9 mix 存在下の短時間処理用の陽性対照物質としてシクロホスファミド（CP、ロット番号:SLBG4216V、Sigma Chemical）を用いた。

試験には、これらの陽性対照物質を日局注射用水(ロット番号:K4D76、大塚製薬工場)に溶かし、凍結保存(-30℃)した原液(MMC:20 μg/mL、CP:1 mg/mL、調製日:MMC および CP ともに 2015 年 9 月 30 日)を用時解凍して、調製後 6 か月以内に試験に用いた。

3. 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で、我が国においては染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手(1988 年 2 月 10 日入手、入手時の継代数 4)し、継代後、液体窒素(気相)中に凍結保存(現在の継代数 23)した。その細胞(倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし)を、解凍後、継代 5 代(細胞毒性試験)、9 代(染色体異常試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清(CS、ロット番号:990250、Gibco)を 10 vol%添加したイーグル MEM 培養液(10%CS/MEM)を用い、CO_2 インキュベーター(5%CO_2、37℃ の加湿条件下)内で培養した。イーグル MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末(日水製薬)4.7 g に精製水を 500 mL 加えて溶解し、高圧蒸気滅菌(121℃、15 分)したものに、L-グルタミン(日水製薬)を約 0.15 g、10 w/v%$NaHCO_3$水溶液を約 10 mL 無菌的に添加して調製した。

4. S9 反応液

S9(ロット番号:RAA201508A、2015 年 8 月 21 日製造、キッコーマンバイオケミファ)は、フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラット(体重:199～237 g)の肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽(-80℃)に保管し、製造後 6 か月以内に使用した。グルコース-6-リン酸(G-6-P、Sigma)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(β-$NADP^+$、オリエンタル酵母工業)および KCl を精製水に溶かし、混合液として超低温槽(-80℃)に保管し、使用時(調製後 6 か月以内に使用)はこれに S9、$MgCl_2$ および HEPES(pH 7.2)を加え、S9 mix とした。試験には 10%CS/MEM:S9 mix を 22:5 の割合で混和した S9 反応液を用いた(各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-$NADP^+$、0.83 mmol/L $MgCl_2$、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

予備検討の結果、試験に必要な濃度で水に溶解したことから、媒体として日局注射用水(ロット番号:K5C00、大塚製薬工場)を用いた。

試験に際しては、被験物質の融点が約 25 ℃のため、約 30 ℃の微温湯につけて融解しよく混和してから使用した。溶解した被験物質を秤量したのち、媒体(日局注射用水)を加えて原液(細胞毒性試験および染色体異常試験ともに 9.00 mg/mL)を用時調製した。その原液を媒体で希釈して下記の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 10 vol%添加して処理を行った。

細胞毒性試験:0.281、0.563、1.13、2.25、4.50、9.00 mg/mL(公比 2)

染色体異常試験:1.78、2.67、4.00、6.00、9.00 mg/mL(公比 1.5)

媒体中での被験物質の安定性については、当試験施設において室温、遮光下で保管した 0.02

mg/mL および 50 mg/mL の濃度の試験液について、調製後 4 時間以上の安定性が確認されている（試験番号: Q-15-006)。また、被験物質調製液（原液）の調製時に目視により、発熱、発泡などの変化がないことを確認した。

含量試験については、「医薬品・化学物質 GLP 解説（2002)、薬事日報社」に基づき実施しなかった。

6. 細胞毒性試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、試験ガイドラインに従って 0.90 mg/mL（約 10 mmol/L）を最高処理濃度とする 6 濃度群（0.028～0.90 mg/mL、公比 2）を設定して細胞毒性試験を実施した。

CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシン溶液を用いてはがした後、8×10^3 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL（4×10^4 個）をプラスチックディッシュ（直径 6 cm）に播種した。培養開始 3 日目に以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。各群 2 枚のディッシュを用いた。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%CS/MEM または S9 反応液と交換（2.7 mL/ディッシュ）したのち、媒体（陰性対照）または各濃度の被験物質調製液を 10 vol%添加（300 μL/ディッシュ）し、6 時間処理した。処理後、MEM（血清不含）で洗浄し、10%CS/MEM（5 mL/ディッシュ）でさらに 18 時間培養した。

連続処理する場合は、各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM と交換（4.5 mL/ディッシュ）したのち、媒体（陰性対照）または各濃度の被験物質調製液を 10 vol%添加（500 μL/ディッシュ）し、24 時間処理した。

なお、処理開始時および処理終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了後、培養液を捨て、5 mL の 0.02 w/v%EDTA 含有 PBS（Ca^{2+}および Mg^{2+}不含）を加えたのち、細胞を剥がして細胞懸濁液とした。細胞懸濁液を遠沈管に移した後、0.5 mL の細胞懸濁液を 9 mL の ISOTON® II（Beckman Coulter）に加え、コールターカウンター（Z2、Beckman Coulter）で各ディッシュの細胞数を測定した。

細胞数の測定結果をもとに陰性対照群に対する相対細胞数（%）を算出し、細胞毒性の指標とした。

7. 染色体異常試験

細胞毒性試験とほぼ同じ試験条件で染色体異常試験を行った。

細胞毒性試験の結果、24 時間連続処理した 0.90 mg/mL の濃度で約 50%の細胞毒性作用を示したが、いずれの処理条件においても 50%を超える細胞毒性作用は認められなかったことから、0.90 mg/mL を最高濃度とし、公比 1.5 で計 5 濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

陽性対照群については、培養液を 10%CS/MEM または S9 反応液と交換したのち、日局注射用水を 10 vol%加え、さらに MMC（20 μg/mL）を S9 mix 非存在下の短時間処理では 15 μL/ディッシュ（最終濃度: 0.1 μg/mL）、連続処理では 12.5 μL/ディッシュ（最終濃度: 0.05 μg/mL）添加し、S9 mix 存在下の短時間処理では CP（1 mg/mL）を 30 μL/ディッシュ（最終濃度: 10 μg/mL）添加した。なお、MMC および CP はこれらの濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。また、陰性対照群および被験物質処

理群については、処理開始時および処理終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が0.1 μg/mLになるように添加した。培養終了後、培養液を捨てたのち0.02 w/v% EDTA含有PBS(Ca^{2+}およびMg^{2+}不含)をディッシュあたり5 mL加え、ピペッティングにより細胞を剥がして細胞懸濁液とした。細胞懸濁液を遠沈管に移したのち、陽性対照群を含むすべての処理群について、0.5 mLの細胞懸濁液を9 mLのISOTON®Ⅱに加え、コールターカウンターで細胞数を測定した。

残りの細胞懸濁液については遠沈(1400 rpm、5分)し、上清を捨てた後、3 mLの低張液(0.075 mol/L KCl水溶液)を加え、30分間低張処理を行った。低張処理後、固定液(メタノール:氷酢酸=3:1(v/v))を6 mL加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作をさらに1回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス(あらかじめフロスト部分に試験番号、コード番号およびスライド番号を記入)上に滴下し、そのまま風乾した。1ディッシュあたり4～6枚のスライド標本を作製した。

作製したスライド標本を70 vol%メタノールに軽く浸漬したのち、3 vol%ギムザ液(pH 6.8の1/15 mol/Lリン酸緩衝液で希釈調製)で8分染色後、水道水ですすいで風乾した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立ち、1ディッシュから得られた1枚の標本を用いて濃度の高い方から分裂指数の分析(500細胞/標本)を行い、0.5%未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断し、分析可能な最高濃度とそれより低い2濃度を加えた計3濃度を観察対象群とした。

ディッシュ1枚から得られたスライド標本4枚を、4人の観察者がそれぞれ処理条件が分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1群あたり200個(100細胞/ディッシュ、25細胞/標本)の分裂中期細胞(染色体数:23～27本)について構造異常の種類と数を、1群あたり800個(400細胞/ディッシュ、100細胞/標本)の分裂中期細胞について倍数性細胞(染色体数が38本以上)の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断を除く構造異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会[1)]による分類法に基づいて行った。ギャップおよび切断については染色分体幅よりも狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

9. 試験成立条件

以下の基準に合致した場合、該当した処理条件については試験不成立とし、再試験を実施するか、試験不成立としない理由を報告書に記載することとした。

1) 処理した最高濃度が試験法ガイドラインの基準を満たしていない場合
2) 分析可能な被験物質処理群が各試験条件で3群得られない場合
3) 陰性対照群の構造異常を有する細胞の出現率が5.0%を超えた場合
4) 陽性対照群の構造異常を有する細胞の出現率が20%未満の場合

10. 判定

染色体の構造異常(ギャップを除く)を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法($p<0.01$、片側)により有意差検定を実施した。また、有意差が認められた処理条件については、その用量依存性に関して、コクラン・アーミテッジの傾向性検定($p<0.01$、片側)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を総合的に行った。

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

本試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

試験成績および考察

用量設定のために実施した細胞毒性試験の結果、24 時間連続処理した 0.90 mg/mL (10 mmol/mL)の濃度で約 50%の細胞毒性作用が認められたが、それ以外はいずれの処理条件においても 50%を超える細胞毒性作用は認められなかった。また、濃度に依存して培養液の色が赤色となったが、肉眼観察においていずれの処理条件においても培養液中に沈殿は認められなかった(Figure 1)。

以上の結果をもとに、すべての処理条件において 0.90 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、公比 1.5 で 5 濃度群(0.18、0.27、0.40、0.60、0.90 mg/mL)を設定して染色体異常試験を実施した。なお、細胞毒性試験と同様、培養液がやや赤色となったが、いずれの処理条件においても培養液中に沈殿は認められなかった。

分裂指数分析の結果、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 0.90 mg/mL、24 時間連続処理では 0.40 mg/mL の濃度が分析可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む以下の 3 濃度を観察対象群として、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.40、0.60、0.90 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.40、0.60、0.90 mg/mL

24 時間連続処理:0.18、0.27、0.40 mg/mL

染色体分析の結果、すべての処理条件で被験物質処理群に構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった(Table 1、Table 2、Table 3)。倍数性細胞については、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した 0.90 mg/mL で統計学的に有意な増加(出現率:それぞれ 1.6%および 3.6%)が認められ、傾向性検定も有意となった(Table 1、Table 2)。24 時間連続処理については、倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった(Table 3)。

陽性の結果が得られた倍数性細胞について D_{20} 値 [2)]を算出した結果、S9 mix 非存在下および存在下

の短時間処理におけるD_{20}値はいずれも最高処理濃度の10倍を超える値となったことから、対象外となった。

陽性対照物質として用いたMMCは、S9 mix非存在下の短時間処理および連続処理において染色体の構造異常を誘発し(Table 1、Table 3)、CPはS9 mix存在下の短時間処理において染色体の構造異常を誘発した(Table 2)。これらの結果より、本実験系の成立が確認された。

2-アミノ-2-メチルプロパノールについては、当試験施設で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験(試験番号:M-15-074)で陰性の結果が得られているほか、細菌を用いる復帰突然変異試験、マウスリンフォーマTK試験およびマウス骨髄細胞を用いる小核試験においても陰性の結果が報告されている[3)]。また、当該被験物質の関連物質である 2,2-dimethyl-1,3-propanediol に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性の結果が報告されている[4)]。*tert*-Butylamineに関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の結果が報告されている[5)]。

以上の結果より、2-アミノ-2-メチルプロパノールは、本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体の構造異常を誘発しないが、倍数性細胞を誘発すると結論した。

参考文献

1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編:「化学物質による染色体異常アトラス」, 朝倉書店, 東京(1988)

2) 祖父尼俊雄 監修, 染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー, 東京 (1999)

3) U.S. Environmental protection agency hazard characterization document, Screening-level hazard characterization of high production volume chemicals, 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP) CASRN 124-68-5, (March 2012)

4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修: 化学物質毒性試験報告 Vol. 1, 化学物質点検推進委員会, 東京 (1994) pp. 177-197

5) European Chemicals Agency website. http://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/1916/7/7/2, (Access date: March 3, 2016)

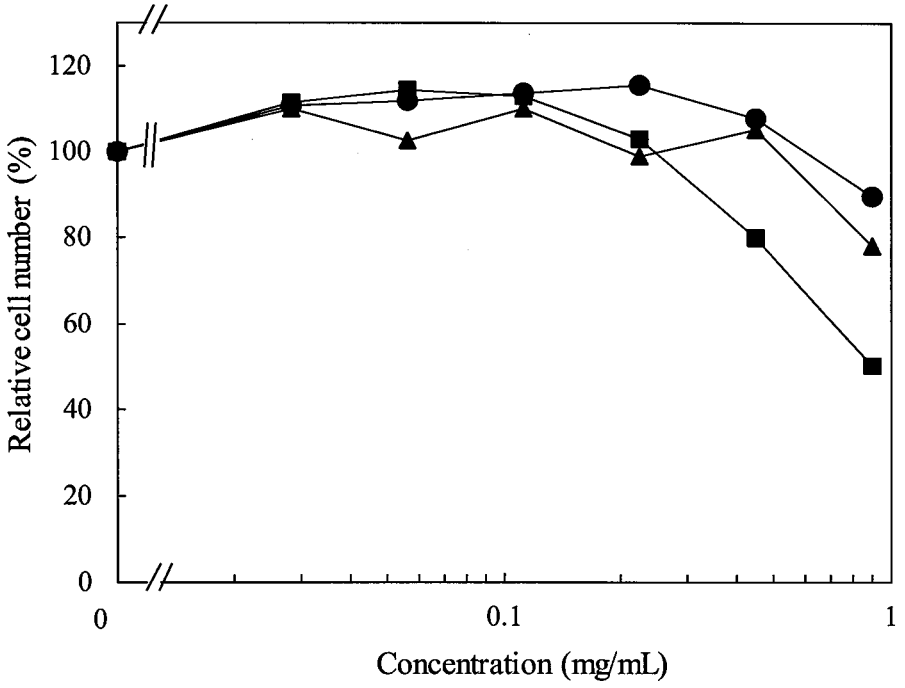


Figure 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-amino-2-methyl-1-propanol

●: Short-term treatment without S9 mix
▲: Short-term treatment with S9 mix
■: 24-h continuous treatment

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) for 6 hours without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Relative [2] cell number (%)	Mitotic [3] index (%)	Number of cells analyzed	Type and number of structural aberrations							Others [5]	Number of cells with structral aberrations		Number [6] of polyploid cells (%)	Trend test [7]	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul [4]	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative [1]	0	-	6 - (18)	100	NA	100	1	0	0	2	0	0	3	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
						200	1	1	0	2	0	0	4	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0 (0.0)		
AMP	0.18	-	6 - (18)	122	NA									NA					
AMP	0.27	-	6 - (18)	124	NA									NA					
AMP	0.40	-	6 - (18)	113	NA	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						100	0	0	4	1	0	0	5	1	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
						200	0	1	4	1	0	0	6	1	4 (2.0)	4 (2.0)	2 (0.3)		
AMP	0.60	-	6 - (18)	99	NA	100	0	4	1	0	0	0	5	0	5 (5.0)	5 (5.0)	0 (0.0)		
						100	2	1	0	0	0	0	3	1	3 (3.0)	1 (1.0)	2 (0.5)	NA	+
						200	2	5	1	0	0	0	8	1	8 (4.0)	6 (3.0)	2 (0.3)		
AMP	0.90	-	6 - (18)	83	5.8, 4.6	100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	7 (1.8)		
						100	0	2	0	0	0	0	2	3	2 (2.0)	2 (2.0)	6 (1.5)		
						200	0	4	0	0	0	0	4	3	4 (2.0)	4 (2.0)	13 *(1.6)		
MMC	0.1 μg/mL	-	6 - (18)	94	NA	100	1	25	44	0	0	0	70	0	44 (44.0)	44 (44.0)	0 (0.0)		
						100	2	24	38	1	0	0	65	1	43 (43.0)	42 (42.0)	0 (0.0)		
						200	3	49	82	1	0	0	135	1	87 (43.5)	86 *(43.0)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Distiled water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$ (one-side).

*, Significantly different from the negative control at $p<0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) for 6 hours with S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Relative [2] cell number (%)	Mitotic [3] index (%)	Number of cells analyzed	Type and number of structural aberrations							Others [5]	Number of cells with structral aberrations		Number [6] of polyploid cells (%)	Trend test [7]	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul [4]	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative [1]	0	+	6 - (18)	100	NA	100	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
						100	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	3 (0.8)		
						200	2	0	2	0	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	3 (0.4)		
AMP	0.18	+	6 - (18)	103	NA									NA					
AMP	0.27	+	6 - (18)	104	NA									NA					
AMP	0.40	+	6 - (18)	105	NA	100	0	0	2	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	2 (0.5)		
						100	0	4	0	1	0	0	5	2	3 (3.0)	3 (3.0)	2 (0.5)		
						200	0	4	2	1	0	0	7	2	5 (2.5)	5 (2.5)	4 (0.5)		
AMP	0.60	+	6 - (18)	97	NA	100	0	0	1	1	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	4 (1.0)		
						100	1	2	0	2	0	0	5	0	5 (5.0)	4 (4.0)	3 (0.8)	NA	+
						200	1	2	1	3	0	0	7	0	7 (3.5)	6 (3.0)	7 (0.9)		
AMP	0.90	+	6 - (18)	77	6.4, 7.6	100	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	15 (3.8)		
						100	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	14 (3.5)		
						200	1	0	0	2	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	29 *(3.6)		
CP	10 μg/mL	+	6 - (18)	88	NA	100	4	9	38	1	0	0	52	0	39 (39.0)	37 (37.0)	1 (0.3)		
						100	3	18	21	1	0	0	43	0	35 (35.0)	34 (34.0)	2 (0.5)		
						200	7	27	59	2	0	0	95	0	74 (37.0)	71 *(35.5)	3 (0.4)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Distiled water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$ (one-side).

*, Significantly different from the negative control at $p<0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) for 24 hours without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Relative[2] cell number (%)	Mitotic[3] index (%)	Number of cells analyzed	Type and number of structural aberrations							Others[5]	Number of cells with structral aberrations		Number[6] of polyploid cells (%)	Trend test[7]	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul[4]	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative[1]	0	-	24	100	NA	100	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
						100	0	0	5	0	0	0	5	0	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
						200	0	3	5	0	0	0	8	0	6 (3.0)	6 (3.0)	1 (0.1)		
AMP	0.18	-	24	101	NA	100	0	1	1	1	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
						100	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						200	0	2	1	2	0	0	5	0	5 (2.5)	5 (2.5)	1 (0.1)		
AMP	0.27	-	24	90	NA	100	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	2 (0.5)		
						100	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.3)	NA	NA
						200	0	4	1	0	0	0	5	0	5 (2.5)	5 (2.5)	3 (0.4)		
AMP	0.40	-	24	81	0.6, 0.8	100	0	0	1	0	0	0	1	1	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.6)		
						100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						200	1	0	1	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	2 (0.3)[8]		
AMP	0.60	-	24	73	0.4, 0.4	not observed due to the small number of metaphases													
AMP	0.90	-	24	54	0.2[9], 1.4	not observed due to the small number of metaphases													
MMC	0.05 μg/mL	-	24	88	NA	100	1	18	13	1	0	0	33	0	24 (24.0)	23 (23.0)	0 (0.0)		
						100	1	14	18	1	0	0	34	0	29 (29.0)	28 (28.0)	1 (0.3)		
						200	2	32	31	2	0	0	67	0	53 (26.5)	51 *(25.5)	1 (0.1)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Distiled water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter.
3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.
5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.
7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$ (one-side). 8) Six hundred and fifty-one cells were analyzed. 9) Four hundred and seventeen cells were analyzed.
*, Significantly different from the negative control at $p<0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

Appendix 1

nacalai tesque
The quality for certainty.

検査成績報告書

2015年9月4日

ナカライテスク株式会社
京都工場 生産管理部
〒617-0004
京都府向日市鶏冠井町石橋17
TEL (075)932-1755
FAX (075)932-4872

コード	品名
02201-52	2-ｱﾐﾉ-2-ﾒﾁﾙ-1-ﾌﾟﾛﾊﾟﾉｰﾙ

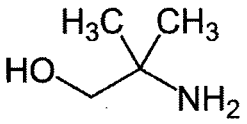
品位	ロット番号	検印
GR	M5N2028	[redacted]
容量	判定	
25ml	適	

項目	単位	規格値	試験結果
純度	%	97.0 以上	99.8

備考

Appendix 2

被験物質の一般的事項

新規化学物質等の名称（IUPAC命名法による）	2-アミノ-2-メチルプロパン-1-オル
別名	2-アミノ-2-メチルプロパノール、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール
CAS番号	124-68-5
構造式又は示性式（いずれも不明の場合は、その製法の概要）	
分子量	89.14
試験に供した新規化学物質の純度（%）	99.8%
試験に供した新規化学物質のロット番号	M5N2028
不純物の名称及び含有率	――
蒸気圧	――
対水溶解度	水に溶解(50 mg/mL)*
1-ｵｸﾀﾉｰﾙ／水分配係数	-0.74
融点	約25°C
沸点	165°C
常温における性状	白～ほとんど白、または無色～ほとんど無色の凝固物または液体
安定性	通常の保管および取扱いの条件においては安定（購入元からのデータより）。

溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性*
	水	50 mg/mL で溶解*	50 mg/mLの濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。調製後4時間以上の安定性（0.02 mg/mLおよび 50 mg/mL、室温、遮光保管)を確認した（試験番号: Q-15-006)。
	DMSO	90 mg/mL で溶解*	90 mg/mLの濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。
	アセトン	100 mg/mL で溶解*	100 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。
	エタノール	溶解**	

〔備考〕物理化学的性状は、可能な限り記入すること。
1.「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2.「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3.「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。
*: 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所において確認した。
**：製品安全データシートより

信頼性保証書

表題　　2-アミノ-2-メチルプロパノールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号　　G-15-028

この試験に関する信頼性保証部門による査察および監査状況等は下記のとおりであった。

査察・監査項目	査察・監査年月日	運営管理者および試験責任者への報告年月日
試験計画書	2015年11月12日	2015年11月12日
試験計画書変更書		
G-15-028-No.1	2015年12月14日	2015年12月14日
G-15-028-No.2	2016年 1月 7日	2016年 1月 7日
被験物質調製液の調製および細胞処理	2015年12月17日	2015年12月17日
標本観察	2016年 1月22日	2016年 1月22日
報告書草案および生データ	2016年 3月14～16日	2016年 3月16日
最終報告書	2016年 3月25日	2016年 3月25日

試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成23年3月31日、薬食発0331第8号、平成23・03・29製局第6号、環保企発第110331010号)を遵守して実施され、また、この報告書は試験に使用された方法および手順を正確に記載し、記載された結果は試験の生データを正確に反映していることを保証する。

2016年3月25日

一般財団法人食品薬品安全センター　秦野研究所
信頼性保証部門責任者　[redacted]