

最 終 報 告 書

2-ethylhexyl vinyl ether のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：9047 (115-198)

平成 18 年 9 月 11 日

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約.....	4
2. 表題.....	5
3. 試験目的.....	5
4. 準拠したガイドラインおよび遵守したGLP.....	5
5. 試験番号.....	5
6. 試験施設.....	5
7. 試験委託者	5
8. 試験責任者.....	5
9. 被験物質等管理責任者.....	6
10. 分担責任者.....	6
11. 主担当者および試験従事者.....	6
12. 試験日程.....	6
13. 被験物質.....	6
14. 試験材料および方法.....	8
15. 試験結果.....	15
16. 考察および結論	16
17. 参考とした資料.....	17
18. 試験関係資料の保存.....	17
19. 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および試験計画書 に従わなかったこと	18
20. 試験責任者の署名および日付	18

Figures

Figure 1	Growth inhibition of CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether [Short-term treatment]	19
Figure 2	Growth inhibition of CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether [Continuous treatment].....	20
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by 2-ethylhexyl vinyl ether [Short-term treatment: -S9]	21
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by 2-ethylhexyl vinyl ether [Short-term treatment: +S9]	22
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by 2-ethylhexyl vinyl ether [Continuous treatment: 24h].....	23

Tables

Table 1	Results of growth inhibition test of 2-ethylhexyl vinyl ether [Short-term treatment]	24
Table 2	Results of growth inhibition test of 2-ethylhexyl vinyl ether [Continuous treatment]	25
Table 3	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether [Short-term treatment: -S9]	26
Table 4	Chromosome aberration test in CHL cells treated 2-ethylhexyl vinyl ether [Short-term treatment: +S9]	27
Table 5	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether [Continuous treatment: 24h].....	28

1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2-ethylhexyl vinyl ether は染色体異常を誘起しないものと判断した。

2-ethylhexyl vinyl ether の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に染色体異常試験の用量を設定した。染色体異常試験では短時間処理法-S9 処理ならびに同+S9 処理で 393, 785 および 1570 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、2-ethylhexyl vinyl ether 処理群の場合、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても、明確な染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。以上の結果より、さらに、連続処理法 24 時間処理群においても 393, 785 および 1570 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施したが、同試験法においても、2-ethylhexyl vinyl ether 処理による染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) 処理群では、染色体構造異常の出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な増加を示した。

2. 表題

2-ethylhexyl vinyl ether のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討する。

4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP

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 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環保企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 473 (21st July 1997: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

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 (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

5. 試験番号

9047 (115-198)

6. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

7. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

8. 試験責任者

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

Tel: 0538-58-3572 Fax: 0538-58-1368

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

2-ethylhexyl vinyl ether (2-エチルヘキシル=ビニル=エーテル)

13.2. ロット番号

13.3. 純度

99.9%

13.4. 提供元

13.5. 出荷年月日

2005 年 3 月 11 日

13.6. 保存条件

遮光, 冷暗所 (1~9°C)

13.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (H-2 : 実測値 3.2~7.7°C, 2005 年 3 月 14 日~2005 年 8 月 19 日 ; 6 号館 2 階被験物質調製室内バイオマルチクーラーch. 41 : 実測値 3.1~7.7°C, 2005 年 8 月 19 日~2005 年 11 月 1 日)

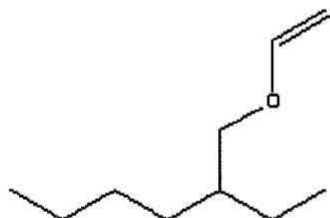
13.8. 化学名

2-ethylhexyl vinyl ether

13.9. CAS No.

103-44-6

13.10. 化学構造



13.11. 分子式

C₁₀H₂₀O

13.12. 分子量

156.27

13.13. 物質の状態

無色透明液体

13.14. 溶解性

溶解度 : 0.05 g/100 g 水, 約 157 mg/mL DMSO (当施設の試験による)

13.15. 安定性／反応性

酸化剤、重金属には不安定（重合、分解を起こす）。
高温化では不安定。

13.16. 蒸気圧

3.3 kPa (25 mmHg) (73°C)

13.17. 取り扱い上の注意

危険性：可燃性液体で、蒸気は爆発性ガスを作りやすい。

有害性：蒸気は咽喉、目、鼻などの粘膜を刺激する。

軽度の麻酔作用がある。

液体が目に入ると粘膜を侵し、炎症を起こす。

適切な保護具（マスク・手袋等）を着用し、吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないようにした。

13.18. 毒性

急性経口毒性（ラット）：LD₅₀, 1350 mg/kg

13.19. 残余被験物質の処理

実験終了後、1 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは安定性分析のため、被験物質等管理責任者を介して提供元に返却した。分析の結果（2005 年 11 月 22 日付報告）、被験物質が試験期間中安定であったことが確認された。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において、遺伝毒性ガイドラインで指定されていることから、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を使用した。CHL/IU 細胞は 1984 年 11 月 15 日に国立衛生試験所（現 国立医薬品食品衛生研究所）から分与を受け、ジメチルスルホキシド（DMSO, GC 用、純度 99.9%, Lot No. K26414578, Merck）を容量比で 10% 添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては、凍結した細胞を融解した後、3～5 日ごとに継代したものを使用した。

なお、細胞増殖抑制試験では継代数 15 の細胞を、染色体異常試験では継代数 20 の細胞を用いた。

凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査（陰性）、倍加時間の測定（17.9 時間）、染色体数（モード数 25 本の細胞が 82%）の測定ならびに陰性対照および陽性対照における構造異常出現頻度の確認を実施し、異常のない細胞を試験に使用した。

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI, Lot No. 519045, 旭テクノグラス) に非働化 (56°C, 30 分) 済みの仔牛血清 (Lot No. 54238545D, Invitrogen) を最終濃度で 10% になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所 (15°C 以下) に保存した。

14.3. 培養条件

CO₂ インキュベーター (三洋電機バイオメディカ) を用い, CO₂ 濃度 5%, 37°C の条件で細胞を培養した。

14.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. CAM-526, キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を以下に示す。

ロット番号	RAA-526
製造年月日	2005 年 7 月 29 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	215~259 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 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	25.58 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の各内容物の量を以下に示す.

S9	0.3	mL
MgCl ₂	5	μmol/0.1mL
KCl	33	μmol/0.1mL
G-6-P	5	μmol/0.1mL
NADP	4	μmol/0.1mL
HEPES 緩衝液	4	μmol/0.2mL
蒸留水	0.1	mL

14.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に難溶で DMSO に溶解することから, 被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (Lot No. K31758278, Merck) に溶解し, 調製原液とした.

細胞増殖抑制試験では, 使用直前に被験物質 314 mg を精密に量り, 目盛付き試験管に移した後, 約 1 mL の DMSO (使用溶媒) を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらに, DMSO を加えて 2 mL に定容し, 調製原液 (157 mg/mL 溶液) を準備した. DMSO 1 mL に対し, この 157 mg/mL 調製原液 1 mL に加えることにより 78.5 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様な希釈を順次行うことにより, 39.3, 19.6, 9.81, 4.91, 2.45, 1.23 および 0.613 mg/mL 溶液を調製した.

染色体異常試験では, 使用直前に被験物質 314 mg を精密に量り, 目盛付き試験管に移した後, 約 1 mL の DMSO (使用溶媒) を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらに, DMSO を加えて 2 mL に定容し, 調製原液 (157 mg/mL 溶液) を準備した. DMSO 1 mL に対し, この 157 mg/mL 調製原液 1 mL を加えることにより 78.5 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様な希釈を順次行うことにより, 39.3 および 19.6 mg/mL 溶液を調製した.

調製後, 速やかに処理を行った.

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した.

14.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. K3G77, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC, Lot No. 415ACF, 協和醗酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, Lot No. 4C87N, 大塚製薬工場) を用いて希釈し, 1 mL ずつ分注した後,

凍結保存したものを試験に用いた。

用量は、短時間処理法で 0.1 µg/mL、連続処理法で 0.05 µg/mL とした。

14.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K3G77）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP, Lot No. 4028, 塩野義製薬）を生理食塩液（Lot No. 4C87N）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

用量は 12.5 µg/mL とした。

14.7. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

14.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 1570 µg/mL（10 mM 相当）を最高用量とし、以下、785, 393, 196, 98.1, 49.1, 24.5, 12.3 および 6.13 µg/mL の計 9 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした。

14.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

14.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F：住友ベークライト）の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 094K2331, Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 µL を加え、さらに 18 時間培養を続けた。

14.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行った。

その後の操作は 14.7.3. に記載した方法に準じた。

14.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた。

14.7.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質		
	培養液	S9 mix	溶媒/ 被験物質液
-S9 処理	600 μ L	-	3 μ L
+S9 処理	500 μ L	100 μ L	3 μ L
24 時間処理	600 μ L	-	3 μ L

14.7.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウェルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：Lot No. EWK9790, 和光純薬工業）を加えて10分間細胞を固定した。次いで、0.1%クリスタル・バイオレット（Lot No. K31134240, Merck）水溶液で10分間細胞を染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。各ウェルに色素溶出液（30%エタノール、1%酢酸水溶液）を3 mL 加え、5分間放置した。各ウェルの溶出液を96ウェルのプレート（アッセイプレート, IWAKI）に各々300 μ L 分注し、マイクロプレートリーダー（モデル450, BIO・RAD）を用いて570 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（＝細胞生存率）を各用量群について求めた。

14.8. 染色体異常試験

14.8.1. 用量

細胞増殖抑制試験の結果、いずれの処理においても最高用量の1570 μ g/mL（10 mM 相当）で細胞の増殖を50%以上抑制することはなかった。従って、染色体異常試験では1570 μ g/mL を最高用量とし、785, 393 および196 μ g/mL の計4用量を設定した。

処理法	用量 (μ g/mL)			
短時間処理法-S9 処理	196	<u>393</u>	<u>785</u>	<u>1570</u>
短時間処理法+S9 処理	196	<u>393</u>	<u>785</u>	<u>1570</u>
連続処理法 24 時間処理	196	<u>393</u>	<u>785</u>	<u>1570</u>

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり2枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mmのプレート（細胞培養用シャーレ：住友ベークライト）に 8×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 094K2331, Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mLを加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 5 mLを播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は 14.8.3.に記載した方法に準じた。

14.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 5 mLを播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

14.8.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	溶媒／被 験物質液	培養液	S9 mix	陽性対照 物質液
-S9 処理	3.0 mL	—	0.03 mL	2.7 mL	—	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	—	0.03 mL	2.7 mL	—	0.3 mL

14.8.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.8. 標本作製

染色体標本作製の 2 時間前に、最終濃度で $0.2 \mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド溶液（Lot No. 1252976, Invitrogen）を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25%トリプシン溶液（Lot No. 1263419, Invitrogen）を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、 37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え、 37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液（メタノール 3 容：酢酸 1 容）で細胞を固定した。固定液を 2

回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を1枚作製した。その後、染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を1滴滴下し、染色体標本を2枚作製した。スライド標本を十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8 : Lot No. TP601474, Merck) を用いて希釈した1.2%ギムザ染色液 (Lot No. OB318388, Merck) で12分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

14.8.9. 細胞増殖抑制制度の測定

染色体標本作製時に、陰性対照群、各被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスターC-100LU, キッコーマン) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理した細胞液を 50 μ L 添加し、攪拌してから約 20 分間静置した。測定用チューブにこの混合液を 100 μ L 分注し、ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250, キッコーマン) の発光試薬を 100 μ L 添加した後、相対発光量 (Relative Light Unit ; RLU) を測定した。陰性対照群における RLU に対する比 (=細胞生存率) を各用量群について求め、細胞増殖抑制制度とした。

14.8.10. 評価対象

観察用量としては、細胞増殖抑制試験および 14.8.9. の相対細胞増殖率がいずれの処理群においても 50% 以上であったことから、試験した最も高い用量を最高用量とした。いずれにおいても連続する 3 用量を評価対象とした。

14.8.11. 染色体の観察

短時間処理法と連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。始めに短時間処理法について染色体の観察を実施し、その結果、陰性結果が得られたため、引き続き連続処理法の標本についても観察を行った。

各プレート当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下 ($\times 600$) で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap), 染色分体切断 (ctb), 染色分体切断 (csb), 染色分体交換 (cte), 染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.9. 試験成立条件

陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも 5%未満であること。陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること。以上の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

14.10. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞については異常細胞数に含めないで判定した。

異常細胞の出現頻度を、Fisher の直接確率計算法（有意水準片側 2.5%）を用いて検定した。また、用量依存性については、Cochran Armitage の傾向検定（有意水準片側 2.5%）を用いて検定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した。

短時間処理法-S9 処理、同+S9 処理および連続処理法 24 時間処理では、いずれの被験物質処理においても、細胞生存率は陰性対照群の 80%以上を示したことから、50%細胞増殖抑制濃度は算出できなかった。

15.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、全ての処理の 393 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において油滴状の析出物が認められた。被験物質処理終了後、析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理群での染色体構造異常出現頻度は、393 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%, 785 および 1570 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%を示し、陰性対照群（0.5%）と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、393 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 785 および 1570 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%を示し、陰性対照群（0.0%）と同等であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 42.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した.

2-ethylhexyl vinyl ether 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 393 および 785 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 1570 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%を示し, 陰性対照群 (0.0%) と比較し明確な増加は認められなかった. 倍数性細胞の出現頻度は, 393 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 785 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 1570 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%を示し, 陰性対照群 (0.5%) と同等であった.

一方, 陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 24.0% ($p \leq 0.025$) であった.

15.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 3 に示した.

2-ethylhexyl vinyl ether 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 393, 785 および 1570 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%を示し, 陰性対照群 (1.5%) と比較し明確な増加は認められなかった. 倍数性細胞の出現頻度は, 393 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 785 および 1570 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%を示し, 陰性対照群 (1.0%) と同等であった.

一方, 陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され, その出現頻度は 24.5% ($p \leq 0.025$) であった.

15.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始時, 全ての処理の 393 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において油滴状の析出物が認められた. 被験物質処理終了後, 析出等の特筆すべき変化は認められなかった.

16. 考察および結論

2-ethylhexyl vinyl ether の変異原性, すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため, 培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した.

細胞増殖抑制試験結果を基に, 短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理ではガイドライン上定められた最高用量である 1570 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) まで検討した.

その結果, 2-ethylhexyl vinyl ether 処理群の場合, 短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても染色体異常の誘発頻度は陰性対照群と同等の値を示し, 明確な染色体構造異常の誘発は認められなかった.

短時間処理法において陰性と判定されたことから, 連続処理法 24 時間処理の染色体の観察を実施した. その結果, いずれの用量においても明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった.

本被験物質 2-ethylhexyl vinyl ether についての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった.

類縁体すなわち、異性体である hexanol, 2-ethyl-および ethylhexyl acrylate の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告もなかった。

なお、陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも背景データ (Appendix 4) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において 2-ethylhexyl vinyl ether のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

17. 参考とした資料

- Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48: 337-354.
- Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. *The Tissue Culture* 1979; 5: 115-122.
- Evans HJ. In: Hollaender A editor. Cytological methods of detecting chemical mutagens. *Chemical Mutagens*. New York Plenum press 1976; 4: 1-25.
- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Jr. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutat Res* 1979; 66: 277-290.
- Ishidate M. Chromosomal aberration test *in vitro*. Tokyo: REALIZE INC. 1987.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research [editorial]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 22: 269-275.

Exp. No. 9047 (115-198)

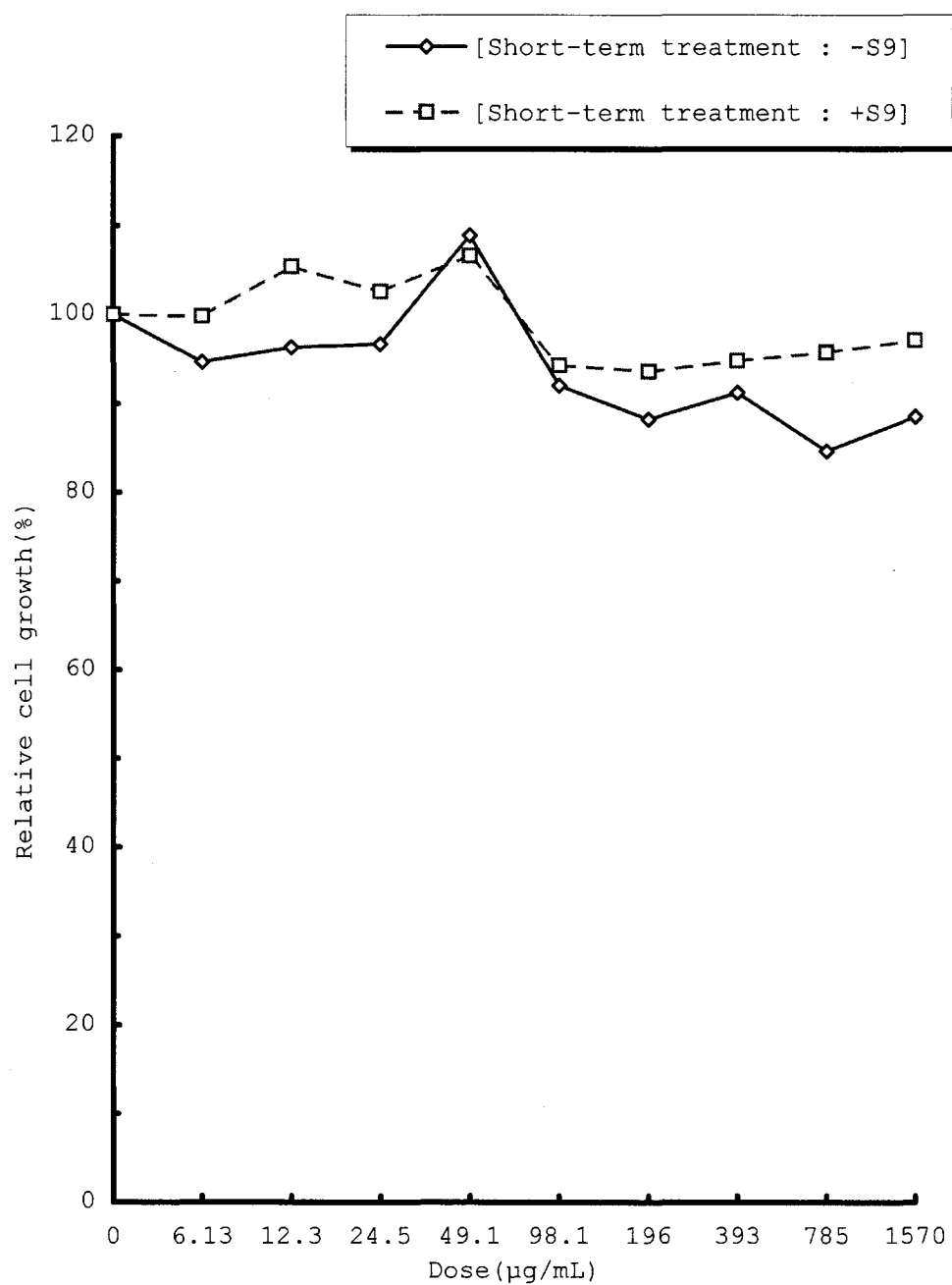


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether [Short-term treatment]

Exp. No. 9047 (115-198)

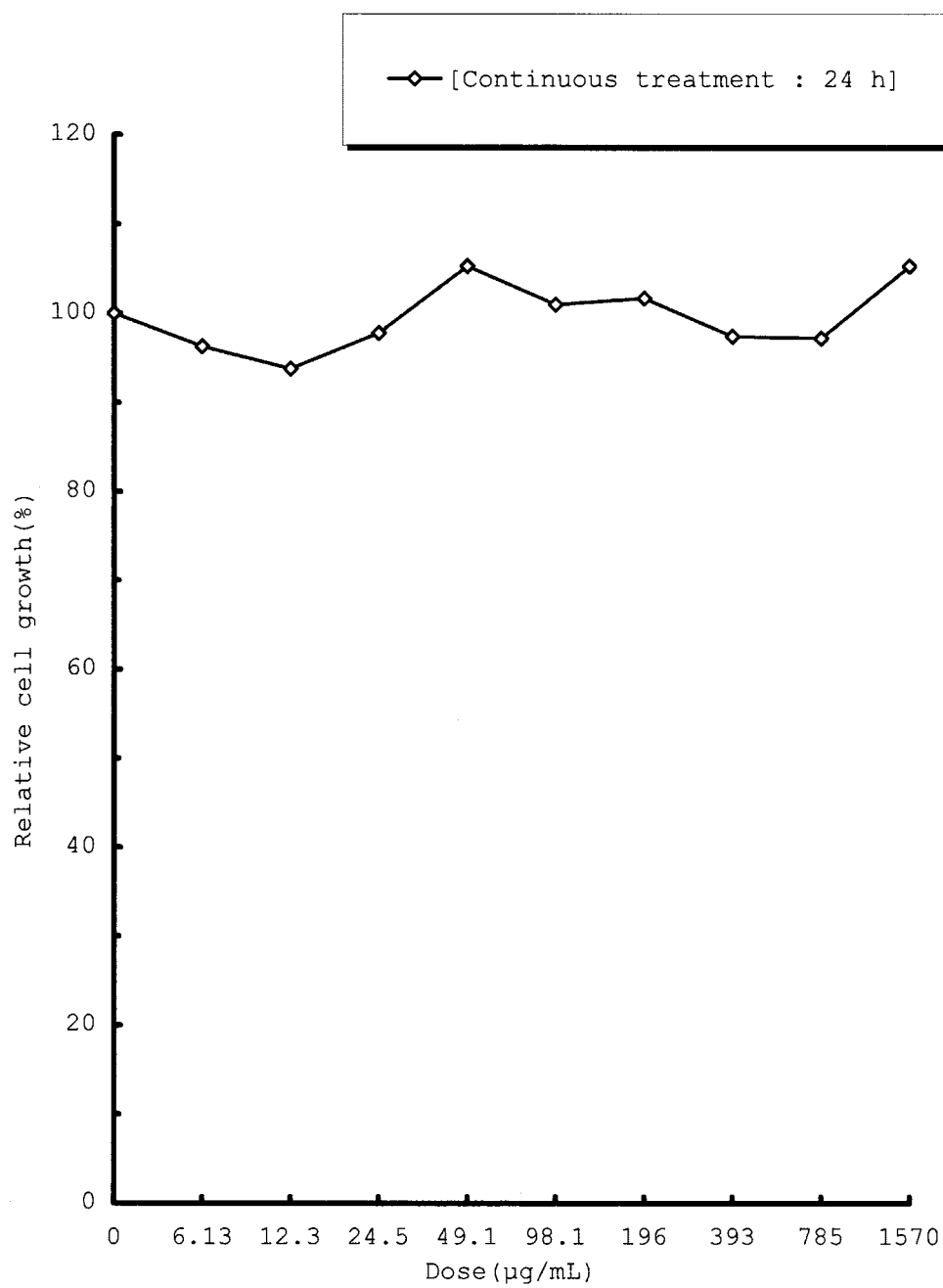


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with
2-ethylhexyl vinyl ether
[Continuous treatment]

Exp. No. 9047(115-198)

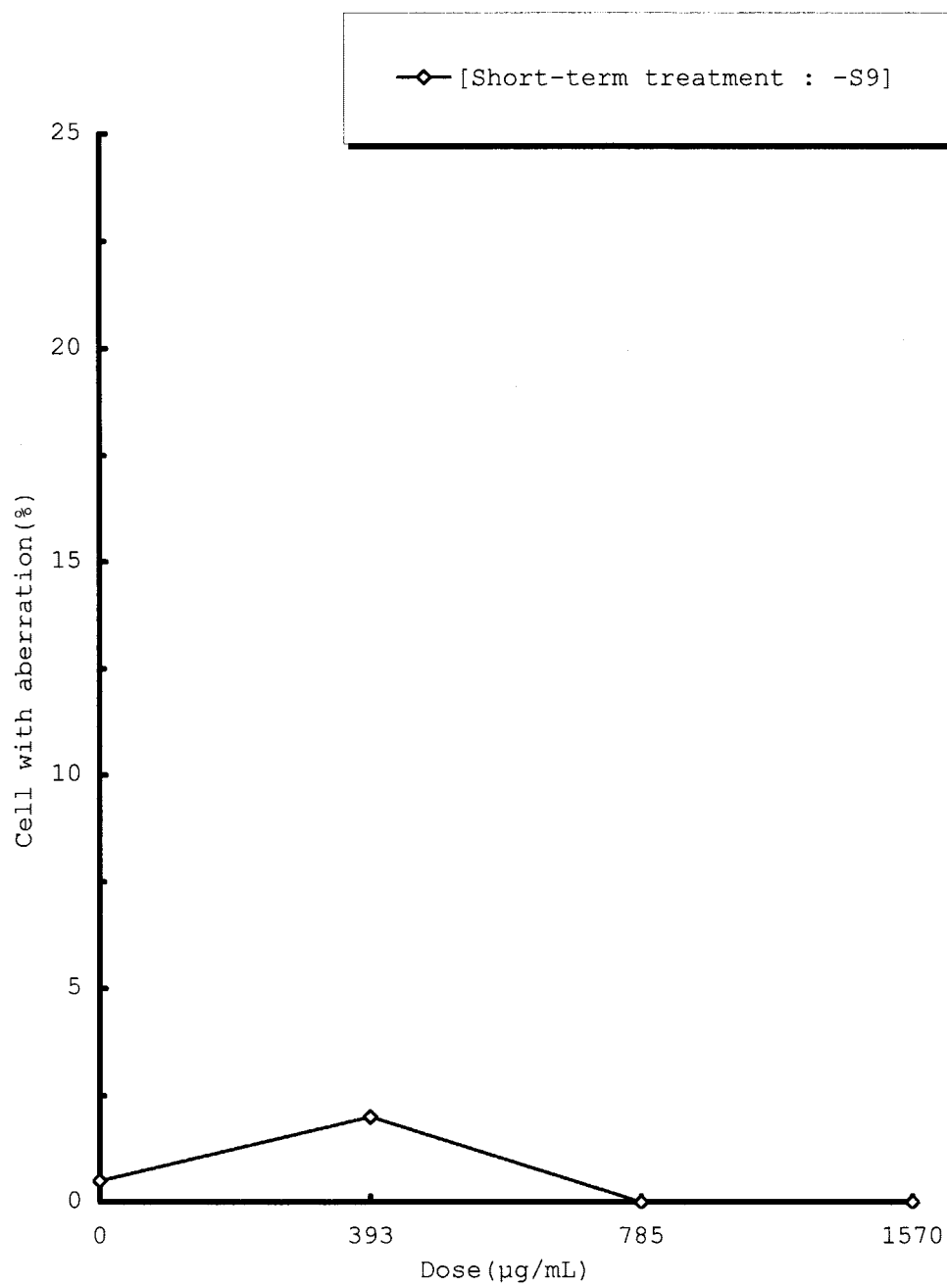


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by
2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment:-S9]

Exp. No. 9047(115-198)

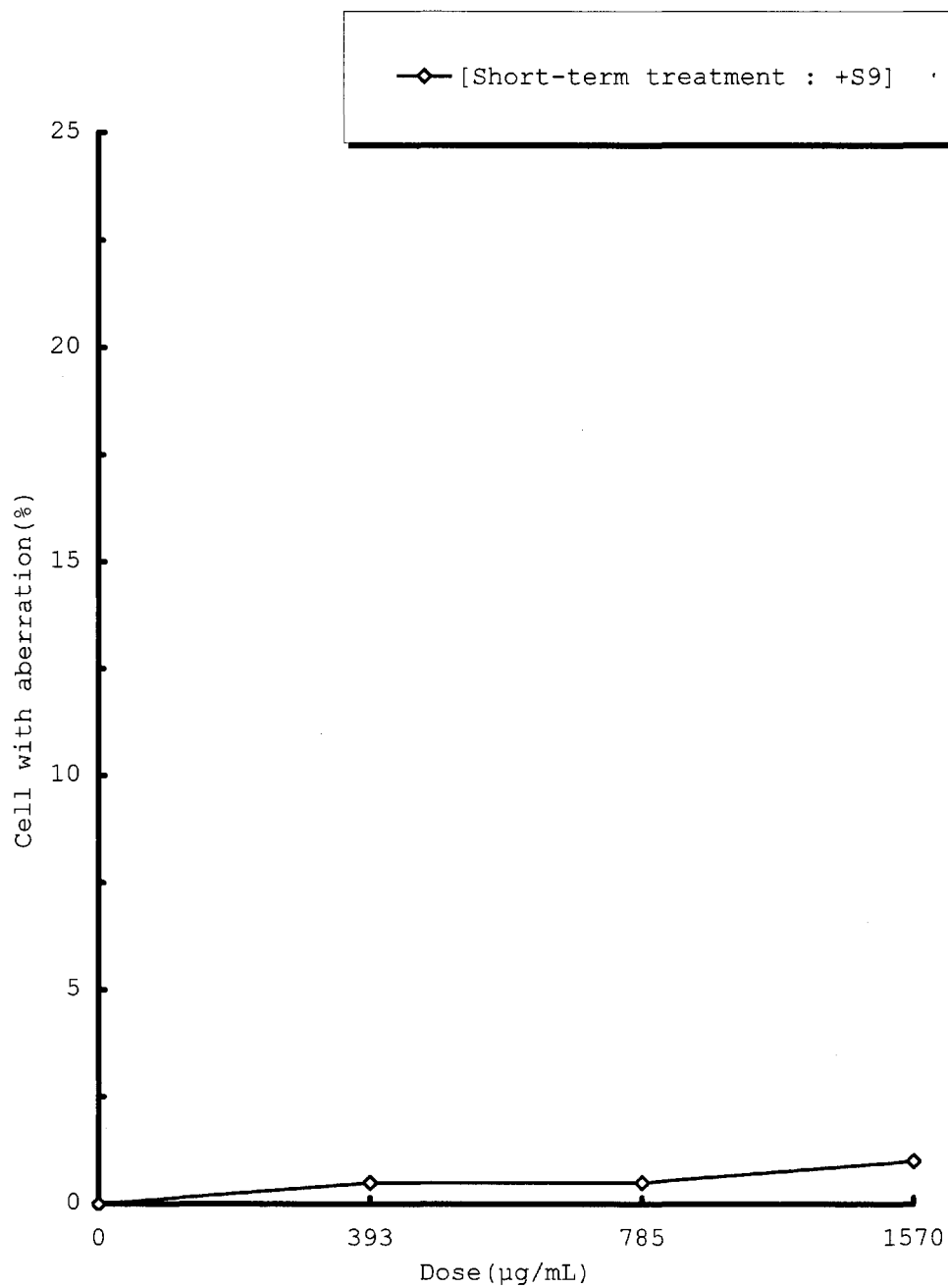


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by
2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment:+S9]

Exp. No. 9047(115-198)

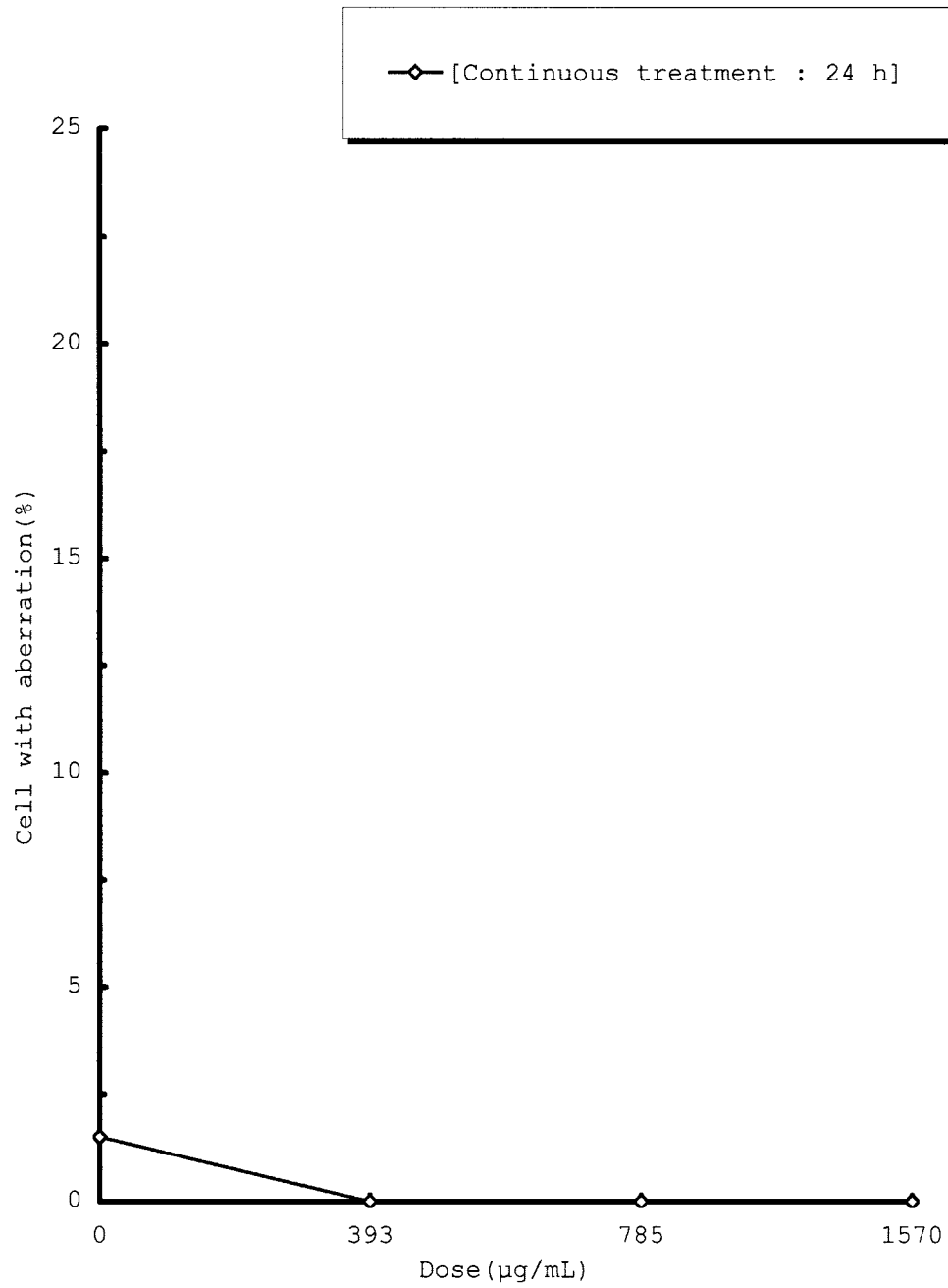


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by
2-ethylhexyl vinyl ether
[Continuous treatment:24 h]

Table 1. Results of growth inhibition test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment]

Exp. No. 9047 (115-198)

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	100.0 100.0	[100.0]	2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	6.13	94.3 95.0	[94.7]		6.13	99.8 99.8	[99.8]
	12.3	93.5 99.2	[96.4]		12.3	106.2 104.5	[105.4]
	24.5	97.9 95.5	[96.7]		24.5	103.4 101.7	[102.6]
	49.1	108.2 109.6	[108.9]		49.1	104.1 109.1	[106.6]
	98.1	90.4 93.6	[92.0]		98.1	94.6 93.9	[94.3]
	196	90.6 85.7	[88.2]		196	93.9 93.2	[93.6]
	393	93.6 88.8	[91.2]		393	99.0 90.6	[94.8]
	785	84.0 85.2	[84.6]		785	96.6 94.8	[95.7]
	1570	87.4 89.5	[88.5]		1570	99.5 94.6	[97.1]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] ——— Not inhibited

[short-term treatment : +S9] ——— Not inhibited

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide,10 µL/mL)

Table 2. Results of growth inhibition test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Continuous treatment]

Exp. No. 9047 (115-198)

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	6.13	94.7 97.9	[96.3]
	12.3	94.0 93.5	[93.8]
	24.5	98.5 97.2	[97.9]
	49.1	99.6 110.9	[105.3]
	98.1	99.3 102.7	[101.0]
	196	101.8 101.5	[101.7]
	393	98.2 96.6	[97.4]
	785	103.8 90.6	[97.2]
	1570	106.5 104.0	[105.3]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Continuous treatment : 24 h] ——— Not inhibited
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide: 10 µL/mL)

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	393	6	89.9	200	3	1	3	0	0	0	4 (2.0)	200	0 (0.0)
	785	6	95.9	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	1570	6	85.7	200	5	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
MMC b)	0.1	6	78.6	200	16	33	67	0	0	0	84 (42.0) *	200	1 (0.5)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control(Mitomycin C)

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	393	6	87.0	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	785	6	89.4	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	2 (1.0)
	1570	6	90.0	200	1	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	1 (0.5)
CP b)	12.5	6	89.0	200	5	8	43	0	0	0	48 (24.0) *	200	1 (0.5)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether
[Continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	24	100.0	200	0	2	1	0	0	0	3 (1.5)	200	2 (1.0)
	393	24	93.8	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	785	24	95.8	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	1570	24	91.6	200	2	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
MMC b)	0.05	24	86.3	200	9	12	38	0	2	0	49 (24.5) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control(Mitomycin C)