

最終報告書

酢酸ヘキシルの

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

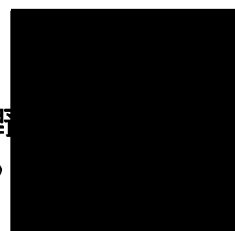
厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課 化学物質安全対策室 委託

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・生活衛生局審査管理課 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-15-016

被験物質 酢酸ヘキシル

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 2015 年 9 月 30 日

実験開始日 2015 年 10 月 5 日

実験終了日 2016 年 1 月 4 日

試験終了日 試験責任者の押印日

試験資料保管場所 秦野研究所資料保存施設

保管期間 試験終了後 10 年間
その後の保存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、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、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。

2016 年 03 月 04 日

試験責任者  

試験従事者

試験責任者

試験担当主任者

試験担当者

被験物質調製液中の安定性試験
培養

検体調製および細胞処理

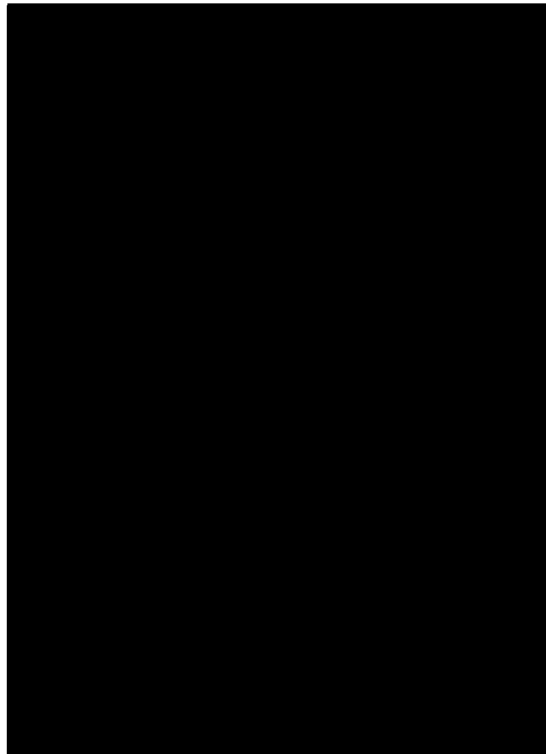
細胞数測定用サンプル作製

細胞数測定

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	7
3. 細胞と培養条件	7
4. S9 反応液	8
5. 被験物質調製液の調製	8
6. 細胞毒性試験	9
7. 染色体異常試験	9
8. 染色体分析	10
9. 試験成立条件	11
10. 判定	11
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	11
試験成績および考察	11
参考文献	13
Figure	14
Tables	15
Appendices	18

(最終ページ:22 ページ)

信頼性保証書

要約

酢酸ヘキシルの 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。

用量設定のために細胞毒性試験を行った結果、50%の細胞毒性を示す被験物質濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では0.67 mg/mLおよび1.1 mg/mL、24時間連続処理では0.52 mg/mLと推測された。なお、肉眼観察の結果、処理開始時にはすべての処理条件で0.70 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が、処理終了時にはすべての処理条件で被験物質処理群の培養液中に沈殿は認められなかった。

従って、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 1.0 mg/mL および 1.4 mg/mL(約 10 mmol/L)、24 時間連続処理では 0.70 mg/mL の濃度を最高濃度としてそれぞれ以下の 6 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:0.13、0.25、0.50、0.70、0.85、1.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.25、0.50、0.70、1.0、1.2、1.4 mg/mL

24 時間連続処理:0.15、0.22、0.33、0.50、0.60、0.70 mg/mL

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の 1.2 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が、処理終了時にはすべての処理条件で被験物質処理群の培養液中に沈殿は認められなかった。

なお、S9 mix 非存在下の短時間処理については、細胞毒性作用を測定した結果、設定した最高濃度(1.0 mg/mL)で 50%を超える細胞毒性(50%未満の相対細胞数)が認められなかったことから、最高濃度を 1.4 mg/mL(約 10 mmol/L)とした以下の 10 濃度群を設定して染色体異常試験の再試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.13、0.25、0.50、0.70、0.85、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4 mg/mL

なお、肉眼観察の結果、処理開始時には 1.1 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が、処理終了時にはすべての被験物質処理群で培養液中に沈殿は認められなかった。

細胞毒性作用の測定、および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:0.50、0.70、1.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:1.0、1.2、1.4 mg/mL

24 時間連続処理:0.50、0.60、0.70 mg/mL

染色体分析の結果、すべての処理条件で被験物質処理群に構造異常を有する細胞および倍数性細胞

胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、酢酸ヘキシルは本試験条件下で 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

酢酸ヘキシル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、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、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

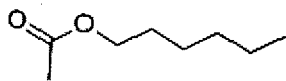
1. 被験物質

被験物質の情報を、下記および Appendix 1、Appendix 2 に示す。

- | | |
|------------|--|
| 1) 名称 | 酢酸ヘキシル |
| 2) 英名 | Hexyl acetate |
| 3) 別名 | Acetic acid hexyl ester |
| 4) 略称 | HA |
| 5) CAS 番号 | 142-92-7 |
| 6) 分子式 | $C_8H_{16}O_2$ |
| 7) 分子量 | 144.21 |
| 8) 物理化学的性質 | 性状: 果香を有する無色透明液体
融点: -80.9°C
沸点: 169°C
1-オクタノール/水分配係数: 購入元からのデータなし
蒸気圧: 176 Pa/ 25°C
引火点: 62°C
比重: 0.8745
屈折率: 1.4091 |

溶解性:水に不溶、エーテル、アルコール、プロピレングリコールに易溶

9) 構造式



10) ロット番号

NWQZH

11) 純度

99.5%(GC)

12) 不純物

情報なし

13) 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)。なお、当試験施設において、実験開始前と実験終了後に被験物質の目視による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:R-15-003)。

14) 保管条件

冷蔵(実測値:3~7°C)、遮光、密閉

15) 購入元



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:572ADD、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:SLBG4216V、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:K4D76、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:2015 年 5 月 15 日および 2015 年 9 月 30 日、CP:2015 年 5 月 15 日)を用時解凍して、調製後 6 か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 8 代および 3 代(細胞毒性試験)、6 代および 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、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:RAA201508A、2015 年 8 月 21 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℃)に保管し、製造後 6 か月以内に使用した。なお、細胞毒性試験において使用期限切れの S9 を使用したが、事象が確認された時点で S9 mix 存在下の短時間処理は実験を中止し、上記のロットの S9 を用いて再試験を実施した。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 か月以内に使用)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

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)には溶解したことから、溶媒として DMSO(ロット番号:KPN0147 および KPE1010、和光純薬工業、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(細胞毒性試験および染色体異常試験ともに 140 mg/mL)を用時調製した。その原液を溶媒で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。

細胞毒性試験(S9 mix 存在下の短時間処理の再試験も同一濃度で実施)

2.19、4.38、8.75、17.5、35.0、70.0、140 mg/mL(公比 2)

染色体異常試験

S9 mix 非存在下の短時間処理:12.5、25.0、50.0、70.0、85.0、100 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:25.0、50.0、70.0、100、120、140 mg/mL

24 時間連続処理:14.8、22.2、33.3、50.0、60.0、70.0 mg/mL

染色体異常試験(再試験)

S9 mix 非存在下の短時間処理:12.5、25.0、50.0、70.0、85.0、100、110、120、130、140 mg/mL

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

被験物質の溶媒中での安定性については、当試験施設において室温、遮光条件下で保管した 0.2 mg/mL および 140 mg/mL の試験液について、保管後 23 時間の安定性を確認した(Appendix 3-1、Appendix 3-2、Appendix 3-3)。安定性の判定基準(溶液)は、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、各測定濃度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濃度に対する保管後の測定濃度の比(残存率)の平均値が、90.0%以上を示す期間を被験物質調製液の有効期間とした。なお、含量試験については、調製後速やかに試験に供すること、および遺伝毒性試験に対する GLP の基本的考え方「医薬品・医療機器改正 GLP 解説(2009)、薬事日報社」に基づき実施しなかった。

6. 細胞毒性試験

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、試験ガイドラインに従って 1.4 mg/mL (約 10 mmol/L) を最高処理濃度とする 7 濃度群 (0.022~1.4 mg/mL、公比 2) を設定して細胞毒性試験を実施した。

CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシン溶液を用いてはがした後、 8×10^3 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL (4×10^4 個) をガラスディッシュ (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 または S9 反応液と交換 (3 mL/ディッシュ) したのち、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) したのち、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。

培養器は、各処理群につき 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、5 mL の 0.02 w/v EDTA 含有 PBS (Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含) を加えたのち、細胞を剥がして細胞懸濁液とした。細胞懸濁液を遠沈管に移した後、0.5 mL の細胞懸濁液を 9 mL の ISOTON[®] II (Beckman Coulter) に加え、コールターカウンター (Z2, Beckman Coulter) で各ディッシュの細胞数を測定した。

細胞数の測定結果をもとに陰性対照群に対する相対細胞数 (%) を以下の計算式で求め、細胞毒性の指標とした。

$$\text{相対細胞数 (\%)} = \frac{\text{処理群の細胞数}}{\text{陰性対照群の細胞数}} \times 100$$

7. 染色体異常試験

細胞毒性試験とほぼ同じ試験条件で染色体異常試験を行った。

細胞毒性試験の結果、50%の細胞毒性 (50%の相対細胞数) を示す被験物質濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理で 0.67 mg/mL および 1.1 mg/mL、24 時間連続処理では 0.52 mg/mL と推

定されたことから、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 1.0 mg/mL および 1.4 mg/mL (約 10 mmol/L)、24 時間連続処理では 0.70 mg/mL を最高濃度としたそれぞれ計 6 濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

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。

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、培養液を捨てたのち 0.02 w/v% EDTA 含有 PBS (Ca²⁺ および Mg²⁺ 不含) をディッシュあたり 5 mL 加え、ピペッティングにより細胞を剥がして細胞懸濁液とした。細胞懸濁液を遠沈管に移したのち、陽性対照群を含むすべての処理群について、0.5 mL の細胞懸濁液を 9 mL の ISOTON® II に加え、コールターカウンターで細胞数を測定した。

残りの細胞懸濁液については遠沈 (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、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。なお、相対細胞数が 20% 未満の被験物質処理群については、スライド標本作製しなかった。

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、設定した最高濃度 (1.0 mg/mL) で 50% を超える細胞毒性が認められなかったことから、1.4 mg/mL (約 10 mmol/L) を最高濃度とした 10 濃度群を設定して、上記と同様の方法で染色体異常試験の再試験を実施した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立ち、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/標本) 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/標本) 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) 処理した最高濃度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。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

細胞毒性試験において、S9 mix 存在下の短時間処理で使用期限切れの S9 (ロット番号: RAA201504A、製造年月日: 2015 年 4 月 17 日、使用期限: 2015 年 10 月 16 日)を使用したことが当該試験の処理終了時に確認されたが、本事象が確認された時点で試験を中止し、S9 mix 存在下の短時間処理については細胞毒性試験の再試験を実施したことから試験の信頼性に影響はなかった。その他、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毒性試験の結果、50%の細胞毒性を示す被験物質濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 0.67 mg/mL および 1.1 mg/mL、24 時間連続処理では 0.52 mg/mL と推定された。なお、肉眼観察の結果、処理開始時にはすべての処理条件で 0.70 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が、処理終了時にはすべての処理条件の被験物質処理群で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、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ 50%の細胞毒性を示した被験物質濃度の約 1.5 倍および 1.3 倍となる 1.0 mg/mL および 1.4 mg/mL (約 10 mmol/L)、24 時間連続処理では 50%の細胞毒性を示した被験物質濃度の約 1.3 倍となる 0.70 mg/mL を最高処理濃度として、それぞれ以下の 6 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: 0.13、0.25、0.50、0.70、0.85、1.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.25、0.50、0.70、1.0、1.2、1.4 mg/mL

24 時間連続処理: 0.15、0.22、0.33、0.50、0.60、0.70 mg/mL

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の 1.2 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が、処理終了時にはすべての処理条件の被験物質処理群で培養液中に沈殿は認められなかった。

なお、S9 mix 非存在下の短時間処理については、設定した最高濃度 (1.0 mg/mL) で 50%を超える細胞毒性 (50%未満の相対細胞数) が認められなかったことから、試験法ガイドラインの基準を満たさなかったため、最高処理濃度を 1.4 mg/mL (約 10 mmol/L) とした以下の 10 濃度群を設定し、染色体異常試験の再試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.13、0.25、0.50、0.70、0.85、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4 mg/mL

肉眼観察の結果、処理開始時には 1.1 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が、処理終了時にはすべての被験物質処理群で培養液中に沈殿は認められなかった。

細胞毒性作用の測定結果および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 (分裂指数が 0.5%以上) な最高濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 1.0 mg/mL および 1.4 mg/mL、24 時間連続処理では 0.70 mg/mL となったことから、その濃度を最高濃度とした以下の 3 濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.50、0.70、1.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理: 1.0、1.2、1.4 mg/mL

24 時間連続処理: 0.50、0.60、0.70 mg/mL

染色体分析の結果、すべての処理条件で被験物質処理群に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 (Table 1、Table 3)、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 (Table 2)。これらの結果より、本実験系の成立が確認された。なお、関連物質である Acetic acid では復帰突然変異試験で陰性、Butyl acetate では染色体異常試験および復帰突然変異試験で陰性、Ethyl acetate では染色体異常試験で陽性、復帰突然変異試験および小核試験では陰性の報告がされている^{2)~4)}。

以上の結果より、酢酸ヘキシルは、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) 賀田恒夫、石館基 監修、環境変異原データ集 1、サイエンティスト社、東京(1980)、p15
- 3) 祖父尼俊雄 監修、染色体異常試験データ集、改訂 1998 年版、株式会社エル・アイ・シー、東京(1999)、p90
- 4) 祖父尼俊雄 監修、染色体異常試験データ集、改訂 1998 年版、株式会社エル・アイ・シー、東京(1999)、p217

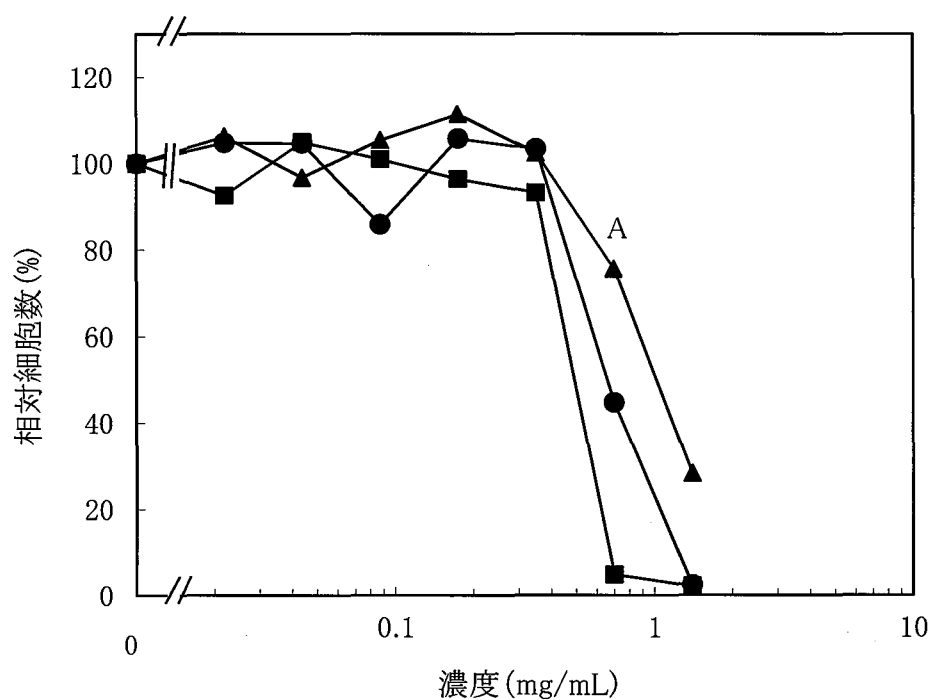


Figure 1 酢酸へキシルで CHL/IU 細胞を処理したときの細胞毒性作用

- : S9 mix 非存在下の短時間処理
- ▲: S9 mix 存在下の短時間処理
- : 24 時間連続処理

肉眼観察の結果、処理開始時にはすべての処理条件で 0.70 mg/mL (A) 以上の被験物質処理群で培養液中に沈殿が認められたが、処理終了時にはすべての処理条件の被験物質処理群で培養液中に沈殿は認められなかった。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with Hexyl acetate (HA) for 6 hours without S9 mix

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 (%)
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)	
Negative ¹⁾	0	—	6 - (18)	100	NA	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
						100	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
						200	1	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (0.3)
HA	0.13	—	6 - (18)	88	NA	not observed											
HA	0.25	—	6 - (18)	97	NA	not observed											
HA	0.50	—	6 - (18)	82	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	2	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
						200	0	0	0	0	0	0	0	2	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.3)
HA	0.70	—	6 - (18)	27	NA	100	0	1	1	3	0	0	5	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)
						100	2	0	2	1	0	0	5	0	5 (5.0)	3 (3.0)	1 (0.3)
						200	2	1	3	4	0	0	10	0	8 (4.0)	6 (3.0)	1 (0.1)
HA	0.85	—	6 - (18)	63	NA	not observed											
HA	1.0	—	6 - (18)	60	5.8, 5.6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.8)
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.4)
HA	1.1 ^{pb}	—	6 - (18)	2	NA	cytotoxic											
HA	1.2 ^{pb}	—	6 - (18)	1	NA	cytotoxic											
HA	1.3 ^{pb}	—	6 - (18)	1	NA	cytotoxic											
HA	1.4 ^{pb}	—	6 - (18)	1	NA	cytotoxic											
MMC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	90	NA	100	1	27	25	1	0	0	54	0	33 (33.0)	33 (33.0)	0 (0.0)
						100	2	30	42	2	0	0	76	1	45 (45.0)	45 (45.0)	0 (0.0)
						200	3	57	67	3	0	0	130	1	78 (39.0)	78 (39.0)	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; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Dimethylsulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter®. 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.

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

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with Hexyl acetate (HA) for 6 hours with S9 mix

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 (%)
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)	
Negative ¹⁾	0	+	6 - (18)	100	NA	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)
						100	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)
						200	0	2	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	1 (0.1)
HA	0.25	+	6 - (18)	97	NA	not observed											
HA	0.50	+	6 - (18)	101	NA	not observed											
HA	0.70	+	6 - (18)	105	NA	not observed											
HA	1.0	+	6 - (18)	104	NA	100	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)
						100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
						200	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	3 (0.4)
HA	1.2 ^{pb}	+	6 - (18)	64	NA	100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.3)
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
						200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	3 (0.4)
HA	1.4 ^{pb}	+	6 - (18)	57	9.8, 4.6	100	0	0	0	6	0	0	6	0	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)
						200	0	1	0	6	0	0	7	0	2 (1.0)	2 (1.0)	3 (0.4)
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	85	NA	100	4	5	18	1	0	0	28	0	25 (25.0)	22 (22.0)	1 (0.3)
						100	0	6	20	1	0	0	27	0	19 (19.0)	19 (19.0)	0 (0.0)
						200	4	11	38	2	0	0	55	0	44 (22.0)	41 * (20.5)	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; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Dimethylsulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter[®]. 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.

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

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with Hexyl acetate (HA) 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 (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)	
Negative ¹⁾	0	24	100	NA	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)
					100	0	1	0	1	2	0	4	0	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.3)
					200	0	2	0	1	2	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	1 (0.1)
HA	0.15	24	114	NA	not observed											
HA	0.22	24	114	NA	not observed											
HA	0.33	24	104	NA	not observed											
HA	0.50	24	112	NA	100	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	3 (0.8)
					100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)
					200	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	3 (0.4)
HA	0.60	24	93	NA	100	0	2	0	0	1	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.0)
					200	0	2	0	0	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	4 (0.5)
HA	0.70	24	35	7.2, 4.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.8)
					100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)
					200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	4 (0.5)
MMC	0.05 µg/mL	24	75	NA	100	1	20	20	1	0	0	42	0	36 (36.0)	35 (35.0)	0 (0.0)
					100	0	20	32	2	0	0	54	1	36 (36.0)	36 (36.0)	0 (0.0)
					200	1	40	52	3	0	0	96	1	72 (36.0)	71 * (35.5)	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;

MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Dimethylsulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter®.

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



試験成績書

2015年08月19日

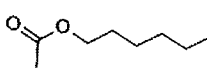
東京化成工業株式会社 品質保証部
〒103-0023
東京都中央区日本橋本町4丁目10-1
TEL: 03(5640)8860 FAX: 03(5640)8861

製品名：Hexyl Acetate					
製品コード：A0032 CAS番号：142-92-7	等級：GR	製品ロット：NWQZH	判定：合格		

項目	結果	規格値
純度(GC)	99.5 %	99.0 %以上
比重 (20/20)	0.8745	0.8720 ~ 0.8760
屈折率 n _{20/D}	1.4091	1.4070 ~ 1.4100

製品ラベルに記載された弊社のロット番号は、半角のアルファベットと数字の組み合わせで4桁又は5桁です。
それ以降は、社内管理用の記号となります。

Appendix 2

新規化学物質の名称 (IUPACの命名法による)	Acetic acid hexyl ester		
別名	酢酸ヘキシル、Hexyl acetate		
C A S 番号	142-92-7		
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	144.21		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.5%(GC)		
試験に供した新規化学物質のロット番号	NWQZH		
不純物の名称及び含有率	情報なし		
蒸気圧	176 Pa/25℃		
対水溶解度	水に不溶		
1-オクタノール／水分配係数			
融点	-80.9℃		
沸点	169℃		
常温における性状	無色透明な液体、果香		
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	14.0 mg/mLで不溶*	
	DMSO	140 mg/mLで溶解*	室温、遮光条件下で保管した0.2 mg/mLおよび140 mg/mLの調製液について、保管後23時間の安定性を確認した。また、発熱、発泡、変色等の無いことを確認した。
	エーテル	易溶**	
	アルコール プロピレン グリコール	易溶**	

*:一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所において確認した。

**:製品安全データシートより

Appendix 3-1

被験物質調製液中の安定性試験

① 試薬

2-プロパノール (HPLC 用、以下 2-PrOH) 和光純薬工業 (ロット番号: ECK0759 および ECK1685)

② 使用機器

電子天秤 (R200D) ザルトリウス

天秤 (CPA324S) ザルトリウス

ガスクロマトグラフ 島津製作所

主要構成: GC-14B (ガスクロマトグラフ)、AOC-20i (オートインジェクタ)、C-R7A plus (データ処理装置)

③ 被験物質調製液の調製 (安定性試験用)

約 140 mg/mL 溶液については、被験物質 2.8 g を精密に量り取り、DMSO (ロット番号: ECK1532、和光純薬工業、分光分析用) を加えて正確に 20 mL とした。

約 0.2 mg/mL 溶液については、被験物質 0.1 g を精密に量り取り、DMSO を加えて正確に 50 mL とし、この溶液 2 mL を正確に採り、DMSO を加えて正確に 20 mL とした。

④ 標準溶液の調製

被験物質約 50 mg を精密に量り取り、2-PrOH に加えて正確に 10 mL とした。この液 1 mL を正確に採り、2-PrOH を加えて正確に 100 mL とし、標準溶液 (約 50 µg/mL) とした。この液 1、1、3 および 5 mL を正確に採り、それぞれ 2-PrOH を加えて正確に 50、20、20 および 10 mL とし、標準溶液 (約 1、2.5、7.5、25 µg/mL) とした。標準溶液は測定日ごとに被験物質を秤量し、n=1 で調製した。

⑤ 試料溶液の調製

約 0.2 mg/mL の被験物質調製液については、被験物質調製液を 1 mL を正確に採り、2-PrOH を加えて正確に 100 mL とし、試料溶液とした (約 2 µg/mL、希釈率 100)。約 140 mg/mL の被験物質調製液については、被験物質調製液 1 mL を正確に採り、2-PrOH を加えて正確に 100 mL とした。この液 1 mL を正確に採り、2-PrOH を加えて正確に 100 mL とし、試料溶液とした (約 14 µg/mL、希釈率 10000)。いずれの試料溶液も被験物質調製液の採取から n=3 で調製した。

⑥ 被験物質の濃度測定

標準溶液および試料溶液をそれぞれ下記の試験条件でガスクロマトグラフィーにより測定を行った。標準溶液は各濃度 3 回ずつ、試料溶液はそれぞれ 1 回ずつ測定し、標準溶液から作成した検量線を用いて、試料溶液中の被験物質濃度を求め、これに希釈率を乗じて調製液中の被験物質濃度を算出した。検量線の作成はデータ処理装置の定量計算機能を用いた。また、調製液の溶媒 (n=1、DMSO、2-PrOH で 100 倍に希釈した) を 1 回測定し、被験物質に相当するピークが無いことを確認した。

⑦ 試験条件

検出器 水素炎イオン化検出器 (FID)

カラム DB-5 (内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm)、J&W Scientific

キャリアガス ヘリウム (100 kPa)

Appendix 3-2

カラム温度	50°C(1 分)、15°C/min、140°C
注入口温度	280°C
検出器温度	300°C
注入量	2 μ L
注入方式	スプリットレス(サンプリング時間 0.5 分)
オートインジェクタ洗浄溶液	2-PrOH
システム適合性	測定開始前に 2-PrOH を 1 回測定し、クロマトグラム上の測定対象物質の保持時間付近に妨害ピークが無いことを確認した。また、測定開始前および測定終了後に標準溶液を 1 回ずつ測定し、測定開始前に対する保持時間およびピーク面積の変動を確認した。変動の許容基準は保持時間の差が ± 0.5 分以内、ピーク面積が ± 5.0 %以内(測定開始前に対する測定終了後の偏差%)を目安とした。

⑧ 数値の取り扱い

- (1) 被験物質調製液の調製濃度は、四捨五入して有効数字 3 桁で表示。
- (2) 標準溶液の濃度は、切り捨てて有効数字 4 桁で表示。
- (3) 試験結果における測定濃度 (mg/mL) およびその平均は四捨五入して有効数字 3 桁で表示。
- (4) 含量(%）、平均含量(%）、残存率(%）、平均残存率(%）およびばらつき(%）は四捨五入して、小数第 1 位まで表示。
- (5) システム適合性における偏差%は四捨五入して、小数第 1 位まで表示する。

Appendix 3-3

安定性試験結果

被験物質：酢酸ヘキシル
ロット番号：NWQZH
溶媒：DMSO

試験番号 :G-15-016

調製年月日 :2015年10月5日
測定年月日 A :2015年10月5日(調製直後)
B :2015年10月6日(保管後23時間)
保管条件 :室温、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)} (%)
0.200	1	0.214	107.0	101.4	7	0.207	103.5	100.0	98.1
	2	0.207	103.5	98.1	8	0.207	103.5	100.0	98.1
	3	0.212	106.0	100.5	9	0.208	104.0	100.5	98.6
	平均	0.211	105.5		平均	0.207	103.7		98.3
140	4	136	97.1	98.6	10	141	100.7	100.7	102.2
	5	137	97.9	99.3	11	141	100.7	100.7	102.2
	6	140	100.0	101.4	12	139	99.3	99.3	100.7
	平均	138	98.3		平均	140	100.2		101.7

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

安定性の判定基準(溶液検体)

各試料採取時点の平均含量がそれぞれ調製濃度の90.0～110.0%、また、各測定濃度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、初回の平均測定濃度に対する保管期間後の測定濃度の比(残存率)の平均値が90.0%以上を示す期間とする

信頼性保証書

表題 酢酸ヘキシルのチャイニーズ・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-15-016

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	2015 年 9 月 30 日	2015 年 9 月 30 日
試験計画書変更書		
G-15-016-No.1	2015 年 10 月 2 日	2015 年 10 月 2 日
G-15-016-No.2	2015 年 10 月 15 日	2015 年 10 月 15 日
G-15-016-No.3	2015 年 11 月 4 日	2015 年 11 月 5 日
G-15-016-No.4	2015 年 11 月 30 日	2015 年 11 月 30 日
G-15-016-No.5	2015 年 12 月 24 日	2015 年 12 月 24 日
G-15-016-No.6	2016 年 1 月 15 日	2016 年 1 月 15 日
G-15-016-No.7	2016 年 1 月 21 日	2016 年 1 月 21 日
被験物質調製液中の安定性試験 (安定性試験開始日)	2015 年 10 月 5 日	2015 年 10 月 5 日
被験物質調製液の調製および細胞処理	2015 年 11 月 9 日	2015 年 11 月 9 日
標本観察	2016 年 1 月 4 日	2016 年 1 月 4 日
報告書草案および生データ	2016 年 1 月 27 日	2016 年 1 月 27 日
最終報告書	2016 年 3 月 4 日	2016 年 3 月 4 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」(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。

2016 年 3 月 4 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 