試験番号 G-12-007

最終報告書

β-Cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers 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-12-007
被験物質	β-Cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers
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 11 月 1 日
実験開始日	2012 年 11 月 23 日
実験終了日	2013 年 2 月 6 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

- 化学分析
- 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 8
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 10
試験成績および考察 10
参考文献 11
Figure 12
Tables 13
Appendices 16

(最終ページ:20 ページ)

信頼性保証書

要約

β-Cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers 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、すべての試験条件(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)において 5.0 mg/mL 最高処理濃度とし、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:0.63、1.3、2.5, 5.0 mg/mL(公比 2)
S9 mix 存在下の短時間処理:0.63、1.3、2.5、5.0 mg/mL(公比 2)
24 時間連続処理:0.31、0.63、1.3、2.5、5.0 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:1.3、2.5、5.0 mg/mL
S9 mix 存在下の短時間処理:1.3、2.5、5.0 mg/mL
24 時間連続処理:1.3、2.5、5.0 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および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。

なお、類縁物質であるβ-シクロデキストリンについてはチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験および復帰突然変異試験で陰性の結果が得られている。

以上の結果より、β-cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers は本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

試験目的

β-Cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers 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β-cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers[化学名(別名):2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、略称:B-CH、CAS No.:128446-35-5、分子式:$C_{63}H_{112}O_{42}$、分子量:1541.54、ロット番号:TLN0205、含量:99.7%、Appendix 1 参照]は、白色の粉末である。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、使用時まで密閉して室温(実測値:20.1～25.5°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、一般的には安定であることが記載されている。また、当該試験において、室温保管した被験物質を用いて実験開始前(測定日:2012 年 11 月 7 日)および実験終了後(測定日:2013 年 2 月 19 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(Appendix 3)。

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 8 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:990250、GIBCO)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-655、2012 年 9 月 14 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、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℃)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 22:5 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たことから、溶媒として日局注射用水(ロット番号:C23VS1、光製薬)を用いた。

被験物質を秤量したのち、溶媒(日局注射用水)を加えて原液(50 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 10 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 mg/mL(公比 2)

[染色体異常試験]

3.13、6.25、12.5、25.0、50.0 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冷蔵、遮光下で保管(保管温度:4～5℃)した 5.00 mg/mL 溶液および 200 mg/mL 溶液について被験物質調製液の調製後 8 日間の安定性を確認した(分析方法は Appendix 4 参照)。5.00 mg/mL 溶液については調製直後および調製 8 日後の平均含量が 96.7%および 99.2%、各測定値のばらつきが 94.7～105.9%、平均残存率は 102.6%であった。また、200 mg/mL 溶液については調製直後および調製 8 日後の平均含量が 100.2%および 96.5%、各測定値のばらつきは 99.6%～100.6%、平均残存率は 96.4%であった。これらの測定値は、いずれも試験計画

載した許容基準の範囲内(調製直後および保管後の平均含量が、それぞれ調製濃度の 90.0～110.0%、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0～110.0%以内、調製直後の平均測定値に対する保管後の残存率の平均値が 90.0%以上)であった(Appendix 5)。

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 5.0 mg/mL を最高処理濃度とする 7 濃度群(0.078～5.0 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(2.7 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 10 vol%添加(300 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(4.5 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 10 vol%添加(500 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(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すべての処理条件で 5.0 mg/mL を最高濃度とし、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では公比 2 で 4 濃度群、24 時間連続処理では公比 2 で 5 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、溶媒ないし被験物質調製液の代わりに日局注射用水を 10 vol%加えたのち、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 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。

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。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、すべての試験条件で 5.0 mg/mL の濃度においても 50%を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。また、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(Figure 1)。

以上の結果より、すべての試験条件で 5.0 mg/mL を最高処理濃度として下記の濃度群を設定し、染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.63、1.3、2.5、5.0 mg/mL(公比 2)
S9 mix 存在下の短時間処理:0.63、1.3、2.5、5.0 mg/mL(公比 2)
24 時間連続処理:0.31、0.63、1.3、2.5、5.0 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、すべての試験条件で 5.0 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:1.3、2.5、5.0 mg/mL
S9 mix 存在下の短時間処理:1.3、2.5、5.0 mg/mL
24 時間連続処理:1.3、2.5、5.0 mg/mL

染色体分析の結果、すべての処理条件において、構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった(Table 1、Table 2、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)。

β-Cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers 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-12－018)では陰性の結果が得られている。なお、類縁物質であるβ-シクロデキストリンについては、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および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、β-cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers は、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

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) 祖父尼俊雄 監修、染色体異常試験データ集、改定 1998 年版、Life-Science Information Center、東京(1998)、p151-152

3) 石館基 監修、微生物を用いる変異原性試験データ集、Life-Science Information Center、東京(1991)、p146-147

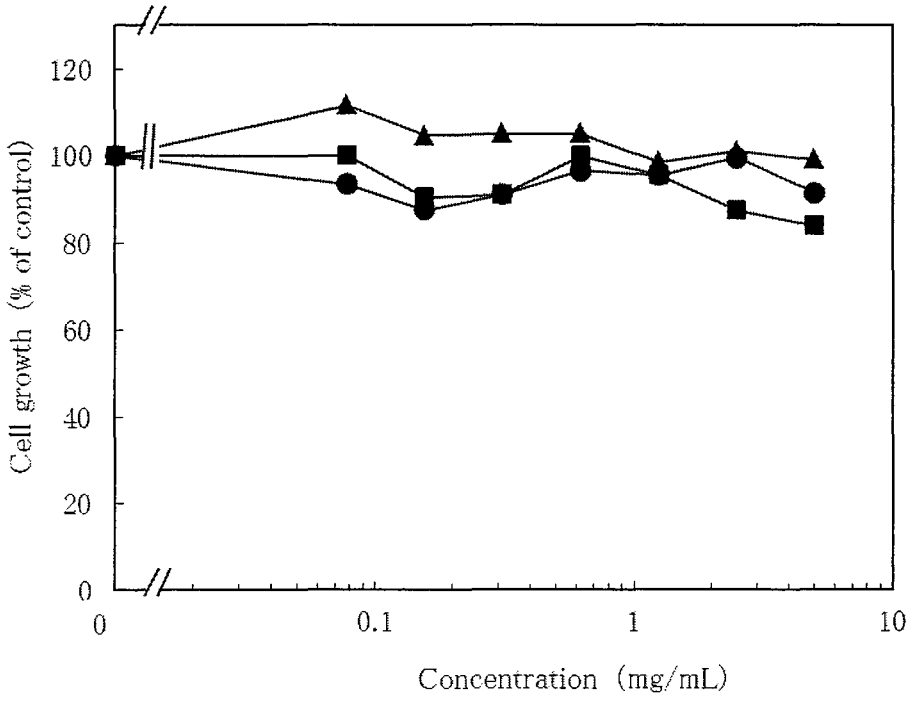


Figure1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with β-cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers.

●:Short-term treatment without S9 mix

▲:Short -term treatment with S9 mix

■:Continuous treatment (24 hours)

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with β-cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers (B-CH) 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 (%)
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul [4]	total		+gap (%)	-gap (%)	
Negative [1]	0	−	6 - (18)	100	NA	100	0	2	0	0	0	0	2	1	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)
						100	0	4	2	0	0	0	6	2	6 (6.0)	6 (6.0)	0 (0.0)
						200	0	6	2	0	0	0	8	3	8 (4.0)	8 (4.0)	0 (0.0)
B-CH	0.63	−	6 - (18)	96	NA	not observed											
B-CH	1.3	−	6 - (18)	97	NA	100	2	4	0	0	0	0	6	0	6 (6.0)	4 (4.0)	0 (0.0)
						100	5	3	1	1	0	0	10	0	10 (10.0)	5 (5.0)	1 (0.3)
						200	7	7	1	1	0	0	16	0	16 (8.0)	9 (4.5)	1 (0.1)
B-CH	2.5	−	6 - (18)	97	NA	100	3	2	2	0	0	0	7	2	6 (6.0)	4 (4.0)	0 (0.0)
						100	0	2	1	0	0	0	3	2	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)
						200	3	4	3	0	0	0	10	4	9 (4.5)	7 (3.5)	0 (0.0)
B-CH	5.0	−	6 - (18)	93	8.6, 3.8	100	1	2	0	0	0	0	3	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)
						100	1	3	2	0	0	0	6	0	6 (6.0)	5 (5.0)	0 (0.0)
						200	2	5	2	0	0	0	9	0	8 (4.0)	6 (3.0)	0 (0.0)
MMC	0.1 μg/mL	−	6 - (18)	NA	NA	100	5	28	51	1	0	10	95	0	56 (56.0)	54 (54.0)	0 (0.0)
						100	2	53	55	0	2	0	112	0	57 (57.0)	57 (57.0)	0 (0.0)
						200	7	81	106	1	2	10	207	0	113 (56.5)	111 *(55.5)	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; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Distilled water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 vol% to each 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.

*, 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 β-cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers (B-CH) 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 (%)
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul [4]	total		+gap (%)	-gap (%)	
Negative [1]	0	+	6 - (18)	100	NA	100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	2 (0.5)
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	3 (0.8)
						200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	5 (0.6)
B-CH	0.63	+	6 - (18)	99	NA	not observed											
B-CH	1.3	+	6 - (18)	101	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (0.5)
B-CH	2.5	+	6 - (18)	96	NA	100	1	1	2	0	0	0	4	0	4 (4.0)	3 (3.0)	1 (0.3)
						100	1	0	0	0	0	0	1	1	1 (1.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
						200	2	1	2	0	0	0	5	1	5 (2.5)	3 (1.5)	3 (0.4)
B-CH	5.0	+	6 - (18)	94	14.8, 11.2	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	3 (0.8)
						200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	5 (0.6)
CP	10 μg/mL	+	6 - (18)	NA	NA	100	2	37	117	0	0	0	156	1	74 (74.0)	74 (74.0)	1 (0.3)
						100	3	13	44	0	0	0	60	0	46 (46.0)	43 (43.0)	0 (0.0)
						200	5	50	161	0	0	0	216	1	120 (60.0)	117 *(58.5)	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; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Distilled water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 vol% to each 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.

*, 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 β-cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers (B-CH) 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 (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul [4]	total		+gap (%)	-gap (%)	
Negative [1]	0	24	100	NA	100	0	2	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)
					100	1	3	1	0	0	0	5	0	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)
					200	1	5	2	0	0	0	8	0	8 (4.0)	7 (3.5)	1 (0.1)
B-CH	0.31	24	97	NA	not observed											
B-CH	0.63	24	97	NA	not observed											
B-CH	1.3	24	95	NA	100	0	2	1	0	0	0	3	3	3 (3.0)	3 (3.0)	2 (0.5)
					100	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)
					200	0	3	1	0	0	0	4	4	4 (2.0)	4 (2.0)	4 (0.5)
B-CH	2.5	24	90	NA	100	0	3	0	0	1	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	5 (1.3)
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
					200	0	3	0	0	1	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	7 (0.9)
B-CH	5.0	24	82	8.0, 8.2	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)
					100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)
					200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	1 (0.1)
MMC	0.05 μg/mL	24	NA	NA	100	3	27	32	2	0	0	64	0	47 (47.0)	45 (45.0)	0 (0.0)
					100	4	21	21	0	1	0	47	0	36 (36.0)	34 (34.0)	0 (0.0)
					200	7	48	53	2	1	0	111	0	83 (41.5)	79 *(39.5)	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; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Distilled water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 vol% to each 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.

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

Appendix 1

検査成績書

財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所/化学物質管理室 御中

2012年7月3日
株式会社 ワコーケミカル
[redacted]

Code No. 324-84233
2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン

規格／等級

Lot No.	TLN0205
数量	100g

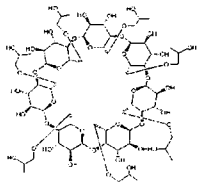
検査項目	検査成績	規格値
外観	白色の粉末	白～淡黄色、結晶性粉末～粉末
含量	99.7%	98.0%以上
検査年月日	2012/04/23	

判定	合格	検査責任者	[redacted]

成績書発行番号 9861461

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)	β-シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピルエーテル
別名	β-Cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン
CAS番号	128446-35-5
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	1541.54
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.7%
試験に供した新規化学物質のロット番号	TLN0205
不純物の名称及び含有率	――――
蒸気圧	――――
対水溶解度	水に溶けやすい
1-オクタノール/水分配係数	――――
融点	278℃
沸点	――――
常温における性状	白色の粉末
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	250 mg/mLで溶解	250 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:R-12-005)。また、冷蔵、遮光下で保管した5 mg/mLおよび200 mg/mLの試験液について、調製後8日間の安定性を確認した(試験番号:G-12-007)
DMSO	510.3 mg/mLで溶解	510.3 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。
アセトン	114.5 mg/mLで不溶	114.5mg/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。

[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。

Appendix 3

被験物質原体の安定性測定方法

① 使用機器

フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR-8300)島津製作所

② 測定条件

測定方法　　臭化カリウム錠剤法

波数範囲　　4000～400cm^{-1}

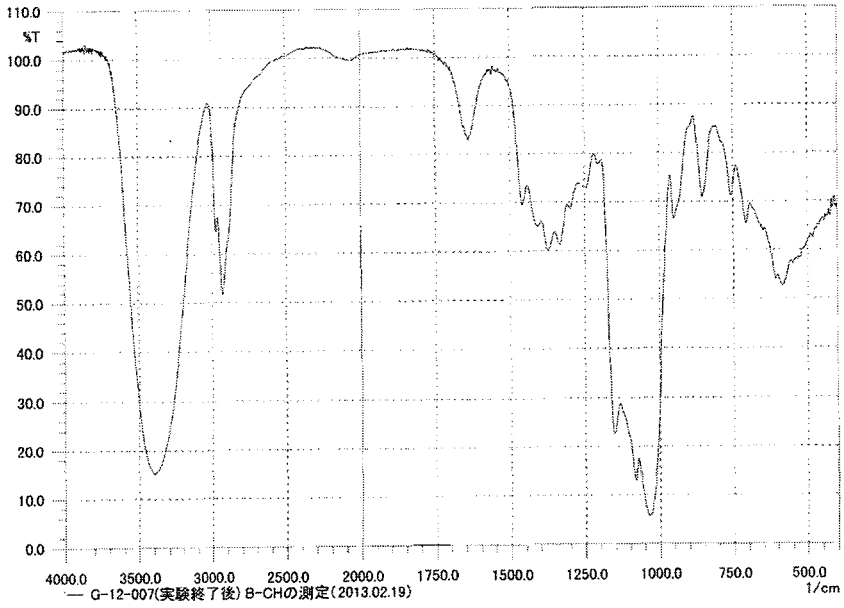
③ 測定方法

被験物質 1～2 mg をとり、めのう製乳鉢で粉末とし、これに赤外吸収スペクトル用臭化カリウム(島津製作所)0.10～0.20 g を加え、湿気を吸わないように注意し、速やかによくすり混ぜた後、錠剤成型器に入れて加圧製錠した。同様にして対照臭化カリウム錠剤を製した。

β-Cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers の赤外吸収スペクトル測定結果

実験開始前

実験終了後



Appendix 4

投与検体中の被験物質濃度測定法

① 試薬

日局注射用水(以下、水)　　光製薬(ロット番号:C23VS1)

② 使用機器

電子天秤(R200D)　　ザルトリウス

紫外可視分光光度計　　島津製作所

③ 標準溶液の調製

被験物質約 1 g を精密に量り、水に溶解して正確に 50 mL とし、標準溶液(約 20 mg/mL)とした。この標準用液を 2.5、5 および 10 mL 正確に採り、水を加えてそれぞれ正確に 20 mL とし、標準溶液(約 2.5、5 および 10 mg/mL、各濃度 n=1)を調製した。

④ 試料溶液の調製

5.00 mg/mL の被験物質調製液については、そのまま試料溶液とした。また、200 mg/mL の被験物質調製液については、1 mL を正確にとり、水で希釈して 20 mL とし、試料溶液(約 10 mg/mL)を調製した。

⑤ 検量線の作成および投与検体中被験物質濃度の算出

試料溶液および標準溶液につき、水を対照として紫外可視分光光度計により、波長 205 nm における吸光度を n=1 で測定した。標準溶液から得られた B-CH の吸光度と調製濃度を基に検量線を作成し、この検量線を用いて試料溶液中の B-CH の濃度を求めた。さらに、希釈係数を乗じて被験物質調製液中の B-CH 濃度を算出し、調製濃度に対する割合(含量、%)および各測定濃度の平均値に対するばらつき(%)を算出した。

⑥ 数値の取り扱い

被験物質の秤量:有効数字 3 桁以上

標準物質の秤量:有効数字 4 桁以上

投与検体の濃度:有効数字 3 桁(有効数字 4 桁目を四捨五入)

標準溶液の濃度:有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の濃度およびそれらの平均値:有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の含量(%)、ばらつき(%)、および残存率(%)ならびにそれらの平均値:

小数点以下第 1 位(小数点以下第 2 位を四捨五入

Appendix 5

安定性試験結果

被験物質：β-Cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers
ロット番号：TLN0205
媒　　体：日局注射用水

調製年月日　2012年11月07日
測定年月日　A　2012年11月07日（調製直後）
　　B　2012年11月15日（調製後8日）
保管条件　冷蔵、遮光

調製濃度 (mg/mL)	A				B				
	試料番号	測定濃度 (mg/mL)	含量[a)] (%)	ばらつき[b)] (%)	試料番号	測定濃度 (mg/mL)	含量[a)] (%)	ばらつき[b)] (%)	残存率[c)] (%)
5.00	1	5.118	102.4	105.9	7	4.934	98.7	99.5	102.1
	2	4.805	96.1	99.4	8	5.004	100.1	100.9	103.5
	3	4.578	91.6	94.7	9	4.940	98.8	99.6	102.2
	平均	4.833	96.7		平均	4.959	99.2		102.6
200	4	201.5	100.8	100.6	10	193.6	96.8	100.4	96.7
	5	199.8	99.9	99.8	11	193.0	96.5	100.1	96.4
	6	199.5	99.8	99.7	12	192.2	96.1	99.6	96.0
	平均	200.2	100.2		平均	192.9	96.5		96.4

a)：各測定時の測定濃度／調製濃度×100　b)：各測定時の測定濃度／各測定時の平均測定濃度×100　c)：各測定時の測定濃度／初回の平均測定濃度×100

安定性の判断基準（溶液検体）

調製直後および保管後の平均含量がそれぞれ調製濃度の90.0～110.0%、また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の90.0～110.0%以内であり、かつ、調製直後の測定平均値に対する保管後の残存率が平均値の90.0%以上を示す期間とする。

信頼性保証書

表題　　β-Cyclodextrin, 2-hydroxypropyl ethers 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-12-007

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 11 月 1 日	2012 年 11 月 1 日
試験計画書変更書		
G-12-007-No.1	2012 年 11 月 7 日	2012 年 11 月 7 日
G-12-007-No.2	2012 年 12 月 10 日	2012 年 12 月 10 日
G-12-007-No.3	2013 年 1 月 21 日	2013 年 1 月 21 日
被験物質原体の安定性(実験開始前)および溶媒中の安定性(調製直後)	2012 年 11 月 7 日	2012 年 11 月 7 日
被験物質調製液調製および細胞処理	2012 年 12 月 17 日	2012 年 12 月 17 日
標本観察	2013 年 1 月 25 日	2013 年 1 月 25 日
報告書草案および生データ	2013 年 3 月 13、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]