



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最 終 報 告 書

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの
ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1129

2004 年 2 月 27 日

株式会社 **ボソリサーチセンター**

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目 次

	頁
目 次	1
要 約	9
緒 言	10
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び媒体	11
1) 被験物質	11
2) 媒体	11
2. 被験液の調製	12
1) 調製方法	12
2) 保存方法	12
3) 安定性	12
3. 対照物質	12
1) 陰性対照（媒体対照）	12
2) 陽性対照	13
4. 使用細胞株	14
1) 供試ほ乳類培養細胞	14
2) 入手先及び入手年月日	14
3) 細胞の選択理由	14
4) 染色体構成	14
5) 増殖様式	14
6) 培養液	14

	頁
7) 培養条件	15
8) 細胞の保存	15
5. S9mix 及び培養液	15
1) S9 mix	15
2) 培養液	16
6. 試験方法	17
1) 識別方法	17
2) 細胞増殖抑制試験	17
3) 染色体異常試験	18
4) 標本の観察	19
5) 染色体異常の分類	19
6) 判定基準	20
 試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	22
1) 短時間処理法	22
2) 連続処理法	22
2. 染色体異常試験	22
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	23
2) 染色体構造異常	23
3) 倍数性細胞	23
考察	24
参考文献	25

Figures and Tables

- Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 1-2 Results of the cell-growth inhibition test (◇) and
chromosome aberration test (structural ○)
treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 2-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 2-2 Results of the cell-growth inhibition test (◇) and
chromosome aberration test (structural ○)
treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 3-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment: 24 hr]
- Fig. 3-2 Results of the cell-growth inhibition test (◇) and
chromosome aberration test (structural ○)
treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment: 24 hr]
- Fig. 4-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment: 48 hr]
- Fig. 4-2 Results of the cell-growth inhibition test (◇) and
chromosome aberration test (structural ○)
treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment: 48 hr]

Table 1-1 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: -S9 mix]

Table 1-3 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment: 24 hr]

Table 1-4 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment: 48 hr]

Table 2-1 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: +S9 mix]

Table 2-2 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: -S9 mix]

Table 2-3 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment: 24 hr]

Table 2-4 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment: 48 hr]

要 約

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオール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培養細胞（CHL/IU）を用いて染色体異常試験を実施した。

最初に、細胞増殖抑制試験を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する約 1200 μ g/mL を最高試験濃度として行った。その結果、短時間処理法の、代謝活性化及び非代謝活性化及び連続処理法の 24 時間処理では最高試験濃度においても 50%細胞増殖抑制を示さなかった。連続処理法の 48 時間処理では最高試験濃度において 60%細胞増殖抑制を示し、50%細胞増殖抑制濃度は 1075 μ g/mL であった。したがって、染色体異常試験における最高試験濃度を両法ともに 1200 μ g/mL とし、以下 600、300、150 及び 75.0 μ g/mL の計 5 用量を設定し染色体異常誘発能を検討した。なお、媒体には生理食塩液を用いた。

染色体異常試験の結果、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに染色体の構造異常の出現率は増加せず、また倍数性細胞の増加も認められなかった。また、連続処理法においても、24 時間処理及び 48 時間処理ともに染色体の構造異常の出現率は増加せず、また倍数性細胞の増加も認められなかった。一方、陽性対照では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

以上の結果から、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは本試験条件下において染色体異常誘発能を有さないものと判定した。

結 言

厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの安全性試験の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/TU）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、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び媒体

1) 被験物質

被験物質は で製造された市販品を購入し、御殿場研究所生化学部において特性分析を行った (Attached Data 1)。

供給者 : 厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室
 製造者 :
 名称 : 2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオール
 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
 CAS番号 : 115-70-8
 構造式
 又は示性式 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_2\text{NH}_2$
 純度 : 99.4%
 性状 : 微黄色透明、粘性の液体
 分子量 : 119.16
 ロット番号 :
 保存方法 : 冷暗所 (保存期間中の実測温度: 1~9℃)
 安定性 : 実験終了後の被験物質を分析した結果、品質に問題はなく、
 実験期間中は安定であった。(Attached Data 2)

取り扱い上の

注意 : 刺激性を有するので、取り扱い時は手袋等を着用した。

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室、変異原室及び第1研究棟
 被験物質調製室

返却 : すべての関連試験終了後に被験物質の残量を廃棄する。

2) 媒体

名称 : 生理食塩液
 ロット番号 : K0D95
 規格 : 日本薬局方
 製造元 : 株式会社大塚製薬工場
 保存方法 : 室温

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

媒体の選択理由 : 被験物質は 500 mg/mL の濃度で生理食塩液に溶解し、肉眼的に発泡、発熱、吸熱及び変色等の変化は認められなかった。
したがって生理食塩液を媒体として選択した。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.6005 g を 5 mL メスフラスコに秤取し、媒体で溶解し、メスアップして最高濃度の 120 mg/mL 溶液（プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度：1200 µg/mL）を調製し、濾過滅菌（IWAKI GLASS、孔径 0.20µm）した。次いで、120 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1.0 mL：生理食塩液 1.0 mL）で順次 7 段階希釈し、60.0、30.0、15.0、7.50、3.75、1.88 及び 0.94 mg/mL の 8 濃度の被験液を調製した。

(2) 染色体異常試験

被験物質を短時間処理では 0.6000 g、連続処理では 0.5999 g を 5 mL メスフラスコに秤取し、媒体で溶解し、メスアップして最高濃度の 120 mg/mL 溶液を調製し、濾過滅菌（IWAKI GLASS、孔径 0.20µm）した。次いで、120 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1.0 mL：生理食塩液 1.0 mL）で順次 4 段階希釈し、60.0、30.0、15.0 及び 7.50 mg/mL の 5 濃度の被験液を調製した。

2) 保存方法

被験液は用時調製とし、保存は行わなかった。

3) 安定性

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールに生理食塩液を添加した際に、発泡、発熱、吸熱及び色調変化などは認められなかった。

3. 対照物質

1) 陰性対照（媒体対照）

名 称 : 生理食塩液

ロット番号 : K0D95

規 格 : 日本薬局方

製 造 元 : 株式会社大塚製薬工場
保 存 方 法 : 室温
保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

2) 陽性対照

陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシンCを用いた。

名 称 : シクロフォスファミド (以下 CP と略記する)
ロ ッ ト 番 号 : CKP7428
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 (機器登録番号: 1793)、遮光
保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

名 称 : マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)
ロ ッ ト 番 号 : 319AJD
製 造 元 : 協和醗酵工業株式会社
力 価 : 2mg (力価) /瓶
保 存 方 法 : 室温 (保存期間中の実測温度: 12~25℃)、遮光
保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

(2) 調製方法

CP をプラスチック遠沈管 (50 mL) に 0.0150 g 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、K0D95) を 20.0 mL 加えて溶解し 0.75 mg/mL 溶液 (培養液 4.9 mL に 0.1 mL を加えた時の最終濃度: 15 µg/mL) を調製した。

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、K0D95) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1.00 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.25 mL: 生理食塩液 4.75 mL) し、0.0500 及び 0.00250 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.9 mL に 0.00250 mg/mL 溶液を 0.1 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.05 µg/mL)。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて SOP に従って廃棄した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験法ガイドラインに使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

4. 使用細胞株

1) 供試は乳類培養細胞

細胞は、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。なお、入手後液体窒素で凍結保存していた細胞を解凍、再培養して用いた。

2) 入手先及び入手年月日

細胞は、2001 年 12 月 26 日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。入手後、継代数の少ない細胞をジメチルスルホキシド（DMSO、ロット番号 KSH7174、試薬特級 99%以上、和光純薬工業株式会社）を 10 vol%添加した培養液で大量に液体窒素中で保存した。試験にはこの保存細胞を解凍し継代培養したものを、細胞の性状検査を実施して性状などが適正であることを確認した後に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験で 16 継代目、染色体異常試験では短時間処理法で 20 継代目の、連続処理法で 28 継代目の細胞を用いた。また、入手時の情報でマイコプラズマ陰性であることを確認した。

3) 細胞の選択理由

染色体数が少なく比較的大型で染色体異常の観察に適すること、自然発生の染色体異常発現率が低いこと、更に種々の化学物質に対して感受性が高くバックグラウンドデータが豊富であることなどの理由から本細胞を選択した。

4) 染色体構成

試験に使用した細胞の染色体数のモードは 25 本（ $n=20$ 、70%の細胞が 25 本）であり、適切であった。

5) 増殖様式

試験に用いた細胞は、プレート上で単層状に増殖し、使用細胞の倍加時間は 15.5 時間であった。これらは入手時の特性（単層状に増殖、倍加時間 18～20 時間）と同様で適切な増殖様式であった。

6) 培養液

培養液は Minimum Essential Medium（GIBCO™、Cat.No.11095-080、Invitrogen Co.）を用いた。これに非働化（56℃、30 分）した仔牛血清を 10 vol%添加して培養液を

調製した。

7) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37℃の高湿度条件下で培養し、1～4 日ごとに継代した。

8) 細胞の保存

培養液にジメチルスルホキシド (DMSO、JIS 規格試薬特級 99%以上、和光純薬工業株式会社) を 10%を加え、液体窒素タンク (−196℃理論値) 中で保存した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

S9 及び補酵素 (S9/コファクターC セット、Lot No. C030314131、オリエンタル酵母工業株式会社) 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

ロット番号 : 03031413

製造日 : 2003 年 3 月 14 日

種・系統 : ラット・SD 系

性 : 雄

週 齢 : 7 週齢

体 重 : 223.4±8.1 g

誘導物質 : フェノバルビタール (PB) と 5,6-ベンゾフラボン (BF)

投与法 : 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60+60mg/kg body weight

BF 1日 80mg/kg body weight

保存方法 : 冷凍保存 (−80℃設定の冷凍庫、機器登録番号 : 928)

使用期限 : 2003 年 9 月 13 日

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(2) 補酵素

名 称 : コファクターC

ロット番号 : C03031110

製造日 : 2003年3月11日

保存方法 : 冷凍保存 (−80℃設定の冷凍庫、機器登録番号 : 928)

使用期限 : 2003年9月10日

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(3) S9 mix の組成

S9	2 mL			
補酵素	4.7 mL	20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL	
		50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL	
		330mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL	
		50mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL	
		40mmol/L 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)水溶液	0.67 mL	
		精製水	0.67 mL	

2) 培養液

培養液は Minimum Essential Medium (GIBCO™、Cat. No. 11095-080、Invitrogen Co.) を用いた。これに非働化 (56℃, 30 分) した仔牛血清を 10 vol% 添加して培養液を調製した。調製後の培養液は冷蔵保存した。

(1) 仔牛血清

名 称 : CS (Calf serum)

ロット番号 : 411062

製造元 : Life Technologies Inc.

保存方法 : 冷凍 (−80℃設定の冷凍庫、機器登録番号 : 928)

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号 : 1167442

製造元 : Invitrogen Corporation

保存方法 : 冷蔵 (機器登録番号 : 1793)

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

6. 試験方法¹⁻⁴⁾

試験は以下のステージ順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法・連続処理法	
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
		48 時間処理

1) 識別方法

(1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では 24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて陰性（媒体）対照を「NC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照（Positive Control）は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」～「99」までの 2 桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するための予備試験として実施した。いずれの処理法においても最高濃度を 1200 $\mu\text{g/mL}$ （10 mM 相当）とし、以下公比 2 で希釈した 600、300、150、75.0、37.5、18.8 及び 9.40 $\mu\text{g/mL}$ の計 8 濃度を設定し、これに陰性（媒体）対照を設けた。また、短時間処理法では代謝活性化と非代謝活性化で試験を実施した。

(1) 短時間処理法

シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を 2 枚とし、シャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陰性（媒体）対照については、培養液 0.883 mL を除き S9 mix 0.833 mL 及び生理食塩液 0.05 mL を加えた。非代謝活性化では、培養液 0.05 mL を除き、各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陰性

(媒体) 対照については、培養液 0.05 mL を除き生理食塩液 0.05mL を加えた。更に 6 時間培養した後、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。培養終了後、培養液を除き生理食塩液で細胞を洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。単層培養細胞密度計(モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社)を用いて細胞の染色の濃淡から細胞密度を測定し、陰性(媒体)対照の値を 100%とした 50%細胞増殖抑制濃度(概略値)を求めた。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、更に倒立位相差顕微鏡で細胞の状態を確認した(培養終了時の結果は、参考データとした)。

(2) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、培養液 0.05 mL を除き、各濃度の被験液 0.05 mL を、陰性(媒体)対照については生理食塩液 0.05mL を加え、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。培養終了後、短時間処理法と同様に培養液の色、細胞の状態及び析出の有無を観察した後に、洗浄、固定、染色し、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)を求めた。

3) 染色体異常試験

(1) 用量設定の根拠

細胞増殖抑制試験の短時間処理法では代謝活性化の有無にかかわらず、最高濃度の 1200 µg/mL においても 50%細胞増殖抑制は認められなかった。更に、連続処理法においては 24 時間処理では 1200 µg/mL においても 50%細胞増殖抑制は認められなかったが、48 時間処理では 50%細胞増殖抑制は 1200 µg/mL であった。このことから、毒性試験法ガイドラインに従って染色体異常試験の各処理法における最高濃度は 10mM に相当する 1200 µg/mL とし、3 濃度以上の染色体観察が可能となることを考慮して、以下公比 2 で 600、300、150 及び 75.0 µg/mL の計 5 用量を設定した。また、これに陰性(媒体)対照及び陽性対照を設けた。

(2) 短時間処理法

直径 60mm のシャーレ 4 枚を使用し、1 枚当たり 2×10^4 個の細胞(培養液 5.0mL)を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では培養液 0.883 mL を除き、陰性(媒体)対照については S9 mix 0.833 mL 及び生理食塩液 0.05 mL を、被験物質処理については S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陽性対照については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833

mL 及び CP 0.1 mL を加えて 6 時間培養した。非代謝活性化では、培養液 0.05 mL を除き、陰性（媒体）対照については生理食塩液 0.05 mL を、被験物質処理群については各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陽性対照については培養液 0.1 mL を除き、MMC 0.1 mL を加えて 6 時間培養した。6 時間の培養後、培養液を除き生理食塩液で細胞を洗浄し、新たな培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。なお、染色体観察用のスライドガラス標本作製に際しては、細胞分裂を分裂中期で停止させるため標本作製約 2 時間前にコルセミド 0.1 mL（最終濃度：0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液で単離した細胞を遠心分離し、0.075M 塩化カリウム溶液で低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。その細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所滴下し、空気乾燥後 2%ギムザ液で染色標本作製した。スライド標本は、1 枚のシャーレから 2 枚作製した。各処理群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じ洗浄、固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

(3) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、培養液 0.05 mL を除き、各濃度の被験液 0.05 mL を、陰性（媒体）対照については生理食塩液 0.05 mL をそれぞれ加え、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。また陽性対照については培養液 0.1 mL を除き、MMC 0.1 mL を加え、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。なお、染色体観察用のスライドガラス標本作製は短時間処理法と同様に行った。各処理群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じ洗浄、固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、被験物質処理終了時に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

4) 標本の観察

各濃度当たり 200 個（シャーレ当たり 100 個）のよく広がった分裂中期像について構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の数も記録した（3 倍体を含めた染色体数 37 本以上を倍数体とした）。なお、客観的な観察を行うため染色体標本はすべて盲検法により観察した。

5) 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

染色体構造が、その細胞が本来持っている固有の構造（核型）と異なる場合を構造異常と定義した。

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と定義した。

染色分体型切断(ctb) : 切断とは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場合と定義した。

染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。

染色体型切断(csb)

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) : 断片化他(frg)

(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。

倍数体 : polyploid（核内倍加体：endoreduplicationを含む）

6) 判定基準

2枚のシャーレ間で異常細胞の出現頻度に著しいばらつきがないこと、陰性（媒体）対照で異常細胞の出現頻度が5%未満であること、陽性対照でギャップ以外の異常細胞の出現頻度が10%以上であること、被験物質処理群の3用量以上における染色体標本の評価が可能であること及び培養条件など試験環境に異常が認められないことを本試験の成立条件とした。

石館らの判定基準^{1,2,3)}に従い、各試験群の異常細胞の出現率に対して以下のような判定基準を設けた。

<u>異常細胞の出現率</u>	<u>判定基準</u>
5% 未満	陰 性 (－)

5% 以上 10% 未満 疑陽性 (±)

10% 以上 陽 性 (+)

染色体構造異常を有する細胞の出現率はギャップを含む場合(TAG)と含まない場合(TA)について集計し、ギャップを含まない場合について判定した。異常細胞の出現に用量依存性又は再現性が認められた場合を染色体異常誘発能陽性と判定した^{2,3,4)}。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 2-1 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、代謝活性化の有無にかかわらず最高試験濃度の 1200 $\mu\text{g/mL}$ でも 20～30%の増殖抑制しか認められず、50%抑制濃度は求められなかった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化の有無にかかわらず、培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。また、用量群の細胞の状態を陰性（媒体）対照と比較すると、1200 $\mu\text{g/mL}$ に細胞の不連続性が代謝活性化及び非代謝活性化ともに多数認められ、600 $\mu\text{g/mL}$ では代謝活性化で微少に認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 3-1 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 4-1 及び Table 1-4 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理では最高試験濃度の 1200 $\mu\text{g/mL}$ でも 36%の増殖抑制しか認められず 50%抑制濃度は求められなかった。一方、48 時間処理では最高試験濃度の 1200 $\mu\text{g/mL}$ で 60%の増殖抑制が認められ、50%抑制濃度は 1075 $\mu\text{g/mL}$ であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間及び 48 時間処理とも、培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。また、用量群の細胞の状態を陰性（媒体）対照と比較すると、24 時間及び 48 時間処理とも 1200 $\mu\text{g/mL}$ に細胞の不連続性が多数認められ、24 時間処理では 600 $\mu\text{g/mL}$ で微少に認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 1-2、2-2、Table 1-1、1-2、2-1 及び 2-2 に、連続処理法の結

果を Fig. 3-2、4-2、Table 1-3、1-4、2-3 及び 2-4 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態は、細胞増殖抑制試験の場合とほぼ同様であった。すなわち、短時間処理法では代謝活性化の有無にかかわらず培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。また、用量群の細胞の状態を陰性（媒体）対照と比較すると、細胞の不連続性が代謝活性化及び非代謝活性化ともに 1200 µg/mL では多数、600 µg/mL では微少に認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。

連続処理法では 24 時間及び 48 時間処理とも、培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。また、用量群の細胞の状態を陰性（媒体）対照と比較すると、24 時間及び 48 時間処理とも 1200 µg/mL に細胞の不連続性が多数、24 時間処理では 600 µg/mL で微少に認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。

2) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現頻度は、短時間処理法の代謝活性化では 1200 µg/mL で 1.5%、600 µg/mL で 1.0%、300 µg/mL で 1.0%、150 µg/mL で 0.5% 及び 75.0 µg/mL で 1.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、非代謝活性化においても、1200 µg/mL で 1.5%、600 µg/mL で 1.0%、300 µg/mL で 0.5%、150 µg/mL で 1.5% 及び 75.0 µg/mL で 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。。

連続処理法の 24 時間処理では 1200 µg/mL で 3.7%、600 µg/mL で 0.5%、300 µg/mL で 1.0%、150 µg/mL で 1.0% 及び 75.0 µg/mL で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、48 時間処理では、1200 µg/mL で 3.6%、600 µg/mL で 0.5%、300 µg/mL で 1.5%、150 µg/mL で 0.5% 及び 75.0 µg/mL で 0.0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

3) 倍数性細胞

いずれの用量群にも 5% を越える倍数性細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

考 察

染色体異常試験において、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに染色体の構造異常の出現率は増加せず、倍数性細胞の増加も認められなかった。また、連続処理法でも、24 時間連続処理及び 48 時間連続処理ともに染色体の構造異常の出現率は増加せず、倍数性細胞の増加も認められなかった。

一方、陰性（媒体）対照における染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、2 枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは、本試験条件下において染色体異常誘発能を有さないものと判定した。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354 (1977)
- 2) 石館基監修：染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1987)
- 3) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集：厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、1992
- 4) Matsuoka, A., *et al.*: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290 (1979)

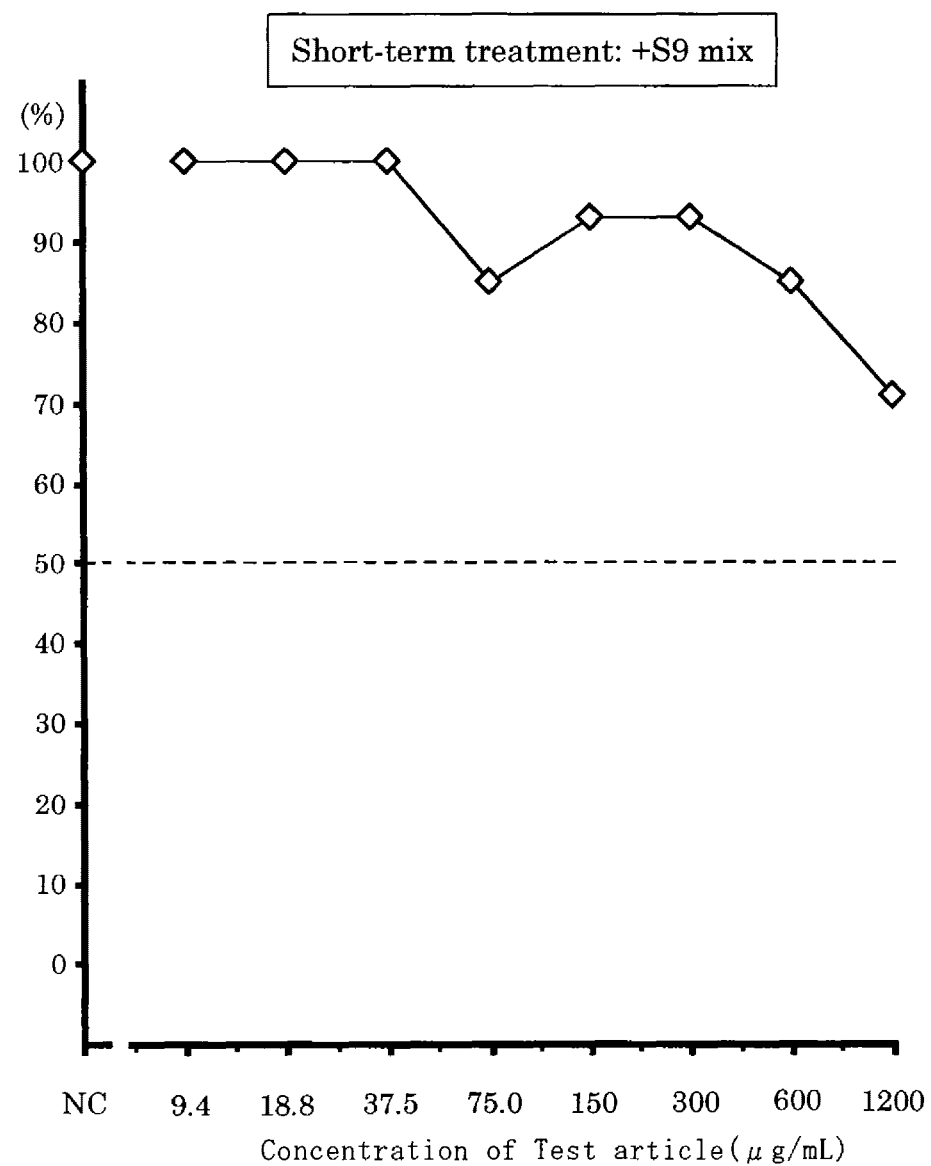


Fig. 1-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
NC:negative control

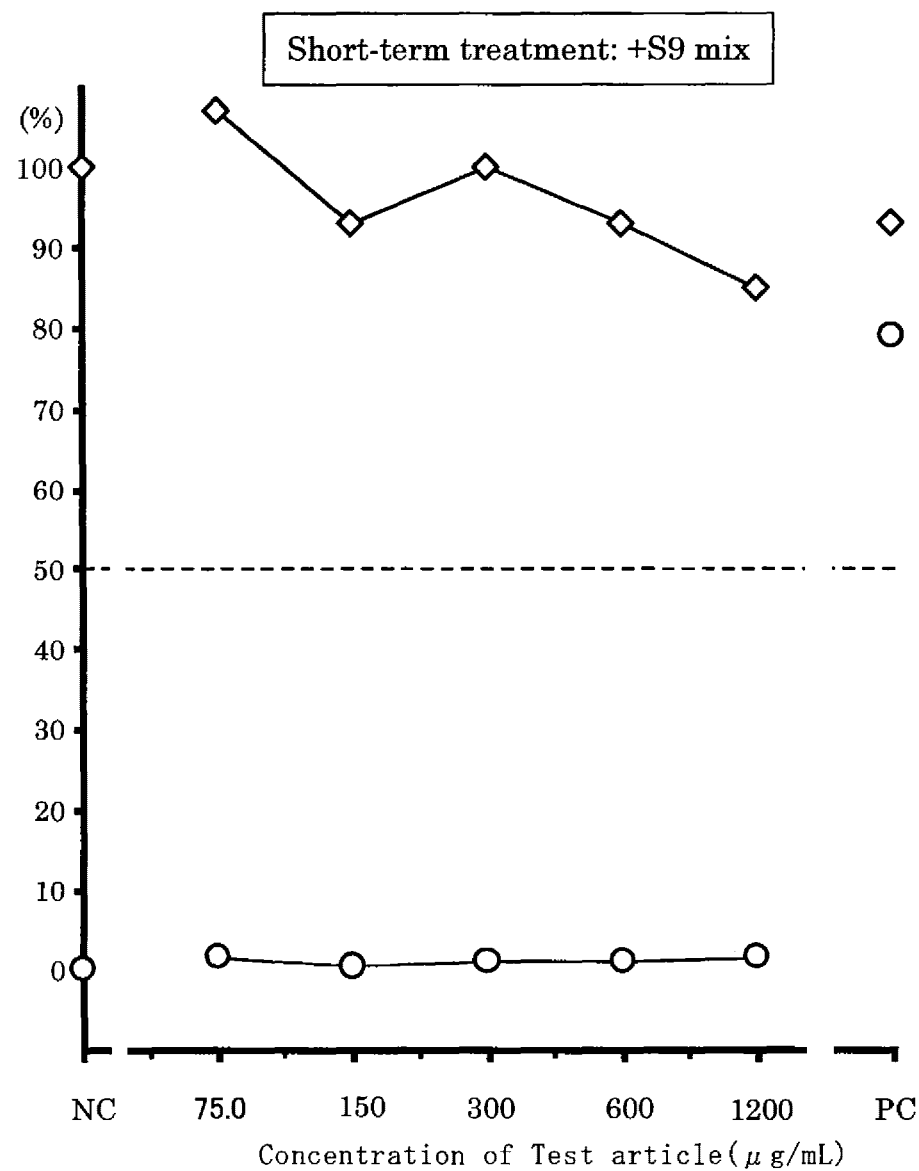


Fig. 1-2 Results of the cell- growth inhibition test ($\diamond$) and chromosome aberration test (structural $\circ$) treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
NC:negative control PC:positive control

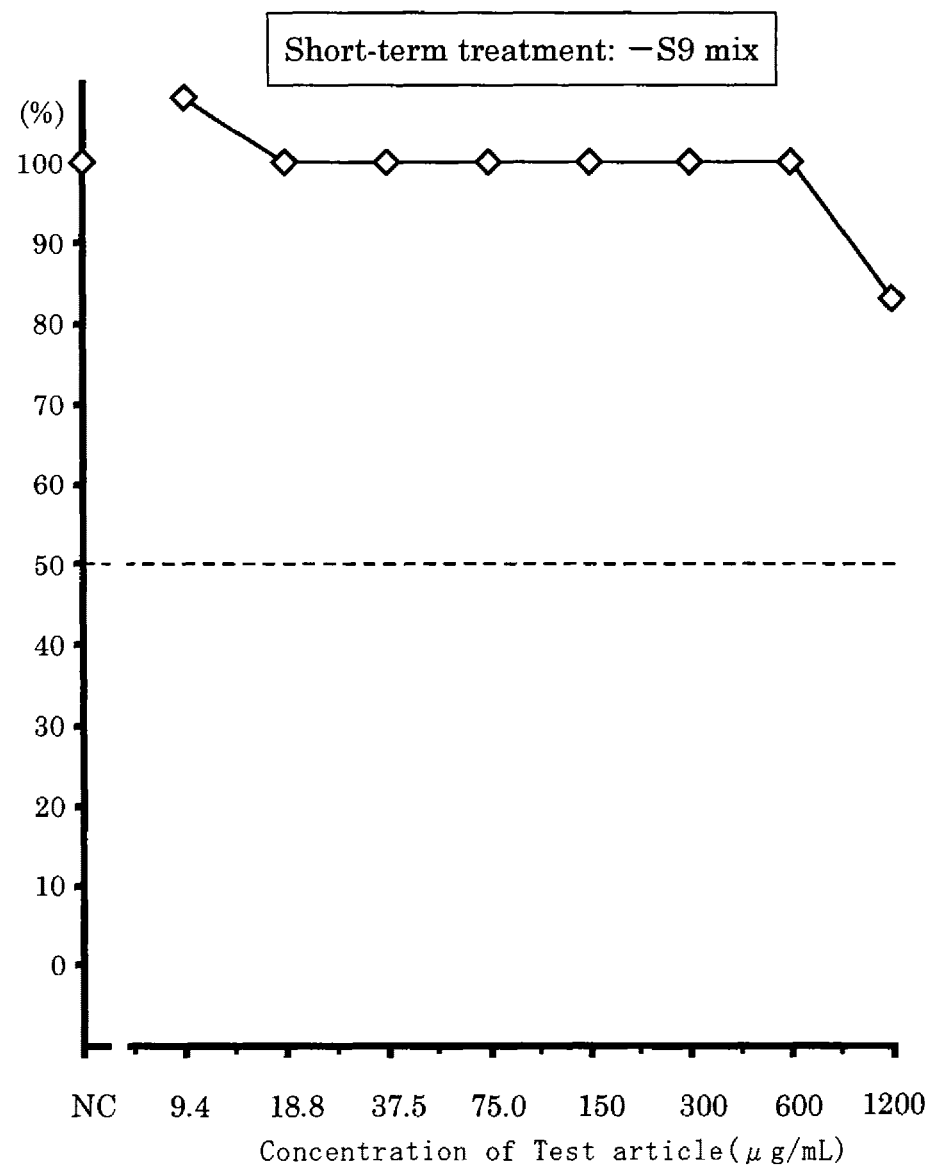


Fig. 2-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
NC:negative control

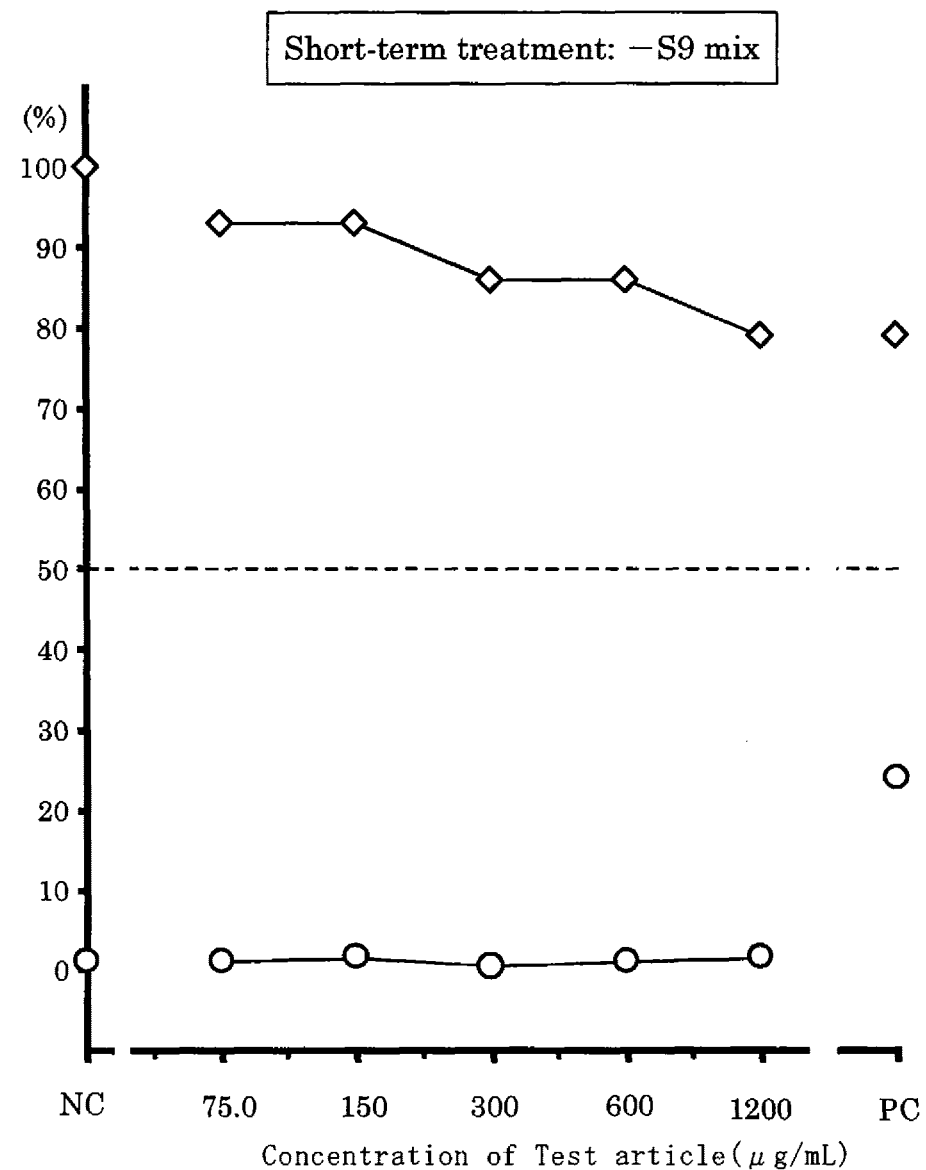


Fig. 2-2 Results of the cell- growth inhibition test ($\diamond$) and chromosome aberration test (structural $\circ$) treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
NC:negative control PC:positive control

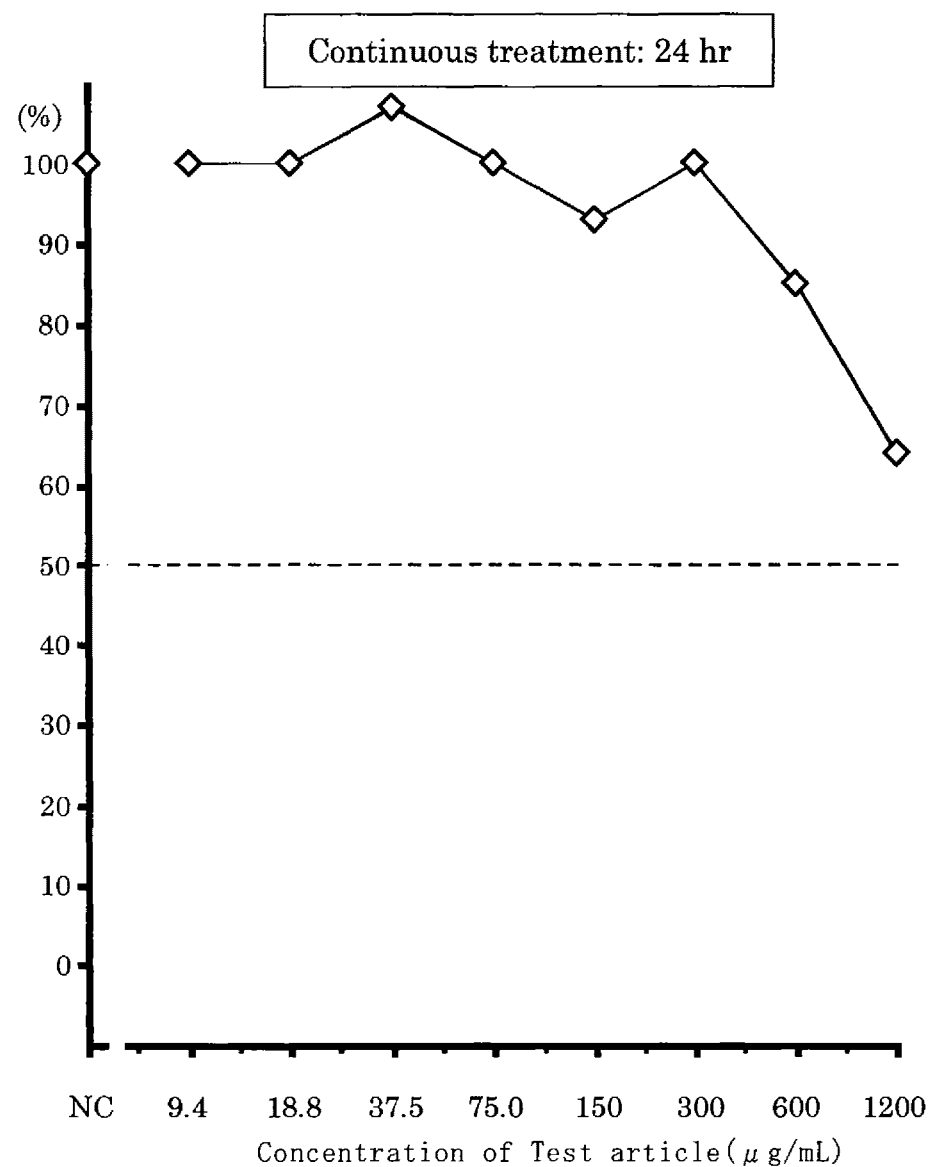


Fig. 3-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
NC:negative control

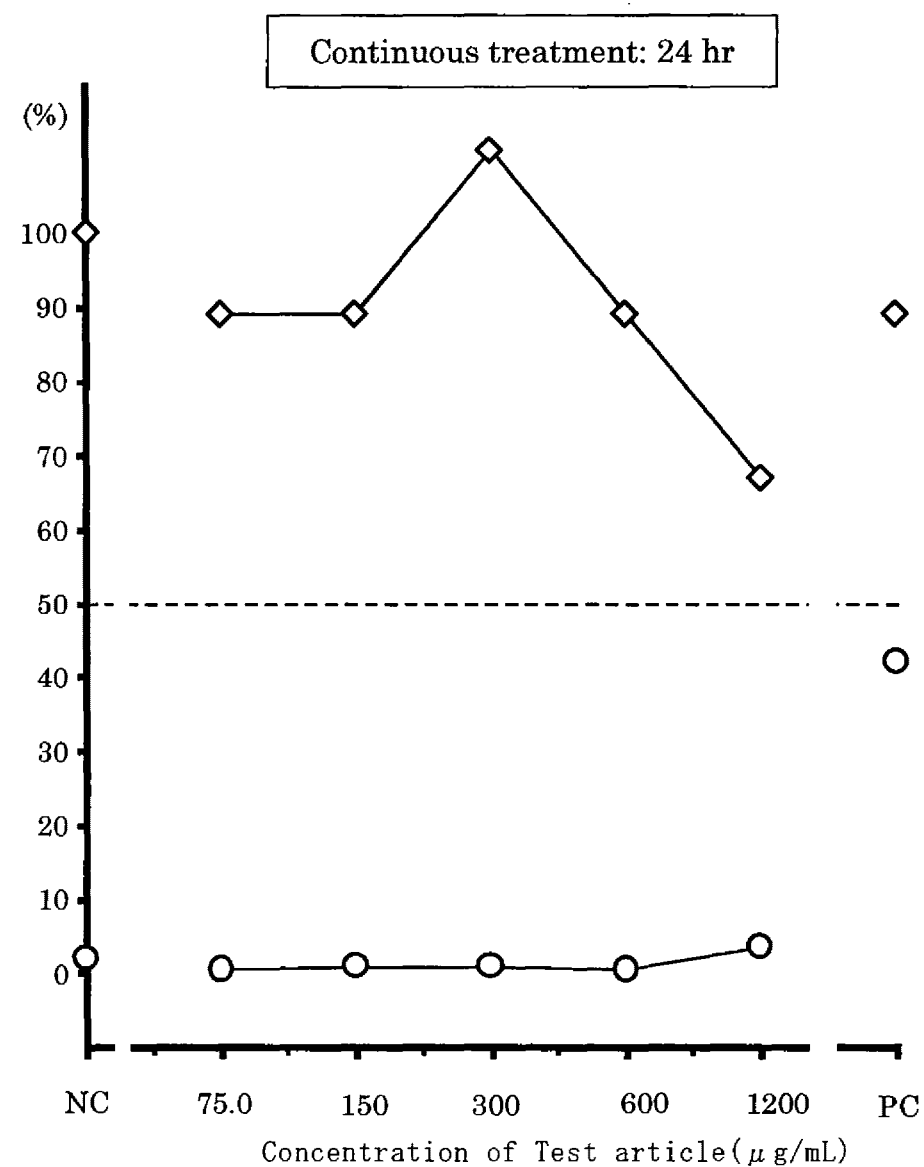


Fig. 3-2 Results of the cell- growth inhibition test ($\diamond$) and chromosome aberration test (structural O) treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
NC:negative control PC:positive control

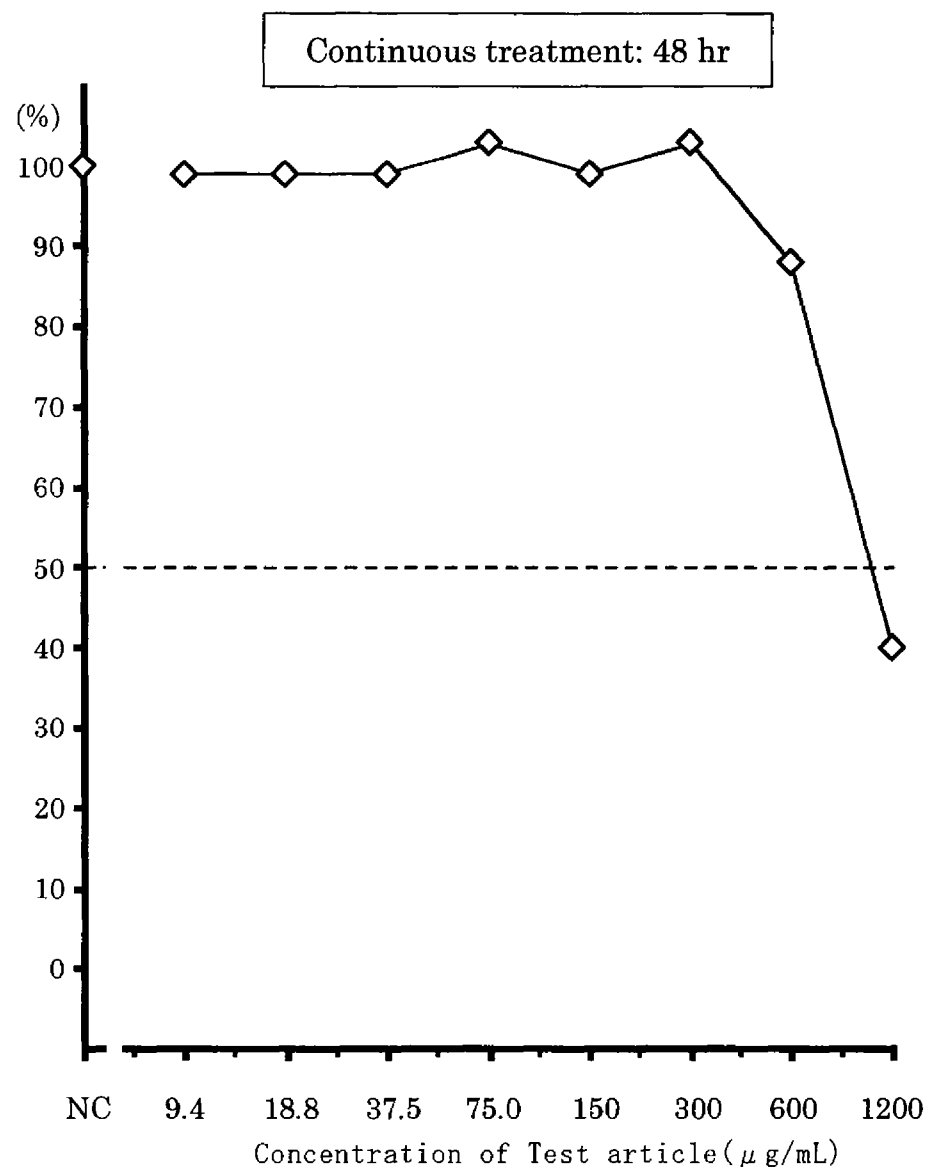


Fig. 4-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
NC:negative control

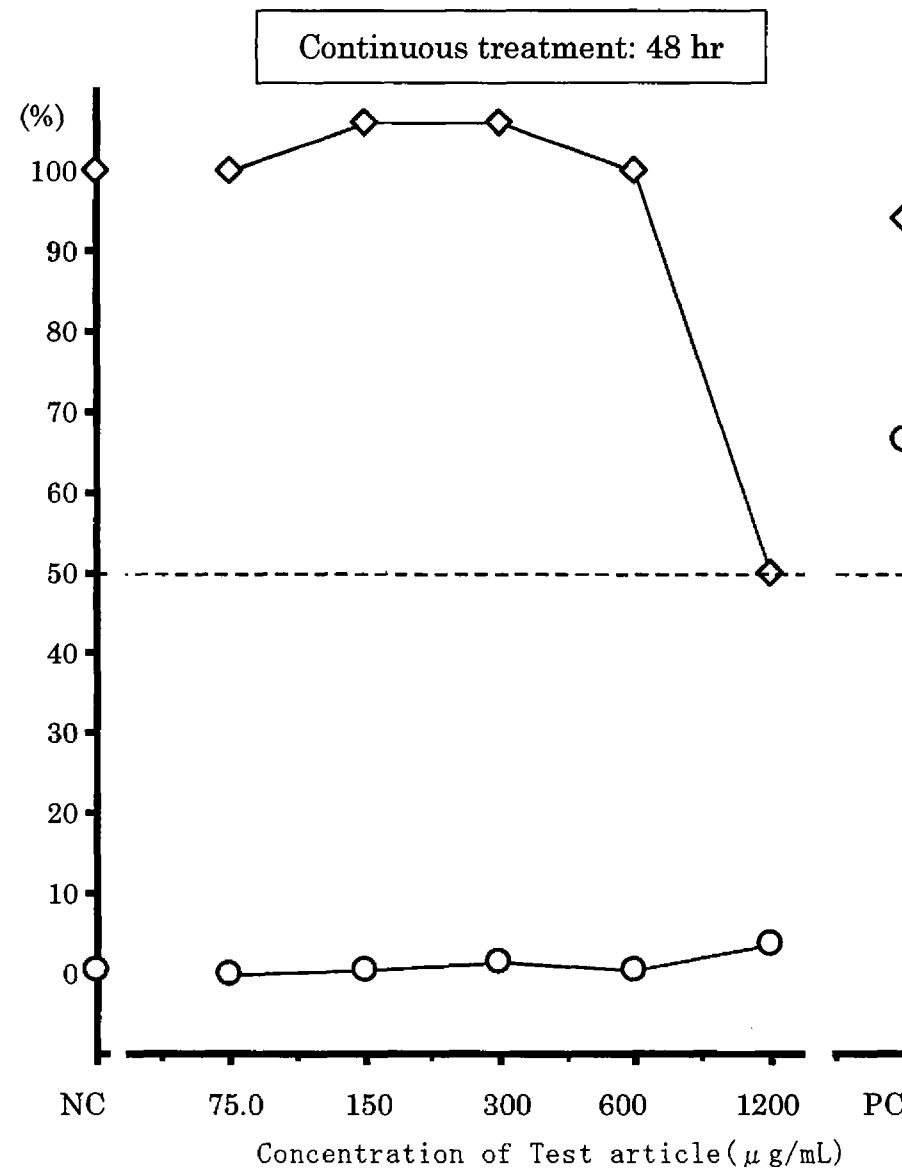
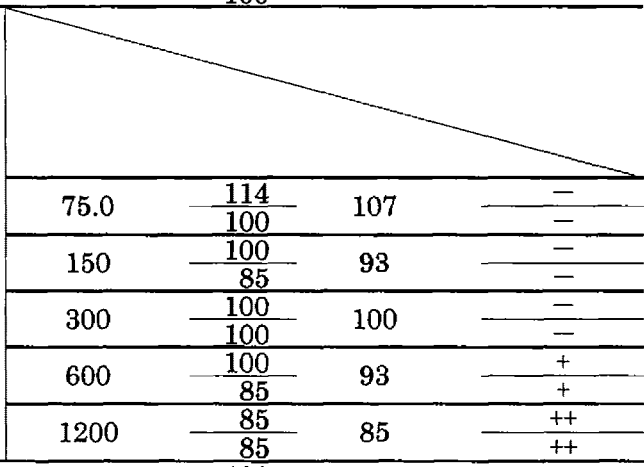
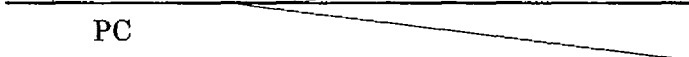


Fig. 4-2 Results of the cell- growth inhibition test ($\diamond$) and chromosome aberration test (structural $\circ$) treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
NC:negative control PC:positive control

Table 1-1 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: +S9 mix]

Study type	Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test			Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test		
		Cell growth ratio		Observation ^{c)}		Cell growth ratio		Observation ^{c)}
		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}
+ 6-18	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	— —	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	— —
	9.4	100 100	100	— —	Test article			
		100 100	100	— —				
	18.8	100 100	100	— —				
		100 100	100	— —				
	37.5	100 100	100	— —				
		100 100	100	— —				
	75.0	85 85	85	— —		75.0	114 100	107 —
		100 85	93	— —		150	100 85	93 —
	300	100 85	93	— —		300	100 100	100 —
		85 85	85	+ +		600	100 85	93 +
	1200	71 71	71	++ ++		1200	85 85	85 ++
	PC				PC	100 85	93	— —

Concentration of 50% cell growth inhibition: above 1200 μ g/mL

NC: Negative Control (physiological saline)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 15 μ g/mL)

a): This plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b): The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c): Observation of plate at the end of treatment

d): —: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++: There was discontinuity among approximately half of surviving cells.

Table 1-2 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test			Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test				
S9 Time mix (hr)	Plate 1 and 2		Cell growth ratio Mean ^{b)} (%)	Observation ^{c)} Condition of cells ^{d)}	Plate 1 and 2		Cell growth ratio Mean ^{b)} (%)	Observation ^{c)} Condition of cells ^{d)}			
- 6-18	Test article	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	— —	0 (NC)	100 ^{a)} 114	100	— —		
		9.4	116 100	108	— —	75.0	100 100	93	— —		
			18.8	100 100	100		— —	150	100 100	93 —	
			37.5	100 100	100		— —	300	100 85	86 —	
			75.0	100 100	100		— —	600	100 85	86 +	
			150	100 100	100		— —	1200	85 85	79 ++	
			300	100 100	100		— —	PC	85 85	79 —	
			600	100 100	100		— —				
			1200	83 83	83		++ ++				
			PC								
		Concentration of 50% cell growth inhibition: above 1200 μ g/mL									

NC: Negative control (physiological saline)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

a): The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b): The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c): Observation of plate at the end of treatment

d): - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of surviving cells.

Table 1-3 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment: 24hr]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test			Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test			
S9 Time mix (hr)	Plate 1 and 2		Cell growth ratio Mean ^{b)} (%)	Observation ^{c)} Condition of cells ^{d)}	Plate 1 and 2		Cell growth ratio Mean ^{b)} (%)	Observation ^{c)} Condition of cells ^{d)}		
— 24	Test article	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	— —	0 (NC)	100 ^{a)} 80	100	— —	
		9.4	100 100	100	— —					
			100 100	100	— —					
		18.8	100 100	100	— —		75.0	80 80	89	— —
			100 100	100	— —			150	80 80	89
		37.5	114 100	107	— —		300		100 100	111
			100 100	100	— —			600	80 80	89
		75.0	100 100	100	— —		1200		60 60	67
			100 100	100	— —			PC	80 80	89
		150	100 85	93	— —					
			100 100	100	— —					
		300	100 100	100	— —					
			100 100	100	— —					
		600	85 85	85	+ +					
			85 85	85	+ +					
		1200	71 57	64	++ ++					
			57 57	64	++ ++					
		PC								

Concentration of 50% cell growth inhibition: above 1200 μ g/mL

NC: Negative control (physiological saline)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

a): The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b): The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c): Observation of plate at the end of treatment

d): —: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++: There was discontinuity among approximately half of surviving cells.

Table 1-4 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment: 48hr]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test			Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test				
S9 Time mix (hr)	Plate 1 and 2		Cell growth ratio Mean ^{b)} (%)	Observation ^{c)} Condition of cells ^{d)}	Plate 1 and 2		Cell growth ratio Mean ^{b)} (%)	Observation ^{c)} Condition of cells ^{d)}			
— 48	Test article	0 (NC)	100 ^{a)} 92	100	— —	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	— —		
		9.4	99 92	99	— —	75.0	100 100	100	— —		
			18.8	99 92	99		— —	150	111 100	106	— —
				37.5	92 99		99		— —	300	111 100
			75.0		99 99		103	— —	600		100 100
				150	99 92		99	— —		1200	55 44
			300		99 99		103	— —	PC		100 88
				600	84 84		88	— —	Concentration of 50% cell growth inhibition: 1075 μ g/mL		
			1200		38 38		40	++ ++			
		PC									

NC: Negative control (physiological saline)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

a): The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b): The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c): Observation of plate at the end of treatment

d): —: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

++: There was discontinuity among approximately half of surviving cells.

Table 2-1 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment: +S9 mix]

S9 mix	Time(hr)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NC	200	1.0		2	0	0	0	0	0	0.0	1.0		74-1
			(100)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		86-1
			(100)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		75.0	200	0.0		0	0	2	0	1	0	1.5	1.5		42-1
			(100)	(0)	-	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	-	87-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(2)	(2)		
		150	200	0.5		1	0	1	0	0	0	0.5	1.0		10-1
			(100)	(1)	-	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	-	31-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		300	200	0.0		2	0	2	0	0	0	1.0	2.0		63-1
			(100)	(0)	-	(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)	-	78-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		600	200	0.5		2	0	2	0	0	0	1.0	2.0		33-1
			(100)	(1)	-	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	-	30-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
		1200	200	1.5		2	1	2	0	0	0	1.5	2.5		39-1
			(100)	(1)	-	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)	-	68-1
			(100)	(2)		(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
		PC	200	0.0		6	32	148	2	1	0	79.0	79.0		41-1
			(100)	(0)	-	(1)	(13)	(79)	(1)	(0)	(0)	(81)	(81)	+	77-1
			(100)	(0)		(5)	(19)	(69)	(1)	(1)	(0)	(77)	(77)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (physiological saline)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 15 μ g/mL)

Table 2-2 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[short-term treatment:-S9 mix]

S9 mix	Time(hr)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	6-18	NC	200	0.5		3	1	0	0	1	0	1.0	2.5		
			(100)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		36-1	
			(100)	(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(1)	(0)	(2)	(4)		13-1	
		75.0	200	0.0	-	3	1	1	0	0	0	1.0	2.5	-	48-1
			(100)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)	(3)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(4)		64-1	
		150	200	0.0	-	3	3	0	0	0	0	1.5	3.0	-	96-1
			(100)	(0)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(3)		
			(100)	(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)		69-1
		300	200	0.5	-	4	1	0	0	0	0	0.5	2.5	-	04-1
			(100)	(1)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)		
			(100)	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		15-1
600	200	0.5	-	2	1	0	0	1	0	1.0	2.0	-	90-1		
	(100)	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(2)	(3)				
	(100)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		26-1		
1200	200	0.5	-	1	3	0	0	0	0	1.5	2.0	-	38-1		
	(100)	(1)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(3)				
	(100)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		12-1		
PC		200	1.5	-	4	20	31	0	1	0	24.0	25.0	+	82-1	
		(100)	(1)	(2)	(9)	(14)	(0)	(1)	(0)	(23)	(24)				
		(100)	(2)	(2)	(11)	(17)	(0)	(0)	(0)	(25)	(26)		08-1		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.
NC: Negative control (physiological saline)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 2-3 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment:24hr]

S9 mix	Time(hr)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	24-0	NC	200	0.0		4	1	2	0	1	0	2.0	4.0		
			(100)	(0)		(2)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(4)		56-1
			(100)	(0)		(2)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(2)	(4)		18-1
		75.0	200	0.5		5	0	1	0	0	0	0.5	3.0		
			(100)	(1)	-	(4)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	-	22-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		72-1
		150	200	1.0		4	1	0	0	1	0	1.0	3.0		
			(100)	(1)	-	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(2)	-	03-1
			(100)	(1)		(3)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(4)		45-1
		300	200	0.0		3	0	1	0	1	0	1.0	2.5		
			(100)	(0)	-	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)	-	66-1
			(100)	(0)		(2)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(3)		47-1
		600	200	1.5		4	0	1	0	0	0	0.5	2.5		
			(100)	(1)	-	(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)	-	71-1
			(100)	(2)		(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)		97-1
		1200	81	1.2		1	1	2	0	0	0	3.7	4.9		
			(15)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(13)	(0)	TOX	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	TOX	02-1
			(23)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		84-1
			(30)	(0)		(1)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(3)		84-2
		PC	200	0.0		7	40	60	1	4	1	42.0	43.5		
			(100)	(0)	-	(6)	(22)	(28)	(0)	(1)	(1)	(41)	(44)	+	54-1
			(100)	(0)		(1)	(18)	(32)	(1)	(3)	(0)	(43)	(43)		34-1

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

TOX: cell toxicity was observed.

NC: Negative control (physiological saline)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 2-4 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment:48hr]

S9 mix	Time(hr)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	48-0	NC	200	1.0		5	0	0	0	1	0	0.5	3.0		76-1 11-1
			(100)	(0)		(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)		
		75.0	200	0.0	-	3	0	0	0	0	0	0.0	1.5	-	79-1 37-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		150	200	0.0	-	2	0	0	0	1	0	0.5	1.5	-	28-1 01-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(2)		
		300	200	0.5	-	5	0	1	0	2	0	1.5	4.0	-	53-1 73-1
			(100)	(0)		(3)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(2)	(5)		
		600	200	1.5	-	2	1	0	0	0	0	0.5	1.5	-	75-1 61-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
	48-0	1200	84	3.6	TOX	1	0	0	0	3	0	3.6	4.8	TOX	80-1 80-2 07-1 07-2
			(21)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)		
			(21)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(22)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		PC	200	1.0	-	10	50	108	3	2	0	66.5	68.0	+	21-1 95-1
			(100)	(1)		(6)	(23)	(55)	(2)	(1)	(0)	(68)	(70)		
			(100)	(1)		(4)	(27)	(53)	(1)	(1)	(0)	(65)	(66)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

TOX: cell toxicity was observed.

NC: Negative control (physiological saline)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最終報告書訂正書(1)

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールのほ乳類の培養
細胞を用いる染色体異常試験

M-1129

2004 年 9 月 16 日

株式会社 **ポリサーチセンター**

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまと1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

試験番号 : M-1129

試験表題 : 2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールのは乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

訂正箇所1 : 考察

〔訂正前〕 一方、陰性（媒体）対照における染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、2 枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは、本試験条件下において染色体異常誘発能を有さないものと判定した。

〔訂正後〕 一方、陰性（媒体）対照における染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、2 枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

なお、化学構造的に本被験物質と類似物質である *tert*-butyl hydroperoxide (CAS Registry No. 75-91-2) は、染色体異常試験⁶⁾で陽性の結果が、*isopropyl alcohol* (CAS Registry No. 67-63-0) は細菌を用いる復帰突然変異試験⁶⁾及び姉妹染色分体交換試験⁷⁾で陰性の結果が、*acetone cyanohydrin* (CAS Registry No. 75-86-5) は細菌を用いる復帰突然変異試験⁶⁾で陰性の結果がそれぞれ報告されている。

以上の結果から、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは、本試験条件下において染色体異常誘発能を有さないものと判定した。

訂正理由 : ピア・レビューの結果を受けて、考察の内容を再考し類似物質についての文献情報を記載することとし、下線を付した部分の文章を追記する。

訂正箇所 2 : 参考文献

〔訂正前〕

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354 (1977)
- 2) 石館基監修：染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1987)
- 3) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集：厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、1992
- 4) Matsuoka, A., *et al.*: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290 (1979)

〔訂正後〕

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354 (1977)
- 2) 石館基監修：染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1987)
- 3) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集：厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、1992
- 4) Matsuoka, A., *et al.*: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290 (1979)
- 5) Takahemi, O.: *Mutation Res.*, 213, 243-248 (1989)
- 6) Shimizu, H. *et al.*: *Sangyo Igaku* 27, 400-419 (1985)
- 7) von der Hude, W.: *Environ. Mutagen.* 9, 401-410 (1987)
- 8) Zeiger, E. *et al.*: *Environ. Mol. Mutagen.* 11, 1-157 (1988)

訂正理由 : ピア・レビューの結果を受けて、考察の内容を再考し類似物質についての文献情報を記載することとし、下線を付した部分の文献を追記する。

訂正年月日 : 2004 年 9 月 16 日