

イソプロピル=テトラデカノートの
哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験報告書

試験番号 7492

2017年 3月 3日

目 次

[項目]	[ページ]
表題	i
試験目的	i
GLP対応	i
試験ガイドライン対応	i
試験委託者	i
試験施設の名称及び所在地	i
試験日程	ii
業務分担	ii
試資料の保管	ii
試験責任者の署名、捺印及び日付	ii
運営管理者及び試験責任者陳述書	iii
信頼性保証証明書	iv
本文	v

表題：イソプロピル＝テトラデカノートの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験目的

イソプロピル＝テトラデカノート(被験物質番号：4360)の染色体異常誘発性の有無についてチャイニーズハムスター培養細胞(CHL/TU細胞)を用いて検索した。

GLP対応

試験は、平成23年 3月31日付け、薬食発0331第8号、平成23・03・29製局第6号、環保企発第110331010号、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「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」に準拠して実施した。

試験ガイドライン対応

試験は、平成23年3月31日薬食発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連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(最終改正、平成27年12月21日付け、薬生発1221第1号、20151209製局第1号、環保企発第1512211号)の別添「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」に準じて実施した。

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
東京都千代田区霞が関1-2-2

試験施設の名称及び所在地

独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター
神奈川県秦野市平沢2445番地
電話：0463-82-3911 FAX：0463-82-3860

試験日程

試験開始日	2016年10月13日
短時間処理法	
細胞増殖抑制試験	
実験期間	2016年10月31日 ～ 11月 2日
染色体異常予備試験	
実験期間	2016年10月31日 ～ 11月 8日
染色体異常試験	
実験期間	2016年12月 5日 ～ 12月12日
連続処理法	
細胞増殖抑制試験	
実験期間	2017年 1月10日 ～ 1月12日
染色体異常予備試験	
実験期間	2017年 1月10日 ～ 1月13日
染色体異常試験	
実験期間	2017年 1月16日 ～ 1月23日
試験終了日	2017年 3月 3日

業務分担

運 営 管 理 者	職 氏 名	所長	
運営管理者代行 (2016年9月30日から 2016年10月14日まで)	職 氏 名	管理課長	
試 験 責 任 者	職 氏 名	病理検査部 遺伝毒性試験室	
	経験年数	23年11か月	
試 験 担 当 者	職 氏 名	病理検査部 遺伝毒性試験室	
	職 氏 名	病理検査部 遺伝毒性試験室	
	職 氏 名	病理検査部 遺伝毒性試験室	

試資料の保管

試験計画書、標本、被験物質、生データ、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、その他本試験に係わる試資料は、日本バイオアッセイ研究センターの標準操作手順書に従って、試資料保管施設に保管する。被験物質は、1g程度を保管して、残量を廃棄する。保管期間は、最終報告書作成後10年間とする。

試験責任者の署名、捺印及び日付

試験責任者



陳 述 書

試験番号： 7492

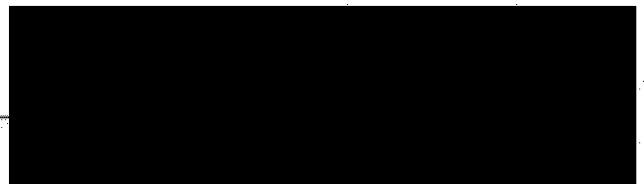
試験名： イソプロピル=テトラデカノートの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常
試験

記

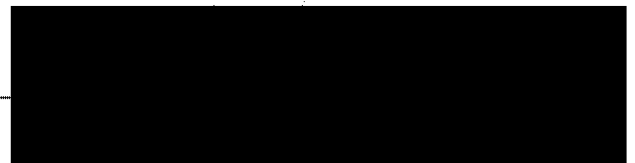
上記試験は、平成23年 3月31日付け、薬食発0331第8号、平成23・03・29製局第6号、
環企発第110331010号、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省
総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基
準について」に準拠して実施され、この報告書はその試験結果に基づいてまとめられた
ものに相違ありません。

独立行政法人労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター

運営管理者



試験責任者



信頼性保証証明書

標 題 (表 題) イソプロピル=テトラデカノアートの
哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 7492

被験物質の名称 イソプロピル=テトラデカノアート

本試験は、平成 23 年 3 月 31 日薬食発第 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連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(最終改正、平成 27 年 12 月 21 日付け、薬生発 1221 第 1 号、20151209 製局第 1 号、環保企発第 1512211 号)の別添「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」に準拠して実施された。

最終報告書には、試験で使用方法及び手順が正確に記載されており、報告結果は、試験の生データを正確に反映していることを認める。

なお、監査・査察の実施日及び報告日は以下のとおりである。

対 象	監査・査察実施日	運営管理者及び試験責任者への報告日
試験計画書	2016 年 10 月 13 日	2016 年 10 月 13 日
試験の実施	2016 年 12 月 5, 6, 7, 8 日 2017 年 1 月 16, 17, 18 日	2016 年 12 月 8 日 2017 年 1 月 18 日
被験物質の管理	2017 年 2 月 16 日	2017 年 2 月 16 日 2017 年 3 月 3 日
データの取り扱い管理	2017 年 2 月 9 日～ 2 月 16 日	
最終報告書	2017 年 2 月 9 日～ 2 月 16 日 2017 年 3 月 3 日	

2017 年 3 月 3 日

信頼性保証責任者

所 属 独立行政法人 労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター
職 名 信頼性保証主管

氏 名

イソプロピル＝テトラデカノートの
哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験報告書

試験番号 7492

本 文

本文目次

[項目]	[ページ]
1. 要約	1
2. 試験材料	
2-1. 被験物質	2
2-2. 被験物質溶液	3
2-3. 陽性対照	4
2-4. 陰性対照	4
2-5. 使用した細胞	5
2-6. 代謝活性化	5
3. 試験方法	
3-1. 採用した試験方法	7
3-2. 試験構成	7
3-3. 短時間処理法による試験	7
3-4. 連続処理法による試験	8
3-5. 染色体標本の作製	8
3-6. 細胞増殖率の測定	9
3-7. 染色体の観察	9
4. 試験成績	
4-1. 短時間処理法による試験	11
4-2. 連続処理法による試験	12
5. 結果の判定	13
6. 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	13
7. 参考文献	13
試験結果表 1～6	14
試験結果図 1～5	20

1. 要約

イソプロピル=テトラデカノアートの染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来培養細胞(CHL/IU)を用いて検索した。

染色体異常試験の短時間処理法(6時間処理-20時間培養)は、-S9処理、+S9処理ともに、最高用量を1.8 mg/ml(約2 μ l/ml)として、公比2で5段階の用量で実施した。試験の結果、-S9処理、+S9処理ともに構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの被験物質用量においても0.7%以下であり、陰性対照と比較して統計学的(フィッシャー正確検定)に有意な増加は認められなかった。細胞増殖率(相対的細胞数増加: RICC)は、0.11、0.23、0.45、0.90、1.8 mg/mlの各用量において、-S9処理では、99、98、94、81、89%、+S9処理では、100、97、93、84、91%であり、-S9処理、+S9処理ともに0.90 mg/mlで最も減少した。被験物質の析出が、-S9処理、+S9処理ともに0.45～1.8 mg/mlで認められた。

連続処理法の24時間処理(24時間処理-0時間培養)は、最高用量を1.8 mg/mlとして、公比2で5段階の用量で実施した。試験の結果、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの被験物質用量においても0.3%以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。細胞増殖率(RICC)は、0.11、0.23、0.45、0.90、1.8mg/mlの各用量において、86、77、72、72、71%であり、0.23～1.8 mg/mlの用量で細胞増殖阻害を示した。被験物質の析出が0.45～1.8 mg/mlで認められた。

各処理条件(短時間処理法の-S9処理及び+S9処理、連続処理法の24時間処理)における構造異常細胞及び数的異常細胞の出現率について、傾向検定(コ克蘭・アーミテージ検定)を実施した結果、被験物質の用量依存性が有意となる処理条件はなかった。

以上の結果より、本被験物質のCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

2. 試験材料

2-1. 被験物質（被験物質番号：4360）

2-1-1. 被験物質の性質

化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	イソプロピル=テトラデカノアート					
別 名	ミリスチン酸イソプロピル					
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)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{O}}{\overset{\parallel}{\text{C}}}-\text{O}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_3$					
試験に供した 化学物質の純度	98.0% (キャピラリーカラムGC)			試験に供した化学物質 のロット番号		ECJ2197
不純物の名称及び 濃度(含有率)	—					
C A S 番 号	110-27-0		蒸 気 圧		—	
分 子 量	270.45		分 配 係 数 (1-オクタノール/水分配係数)		7.17	
融 点	—		常温における性状		無色、澄明の液体	
沸 点	192°C/20 mmHg		密度 (20°C)		0.853 g/ml	
安 定 性	水： — 光： — 熱： —					
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の 安定性	溶媒	溶解度	溶媒中の 安定性
	水	ほとんど溶けない [18 mg/ml未満*]	—	DMSO**	180 mg/ml未満*	—
	エタノール	—	—	その他 (アセトン)	溶ける [360 mg/ml以上*]	—
供 試 元	和光純薬工業株式会社			製造年月日	2015年8月	
使 用 期 限	設定なし〔製造元の商品保証の期間(入手より半年)内に試験を実施した〕					

* 日本バイオアッセイ研究センター内の試験による

** ジメチルスルホキシド

2-1-2. 保管及び取り扱い

被験物質は、被験物質保管区域で室温にて保管した。被験物質の取り扱いは、黄色灯下で行った。

2-2. 被験物質溶液

2-2-1. 被験物質溶液の調製

被験物質を秤量し、アセトンを加えて溶解した溶液を最高濃度溶液(処理最高濃度の200倍)とした。これをアセトンで段階希釈して各溶液を調製した。調製作業は、黄色灯下で行った。また、アセトンは常温で揮発するため、アセトンを用いた被験物質溶液調製及び段階希釈の作業は氷冷条件下(0℃)で実施し、使用までの保存の際も氷冷した。

使 用 溶 媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グ レード	純度(%)
	アセトン	和光純薬工業(株)	EPJ3958	インフィニティ [®] 7	100.0
溶 媒 選 択 の 理 由	被験物質は、水及びジメチルスルホキシド(DMSO)に対しては試験に用いるのに十分な溶解度を示さなかった(水: 18 mg/ml未満、DMSO: 180 mg/ml未満)が、アセトンに対しては十分な溶解度(360 mg/ml以上)を示した。また、被験物質に水、DMSO、アセトンを加えた際には、発色、発泡、発熱等の変化が認められなかった。以上のことから、アセトンを溶媒として選択した。なお、当センターでは、アセトンを総量の0.5%で使用すれば染色体異常試験の溶媒として使用可能であることを確認している。				
被験物質溶液の性状	溶解				
被験物質が難溶性の場合における分散等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	短時間処理法による試験 細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験 5分 0℃ 染色体異常試験 5分 0℃ 連続処理法による試験 細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験 5分 0℃ 染色体異常試験 5分 0℃				
純 度 換 算 の 有 無	無し				

2-2-2. 被験物質溶液の処理

細胞への処理は、調製した被験物質溶液を速やかに培養液へ添加することにより行った。被験物質溶液の培養液への添加量は、処理溶液総量の0.5%とした。処理作業は、黄色灯下で行った。

被験物質溶液の処理量

	被験物質溶液	S9 mix	培養液
短時間処理(-S9)	0.015 ml	—	3.0 ml
短時間処理(+S9)	0.015 ml	0.20 ml	2.8 ml
連続処理	0.025 ml	—	5.0 ml

2-3. 陽性対照

2-3-1. 陽性対照物質

物質名		製造元	Lot No.	グレード	純度	溶媒名
陽性対照	マイトマイシンC (MMC)	和光純薬工業(株)	ECP4367	生化学用	989 μ g/mg (力価)	超純水
	シクロホスファミド (CYP)	和光純薬工業(株)	SAF6104	生化学用	99.4%	超純水
陽性対照物質溶媒	超純水	自家製	—	(ミリーQ水)	—	

2-3-2. 陽性対照物質の選択理由

MMC、CYPともにCHL/IU細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されており¹⁾、日本バイオアッセイ研究センターにおける背景データも豊富なため。

2-3-3. 陽性対照物質溶液の調製、保存について

MMC、CYPともに、所定の濃度溶液を調製、分注し、凍結保存(-30℃)したものを1本ずつ使用した。

2-3-4. 陽性対照物質及び用量

短時間処理法

-S9処理：マイトマイシンC(MMC) 用量 0.12 μ g/ml

+S9処理：シクロホスファミド(CYP) 用量 6.0 μ g/ml

連続処理法

24時間処理：マイトマイシンC(MMC) 用量 0.040 μ g/ml

2-4. 陰性対照

陰性(溶媒)対照として、アセトンを培養液に添加した。

2-5. 使用した細胞

2-5-1. 細胞

CHL/IU(チャイニーズハムスター新生仔肺由来の株細胞)のクローン11[国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)より1985年11月14日入手]をマイコプラズマの汚染が無いことを確認して使用した。

2-5-2. 選定理由

この系は、染色体異常試験において化学物質に対する感受性が高いことが知られていて、データも豊富なため¹⁾。

2-5-3. 細胞の特徴

1) 培養条件

培養液： 10%非働化仔牛血清(Biowest社、ロット番号：S12160S0750)を含むイーグルMEM(日水製薬株)

条件： 5%CO₂、37℃で培養し、2～4日毎に継代した。

2) 増殖

プレート上で単層状に増殖

倍加時間： 約14時間

3) 染色体

染色体数モード： 25本

4) 保存

DMSO(和光純薬工業株式会社、インフィニティピュア)を培養液に10%になるように加え、液体窒素中(-196℃)で保存したものを融解、培養して試験に使用した。

2-5-4. 継代数

国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)より継代数16を入手し、試験には総継代数22～35(当センターでの継代数は6～19)で使用した。

2-6. 代謝活性化

2-6-1. S9の入手方法等

自製・購入の別	購 入 (製造元 キッコーマンバイオケミファ株式会社)
製 造 年 月 日	2016年 9月 9日 製造 *
購入の場合のLot No.	RAA 201609A
保 存 温 度	-80℃

* 製造日から6か月以内のS9を使用した。

2-6-2. S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・ Sprague-Dawley	名称	フェノバルビタール(PB) 5,6-ベンゾフラボン(BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間 及び 投与量	1日目：PB 30 mg/kg体重 2日目：PB 60 mg/kg体重 3日目：PB 60 mg/kg体重 BF 80 mg/kg体重 4日目：PB 60 mg/kg体重 5日目 S9調製
体重	184 – 227 g		

2-6-3. S9 mixの組成

成分	S9 mix 1 ml中の量	成分	S9 mix 1 ml中の量
S9	0.3 ml	NADP	4 μmol
MgCl ₂	5 μmol	Na-リン酸緩衝液	—
KCl	33 μmol	その他(HEPES)	4 μmol
グルコース 6-リン酸	5 μmol	—	—

2-6-4. S9 mixの処理条件

① プレート法		2. 浮遊細胞法	3. その他()
S9量(最終濃度)	2 %		
S9蛋白量(最終濃度)	0.43 mg/ml		
処理時間	6 h		
培養(回復)時間	20 h		
備考	—		

3. 試験方法

3-1. 採用した試験方法

試験は、平成23年3月31日薬食発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、環境企発第110331009号環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(最終改正、平成27年12月21日付け、薬生発1221第1号、20151209製局第1号、環境企発第1512211号)の別添「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」に準じて実施した。

3-2. 試験構成

染色体異常試験は、短時間処理法による試験及び連続処理法による試験により構成した。短時間処理法による試験において陰性と判定したため、連続処理法による試験を行った。

3-3. 短時間処理法による試験

短時間処理法による試験(6時間処理・20時間培養)は、代謝活性化法による場合(+S9処理)、及び代謝活性化法によらない場合(-S9処理)の条件下で実施した。

3-3-1. 細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験

試験は、各用量2枚のシャーレを処理して、細胞増殖抑制試験に用いた。処理した2枚の内の1枚を用いて染色体標本作製した(染色体異常予備試験用)。細胞毒性(増殖抑制)の指標として、相対的細胞数増加(RICC: Relative Increase Cell Count)を用いた。ガイドライン(上記3-1)で求められる最高用量(2 mg/ml、2 µl/mlまたは10mMのいずれか低い濃度)としては2 µl/ml(約1.8 mg/ml)が適切であったため、1.8 mg/mlを最高用量とし、公比2で8段階の用量で試験を実施した。+S9処理、-S9処理ともに0.056 mg/ml以下の用量は、位相差顕微鏡による観察で明らかに毒性が無いと判断し、染色体標本作製しなかった。作製した染色体標本については全て染色体観察を行った。細胞増殖抑制試験の対照として陰性対照、染色体異常予備試験の対照として陰性対照及び陽性対照を設けた。

実験方法

60mmシャーレに120000個(30000個/ml×4 ml)の細胞を播種し、1日間培養後に培養液を交換(-S9処理: 培養液 3.0 ml、+S9処理: 培養液 2.8 ml及びS9mix 0.2 ml)した。直ちに、被験物質溶液(0.015 ml)を添加し、6時間作用させた後に、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で一回洗浄し、新しい培養液3.5 mlを添加した。さらに20時間培養後に生細胞数計測及び染色体標本の作製を行った。また、被験物質溶液処理時に、無処理のシャーレ3枚を用いて生細胞数計測を行った。

3-3-2. 染色体異常試験

試験は、各用量2枚のシャーレを処理して、染色体標本の作製及び生細胞数計測を行った。用量は、細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験の結果に基づき、最高用量を1.8 mg/mlとして、公比2で5段階に設定した。染色体標本は、処理した全てのシャーレについて作製し、染色体観察を行った。試験の対照として、陰性対照及び陽性対照を設けた。実験方法は、3-3-1と同じ方法で実施した。

3-4. 連続処理法による試験

連続処理法は、24時間処理(24時間処理-0時間培養)とし、代謝活性化系を用いないで行った。

3-4-1. 細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験

試験は、各用量2枚のシャーレを処理して、細胞増殖抑制試験に用いた。処理した2枚の内の1枚を用いて染色体標本を作製した(染色体異常予備試験用)。細胞毒性の指標として相対的細胞数増加(RICC)を用いた。短時間処理法による試験の結果を参考に最高用量を1.8 mg/mlとして、公比2で7段階の用量で実施した。0.056 mg/ml以下の用量は、位相差顕微鏡による観察で明らかに毒性が無いと判断し、染色体標本を作製しなかった。作製した染色体標本については全て染色体観察を行った。細胞増殖抑制試験の対照として陰性対照、染色体異常予備試験の対照として陰性対照及び陽性対照を設けた。

実験方法

60mmシャーレに120000個(30000個/ml×4 ml)の細胞を播種して、1日培養後に培養液を交換(5.0 ml)した。直ちに、被験物質溶液(0.025 ml)を添加し、被験物質処理開始から24時間作用させた後に生細胞数計測及び染色体標本の作製を行った。また、被験物質溶液処理時に無処理のシャーレ3枚を用いて生細胞数計測を行った。

3-4-2. 染色体異常試験

試験は、各用量2枚のシャーレを処理して、染色体標本の作製及び生細胞数計測を行った。用量は、細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験の結果に基づき、最高用量を1.8 mg/mlとして、公比2で5段階に設定した。染色体標本は、処理した全てのシャーレについて作製し、染色体観察を行った。試験の対照として、陰性対照及び陽性対照を設けた。実験方法は、3-4-1と同じ方法で実施した。

3-5. 染色体標本の作製

染色体標本の作製2時間前に、コルセミドを最終濃度0.1 µg/mlとなるように添加した。2時間後培養液を遠沈管に移し、一定量のトリプシン溶液で細胞を剥して単一細胞の懸濁液とし、遠沈管に加えて染色体標本作製に用いた。遠沈管を遠心[1000 rpm(185×g)、

5分]し、培養液を除去し、75 mM KCl溶液4 mlを徐々に添加して、37℃で20分間の低張処理を行った。冷却した固定液(エタノール 3 : 酢酸 1) 0.5 mlを徐々に添加して遠心した。上清を除去し、冷却した固定液4 mlを徐々に添加して固定した後、遠心した。この操作を3回繰り返した後、適当な密度の細胞浮遊液を作製した。清浄なスライドガラスを並べて、細胞浮遊液を滴下した。これを乾燥後、2.5%ギムザ液(pH6.8)で12分間染色し、水洗後乾燥させた。

3-6. 細胞増殖率の測定

染色体標本作製のために一定量のトリプシン溶液で細胞を剥し、単一細胞の懸濁液としたものの一部を用いて、血球計算盤で生細胞数を測定し、相対的細胞数増加(RICC)を算出した。同時に、相対的細胞数(RCC: Relative Cell Count)を算出した。結果表1、3、4及び6には相対的細胞数増加(RICC)を示し、さらに、結果表3及び6には相対的細胞数(RCC)を併せて示した。

$$\text{RICC}(\%) = \frac{[\text{処理した培養細胞における細胞数の増加 (終了時－開始時)}]}{[\text{陰性対照の培養細胞における細胞数の増加(終了時－開始時)}]} \times 100$$

$$\text{RCC}(\%) = \frac{[\text{処理した培養細胞における細胞数 (終了時)}]}{[\text{陰性対照の培養細胞における細胞数(終了時)}]} \times 100$$

3-7. 染色体の観察

染色体構造異常については、各培養器当たり150個（各用量当たりでは予備試験：150個、本試験：300個）の分裂中期細胞を観察した。数的異常については、各培養器当たり150細胞以上の分裂中期細胞を観察した(構造異常細胞の観察と並行して行い、構造異常の観察対象となる細胞が150個に達するまで観察した)。染色体異常の誘発率は、染色体に異常を持つ細胞の出現率で表した。観察は、コード化した標本を用いてブラインド法で行った。

3-7-1. 異常の分類

a) 構造異常

- 切断 (染色分体型)
- 交換 (染色分体型)
- 切断 (染色体型)
- 交換 (染色体型)
- その他 (断片化など、ただし細粉化は含まない)

b) ギャップ (染色分体型・染色体型)

c) 数的異常

- 倍数体
- その他 (核内倍加等)

3-7-2. 観察基準

CHL/IU細胞が株細胞であること及びその染色体の特徴を考慮して観察基準を下記とした^{1, 2)}。構造異常の観察対象は、染色体数が 25 ± 2 本の細胞とした。

a) 構造異常

1) 切断

断片が染色分体の縦軸からずれているもの。同一線上にあっても、その幅が染色分体の太さを越えるもの(ただし、細長い染色体では、この基準としない)。染色体型の切断については、動原体を持たない染色体があるため正確に判定できるもののみスコアした。

2) 交換

1本又は複数の染色体の2ヶ所以上で生じた切断が互いに結合したもの。染色体型については、環状、二動原体等明確に判断できるもののみとした。

3) その他

断片化：交換型を含まず、多くの染色体にギャップ、切断があるもの。

b) ギャップ

非染色部分が染色分体の縦軸上にあり、その幅が染色分体より狭く、非染色部分の形状が明確なもの。

c) 数的異常

1) 倍数体

3倍体(37本)以上のもの。異数性については検索しなかった。

2) その他

核内倍加等。

3-7-3. 判定

以下の判定基準により結果の判定を行った。

構造異常細胞あるいは数的異常細胞(倍数体、核内倍加を含む)の出現率について、次に掲げる全ての要件を満たすものと認められた場合に陽性と判定した。

- a) 少なくとも1つの濃度において、陰性対照と比較して統計学的(フィッシャー正確検定)に有意に増加していること
- b) 傾向検定(コ克蘭・アーミテージ検定)において、用量依存性があること
- c) 試験結果が、当センターの陰性対照の背景データの分布(二項分布)から外れていること

以上の要件に合致しない場合を陰性とした。なお、ギャップのみを持つ細胞は構造異常細胞に含めなかった。

4. 試験成績

4-1. 短時間処理法による試験

4-1-1. 細胞増殖抑制試験

短時間処理法の試験結果を表1及び図1に示した。細胞増殖率(相対的細胞数増加: RICC)は、0.45、0.90、1.8 mg/mlの各用量において、-S9処理では、92、88、92%、+S9処理では、92、86、90%であり、-S9処理、+S9処理ともに0.90 mg/mlで最も減少した。被験物質の析出が-S9処理、+S9処理ともに0.45～1.8 mg/mlで認められた。

4-1-2. 染色体異常予備試験

短時間処理法の試験結果を表2に示した。-S9処理、+S9処理ともに、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの被験物質用量においても0.7%以下であり、陰性対照と比較して統計学的(フィッシャー正確検定)に有意な増加は認められなかった。被験物質の析出が-S9処理、+S9処理ともに0.45～1.8 mg/mlで認められた。

このため、本試験の用量設定は、この結果及び細胞増殖抑制試験の結果を考慮し、-S9処理、+S9処理ともに、最高用量を1.8 mg/mlとして、公比2で5段階に設定した。

4-1-3. 染色体異常試験

短時間処理法の試験結果を表3及び図2、3に示した。-S9処理、+S9処理ともに、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの被験物質用量においても0.7%以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。被験物質の析出が0.45～1.8 mg/mlで認められた。

細胞増殖率(RICC)は、0.11、0.23、0.45、0.90、1.8 mg/mlの各用量において、-S9処理では、99、98、94、81、89%、+S9処理では、100、97、93、84、91%であり、-S9処理、+S9処理ともに0.90 mg/mlの用量で最も減少した。

4-2. 連続処理法による試験

4-2-1. 細胞増殖抑制試験

連続処理法の24時間処理の試験結果を表4及び図4に示した。細胞増殖率(相対的細胞数増加:RICC)は、0.23、0.45、0.90、1.8 mg/mlの各用量において、82、78、78、78%であり、0.23～1.8 mg/mlで細胞増殖阻害を示した。被験物質の析出が0.45～1.8 mg/mlで認められた。

4-2-2. 染色体異常予備試験

連続処理法の24時間処理の試験結果を表5に示した。構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの被験物質用量においても0%であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。被験物質の析出が0.45～1.8 mg/mlで認められた。

このため、本試験の用量設定は、この結果及び細胞増殖抑制試験の結果を考慮して、最高用量を1.8 mg/mlとして、公比2で5段階に設定した。

4-2-3. 染色体異常試験

連続処理法の24時間処理の試験結果を表6及び図5に示した。構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの被験物質用量においても0.3%以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。被験物質の析出が0.45～1.8 mg/mlで認められた。

細胞増殖率(RICC)は、0.11、0.23、0.45、0.90、1.8 mg/mlの各用量において、86、77、72、72、71%であり、0.23～1.8 mg/mlで細胞増殖阻害を示した。

なお、各処理条件(短時間処理法の-S9処理及び+S9処理、連続処理法の24時間処理)における構造異常細胞及び数的異常細胞の出現率について、傾向検定(コクラン・アーミテージ検定)を実施した結果、被験物質の用量依存性が有意となる処理条件はなかった。また、実施した全ての染色体異常試験の陰性対照及び陽性対照の値は、当センターのバックグラウンドデータの範囲内にあり、試験が適切に行われたことを示していた。

5. 結果の判定

短時間処理法の-S9処理及び+S9処理、連続処理法の24時間処理における構造異常細胞あるいは数的異常細胞の出現率について、以下の3つの統計処理を行ったが、①それぞれの処理条件の陰性対照と比較して、統計学的(フィッシャー正確検定)に有意となる被験物質処理群はなかった。②各処理条件における傾向検定(コ克蘭・アーミテージ検定)の結果、被験物質の用量依存性が有意となる処理条件はなかった。③何れの被験物質処理群の各異常細胞の出現率も、当センターの陰性対照の背景データの分布(二項分布)から外れていなかった。また、短時間処理法、連続処理法ともに、準拠した試験ガイドラインで要求される最高用量[1.8 mg/ml(約2 µl/ml)]まで試験を実施した。

以上の結果より、本被験物質のCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

6. 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は発生しなかった。また、試験計画書に従わない事態は発生しなかった。なお、試験計画書の被験物質の別名の記載に誤りがあったため、報告書で訂正した。また、試験委託者の希望により、試験委託者名称の記載の一部を変更した。

7. 参考文献

- 1) 祖父尼俊雄監修：染色体異常試験データ集、LIC、東京、1999.
- 2) 日本環境変異原学会編：化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店、東京、1988.

表1 細胞増殖抑制試験結果(短時間処理法)

被験物質名: イソプロピル＝テトラデカノアート

代謝活性化法によらない場合(-S9処理:6-20h)		代謝活性化法による場合(+S9処理:6-20h)	
用量(mg/ml)	細胞増殖率(%)	用量(mg/ml)	細胞増殖率(%)
0	100	0	100
0.014	100	0.014	102
0.028	99	0.028	103
0.056	102	0.056	103
0.11	94	0.11	99
0.23	95	0.23	101
0.45†	92	0.45†	92
0.90†	88	0.90†	86
1.8 †	92	1.8 †	90

[備考] 括弧には処理時間及び回復時間を記入した。

細胞増殖率は陰性対照群を100%とし、用量の低い順に記録した。

細胞増殖率は2枚のシャーレの平均値を表示した。

細胞増殖率は相対的細胞数増加(RICC)で表示した。

被験物質の析出が見られた用量の右に†を付した。

表2 染色体異常予備試験結果(短時間処理法)

被験物質名： イソプロピル＝テトラデカノアート

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の出現頻度(%)							ギャップの 出現頻度 (%)	染色体数的異常の出現頻度(%)			
			観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞 ^{a)}		観察細胞数	倍數体	その他	総異常細胞
6-20	-	陰性対照 [ACETONE] (0.5%)	150	0	0.7	0	0	0	0.7	0	150	0	0	0
		0.11	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
		0.23	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
		0.45†	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
		0.90†	150	0.7	0	0	0	0	0.7	0	150	0	0	0
		1.8 †	150	0	0	0	0	0	0	0.7	151	0.7	0	0.7
		陽性対照 [MMC] (0.00012)	150	2	34.7	0	0	0	36**	0	150	0	0	0
6-20	+	陰性対照 [ACETONE] (0.5%)	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
		0.11	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
		0.23	150	0	0.7	0	0	0	0.7	0	150	0	0	0
		0.45†	150	0	0	0	0	0	0	0	151	0.7	0	0.7
		0.90†	150	0	0.7	0	0	0	0.7	0	151	0.7	0	0.7
		1.8 †	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
		陽性対照 [CYP] (0.006)	150	3.3	36.7	0	0	0	40**	0	150	0	0	0

【備考】 1. 処理時間の欄には、処理時間・回復時間の順に記入した。

2. 被験物質の析出が見られた用量の右に†を付した。

ACETONE: アセトン

MMC: マイトマイシンC

CYP: シクロホスファミド

^{a)} Fisher exact test: ** p<0.01

表3 染色体異常試験結果(短時間処理法)

被験物質名： イソプロピル=テトラデカノアート

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数(出現頻度%)							ギャップの 出現数 (%)	相対的 細胞数 (RCC, %)	相対的細胞数増加 (RICC, %)	染色体数的異常の細胞数(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	総異常細胞数 ^{a)}				観察細胞数	倍數体	その他	総異常細胞数
6-20	-	陰性対照 [ACETONE] (0.5%)	150	0	0	0	0	0	0	0			150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	100	100	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)			300	0(0)	0(0)	0(0)
		0.11	150	0	0	0	0	0	0	0	98	97	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	100	100	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(99)	(99)	300	0(0)	0(0)	0(0)
		0.23	150	0	0	0	0	0	0	0	94	91	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	102	104	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(98)	(98)	300	0(0)	0(0)	0(0)
		0.45†	150	0	0	0	0	0	0	1	95	92	151	1	0	1
			150	0	0	0	0	0	0	0	97	95	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.3)	(96)	(94)	301	1(0.3)	0(0)	1(0.3)
		0.90†	150	0	0	0	0	0	0	1	87	79	151	1	0	1
			150	0	0	0	0	0	0	0	89	83	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.3)	(88)	(81)	301	1(0.3)	0(0)	1(0.3)
		1.8 †	150	0	0	0	0	0	0	0	90	85	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	95	93	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(93)	(89)	300	0(0)	0(0)	0(0)
		陽性対照 [MMC] (0.00012)	150	4	60	0	0	0	61	0	68	49	151	1	0	1
			150	3	49	0	0	0	50	3	76	61	150	0	0	0
			300	7(2.3)	109(36.3)	0(0)	0(0)	0(0)	111(37.0)**	3(1.0)	(72)	(55)	301	1(0.3)	0(0)	1(0.3)
6-20	+	陰性対照 [ACETONE] (0.5%)	150	0	0	0	0	0	0	0			151	1	0	1
			150	0	0	0	0	0	0	1	100	100	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.3)			301	1(0.3)	0(0)	1(0.3)
		0.11	150	0	0	0	0	0	0	0	98	97	152	2	0	2
			150	0	0	0	0	0	0	0	102	102	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(100)	(100)	302	2(0.7)	0(0)	2(0.7)
		0.23	150	0	0	0	0	0	0	0	93	89	151	1	0	1
			150	0	0	0	0	0	0	0	103	104	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(98)	(97)	301	1(0.3)	0(0)	1(0.3)
		0.45†	150	0	0	0	0	0	0	0	90	84	151	1	0	1
			150	0	0	0	0	0	0	0	101	102	151	1	0	1
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(96)	(93)	302	2(0.7)	0(0)	2(0.7)
		0.90†	150	0	0	0	0	0	0	0	92	87	151	1	0	1
			150	0	0	0	0	0	0	0	87	80	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(90)	(84)	301	1(0.3)	0(0)	1(0.3)
		1.8 †	150	0	0	0	0	0	0	0	94	91	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	94	91	150	0	0	0
			300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(94)	(91)	300	0(0)	0(0)	0(0)
		陽性対照 [CYP] (0.006)	150	2	49	0	0	0	51	0	65	45	151	1	0	1
			150	1	44	0	0	0	44	5	67	47	150	0	0	0
			300	3(1.0)	93(31.0)	0(0)	0(0)	0(0)	95(31.7)**	5(1.7)	(66)	(46)	301	1(0.3)	0(0)	1(0.3)

【備考】 1. 処理時間の欄には、処理時間・回復時間の順に記入した。
2. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入し、括弧内に出現頻度を記入した。
3. 相対的細胞数(RCC)と相対的細胞数増加(RICC)の二種類の細胞増殖率を示した。
4. 被験物質の析出が見られた用量の右に†を付した。

ACETONE: アセトン
MMC: マイトマイシンC
CYP: シクロホスファミド

^{a)} Fisher exact test: ** p<0.01

傾向検定(Cochran-Armitage test)		
構造異常	-S9 mix	有意差なし
	+S9 mix	有意差なし
数的異常	-S9 mix	有意差なし
	+S9 mix	有意差なし

表4 細胞増殖抑制試験結果(連続処理法)

被験物質名: イソプロピル＝テトラデカノート

24時間処理(24・0h)による場合	
用量(mg/ml)	細胞増殖率(%)
0	100
0.028	100
0.056	101
0.11	97
0.23	82
0.45†	78
0.90†	78
1.8 †	78

[備考] 括弧には処理時間及び回復時間を記入した。

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。

細胞増殖率は陰性対照群を100%とし、用量の低い順に記録した。

細胞増殖率は2枚のシャーレの平均値を表示した。

細胞増殖率は相対的細胞数増加(RICC)で表示した。

被験物質の析出が見られた用量の右に†を付した。

表5 染色体異常予備試験結果(連続処理法)

被験物質名: イソプロピル=テトラデカノアート

処理時間 (h)	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の出現頻度(%)							ギャップの 出現頻度 (%)	染色体数的異常の出現頻度(%)			
		観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞 ^{a)}		観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞
24-0	陰性対照 [ACETONE] (0.5%)	150	0	0	0	0	0	0	0.7	150	0	0	0
	0.11	150	0	0	0	0	0	0	0.7	150	0	0	0
	0.23	150	0	0	0	0	0	0	0.7	150	0	0	0
	0.45†	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
	0.90†	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
	1.8 †	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
	陽性対照 [MMC] (0.00004)	150	4	30	0	0	0	32.7**	0.7	150	0	0	0

【備考】 1. 処理時間の欄には、処理時間・回復時間の順に記入した。

^{a)} Fisher exact test: ** p<0.01

2. 被験物質の析出が見られた用量の右に†を付した。

ACETONE: アセトン

MMC: マイトマイシンC

表6 染色体異常試験結果(連続処理法)

被験物質名： イソプロピル＝テトラデカノート

処理時間 (h)	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数(出現頻度%)							ギャップの 出現数 (%)	相対的 細胞数 (RCC, %)	相対的細胞 数増加 (RICC, %)	染色体数的異常の細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体体切断	染色体体交換	その他	総異常細胞数 ^{a)}				観察細胞数	倍數体	その他	総異常細胞数
24-0	陰性対照 [ACETONE] (0.5%)	150	0	0	0	0	0	0	0	100	100	150	0	0	0
		150	0	0	0	0	0	0	0			150	0	0	0
		300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)			300	0(0)	0(0)	0(0)
	0.11	150	0	0	0	0	0	0	0	94 90 (92)	89 83 (86)	150	0	0	0
		150	1	0	0	0	0	1	0			151	1	0	1
		300	1(0.3)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.3)	0(0)			301	1(0.3)	0(0)	1(0.3)
	0.23	150	0	0	0	0	0	0	0	88 87 (88)	78 76 (77)	150	0	0	0
		150	0	0	0	0	0	0	0			150	0	0	0
		300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)			300	0(0)	0(0)	0(0)
	0.45†	150	0	0	0	0	0	0	1	83 86 (85)	69 75 (72)	150	0	0	0
		150	0	0	0	0	0	0	0			151	1	0	1
		300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.3)			301	1(0.3)	0(0)	1(0.3)
	0.90†	150	0	0	0	0	0	0	0	84 85 (85)	70 74 (72)	150	0	0	0
		150	0	0	0	0	0	0	0			151	1	0	1
		300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)			301	1(0.3)	0(0)	1(0.3)
	1.8 †	150	0	0	0	0	0	0	0	84 84 (84)	71 70 (71)	150	0	0	0
		150	0	0	0	0	0	0	0			150	0	0	0
		300	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)			300	0(0)	0(0)	0(0)
	陽性対照 [MMC] (0.00004)	150	1	48	0	2	0	51	5	75 69 (72)	56 44 (50)	150	0	0	0
		150	9	56	0	0	0	64	0			150	0	0	0
		300	10(3.3)	104(34.7)	0(0)	2(0.7)	0(0)	115(38.3)**	5(1.7)			300	0(0)	0(0)	0(0)

【備考】 1.処理時間の欄には、処理時間・回復時間の順に記入した。
2.各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入し、括弧内に出現頻度を記入した。
3.相対的細胞数(RCC)と相対的細胞数増加(RICC)の二種類の細胞増殖率を示した。
4.被験物質の析出が見られた用量の右に†を付した。
ACETONE: アセトン
MMC: マイトマイシンC

傾向検定(Cochran-Armitage test)		
構造異常	24-0 h	有意差なし
数的異常	24-0 h	有意差なし

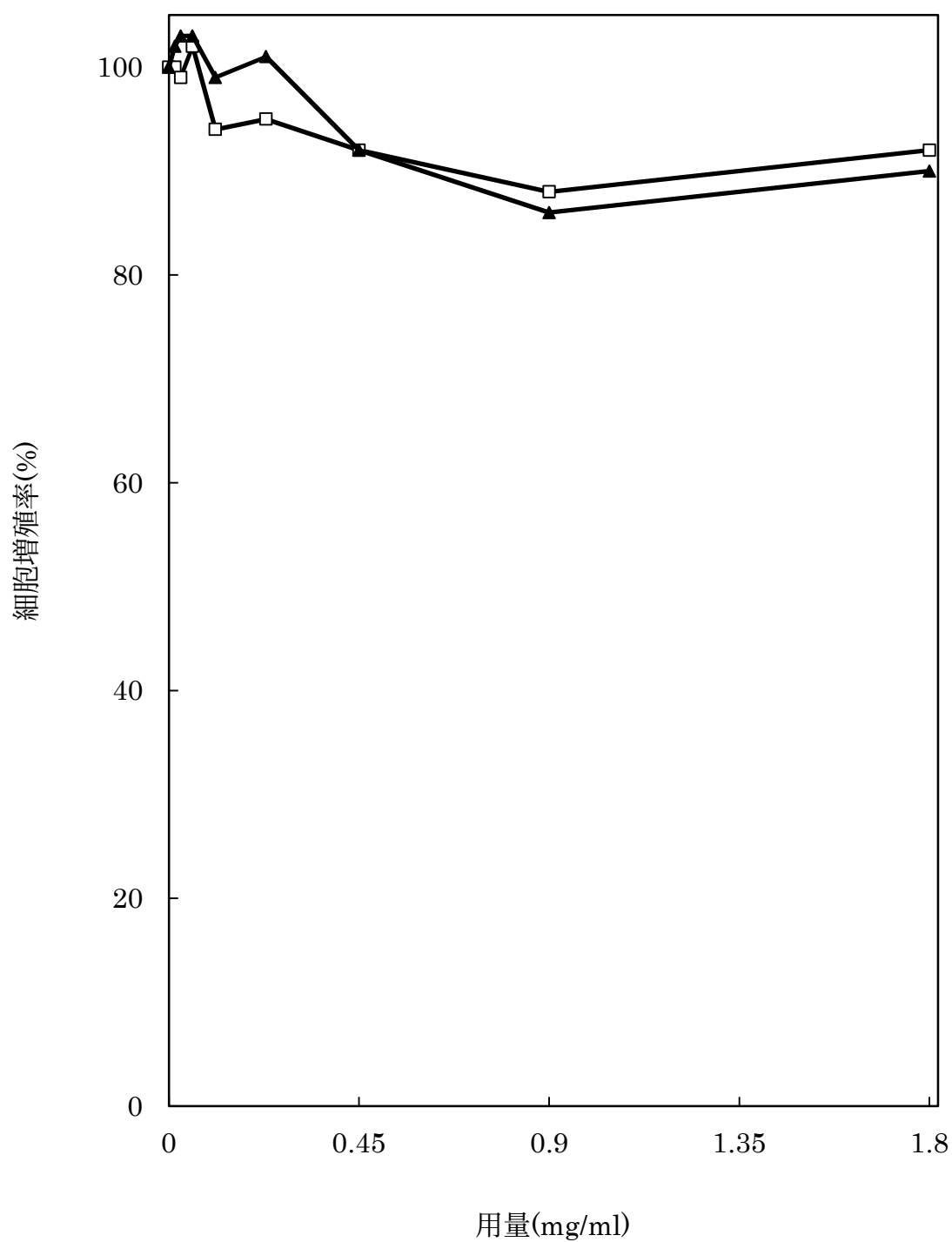


図1 細胞増殖抑制試験結果(短時間処理法)

被験物質名： イソプロピル=テトラデカノアート

□ -S9処理
▲ +S9処理

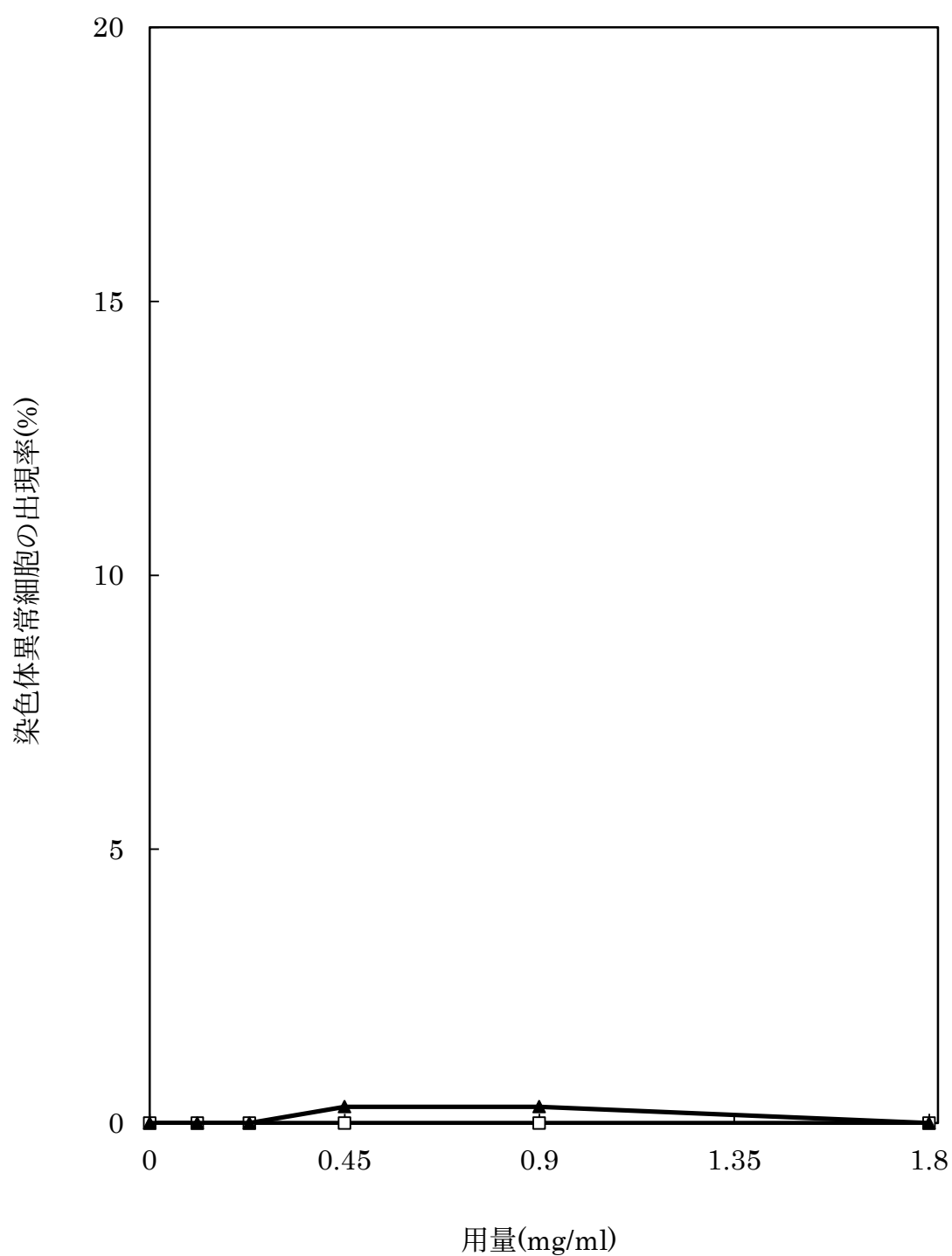


図2 染色体異常試験結果(短時間処理法、-S9処理)

被験物質名： イソプロピル＝テトラデカノアート

—□— 構造異常

—▲— 数的異常

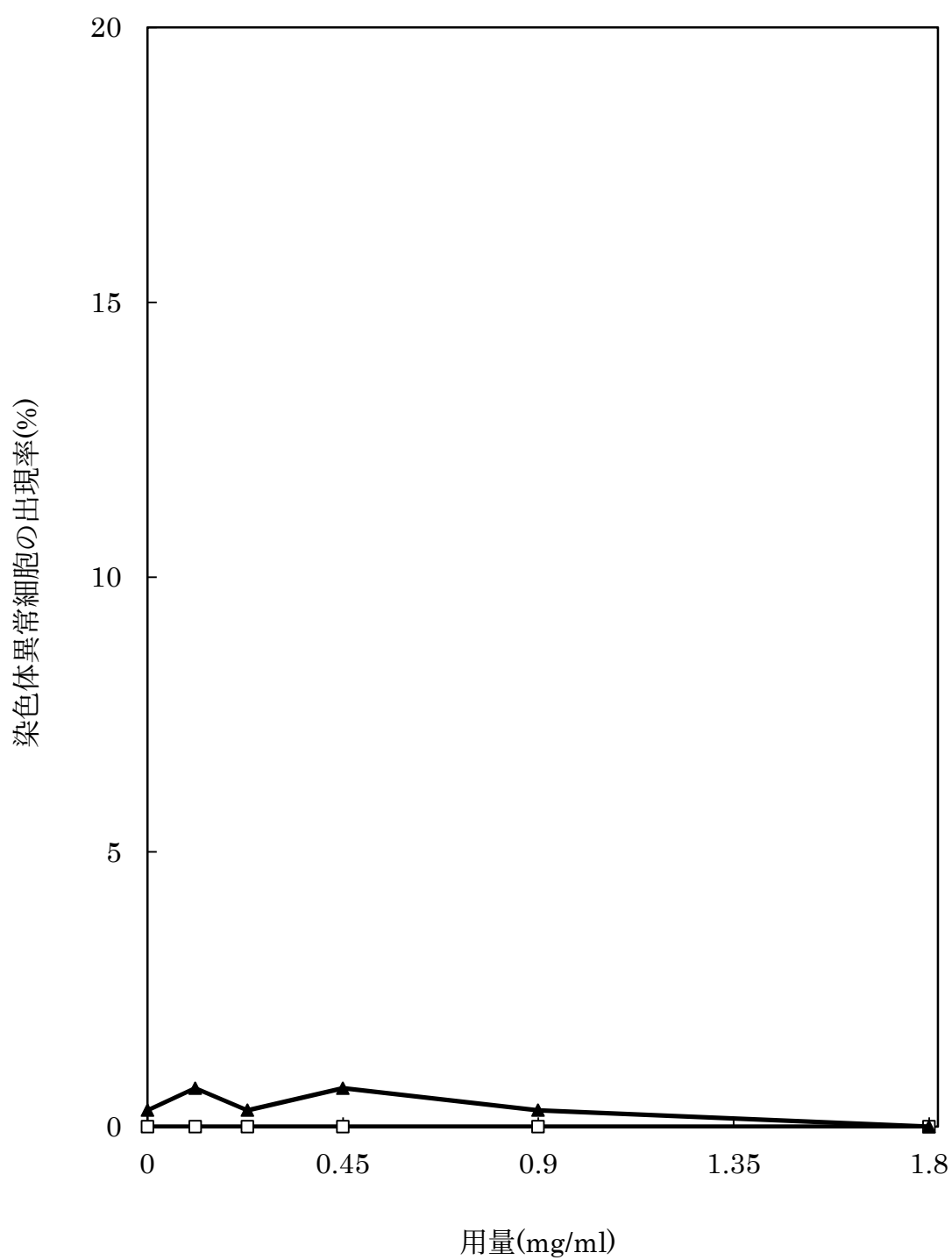


図3 染色体異常試験結果(短時間処理法、+S9処理)

被験物質名： イソプロピル=テトラデカノアート

—□— 構造異常

—▲— 数的異常

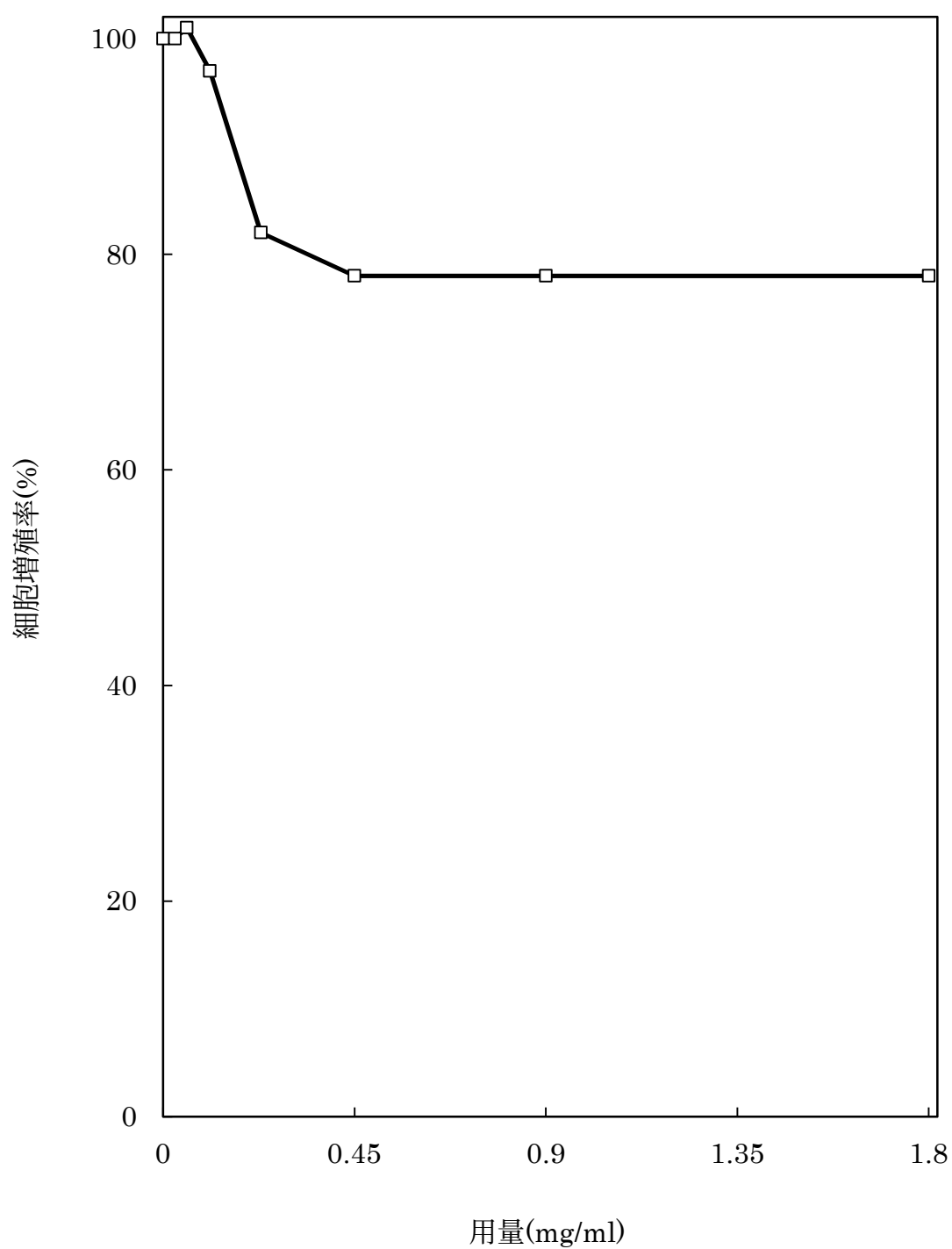


図4 細胞増殖抑制試験結果(連続処理法)

被験物質名： イソプロピル＝テトラデカノアート

—□—24時間処理

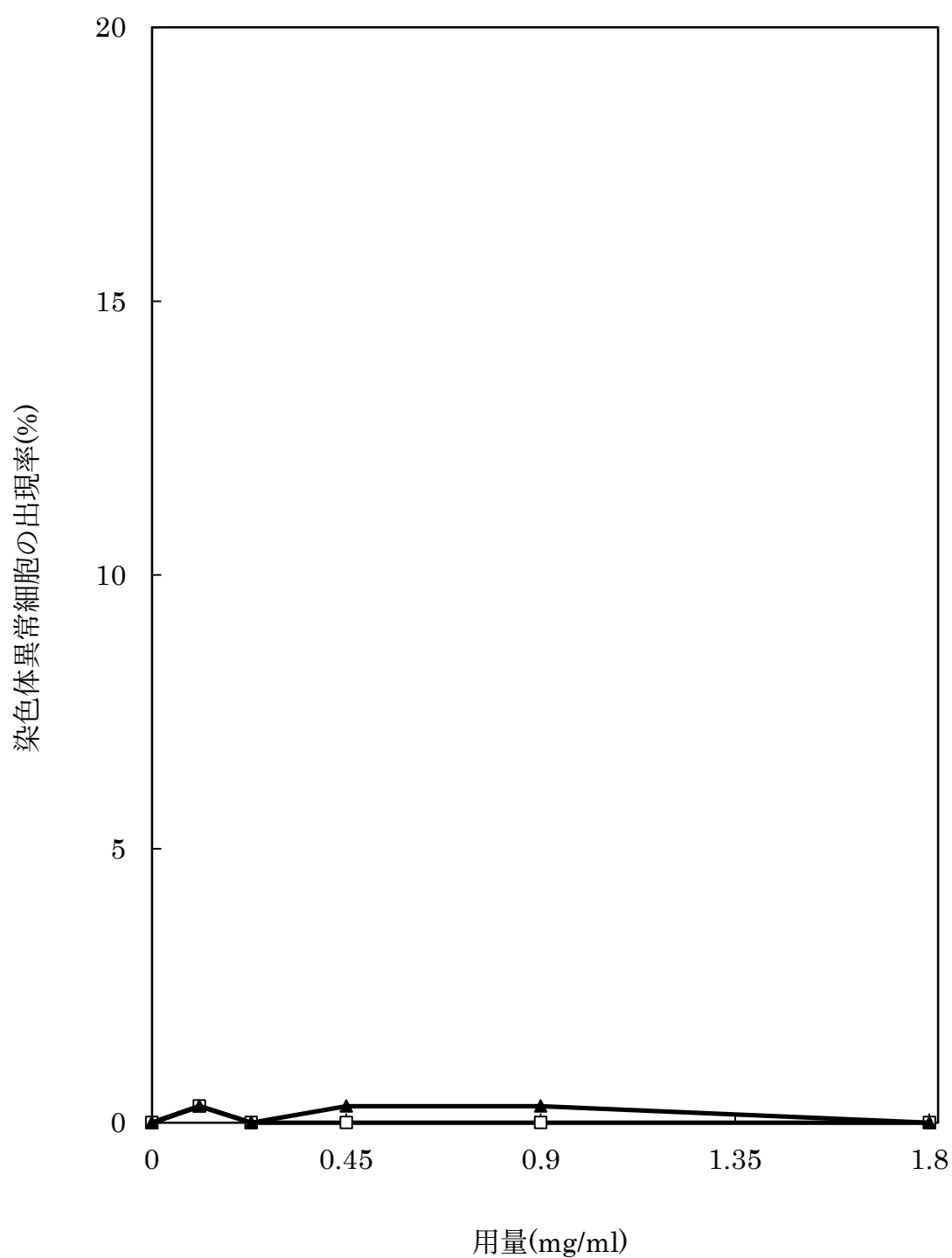


図5 染色体異常試験結果(連続処理法、24時間処理)

被験物質名： イソプロピル＝テトラデカノアート

—□— 構造異常

—▲— 数的異常