

最終報告書

Undecanal 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

厚生労働省医薬食品局審査管理課 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

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729 番地の

TEL 0463-82-4751

試験委託者 厚生労働省医薬食品局審査管理課 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-13-020

被験物質 Undecanal

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 2013 年 9 月 26 日

実験開始日 2013 年 10 月 4 日

実験終了日 2014 年 2 月 14 日

試験終了日 試験責任者の捺印日

試験資料保管場所 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

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 日付け、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 日付け、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、環境企発第 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。

2014 年 03 月 27 日

試験責任者



試験従事者

試験責任者

試験担当者

培養

検体調製および細胞処理

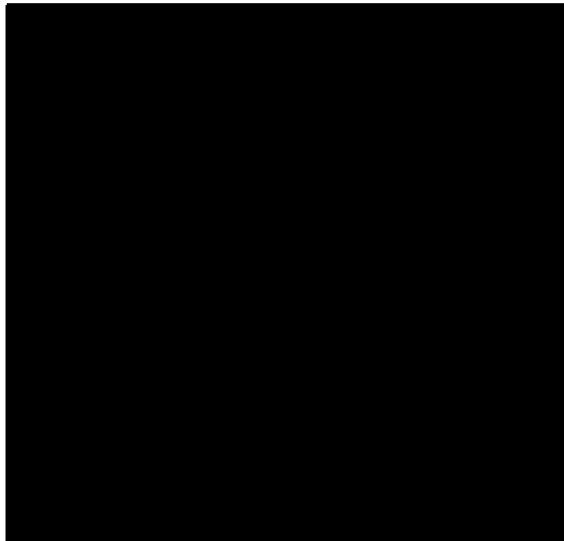
細胞増殖率測定用サンプル作製

細胞増殖率測定

染色体標本作製

染色体分析

被験物質管理



目次

要約	5
試験目的	6
試験ガイドラインと GLP	6
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. 細胞増殖抑制試験	8
7. 染色体異常試験	8
8. 染色体分析	9
9. 試験成立条件	10
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	11
参考文献	13
Figure	14
Tables	15
Appendices	19

(最終ページ:20 ページ)

信頼性保証書

要約

Undecanal 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。

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 0.086 mg/mL および 0.31 mg/mL、24 時間連続処理では 0.073 mg/mL と推定されたことから、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理については、50%細胞増殖抑制濃度の約 1.5 および約 1.8 倍となる 0.13 mg/mL を最高濃度とし、下記の濃度群を設定した。また、S9 mix 存在下の短時間処理については、被験物質の沈殿物の影響と考えられる細胞増殖率の上昇が認められたことや、ディッシュ間のバラつきが認められたことから、1.7 mg/mL (約 10 mM) を最高濃度とし、下記の濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.017、0.026、0.039、0.058、0.087、0.13 mg/mL (公比 1.5)

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.053、0.11、0.21、0.43、0.85、1.7 mg/mL (公比 2)

24 時間連続処理: 0.017、0.026、0.039、0.058、0.087、0.13 mg/mL (公比 1.5)

なお、肉眼観察の結果、S9 mix 存在下の短時間処理において、処理開始時は 0.11 mg/mL 以上、処理終了時はすべての被験物質処理群で培養液中に沈殿が認められた。

染色体分析に先立ち、分裂指数を分析した結果、S9 mix 存在下の短時間処理については観察対象が 2 濃度群しか得られなかったことから、細胞増殖抑制試験および染色体異常試験の細胞増殖率、ならびに分裂指数の分析結果を基に、0.42 mg/mL を最高濃度とし、公比 1.5 で 7 濃度群 (0.037、0.055、0.083、0.12、0.19、0.28、0.42 mg/mL) を設定して再試験を行った。

再試験では、処理開始時および処理終了時においてそれぞれ 0.19 mg/mL 以上、および 0.28 mg/mL 以上の被験物質処理群で培養液中に沈殿が認められた。

分裂指数の分析結果をもとに、分析可能な最高濃度を決定し、以下の 3 濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.026、0.039、0.058 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.055、0.083、0.12 mg/mL

24 時間連続処理: 0.026、0.039、0.058 mg/mL

染色体分析の結果、構造異常についてはすべての処理条件で統計学的に有意な増加は認められなかった。倍数性細胞については、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では統計学的に有意な増加は認められなかったが、24 時間連続処理ではすべての被験物質処理群で統計学的に有意な増加(出現率 3.9~4.0%)が認められ、傾向性検定の結果、用量依存性も認められた。

以上の結果より、undecanal は本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体の構造異常は誘発しないが、倍

数性細胞を誘発すると結論した。

試験目的

Undecanal 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 日付け、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 日付け、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、環境企発第 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

被験物質である undecanal[化学名(IUPAC 名):ウンデカナール、略称:Und、CAS 番号:112-44-7、分子式: $C_{11}H_{22}O$ 、分子量:170.30、ロット番号:N633K、含量:98.8%(GC)Appendix 1]は、無色～わずかにうすい黄色の透明な液体である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 2 に示す。被験物質は東京化成工業株式会社から購入し、使用時まで冷蔵(1～15℃、実測値:3～6℃)、暗所、密閉し、開封後は窒素充填して保管した。

被験物質原体の安定性については、製品安全データシート中に、適切な条件下においては安定と記載されている。また、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実験終了後に、被験物質の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、スペクトルに変化の無いことを確認した(試験番号:Q-13-011)。

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:558AAA、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:120M1253V、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:K2E84、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 共に 2013 年 8 月 2

日)を用時解凍して、調製後 6 ヶ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(細胞増殖抑制試験)、2 代(染色体異常試験)および 7 代(染色体異常試験再試験)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、CO₂ インキュベーター(5%CO₂、37 °C 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 °C、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%NaHCO₃ 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:RAA20130705、2013 年 7 月 5 日製造および RAA20130926、2013 年 9 月 26 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°C)に保管し、製造後 6 ヶ月以内に使用した。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°C)に保管し、使用時(調製後 6 ヶ月以内に使用)はこれに S9、MgCl₂ 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 25:5 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 MgCl₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度で水およびジメチルスルホキシドには溶解しないが、アセトンに溶解したことから、溶媒としてアセトン(ロット番号:EPE1169、和光純薬工業、試薬特級)を用いた。

被験物質を秤量したのち、溶媒(アセトン)を加えて原液(細胞増殖抑制試験および染色体異常試験 170 mg/mL、染色体異常試験再試験:42.0 mg/mL)を用時調製した。その原液を溶媒で段階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 1 vol%添加して処理を行った。

[細胞増殖抑制試験]

2.66、5.31、10.6、21.3、42.5、85.0、170 mg/mL(公比 2)

[染色体異常試験]

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理

1.71、2.57、3.85、5.78、8.67、13.0 mg/mL (公比 1.5)

S9 mix 存在下の短時間処理

5.31、10.6、21.3、42.5、85.0、170 mg/mL (公比 2)

[染色体異常試験再試験]

3.68、5.53、8.30、12.4、18.7、28.0、42.0 mg/mL (公比 1.5)

なお、被験物質調製液(原液)調製時に目視により、発熱、発泡、変色等の変化の無いことを確認した。

被験物質の溶媒中での安定性については、室温、遮光下で保管した 0.01 mg/mL 溶液および 200 mg/mL 溶液について調製後 4 時間以上の安定性を確認した(試験番号:Q-13-011)。

なお、含量分析については、「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. 細胞増殖抑制試験

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、試験法ガイドラインに従い 1.7 mg/mL (約 10 mM)を最高処理濃度とする 7 濃度群(0.027~1.7 mg/mL、公比 2)を設定して細胞増殖抑制試験を実施した。

CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシン溶液を用いてはがした後、 4×10^3 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL (2×10^4 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。

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 および S9 反応液と交換(3 mL/ディッシュ)した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 1 vol%添加(30 μ L/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(5 mL/ディッシュ)した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 1 vol%添加(50 μ L/ディッシュ)し 24 時間処理した。各群 2 枚のディッシュを用いた。また、処理開始時および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、10 vol%ホルマリン水溶液で細胞を固定したのち、0.1%クリスタルバイオレット液で染色し、陰性対照群に対する被験物質処理群の細胞密度を単層培養細胞密度計(MI-60、オリンパス光学工業)で測定し、増殖抑制の指標とした。

7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験とほぼ同じ試験条件で染色体異常試験を行った。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理は 50%細胞増殖抑制濃度のそれぞれ約 1.5 倍および約 1.8 倍となる 0.13 mg/mL を最高濃度とし公比 1.5 で 6 濃度群を設定し、S9 mix 存在下の短時間処理は 50%細胞増殖抑制濃度以上の濃度群で細胞増殖率の上昇が見られたこと、および同一濃度で細胞増殖率がディッシュ間でバラつきが見られる被験物質処理群が認められたことから 1.7 mg/mL (約 10 mM) を最高濃度とし、公比 2 で 6 濃度群を設定した。さらに溶媒(陰性)対照群および陽性対照群も設けた。1 濃度あたり 4 枚のディッシュ(ただし陽性対照群は染色体標本作製用 2 枚のみ)を用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製し、残りの 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

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、MMC (20 μ g/mL) を、S9 mix 非存在下の短時間処理では 15 μ L/ディッシュ(最終濃度:0.1 μ g/mL)、連続処理では 12.5 μ L/ディッシュ(最終濃度:0.05 μ g/mL)添加した。S9 mix 存在下の短時間処理では CP (1 mg/mL) を 30 μ L/ディッシュ(最終濃度:10 μ g/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。

染色体標本作製用のディッシュについては、培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 μ g/mL になるように添加した。培養終了後、培養液を捨て 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 加えてピペッティングにより細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。細胞懸濁液を遠沈(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、約 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。

なお、S9 mix 非存在下の短時間処理については、染色体分析可能な被験物質処理群が 2 濃度しか得られなかったことから、細胞増殖抑制試験および染色体異常試験での細胞増殖率および分裂指数の分析結果より 0.42 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 1.5 で 7 濃度群を設定し、同様の方法で染色体異常試験の再試験を行った。

8. 染色体分析

染色体分析に先立って、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 濃度を観察対象とした。なお、標本あたり 500 細胞分析出来なかった被験物質処理群については、観察した細胞数で分裂指数を算出した。また、標本あたりの分析可能な分裂中期

細胞数が少ない場合は、その数を考慮して観察対象群を決定した。

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/観察者) 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/観察者) 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) 処理した最高用量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、有意差の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統計解析ソフトウェア SAS[®]を用いて、コ克蘭・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増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制濃度は S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 0.086 mg/mL および 0.31 mg/mL、24 時間連続処理では 0.073 mg/mL と推定された。なお、肉眼観察の結果、処理開始時には S9 mix 存在下の短時間処理では 0.053 mg/mL、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では 0.21 mg/mL 以上の被験物質処理群で培養液中に沈殿が認められた。また、処理終了時は S9 mix 存在下の短時間処理では 0.053 mg/mL、S9 mix 非存在下の短時間処理では 0.43 mg/mL および 24 時間連続処理では 0.85 mg/mL 以上の被験物質処理群で培養液中に沈殿が認められた (Figure 1)。

以上の結果より、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では 50%細胞増殖抑制濃度の約 1.5 倍および約 1.8 倍となる 0.13 mg/mL を最高濃度とし、以下の被験物質処理群を設定した。また、S9 mix 存在下の短時間処理については、0.85 mg/mL 以上の被験物質処理群で培地中の沈殿物が油膜状に浮遊したことに起因したと考えられる細胞増殖率の上昇が認められたこと、および同一濃度でディッシュ間に細胞増殖率のバラつきが有る被験物質処理群が認められ、明確に毒性反応を推定できなかったことから、1.7 mg/mL (約 10 mM) を最高濃度とし、以下の被験物質処理群を設定して染色体異常試験をおこなった。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.017、0.026、0.039、0.058、0.087、0.13 mg/mL (公比 1.5)

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.053、0.11、0.21、0.43、0.85、1.7 mg/mL (公比 2)

24 時間連続処理: 0.017、0.026、0.039、0.058、0.087、0.13 mg/mL (公比 1.5)

なお、肉眼観察の結果、処理開始時は S9 mix 存在下の短時間処理では 0.11 mg/mL 以上の被験物質処理群で培養液中に沈殿が認められ、処理終了時は、S9 mix 存在下の短時間処理ですべての被験物質処理群で培養液中に沈殿が認められた。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析の結果、S9 mix 存在下の短時間処理では 0.21 mg/mL では分析可能な分裂中期細胞が少なく、分析不可能と判断したことから観察可能な被験物質処理群が 2 濃度群しか得られなかった。そこで、細胞増殖抑制試験および染色体異常試験での細胞増殖率および分裂指数の分析結果 (Figure 1、Table 1) を基に、0.42 mg/mL を最高濃度とし、以下の被験物質処理群を設定して染色体異常試験の再試験を行った。

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.037、0.055、0.083、0.12、0.19、0.28、0.42 mg/mL (公比 1.5)

再試験では、処理開始時および処理終了時においてそれぞれ 0.19 mg/mL 以上、および 0.28 mg/mL 以上の被験物質処理群で培養液中に沈殿が認められた。

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 非存在下の

短時間処理および 24 時間連続処理共に 0.058 mg/mL、S9 mix 存在下の短時間処理では 0.12 mg/mL となったことから、以下の 3 濃度群について染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.026、0.039、0.058 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.055、0.083、0.12 mg/mL

24 時間連続処理: 0.026、0.039、0.058 mg/mL

染色体分析の結果、すべての処理条件で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 2、Table 3、Table 4)。なお、すべての処理条件で 50%細胞増殖抑制濃度を超えた被験物質処理群で染色体分析を実施できなかったが、設定濃度の間隔は公比 1.5 と十分細かく設定したと考えられ、また分析可能な最高濃度以上の被験物質処理群では細胞毒性が強いため十分な細胞数が得られず観察不能であったことから、観察対象の設定は妥当であると考えられた。

倍数性細胞については、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では統計学的に有意な増加は認められなかったが、24 時間連続処理については染色体分析を行ったすべての被験物質処理群で統計学的に有意な増加 (出現率: 3.9~4.0%) が認められ、傾向性検定の結果、用量依存性も認められた。倍数性細胞に関して陽性の結果が得られた処理条件について D_{20} 値を求めたところ 0.31 mg/mL 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、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。これらの結果より、本実験系の成立が確認された (Table 2、Table 3、Table 4)。

以上の結果より、24 時間連続処理において倍数性細胞が統計学的に有意な増加を示したが、S9 mix 非存在下の短時間処理の中濃度群 (0.039 mg/mL) および高濃度群 (0.058 mg/mL) で、陰性対照群と比べてやや倍数性細胞が出現 (いずれも出現率: 1.5%) していること、S9 mix 存在下の短時間処理ではすべての被験物質処理群で倍数性細胞の出現率は陰性対照と同程度で有ることから、undecanal が代謝されていない条件で、長時間細胞と接触したことにより、倍数性細胞が誘発された可能性が考えられた。

Undecanal 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-13-040) では陰性の結果が得られている。なお、当該物質は、復帰突然変異試験で陰性、V79 細胞を用いた遺伝子突然変異試験で陰性およびヒトリンパ球を用いた *in vitro* 小核試験では陰性の結果が報告されている²⁾。また、類縁物質である undecane に関しては、復帰突然変異試験、チャイニーズ・ハムスターを用いる染色体異常試験共に陰性³⁾、n-pentadecane に関しては、復帰突然変異試験、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験共に陰性の結果が報告されている。⁴⁾

以上の結果より、undecanal は、本試験条件下で CHL/IU 細胞の染色体に構造異常は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) European Chemicals Agency website:
http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-9d84f5d2-6b83-52c9-e044-00144f67d249/DISS-9d84f5d2-6b83-52c9-e044-00144f67d249_DISS-9d84f5d2-6b83-52c9-e044-00144f67d249.html
- 3) 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. 4、化学物質点検推進連絡協議会、東京(1996)p587-614
- 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)p433-455

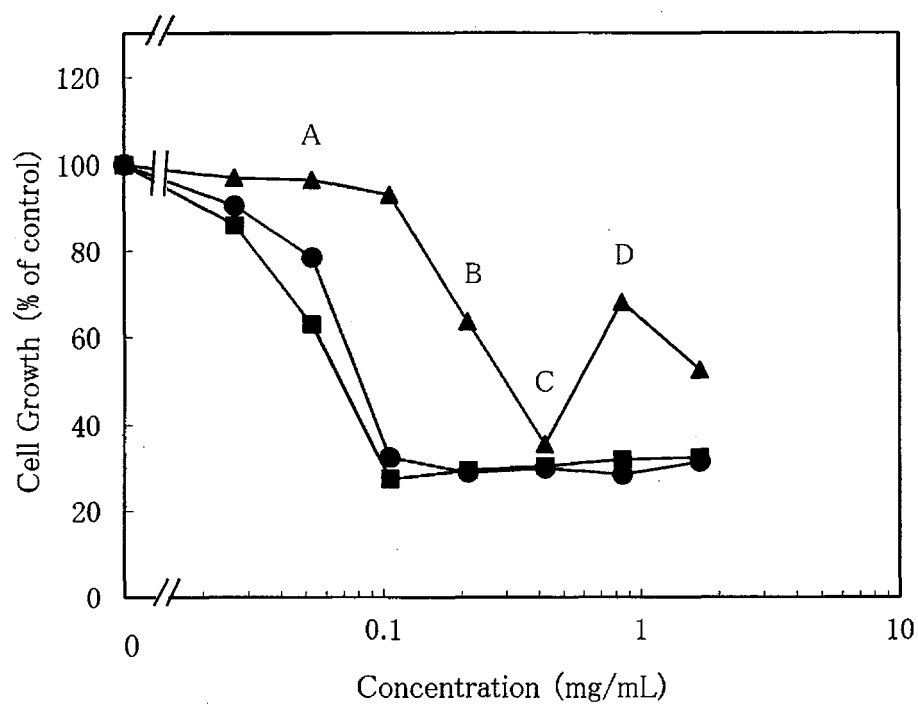


Figure 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with undecanal

- : Short-term treatment without S9 mix
- ▲: Short-term treatment with S9 mix
- : Continuous treatment (24 hours)

Precipitation was observed by the naked eye in the medium at doses of 0.053 mg/mL (A) and more for short-term treatment with S9 mix and 0.21 mg/mL (B) and more for short-term treatment without S9 mix and continuous treatment at the beginning of the treatment period. On the other hand precipitation was observed in the medium at doses of 0.053 mg/mL (A) and more for short-term treatment with S9 mix and 0.43 mg/mL (C) and more for short-term treatment without S9 mix and 0.85 mg/mL (D) and more for continuous treatment at the end of the treatment period.

Table 1 Concurrent cell growth and mitotic index of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with undecanal (Und) for 6 hours with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)
Negative ¹⁾	0	+	6-(18)	100	NA
Und	0.053 ^{pe}	+	6-(18)	92	NA
Und	0.11 ^{pbe}	+	6-(18)	89	7.6, 5.0
Und	0.21 ^{pbe}	+	6-(18)	38	0.8 ⁴⁾ , 5.0
Und	0.43 ^{pbe}	+	6-(18)	32	Tox, 2.0
Und	0.85 ^{pbe}	+	6-(18)	36	2.8, 1.4
Und	1.7 ^{pbe}	+	6-(18)	44	7.4, 5.2
CP	10 µg/mL	+	6-(18)	NA	NA

CP, cyclophosphamide; Tox, cytotoxic; NA, not analyzed.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish.

2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater II.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish.

4) It was judged that chromosome analysis was impossible because there were the small number of analyzable metaphase cells.

pe, Precipitation was observed at the end of the treatment in the medium by the naked eye.

pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with undecanal (Und) for 6 hours without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with 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	3	1	0	0	0	5	0	2 (2.0)	2 (2.0)	3 (0.8)		
						100	1	0	0	1	0	0	2	1	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						200	2	3	1	1	0	0	7	1	4 (2.0)	3 (1.5)	4 (0.5)		
Und	0.017	—	6 - (18)	89	NA	not observed													
Und	0.026	—	6 - (18)	89	NA	100	2	3	0	0	0	0	5	0	5 (5.0)	3 (3.0)	4 (1.0)		
						100	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	3 (0.8)		
						200	2	3	0	1	0	0	6	0	6 (3.0)	4 (2.0)	7 (0.9)		
Und	0.039	—	6 - (18)	81	NA	100	1	2	0	0	0	0	3	3	3 (3.0)	2 (2.0)	3 (0.8)	NA	NA
						100	2	2	0	0	0	0	4	0	3 (3.0)	2 (2.0)	9 (2.3)		
						200	3	4	0	0	0	0	7	3	6 (3.0)	4 (2.0)	12 (1.5)		
Und	0.058	—	6 - (18)	76	3.4, 8.2	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	6 (1.5)		
						100	0	1	1	13	0	0	15	0	7 (7.0)	7 (7.0)	6 (1.5)		
						200	1	1	1	13	0	0	16	0	8 (4.0)	7 (3.5)	12 (1.5)		
Und	0.087		6 - (18)	38	1.9 ⁸⁾ , 1.8	not observed due to the small number of metaphase													
Und	0.13		6 - (18)	25	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
MMC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	NA	NA	100	5	33	50	2	1	0	91	1	53 (53.0)	53 (53.0)	2 (0.5)		
						100	5	49	53	3	0	0	110	4	61 (61.0)	60 (60.0)	0 (0.0)		
						200	10	82	103	5	1	0	201	5	114 (57.0)	113 * (56.5)	2 (0.3)		

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; Tox, cytotoxic; NA, not analyzed.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater II.

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) One hundred and fifty six cells were analyzed.

*, 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 treated with undecanal (Und) for 6 hours with S9 mix (retest)

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with 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	0	1	0	2	0	0	3	1	2 (2.0)	2 (2.0)	3 (0.8)		
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	3 (0.8)		
						200	0	2	0	2	0	0	4	1	3 (1.5)	3 (1.5)	6 (0.8)		
Und	0.037	+	6 - (18)	99	NA	not observed													
Und	0.055	+	6 - (18)	100	NA	100	0	0	0	1	1	0	2	1	2 (2.0)	2 (2.0)	2 (0.5)		
						100	0	0	0	11	0	0	11	0	2 (2.0)	2 (2.0)	3 (0.8)		
						200	0	0	0	12	1	0	13	1	4 (2.0)	4 (2.0)	5 (0.6)		
Und	0.083	+	6 - (18)	95	NA	100	0	1	0	2	0	0	3	0	2 (2.0)	2 (2.0)	2 (0.5)	NA	NA
						100	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)		
						200	0	2	0	2	0	0	4	1	3 (1.5)	3 (1.5)	4 (0.5)		
Und	0.12	+	6 - (18)	70	6.4, 6.4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.0)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.6)		
Und	0.19 ^{pb}	+	6 - (18)	37	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
Und	0.28 ^{pbc}	+	6 - (18)	23	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
Und	0.42 ^{pbc}	+	6 - (18)	28	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	NA	NA	100	0	14	5	6	0	0	25	1	20 (20.0)	20 (20.0)	0 (0.0)		
						100	6	8	15	4	1	0	34	2	25 (25.0)	22 (22.0)	0 (0.0)		
						200	6	22	20	10	1	0	59	3	45 (22.5)	42 *(21.0)	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;

CP, cyclophosphamide; Tox, cytotoxic; NA, not analyzed.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater II.

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.

pb, Precipitation was observed at the beginning of the treatment in the medium by the naked eye.

pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 4 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with undecanal (Und) for 24 hours without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with 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	2	0	0	0	0	0	2	0	1 (1.0)	0 (0.0)	2 (0.5)		
					100	0	3	0	0	0	0	3	2	3 (3.0)	3 (3.0)	2 (0.5)		
					200	2	3	0	0	0	0	5	2	4 (2.0)	3 (1.5)	4 (0.5)		
Und	0.017	24	95	NA	not observed													
Und	0.026	24	84	NA	100	1	1	0	1	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	21 (5.3)		
					100	1	4	3	0	0	0	8	1	6 (6.0)	5 (5.0)	10 (2.5)		
					200	2	5	3	1	0	0	11	1	9 (4.5)	7 (3.5)	31 *(3.9)		
Und	0.039	24	81	NA	100	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	12 (3.0)		
					100	1	0	0	1	0	0	2	4	2 (2.0)	1 (1.0)	20 (5.0)		
					200	2	1	1	1	0	0	5	4	5 (2.5)	3 (1.5)	32 *(4.0)	NA	+
Und	0.058	24	61	1.6, 3.2	100	0	1	2	0	0	0	3	0	2 (2.0)	2 (2.0)	14 (3.5)		
					100	1	0	0	1	0	0	2	1	2 (2.0)	1 (1.0)	18 (4.5)		
					200	1	1	2	1	0	0	5	1	4 (2.0)	3 (1.5)	32 *(4.0)		
Und	0.087	24	23	1.7 ⁸⁾ , 4.7 ⁹⁾	not observed due to the small number of metaphase cells													
Und	0.13	24	20	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
MMC	0.05 µg/mL	24	NA	NA	100	1	40	48	1	0	0	90	2	53 (53.0)	52 (52.0)	1 (0.3)		
					100	4	43	31	5	0	0	83	1	52 (52.0)	50 (50.0)	0 (0.0)		
					200	5	83	79	6	0	0	173	3	105 (52.5)	102 *(51.0)	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; Tox, cytotoxic; NA, not analyzed.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater II.

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) Three hundred and three cells were analyzed. 9) Two hundred and fifty six cells were analyzed.

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

Appendix 1



試験成績書

2013年06月19日

東京化成工業株式会社 品質保証課
〒103-0023
東京都中央区日本橋本町4丁目10番
TEL: 03(5640)8860 FAX: 03(5640)8861

製品名: Undecanal					
製品コード: U0009	等級:	製品ロット: N633K	判定: 合格		
項目	結果		規格値		
純度(GC)	98.8 %		97.0 %以上		
比重 (20/20)	0.8302		0.8280 ~ 0.8330		
屈折率 n _D 20/D	1.4318		1.4300 ~ 1.4340		

Appendix 2

被験物質の一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPACの命名法による)	ウンデカナル		
別名	Undecanal		
C A S 番号	112-44-7		
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	170.30		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	98.8%(GC)		
試験に供した新規化学物質のロット番号	N633K		
不純物の名称及び含有率	_____		
蒸気圧	_____		
対水溶解度	_____		
1-オクタノール/水分分配係数	_____		
融点	-2℃		
沸点	80℃/0.1 kPa		
常温における性状	無色〜わずかにうすい黄色の透明な液体		
安定性	適切な条件下においては安定(製品安全シートより)		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度*	溶媒中の安定性*
	水	17.0 mg/mLで不溶	17.0 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。
	DMSO	50.0 mg/mLで不溶	50.0 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	170.3 mg/mLで溶解	170.3 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(0.01 mg/mLおよび200 mg/mL、室温、遮光保管)を確認した(試験番号: Q-13-011)。

*: 一般財団法人食品薬品安全センター 薬野研究所において確認した。

信頼性保証書

表題 Undecanal 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-13-020

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	2013 年 9 月 26 日	2013 年 9 月 26 日
試験計画書変更書		
G-13-020-No.1	2013 年 10 月 21 日	2013 年 10 月 22 日
G-13-020-No.2	2013 年 12 月 6 日	2013 年 12 月 6 日
G-13-020-No.3	2014 年 1 月 6 日	2014 年 1 月 6 日
被験物質調製液の調製および細胞処理	2013 年 10 月 28 日	2013 年 10 月 28 日
標本観察	2014 年 1 月 22 日	2014 年 1 月 23 日
報告書草案および生データ	2014 年 3 月 12、13 日	2014 年 3 月 13 日
最終報告書	2014 年 3 月 27 日	2014 年 3 月 27 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について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環企発第 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。

2014 年 3 月 27 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

