試験番号 G-12-009

最終報告書

2-メチルバレルアルデヒドの

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

財団法人食品薬品安全センター秦野[redacted]

〒257-8523　神奈川県秦野市落合 729[redacted]

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 (東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2)
試験番号	G-12-009
被験物質	2-メチルバレルアルデヒド
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	2012 年 8 月 16 日
実験開始日	2012 年 8 月 24 日
実験終了日	2012 年 12 月 21 日
試験終了日	試験責任者の捺印日
試資料保管場所	秦野研究所資料保存室
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	財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 所長 [redacted]

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、環保企発第 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、環保企発第 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。

2013 年 03 月 27 日

試験責任者 [redacted]

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

[redacted]

目次

要約 5
試験目的 5
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 6
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 7
7. 染色体異常試験 8
8. 染色体分析 9
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 9
試験成績および考察 10
参考文献 11
Figure 12
Tables 13
Appendices 17

(最終ページ:18 ページ)

信頼性保証書

要約

2-メチルバレルアルデヒドの 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をもとに、すべての処理条件(S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理、24 時間連続処理)で、1.0 mg/mL(約 10 mmol)を最高処理濃度とした以下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:0.063、0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL(公比 2)
S9 mix 存在下の短時間処理:0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL(公比 2)
24 時間連続処理:0.063、0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL(公比 2)

なお、肉眼観察の結果、すべての被験物質処理群で処理開始時および処理終了時に、培養液中に沈殿は認められなかった。

染色体分析に先立ち実施し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、その濃度を含む以下の 3 濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL
S9 mix 存在下の短時間処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL
24 時間連続処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL

染色体分析の結果、構造異常を有する細胞については、すべての被験物質処理群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 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、S9 mix 非存在下の短時間処理の 0.50 mg/mL 濃度群および 24 時間連続処理の 1.0 mg/mL 濃度群で統計学的に有意に増加(出現率:それぞれ 3.1%および 2.1%)し、24 時間連続処理については用量依存性も認められた。

以上の結果より、2-メチルバレルアルデヒドは本試験条件下で 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

2-メチルバレルアルデヒド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、環保企発第 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、環保企発第 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 2-メチルバレルアルデヒド[化学名(IUPAC 名):2-メチルペンタナール、英名:2-methylvaleraldehyde、略称:2-MV、CAS 番号:123-15-9、分子式:$C_6H_{12}O$、分子量:100.16、ロット番号:JPQXD、含量:98.1%(GC)、Appendix 1 参照]は無色～ほとんど無色透明の液体である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 2 に示す。被験物質は[redacted]から購入し、使用時まで密閉容器で冷蔵(実測値:3～7°C)、遮光下で保管した。

被験物質原体の安定性については、製品安全性データシート中に、適切な条件下においては安定であることが記載されている。また、実験開始前(測定日:2012 年 8 月 21 日)および実験終了後(測定日:2013 年 1 月 15 日)にフーリエ変換赤外分光光度計を用いて赤外吸収スペクトルを測定し、両者の測定結果に変化の無いことを確認した(試験番号:M-12-020)。

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、協和醗酵キリン)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:K2B90、大塚製薬工場)に溶かし、凍結保存(-30°C)した原液(MMC:20 μg/mL、CP:1 mg/mL、調製日:MMC および CP 共に 2012 年 10 月 5 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 2 代(細胞増殖抑制試験)および 9 代(染色体異常試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清(CS、ロット番号:522123、Biological Industries)を 10 vol%添加したイーグル MEM 培養液(10%CS/MEM)を用い、CO_2インキュベーター(5%CO_2、37 ℃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 ℃、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%$NaHCO_3$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:RAA-653、2012 年 7 月 20 日製造、キッコーマン)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℃)に保管し、調製後 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℃)に保管し、使用時(調製後 6 ヶ月以内に使用)はこれに S9、$MgCl_2$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 $MgCl_2$、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に溶解しないが、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したことから、溶媒として DMSO(ロット番号:KWK3063、和光純薬、分光分析用)を用いた。

被験物質を秤量したのち、溶媒(DMSO)を加えて原液(100 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]

0.781、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0、100 mg/mL(公比 2)

[染色体異常試験]

6.25、12.5、25.0、50.0、100 mg/mL(公比 2)

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、秦野研究所において室温、遮光下で保管した 0.05 mg/mL 溶液および 100 mg/mL 溶液について被験物質調製液の調製 24 時間の安定性を確認した(試験番号:M-12-020)。

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 1.0 mg/mL

(約 10 mmol)を最高処理濃度とする 8 濃度群(0.0078～1.0 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 μL/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 μL/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おける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(Monocellater™、オリンパス販売)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すべての処理条件で 1.0 mg/mL(約 10 mmol)を最高処理濃度とし、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では公比 2 で 5 濃度群、S9 mix 存在下の短時間処理では公比 2 で 4 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 枚は染色体標本を作製し、残りの 2 枚については単層培養細胞密度計(MI-60、オリンパス光学工業)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 反応液と交換した後、MMC(20 μg/mL)を、S9 mix 非存在下の短時間処理では 15 μL/ディッシュ(最終濃度:0.1 μg/mL)、連続処理では 12.5 μL/ディッシュ(最終濃度:0.05 μg/mL)添加した。S9 mix 存在下の短時間処理では CP(1 mg/mL) を 30 μL/ディッシュ(最終濃度:10 μg/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 μg/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枚のスライド標本を作製した。

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。

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。

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。なお、倍数性細胞について分析細胞数の不足した処理群については、試験責任者の判断で必要と判断した場合には予備スライドを用いて追加分析を行った。

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。

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。なお、観察細胞数が規定に達しなかった処理群については、統計解析ソフトウェア SAS®を用いて有意差検定を実施した。また、有意差が認められた処理条件についても統計解析ソフトウェア SAS®を用いてコクラン・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、すべての処理条件で 1.0 mg/mL(約 10 mmol)においても 50%を超える増殖抑制は認められなかった(Figure 1)。なお、肉眼観察の結果、すべての被験物質処理群で処理開始時および処理終了時に培養液中に沈殿は認められなかった。

以上の結果より、すべての処理条件で 1.0 mg/mL(約 10 mmol)を最高処理濃度とし、以下の処理群を設定し、染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.063、0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL(公比 2)
S9 mix 存在下の短時間処理:0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL(公比 2)
24 時間連続処理:0.063、0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL(公比 2)

なお、肉眼観察の結果、すべての被験物質処理群で処理開始時および処理終了時に培養液中に沈殿は認められなかった。

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、すべての処理条件で 1.0 mg/mL となったことから、その濃度を含む下記の 3 濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL
S9 mix 存在下の短時間処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL
24 時間連続処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下の短時間処理では、構造異常を有する細胞については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、用量依存性は認められないものの、中濃度群(0.50 mg/mL)で統計学的に有意な増加(出現率 3.1%)が認められた(Table 1)。なお、中濃度群については観察細胞数が足りなかったが、細胞増殖抑制作用は認められなかったことから、スライド標本を確認した結果より標本作製時に滴下した細胞浮遊液量中の細胞が少なかったと判断し、予備のスライドを用いて追加観察を行い、観察細胞を 800 細胞とした。S9 mix 存在下の短時間処理については構造異常を有する細胞および倍数性細胞ともに統計学的に有意な増加は認められなかった(Table 2)。なお、陽性対照群(CP 処理群)では、倍数性細胞が規定の細胞数分析が出来なかったが、予備のスライド標本が足りないことから、追加の観察は行わなかった。24 時間連続処理については構造異常を有する細胞については統計学的に有意な増加は認められなかったものの、倍数性細胞については高濃度群(1.0 mg/mL)で統計学的に有意な増加(出現率:2.1%)が認められ、用量依存性も認められた(Table 3)。

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} 値を求めたが、いずれの処理条件についても、最高濃度の 10 倍以上(S9 mix 非存在下の短時間処理:14 mg/mL、24 時間連続処理:13 mg/mL)となり、対象外となった。

なお、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理において倍数性細胞の誘発が認められ、細胞増殖抑制が認められない濃度での誘発であることから生物学的な影響も考えられるが、陽性となった被験物質処理群の倍数性細胞の出現頻度は 2.1～3.1%と低い頻度であることから、生物学的な影響は弱いものと考えられた(Table 1、Table 3)。

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 1、Table 2、Table 3)。

2-メチルバレルアルデヒドは、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験(試験番号: M-12-020)では陰性の結果が得られている。なお、類縁物質であるバレルアルデヒドおよびイソバレルアルデヒドについては復帰突然変異試験で陰性の結果が得られている[2), 3)]。

以上の結果より、2-メチルバレルアルデヒドは、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。

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) Screening Information Data Set for High Volume Chemicals OECD Initial Assessment

3) Screening Information Data Set for High Volume Chemicals OECD Initial Assessment

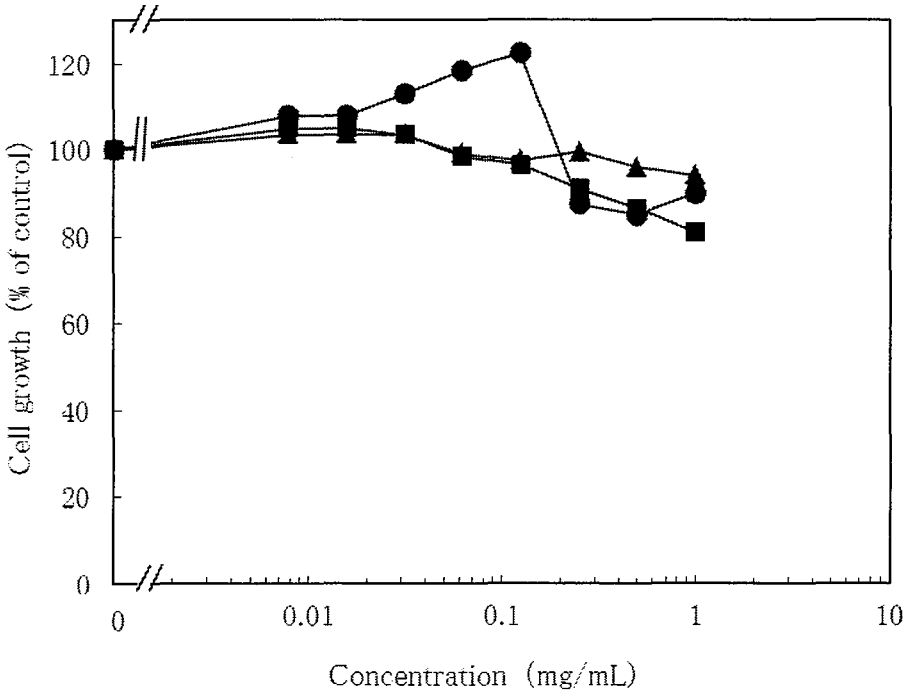

Figure1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-methylvaleraldehyde

●:Short-term treatment without S9 mix

▲:Short-term treatment with S9 mix

■:Continuous treatment (24hours)

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 2-methylvaleraldehyde (2-MV) 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	2	0	0	1	0	0	3	0	3 (3.0)	1 (1.0)	4 (1.0)		
						100	0	0	0	6	1	0	7	0	4 (4.0)	4 (4.0)	4 (1.0)		
						200	2	0	0	7	1	0	10	0	7 (3.5)	5 (2.5)	8 (1.0)		
2-MV	0.063	−	6 - (18)	96	NA	not observed													
2-MV	0.13	−	6 - (18)	100	NA	not observed													
2-MV	0.25	−	6 - (18)	98	NA	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	9 (2.3)		
						100	2	0	0	3	1	0	6	1	5 (5.0)	4 (4.0)	9 (2.3)		
						200	3	1	0	3	1	0	8	1	7 (3.5)	5 (2.5)	18 (2.3)		
2-MV	0.50	−	6 - (18)	101	NA	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	14 (3.5)	NA	−
						100	1	0	1	1	0	0	3	1	3 (3.0)	2 (2.0)	11 (2.8)		
						200	2	1	1	1	0	0	5	1	5 (2.5)	3 (1.5)	25 *(3.1)		
2-MV	1.0	−	6 - (18)	102	7.6, 5.2	100	0	4	0	1	0	0	5	0	5 (5.0)	5 (5.0)	10 (2.5)		
						100	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	0 (0.0)	10 (2.5)		
						200	2	4	0	1	0	0	7	0	7 (3.5)	5 (2.5)	20 (2.5)		
MMC	0.1 μg/mL	−	6 - (18)	NA	NA	100	4	41	101	1	0	0	147	1	67 (67.0)	67 (67.0)	1 (0.3)		
						100	5	48	94	3	0	10	160	2	71 (71.0)	68 (68.0)	5 (1.3)		
						200	9	89	195	4	0	10	307	3	138 (69.0)	135 *(67.5)	6 (0.8)		

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; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide 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™. 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.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 2-methylvaleraldehyde (2-MV) for 6 hours with 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	0	0	1	0	0	2	2	2 (2.0)	1 (1.0)	2 (0.5)		
						100	2	1	1	1	0	0	5	0	5 (5.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
						200	3	1	1	2	0	0	7	2	7 (3.5)	4 (2.0)	2 (0.3)		
2-MV	0.13	+	6 - (18)	103	NA	not observed													
2-MV	0.25	+	6 - (18)	100	NA	100	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	2 (0.5)		
						100	0	1	2	2	0	0	5	0	4 (4.0)	4 (4.0)	4 (1.0)		
						200	1	1	2	3	0	0	7	0	6 (3.0)	5 (2.5)	6 (0.8)		
2-MV	0.50	+	6 - (18)	101	NA	100	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	0 (0.0)	2 (0.5)		
						100	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.3)		
						200	2	1	0	1	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	3 (0.4)	NA	NA
2-MV	1.0	+	6 - (18)	102	5.0, 5.6	100	2	1	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	1 (1.0)	2 (0.5)		
						100	1	2	1	0	0	0	4	0	4 (4.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
						200	3	3	1	0	0	0	7	0	7 (3.5)	4 (2.0)	3 (0.4)		
CP	10 μg/mL	+	6 - (18)	NA	NA	100	13	43	120	2	1	20	199	1	79 (79.0)	79 (79.0)	1 (0.3)		
						100	6	53	164	7	2	10	242	1	80 (80.0)	80 (80.0)	0 (0.0)		
						200	19	96	284	9	3	30	441	2	159 (79.5)	159 *(79.5)	1 (0.1)[8]		

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; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide 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™. 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) Seven hundred and twenty-one 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 continuously treated with 2-methylvaleraldehyde (2-MV) for 24 hours without S9 mix

Group	Concen-tration (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	0	5	1	0	1	0	7	0	7 (7.0)	7 (7.0)	0 (0.0)		
					100	0	1	0	1	0	0	2	1	2 (2.0)	2 (2.0)	3 (0.8)		
					200	0	6	1	1	1	0	9	1	9 (4.5)	9 (4.5)	3 (0.4)		
2-MV	0.063	24	92	NA	not observed													
2-MV	0.13	24	94	NA	not observed													
2-MV	0.25	24	91	NA	100	3	1	0	0	0	0	4	0	4 (4.0)	1 (1.0)	4 (1.0)		
					100	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	7 (1.8)		
					200	3	2	0	1	0	0	6	0	6 (3.0)	3 (1.5)	11 (1.4)		
2-MV	0.50	24	89	NA	100	2	0	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	1 (1.0)	5 (1.3)	NA	+
					100	1	2	0	1	0	0	4	2	4 (4.0)	3 (3.0)	8 (2.0)		
					200	3	2	1	1	0	0	7	2	7 (3.5)	4 (2.0)	13 (1.6)		
2-MV	1.0	24	84	3.4, 3.8	100	0	0	1	1	0	0	2	1	2 (2.0)	2 (2.0)	12 (3.0)		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.3)		
					200	0	0	1	1	0	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	17 *(2.1)		
MMC	0.05 μg/mL	24	NA	NA	100	9	66	87	0	0	30	192	1	75 (75.0)	73 (73.0)	0 (0.0)		
					100	5	31	92	5	0	0	133	1	65 (65.0)	62 (62.0)	1 (0.3)		
					200	14	97	179	5	0	30	325	2	140 (70.0)	135 *(67.5)	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; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide 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 ™. MonocellaterTM. 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.

Table 4　CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験おける秦野研究所の背景データ

(2011 年 6 月～2012 年 1 月)

群	試験数	S9 mix の有無	処理時間 (hrs)	異常細胞の出現率 (%)		
				平均± S.D.	最大	最小
<構造異常(ギャップを除く)>						
陰性対照 [1]	76	——	——	2.2 ± 1.31	5.0	0.0
MMC (0.1 μg/mL)	24	無	6-(18)	53.0 ± 11.6	76.0	30.0
CP (10 μg/mL)	24	有	6-(18)	29.1 ± 5.55	44.0	21.5
MMC (0.05 μg/mL)	24	無	24-(0)	50.0 ± 11.3	71.5	30.0
<倍数性細胞 [2]>						
陰性対照	76	——	——	0.20 ± 0.17	0.63	0.00
MMC (0.1 μg/mL)	23	無	6-(18)	0.11± 0.11	0.38	0.00
CP (10 μg/mL)	24	有	6-(18)	0.14 ± 0.18	0.50	0.00
MMC (0.05 μg/mL)	23	無	24-(0)	0.10 ± 0.14	0.50	0.00

1) 無処理 (培養液)と溶媒(注射用水、ジメチルスルフォキシド, 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液、アセトンなど)の全データを合わせた。
2) 800 細胞分析した。

Appendix 1

試験成績書

2012年07月03日

東京化成工業株式会社　品質保証[redacted]
〒103-0023
東京都中央区日本橋本町4丁目10[redacted]
TEL: 03(5640)8860　FAX: 03(56[redacted]

製品名：2 Methylvaleraldehyde				[redacted]
製品コード：M0596	等級：EP	製品ロット：JPOXD	判定：合格	

項目	結果	規格値
純度(GC)	98.1 %	95.0 %以上
比重 (20/20)	0.8108	0.8050 ～ 0.8120
屈折率 n20/D	1.4002	1.3980 ～ 1.4010

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)	2-メチルペンタナール		
別名	2-メチルバレルアルデヒド 2-Methylvaleraldehyde、2-methylpentanal		
CAS番号	123-15-9		
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	100.16		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	98.1%(GC)		
試験に供した新規化学物質のロット番号	JPQXD		
不純物の名称及び含有率	――――		
蒸気圧	――――		
対水溶解度	水に不溶*		
1-オクタノール/水分配係数	――――		
融点	――――		
沸点	119℃		
常温における性状	無色～ほとんど無色透明の液体		
安定性	適切な条件下においては安定(製品安全データシートより)。		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度*	溶媒中の安定性*
	水	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(試験番号:M-12-020)。
	DMSO	100 mg/mLで溶解	100 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。また、調製後24時間の安定性(0.05 mg/mLおよび100 mg/mL、室温、遮光保管)を確認した(試験番号:M-12-020)。
	アセトン	100 mg/mLで溶解	100 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(試験番号:M-12-020)。

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1.「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。

2.「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。

3.「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

*:(財)食品薬品安全センター秦野研究所において確認した。

信頼性保証書

表題　　2-メチルバレルアルデヒドのチャイニーズ・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-12-009

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	2012年 8月16日	2012年 8月16日
試験計画書変更書		
G-12-009-No.1	2012年10月 1日	2012年10月 1日
G-12-009-No.2	2012年10月11日	2012年10月11日
G-12-009-No.3	2012年10月19日	2012年10月19日
G-12-009-No.4	2012年11月 2日	2012年11月 2日
G-12-009-No.5	2013年 3月 6日	2013年 3月 6日
検体調製および細胞処理	2012年10月18日	2012年10月18日
標本観察	2012年11月 9日	2012年11月 9日
報告書草案および生データ	2013年 3月14日	2013年 3月14日
最終報告書	2013年 3月26日	2013年 3月26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、環保企発第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。

2013年3月26日

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 [redacted]