T-G194

原本

最　終　報　告　書

イソヘキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：T-G194

試験期間：2015 年 12 月 3 日-2016 年 3 月 22 日

試験実施施設
株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所
〒156-0042　東京都世田谷区羽根木 1-3-11

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
〒100-8916　東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065　東京都渋谷区大山町 36-7

1. GLP 陳述書

試験番号　　：　　T-G194

試験表題　　：　　イソヘキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- 「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）

[redacted]　2016 年 3 月 22 日 [redacted]

試験責任者
株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所　研究部

2. 目次

1. GLP 陳述書 2
2. 目次 3
3. 試験実施概要 6
3.1 試験番号 6
3.2 試験表題 6
3.3 試験目的 6
3.4 試験委託者 6
3.5 試験受託者 6
3.6 試験実施施設 6
3.7 試験日程 6
3.8 試験責任者 6
3.9 試験担当者 7
3.10 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 7
3.11 資料保存 7
3.12 試験責任者の記名・押印及びその日付 7
4. 要約 8
5. 緒言 9
6. 試験材料及び方法 10
6.1 被験物質及び溶媒 10
6.1.1 被験物質 10
6.1.2 溶媒 11
6.1.3 溶媒の選択理由 11
6.1.4 調製方法 11
6.1.4.1 細胞増殖抑制試験 11
6.1.4.2 染色体異常試験 11
6.1.5 調製頻度 11
6.1.6 被験液の安定性 11
6.2 対照物質 11
6.2.1 陰性対照 11
6.2.2 陽性対照 12
6.3 使用細胞株 12
6.3.1 細胞株 12
6.3.2 細胞の選択理由 13
6.3.3 培養条件 13
6.4 S9 mix 及び培養液の調製 13

6.4.1 S9 mix 13
6.4.2 培養液 14
6.5 試験方法 [1)] 14
6.5.1 識別方法 14
6.5.2 用量の設定 15
6.5.3 細胞増殖抑制試験 15
6.5.4 染色体異常試験 16
6.5.5 数値の取扱い 17
6.5.6 標本の観察 18
6.5.7 染色体異常の分類 18
6.5.8 判定基準 18
7. 試験結果 20
7.1 細胞増殖抑制試験 20
7.2 染色体異常試験 20
8. 考察 21
9. 参考文献 22

図

Fig. 1 Results of the Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Short-term treatment: –S9 mix] 23
Fig. 2 Results of the Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Short-term treatment: +S9 mix] 24
Fig. 3 Results of the Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Continuous treatment: 24hr] 25

表

Table 1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Short-term treatment: −S9 mix] 26
Table 2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Short-term treatment: +S9 mix] 27
Table 3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Continuous treatment: 24hr] 28

付表

Appendix 1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane... 29
Appendix 2-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Short-term treatment: −S9 mix] 30
Appendix 2-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Short-term treatment: +S9 mix] 31
Appendix 2-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Continuous treatment: 24hr] 32
Appendix 3-1 Results of observation in the Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Short-term treatment: −S9 mix]..... 33
Appendix 3-2 Results of observation in the Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Short-term treatment: +S9 mix]..... 34
Appendix 3-3 Results of observation in the Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane [Continuous treatment: 24hr] 35

信頼性保証書 36

3.　試験実施概要

3.1　試験番号

T-G194

3.2　試験表題

イソヘキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3.3　試験目的

ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いて、イソヘキサンの染色体異常誘発能を確認することを目的とした。

3.4　試験委託者

厚生労働省　医薬・生活衛生局　審査管理課
〒100-8916　東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.5　試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065　東京都渋谷区大山町 36-7

3.6　試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所
〒156-0042　東京都世田谷区羽根木 1-3-11
株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所
〒412-0039　静岡県御殿場市かまど 1284

3.7　試験日程

試験開始日	:	2015 年 12 月　3 日
被験物質受領日	:	2015 年　9 月 15 日
実験開始日	:	2015 年 12 月　4 日
実験終了日	:	2016 年　1 月 20 日
試験終了日	:	2016 年　3 月 22 日

3.8　試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所　研究部
[redacted]

3.9　試験担当者

被験物質保存責任者：[redacted]
化学分析責任者　：
試験担当者　：

3.10　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

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。

3.11　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）は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に最終報告書提出後 10 年間保存する。期間終了後の保存については、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と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

3.12　試験責任者の記名・押印及びその日付

[redacted]　2016 年 3 月 22 日 [redacted]

株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所　研究部

4.　要約

イソヘキサンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の用量を設定するため、870 μg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した計 8 用量を設定し、細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 435～218 μg/mL の用量で、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 109 μg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制作用は認められた。50%細胞抑制濃度（概略値）は短時間処理法の非代謝活性化では 89 μg/mL、短時間処理法の代謝活性化では 155 μg/mL、連続処理法では 83 μg/mL と算出された。以上の結果より、短時間処理法の代謝活性化では 200 μg/mL を最高用量とし、以下等差 30 μg/mL で希釈した 5 用量を、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 110 μg/mL を最高用量とし、以下等差 20 μg/mL で希釈した 5 用量を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、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（Poly 値）は、いずれの処理法においても、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。したがって、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、イソヘキサンは本試験条件下において、染色体構造異常及び染色体数的異常を誘発しないと結論した。

5.　緒言

イソヘキサンの安全性評価の一環として、ほ乳類培養細胞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、遵守した基準及び準拠した毒性試験ガイドラインなどは以下の通りである。

1)　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」
  （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）

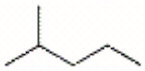
2)　毒性試験ガイドライン

- 「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）

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

製造者	:	[redacted]
名称	:	イソヘキサン
別名	:	Isohexane
CAS 番号	:	73513-42-5
官報公示整理番号	:	(2)-6（化審法）
構造式又は示性式	:	
分子式	:	C_6H_{14}
分子量	:	86.18
物理的状態（20°C）	:	液体
形状	:	透明
色	:	無色～ほとんど無色
ロット番号	:	AG01
純度（GC）	:	98.9%
保存条件	:	冷暗所（冷蔵庫内、許容値：1~10°C、実測値：2.1 ~ 11.5 °C*、2015 年 9 月 15 日 ~ 2016 年 2 月 17 日）、密栓
保存場所	:	東京研究所　被験物質保存室 御殿場研究所　分析室
安定性	:	実験終了後、株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所で被験物質の安定性を確認した。
取扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。
使用後の処理	:	使用後の残量は、関連試験終了後全て廃棄した。

*被験物質保存期間中の実測温度において、最高温度が 11.5°C と許容値を上回ったが、この異常が発生したのが実験終了後である 2016 年 2 月 7 日であること、実験終了後の被験物質の安定性試験において、安定であったことが確認されていることから、本試験に対する影響は無かったと判断した。

6.1.2　溶媒

名称	:	アセトン
ロット番号	:	DCR2620
製造元	:	和光純薬工業㈱
保存方法	:	室温
保存場所	:	東京研究所　培養細胞試験室

6.1.3　溶媒の選択理由

供試前試験の結果、注射用水及び DMSO に不溶、アセトン 1mL に被験物質 87.0 mg を溶解できたことから、溶媒としてアセトンを用いることとした。

6.1.4　調製方法

6.1.4.1　細胞増殖抑制試験

被験物質 0.1740 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を添加し、溶解した後に、メスアップして最高濃度の 87.0 mg/mL 被験液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：870 µg/mL）を調製した。次いで、87.0 mg/mL 被験液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、43.5、21.8、10.9、5.44、2.72、1.36 及び 0.680 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

6.1.4.2　染色体異常試験

被験物質 0.1000 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を添加し、溶解した後に、メスアップして最高濃度の 20.0 mg/mL 被験液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度 : 200 µg/mL）を調製した。次いで、20.0 mg/mL 被験液 0.85、0.70、0.55、0.45、0.40、0.35、0.25 及び 0.15 mL に対し、溶媒を 0.15、0.30、0.45、0.55、0.60、0.65、0.75 及び 0.85 mL 添加し、17.0、14.0、11.0、9.00、8.00、7.00、5.00 及び 3.00 mg/mL の計 9 濃度段階の被験液を調製した。

6.1.5　調製頻度

用時に調製した。

6.1.6　被験液の安定性

用時調製のため実施しなかった。

6.2　対照物質

6.2.1　陰性対照

溶媒として用いるアセトンを陰性対照とした。

6.2.2　陽性対照

1)　非代謝活性化系

マイトマイシン C（MMC）

ロット番号	:	575AEA
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	:	東京研究所　培養細胞試験室

2)　代謝活性化系

シクロフォスファミド（CP）

ロット番号	:	WEF3430
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℃）、遮光
保存場所	:	東京研究所　培養細胞試験室　冷蔵庫

3)　調製方法

調製は全て用時に行った。

(1)　MMC

MMC の 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：K5E97）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

CP 0.0140 g をγ線滅菌済プラスチック遠沈管（50 mL）に秤取した。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：K5E97）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（前述 5. 2)）に使用が推奨されているため。

6.3　使用細胞株

6.3.1　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 2014 年 4 月 2 日に入手し、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 5 継代、染色体異常試験で 11 継代であった。

6.3.2 細胞の選択理由

毒性試験ガイドライン（前述 5. 2)）に使用が推奨されているため。

6.3.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO_2 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で培養した。継代は 1~4 日ごとに行った。

6.4 S9 mix 及び培養液の調製

6.4.1 S9 mix

S9 及び補酵素（S9／コファクターC セット、ロット番号 : C150904061）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	:	15090406
製造日	:	2015 年 9 月 4 日
種・系統	:	ラット･SD 系
週齢・性	:	7 週齢・雄
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	:	2016 年 3 月 3 日
保存方法	:	冷凍(–70°C 以下)
保存場所	:	東京研究所　培養細胞試験室　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	:	C15090206
製造日	:	2015 年 9 月 2 日
保存方法	:	冷凍(–70°C 以下)
使用期限	:	2016 年 3 月 1 日
保存場所	:	東京研究所　培養細胞試験室　超低温フリーザ

3) S9 mix の組成 (1 mL 中)

水	:	0.7 mL
S9	:	0.3 mL
$MgCl_2$	:	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

6.4.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM)(GIBCO™、Cat.No.11095)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	:	1517948、1610982
製造元	:	Life Technologies Corporation
保存方法	:	冷凍（−20°C 以下）
保存場所	:	東京研究所　培養細胞試験室　冷凍庫

2) Minimum Essential Medium（MEM）

ロット番号	:	1732934
製造元	:	Life Technologies Corporation
保存方法	:	冷蔵
保存場所	:	東京研究所　培養細胞試験室　冷蔵庫

6.5 試験方法 [1)]

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

6.5.1 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　代謝活性化	+
	短時間処理法　非代謝活性化	−
	連続処理法　24 時間処理	24-
	陰性対照群	NC
	被験液処理群	高濃度から 1、2、3･･･n の枝番号
	陽性対照群	PC
同一処理群内での識別		1、2、3
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

6.5.2　用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験
最高用量を遺伝毒性試験ガイドライン（前述 5. 2)）で定められた 870 μg/mL（10mM 相当）とし、以下公比 2 で希釈した 435、218、109、54.4、27.2、13.6 及び 6.80 μg/mL の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験
短時間処理法の代謝活性化では、最高用量を 200 μg/mL とし、以下等差 30 μg/mL で希釈した 170、140、110 及び 80.0 μg/mL の計 5 用量を設定した。短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では、最高用量を 110 μg/mL とし、以下等差 20 μg/mL で希釈した 90.0、70.0、50.0 及び 30.0 μg/mL の計 5 用量を設定した。これに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

6.5.3　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。なお、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) 短時間処理法の代謝活性化と非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理のそれぞれに、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。
2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。
3) 培養 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実施した。

	短時間処理法		連続処理法
	非代謝活性化	代謝活性化	24 時間処理
培養液除去量	0.050 mL	0.883 mL	0.050 mL
S9 mix 添加量		0.833 mL	
陰性対照・被験液添加量	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL

4) 被験液処理後、肉眼で析出の有無及び培養液の色調を確認した。確認後、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)と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、牛血清を約 2%となるよう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、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、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、以下の方法に従い、各プレートの細胞濃度を測定した。
(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%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Life Technologies Corporation）を 1 mL 加え、約 5 分間静置した。
(3) 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、血球計算盤を用いて細胞濃度を測定した。血球計算盤の計数値は、8 区画の平均値の小数点第 1 位を四捨五入したものを相対的細胞数（RCC：Relative Cell Count）の計算に用いた。
8) 得られた細胞濃度から、式 1 に従い、陰性対照群を 100%とした各群の相対的細胞数（RCC）を算出した。

$$\text{RCC (\%)} = \frac{\text{（被験物質処理群における細胞数）} \times 100}{\text{（陰性対照群における細胞数）}}$$

〔式 1〕

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。

6.5.4 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) 短時間処理法の代謝活性化と非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理のそれぞれに、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 3 枚（枝番号-1、2 及び 3）とした。ただし、陽性対照群は 2 枚（枝番号-1 及び-2）とした。

2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。

3) 培養 3 日後に、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実施した。

	非代謝活性化	代謝活性化	24 時間処理
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	
陰性対照・被験液・陽性対照物質液添加量	0.050 mL (MMC: 0.150 mL) *	0.050 mL (CP: 0.100 mL) *	0.050 mL (MMC: 0.100 mL) *

*：（　）内は、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した。

4) 被験液処理後、肉眼で析出の有無及び培養液の色調を確認し、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肉眼で被験物質の析出を、倒立位相差顕微鏡で細胞の状態を確認した。次いで、約 2%となるよう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) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 μg/mL）を 0.1 mL 加えた。

7) 培養終了後、プレートの培養液を遠沈管に移し、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Life Technologies Corporation）で細胞を剥がし、回収・遠心分離した。次いで、遠心分離によって集めた細胞を 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。

8) 残る各群 1 枚のプレート（枝番号-3）は、肉眼で被験物質の析出を、倒立位相差顕微鏡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）。その後、細胞増殖抑制試験に準じて細胞濃度を測定し、RCC を算出した。

6.5.5 数値の取扱い

RCC 算出には表示値を用い、下記の桁数に従って計算した。

1) 細胞濃度については、血球計算盤における 8 区画の計数値の平均値の小数点第 1 位を四捨五入し、整数で表示した（単位：計数値の平均値 × 10^4 cells/mL）。

2) RCC（百分率）については、1) の表示値を用いて計算し、小数点第 1 位を四捨五入し整数として表示した。

6.5.6　　標本の観察

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化して行った。

6.5.7　　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

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

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、倍化した場合を数的異常と定義した。

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

6.5.8　　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。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

結果を Appendix 1、Appendix 2-1~2-3 に示した。

被験液添加に伴う析出の有無及び培養液の色調変化は、すべての処理法で 435 μg/mL 以上の用量で析出が認められ、色調変化は認められなかった。細胞毒性の指標である RCC を測定した結果、短時間処理法の代謝活性化では 435～218 μg/mL の用量で、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 109 μg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制作用は認められた。50%細胞抑制濃度（概略値）は短時間処理法の非代謝活性化では 89 μg/mL、短時間処理法の代謝活性化では 155 μg/mL、連続処理法では 83 μg/mL と算出された。

7.2 染色体異常試験

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

被験液添加に伴う析出の有無及び培養液の色調変化は、すべての処理法で認められなかった。

構造異常の出現率（TA）は、短時間処理法の非代謝活性化では 110 μg/mL において規定数の細胞が観察出来ず、90.0、70.0、50.0 及び 30.0 μg/mL で 0、0、0.5 及び 0%であった。短時間処理法の代謝活性化では 200 及び 170 μg/mL において規定数の細胞が観察出来ず、140、110 及び 80.0 μg/mL で 1.0、0 及び 0.5%であった。連続処理法では 110、90.0、70.0、50.0 及び 30.0 μg/mL で 1.5、0.5、0、1.0 及び 1.0%であった。

数的異常（倍数体、Poly）の出現率は、短時間処理法の非代謝活性化では 110 μg/mL において規定数の細胞が観察出来ず、90.0、70.0、50.0 及び 30.0 μg/mL でそれぞれ 0%であった。短時間処理法の代謝活性化では 200 及び 170 μg/mL において規定数の細胞が観察出来ず、140、110 及び 80.0 μg/mL でそれぞれ 0%であった。連続処理法では 110、90.0、70.0、50.0 及び 30.0 μg/mL で 0.5、0.5、0、1.5 及び 0.5%であった。

8.　考察

イソヘキサンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の用量を設定するため、870 μg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した計 8 用量を設定し、細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 435～218 μg/mL の用量で、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 109 μg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制作用は認められた。50%細胞抑制濃度（概略値）は短時間処理法の非代謝活性化では 89 μg/mL、短時間処理法の代謝活性化では 155 μg/mL、連続処理法では 83 μg/mL と算出された。以上の結果より、短時間処理法の代謝活性化では 200 μg/mL を最高用量とし、以下等差 30 μg/mL で希釈した 5 用量を、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 110 μg/mL を最高用量とし、以下等差 20 μg/mL で希釈した 5 用量を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、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（Poly 値）の出現率は、いずれの処理法においても、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。したがって、試験は適切に実施されたと考えられた。

また、本被験物質は Ames 試験で陰性[6)]と報告されている。

以上の結果から、イソヘキサンは本試験条件下において、染色体構造異常及び染色体数的異常を誘発しないと結論した。

9. 参考文献

1) 石館基監修 (1987)：<改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、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), 日本香粧品科学会誌, **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) (2016)：イソヘキサンの細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号：T-1886）、株式会社ボゾリサーチセンター

T-G194

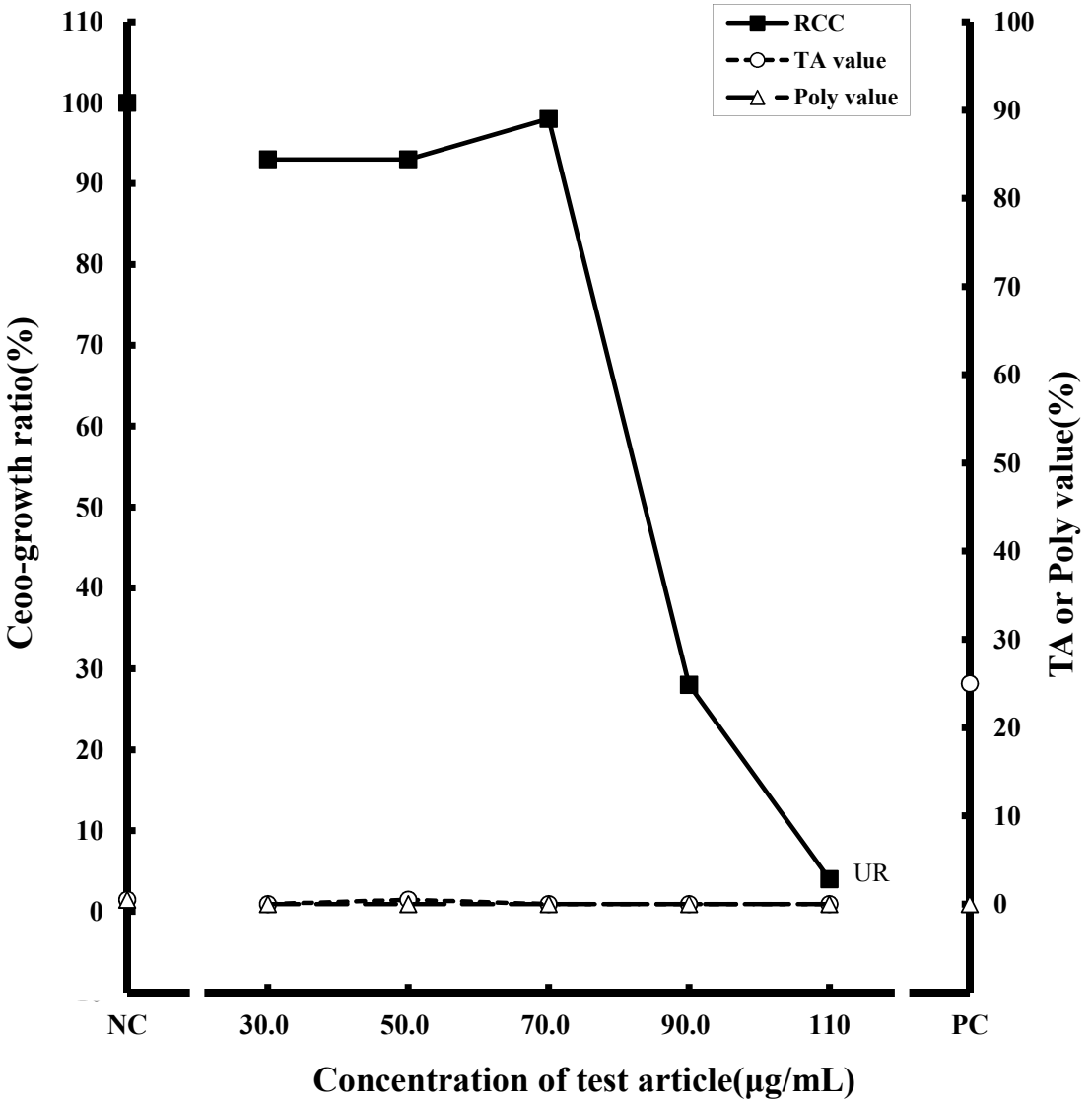


Fig. 1

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

[Short-term treatment : -S9 mix]

NC : Negative Control (acetone)

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

Cell-growth ratio was shown as the RCC.

UR : These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosome could be observed due to severe cytotoxicity.

T-G194

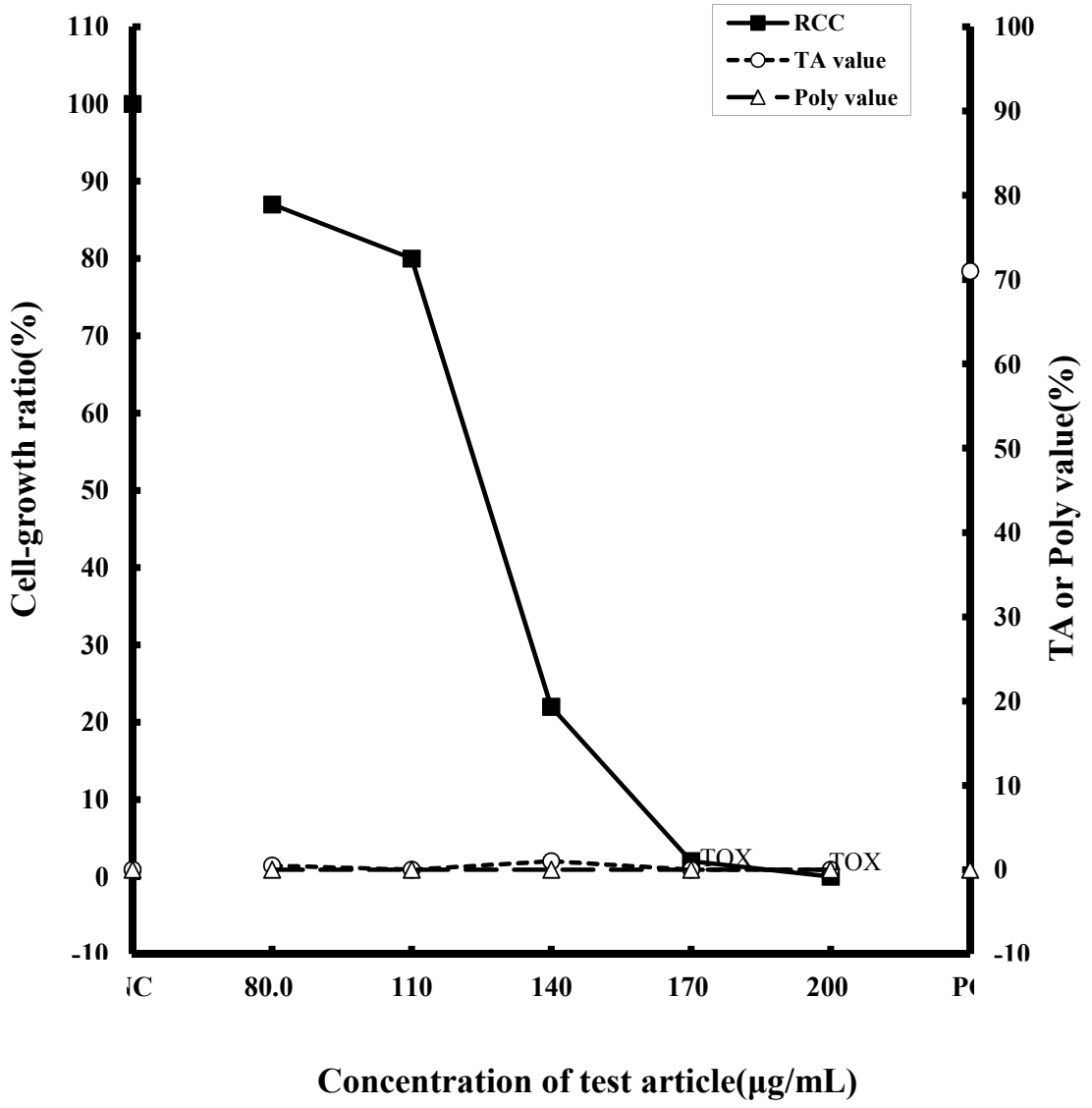


Fig. 2

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

[Short-term treatment : +S9 mix]

NC : Negative Control (acetone)

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

Cell-growth ratio was shown as the RCC.

TOX : Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

T-G194

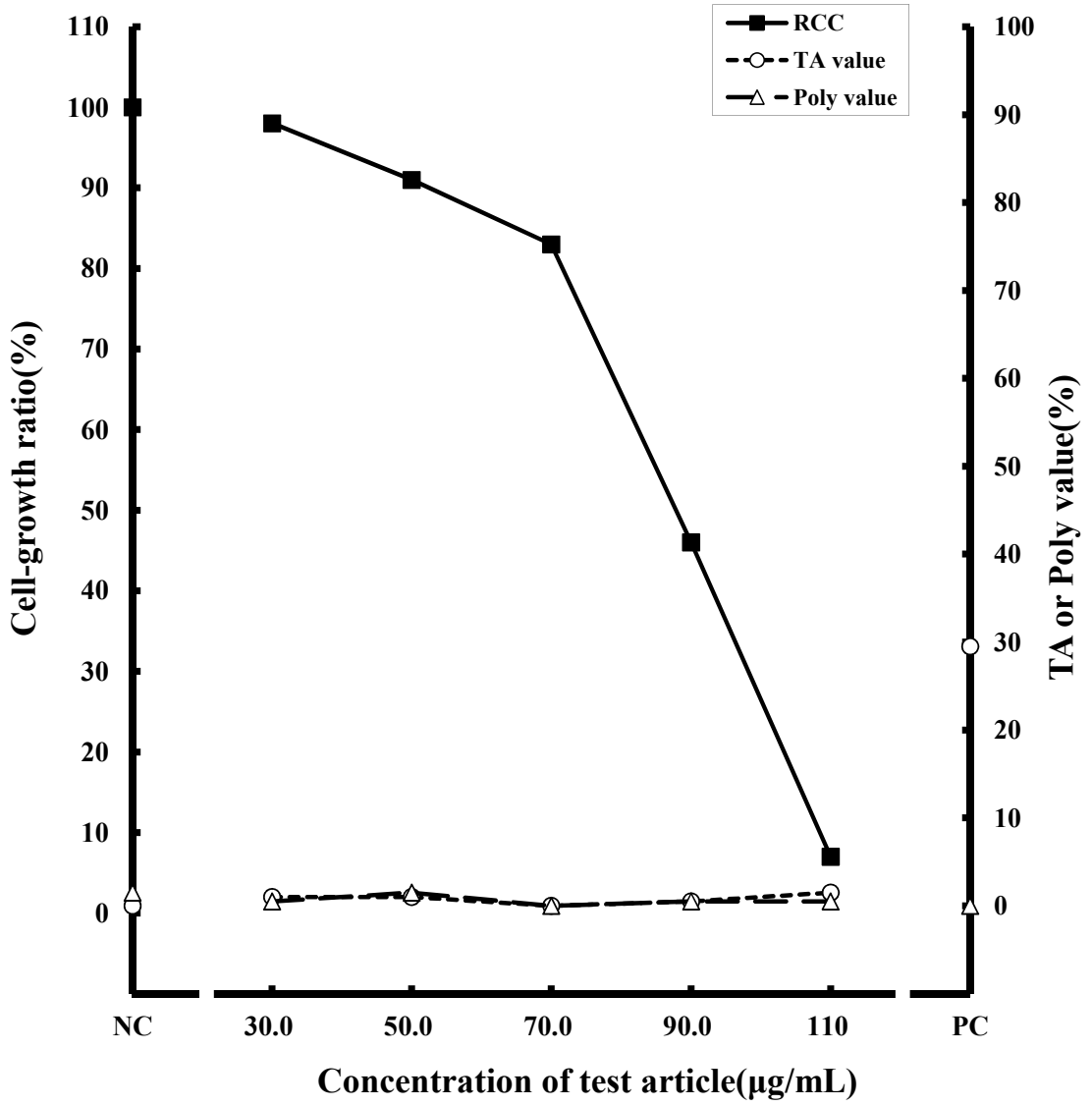


Fig. 3

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

[Continuous treatment : 24hr]

NC : Negative Control (acetone)

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

Cell-growth ratio was shown as the RCC.

Table 1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane
[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	1	0	0	0	1	0	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)			200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
		30.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	93	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)			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		50.0	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	93	100	0	0	0	-
			100	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)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		70.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	98	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)			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		90.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	28	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)			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		110	35	0	0	0	0	0	0	0	0	UR	4	35	0	0	0	UR
			43	0	0	0	0	0	0	0	0			43	0	0	0	
			45	0	0	0	0	0	0	0	0			45	0	0	0	
			55	0	0	0	0	0	0	0	0			55	0	0	0	
			178	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			178	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		PC	100	7	24	0	0	0	30	0	30	+	-	100	0	0	0	-
			100	5	16	0	0	0	20	0	20			100	0	0	0	
			200	12(6.0)	40(20.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	50(25.0)	0(0.0)	50(25.0)			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 (acetone)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 μg/mL)
RCC(%) showed cell counts of tast article treatment group against that of negative control.
UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane
[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	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)			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		80.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	87	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)	
		110	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	80	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)			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		140	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	22	100	0	0	0	-
			100	0	1	0	0	0	1	0	1			100	0	0	0	
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TOX	2	0	0	0	0	TOX
			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	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(0.0)	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	TOX	0	0	0	0	0	TOX
			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	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(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		PC	100	9	67	0	0	0	69	0	69	+	-	100	0	0	0	-
			100	11	73	0	0	0	73	0	73			100	0	0	0	
			200	20(10.0)	140(70.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	142(71.0)	0(0.0)	142(71.0)			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 (acetone)

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

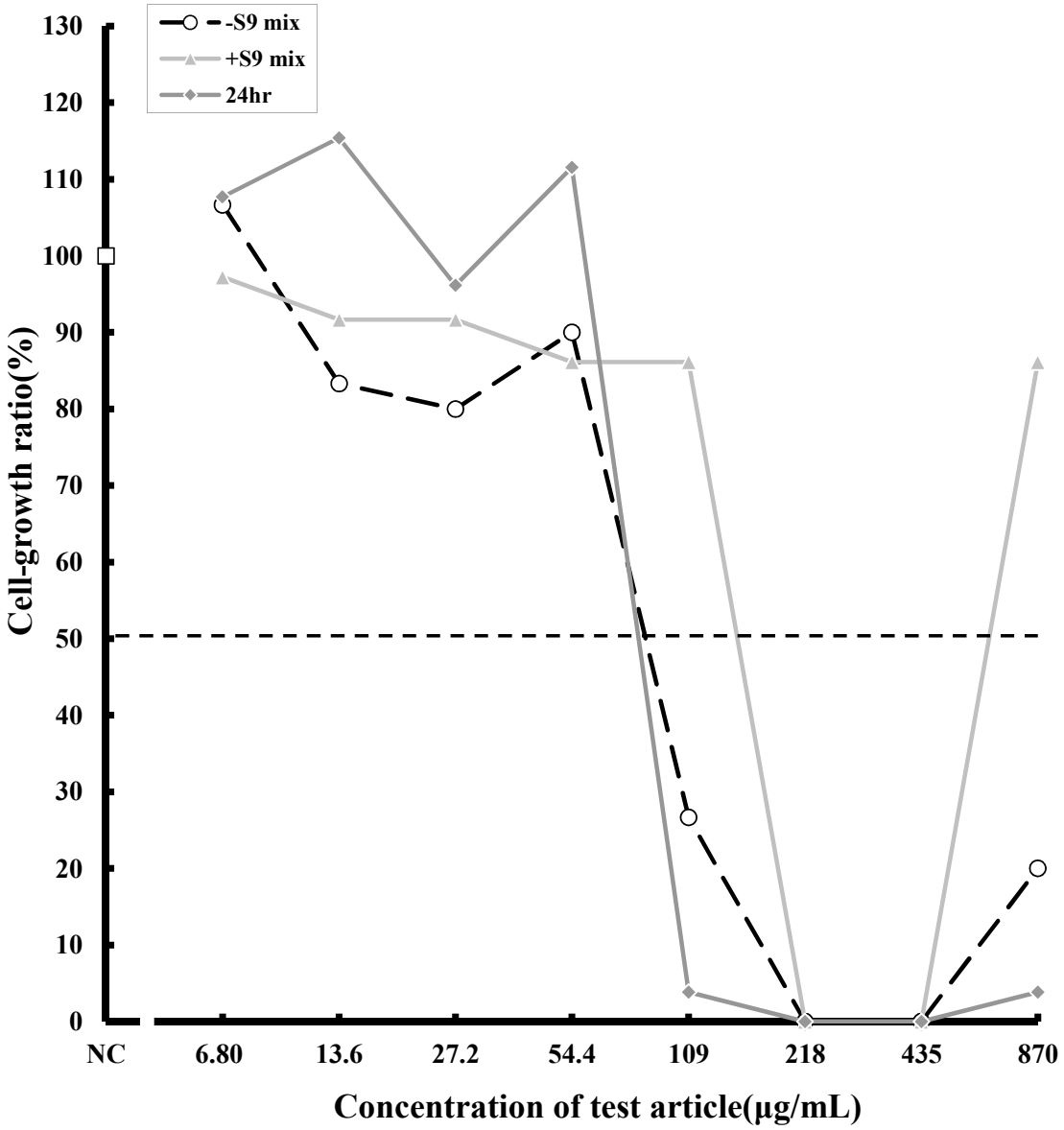
RCC(%) showed cell counts of tast article treatment group against that of negative control.

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

Table 3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane
[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	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge-ment
24-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	3	0	3	-
			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)			200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	
		30.0	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	98	100	0	0	0	-
			100	1	0	0	0	0	1	0	1			100	1	0	1	
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)			200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
		50.0	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	91	100	0	0	0	-
			100	1	0	0	0	0	1	0	1			100	3	0	3	
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)			200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	
		70.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	83	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)			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		90.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	46	100	0	0	0	-
			100	0	1	0	0	0	1	0	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)			200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
		110	100	1	1	0	0	0	2	0	2	-	7	100	1	0	1	-
			100	0	1	0	0	0	1	0	1			100	0	0	0	
			200	1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)			200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
		PC	100	6	24	0	0	0	29	0	29	+	-	100	0	0	0	-
			100	5	25	0	0	0	30	0	30			100	0	0	0	
			200	11(5.5)	49(24.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	59(29.5)	0(0.0)	59(29.5)			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 (acetone)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 μg/mL)
RCC(%) showed cell counts of tast article treatment group against that of negative control.



Appendix 1

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

NC：Negative Control (acetone)

Cell-growth ratio was shown as the RCC.

Appendix 2-1

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

[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)
-	6-18	0 (NC)		100	0	-	-	-	-
		Test article	6.80	107	0	-	-	-	-
			13.6	83	17	-	-	-	-
			27.2	80	20	-	-	-	-
			54.4	90	10	-	-	-	-
			109	27	73	+	-	-	-
			218	0	100	TOX	-	-	-
			435	0	100	TOX	-	+	+
			870	20	80	+	-	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : **89** μg/mL									

NC : Negative Control (acetone)

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 0 and fewer

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.

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 2-2

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

[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)
+	6-18	0 (NC)		100	0	-	-	-	-
		Test article	6.80	97	3	-	-	-	-
			13.6	92	8	-	-	-	-
			27.2	92	8	-	-	-	-
			54.4	86	14	-	-	-	-
			109	86	14	-	-	-	-
			218	0	100	TOX	-	-	-
			435	0	100	TOX	-	+	+
			870	86	14	-	-	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : **155** μg/mL									

NC : Negative Control (acetone)

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.
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 2-3

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

[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)
-	24-0	0 (NC)		100	0	-	-	-	-
		Test article	6.80	108	0	-	-	-	-
			13.6	115	0	-	-	-	-
			27.2	96	4	-	-	-	-
			54.4	112	0	-	-	-	-
			109	4	96	+++	-	-	-
			218	0	100	TOX	-	-	-
			435	0	100	TOX	-	+	+
			870	4	96	+++	-	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : **83** µg/mL									

NC : Negative Control (acetone)

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 0 and fewer

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.

+++ : 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 Isohexane

[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	30.0	-	-	-	-
			50.0	-	-	-	-
			70.0	+	-	-	-
			90.0	++	-	-	-
			110	+++	-	-	-
		PC		-	-	-	-

NC : Negative Control (acetone)

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.

++ : 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 3-2

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

[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	80.0	-	-	-	-
			110	-	-	-	-
			140	++	-	-	-
			170	+++	-	-	-
			200	+++	-	-	-
		PC		-	-	-	-

NC : Negative Control (acetone)

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

Appendix 3-3

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Isohexane
[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)
-	24-0	0 (NC)		-	-	-	-
		Test article	30.0	-	-	-	-
			50.0	-	-	-	-
			70.0	-	-	-	-
			90.0	++	-	-	-
			110	+++	-	-	-
		PC			-	-	

NC : Negative Control (acetone)
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.
++ : 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

信頼性保証書（1/2）

試験番号　：　T-G194

試験表題　：　イソヘキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

- 「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）

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2016 年 3 月 22 日
株式会社ボゾリサーチセンター
信頼性保証部門 [redacted]

試験における調査

項　目	担当者	調　査　日	試験責任者及び運営管理者への報告日
試験計画書	[redacted]	2015 年 12 月 3 日	2015 年 12 月 3 日
試験計画書変更書（1）		2015 年 12 月 24 日	2015 年 12 月 24 日
細胞播種		2015 年 12 月 25 日	2015 年 12 月 28 日
調製・保存（被験物質・陽性対照物質）、被験物質の処理		2015 年 12 月 28 日	2015 年 12 月 28 日
染色体標本作製（固定）		2015 年 12 月 29 日	2015 年 12 月 29 日
染色体標本作製（染色）		2016 年 1 月 4 日	2016 年 1 月 5 日
染色体標本観察		2016 年 1 月 7 日	2016 年 1 月 7 日
被験物質の安定性測定		2016 年 2 月 18 日	2016 年 2 月 18 日

信頼性保証書（2/2）

項　目	担当者	調　査　日	試験責任者及び運営管理者への報告日
生データ	[redacted]	2016年　3月　4日	2016年　3月　4日
改善確認		2016年　3月　7日	2016年　3月　7日
最終報告書草案　図・表・付表		2016年　3月　4日	2016年　3月　4日
改善確認		2016年　3月　7日	2016年　3月　7日
申請資料		2016年　3月　8日	2016年　3月　8日
改善確認		2016年　3月　9日	2016年　3月　9日
最終報告書		2016年　3月 22日	2016年　3月 22日

施設調査

項　目	担当者	調　査　日	部門責任者及び運営管理者への報告日
培養細胞の性状検査	[redacted]	2015年　9月　4日	
		2015年　9月　7日	
		2015年　9月　8日	
		2015年　9月　9日	
		2015年　9月 10日	
		2015年　9月 11日	
		2015年　9月 17日	2015年　9月 17日