

## 最終報告書

表題： $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR17142

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者の署名

表題： $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの哺乳類培養細胞を用いる

染色体異常試験

試験番号：SR17142

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者



2018年3月22日

## 陳 述 書

表題： $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR17142

本試験は GLP 基準「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 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知) を遵守して実施した (ただし、被験物質の安定性を除く)。

本試験に用いた試験方法は、試験法ガイドライン「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 日薬食発 0331 第 7 号・平成 23・03・29 製局第 5 号・環保企発第 110331009 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)、「新規化学物質等に係る試験の方法についての一部改正について」(平成 27 年 12 月 21 日薬生発 1221 第 1 号・20151209 製局第 1 号・環保企発第 1512211 号) に準拠した。

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者



2018 年 3 月 22 日

## 信頼性保証書

表題 :  $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : SR17142

本試験は、株式会社化合物安全性研究所 QAU によって、下記のとおり査察された。

| 査察段階           | 査察日          | 試験責任者<br>への報告日 | 運営管理者<br>への報告日 |
|----------------|--------------|----------------|----------------|
| 試験計画書          | 2017年12月 8日  | 2017年12月 11日   | 2017年12月 11日   |
| 被験物質の管理        | 2018年 1月 25日 | 2018年 1月 25日   | 2018年 1月 25日   |
| 被験物質の調製        | 2018年 1月 25日 | 2018年 1月 25日   | 2018年 1月 25日   |
| 被験物質処理         | 2018年 1月 25日 | 2018年 1月 25日   | 2018年 1月 25日   |
| 標本作製           | 2018年 1月 26日 | 2018年 1月 29日   | 2018年 1月 29日   |
| 観察             | 2018年 2月 1日  | 2018年 2月 1日    | 2018年 2月 1日    |
| 生データ           | 2018年 3月 9日  | 2018年 3月 9日    | 2018年 3月 9日    |
| 最終報告書 (草案): 図表 | 2018年 3月 9日  | 2018年 3月 9日    | 2018年 3月 9日    |
| 最終報告書 (草案): 本文 | 2018年 3月 9日  | 2018年 3月 9日    | 2018年 3月 9日    |
| 最終報告書          | 2018年 3月 22日 | 2018年 3月 22日   | 2018年 3月 22日   |

本試験は、「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 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知) に従い実施された。

本試験は、試験計画書に従って実施され、また、本報告書には当該試験に使用した方法および手順が正確に記載されており、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映していることを確認した。

株式会社化合物安全性研究所

QAU 責任者

2018年 3月 22日

| 目次                          | 頁  |
|-----------------------------|----|
| 表紙                          | 1  |
| 試験責任者の署名                    | 2  |
| 陳述書                         | 3  |
| 信頼性保証書                      | 4  |
| 目次                          | 5  |
| 表題                          | 7  |
| 試験番号                        | 7  |
| 試験目的                        | 7  |
| 試験実施基準および試験法ガイドライン          | 7  |
| 試験委託者                       | 7  |
| 試験施設                        | 7  |
| 試験責任者                       | 8  |
| 試験従事者およびその業務分担              | 8  |
| 試験日程                        | 8  |
| 1 要約                        | 9  |
| 2 緒言                        | 10 |
| 3 材料および方法                   | 10 |
| 4 成績                        | 20 |
| 5 考察                        | 21 |
| 6 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 | 21 |
| 7 資料の保存                     | 22 |
| 8 参考資料                      | 22 |

## Tables

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1   | Effects of HBM on growth rate of CHL/IU with or without S9 in preliminary test<br>(cell-growth inhibition test) | 23 |
| 2   | Effects of HBM on growth rate of CHL/IU with or without S9 in main test<br>(chromosomal aberration test)        | 24 |
| 3-1 | Chromosome analysis of CHL/IU treated with HBM for 6 hours without S9   | 25 |
| 3-2 | Chromosome analysis of CHL/IU treated with HBM for 6 hours with S9  | 26 |
| 3-3 | Chromosome analysis of CHL/IU treated with HBM for 24 hours without S9  | 27 |

## Figures

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | Growth rate of CHL/IU treated with HBM for 6 hours without S9.....                             | 28 |
| 2 | Growth rate of CHL/IU treated with HBM for 6 hours with S9.....                                | 29 |
| 3 | Growth rate of CHL/IU treated with HBM for 24 hours without S9 .....                           | 30 |
| 4 | Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with HBM for 6 hours<br>without S9.....  | 31 |
| 5 | Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with HBM for 6 hours<br>with S9.....     | 32 |
| 6 | Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with HBM for 24 hours<br>without S9..... | 33 |

## Annexes

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | 被験物質の安定性分析 (IR 測定) 簡易報告書 (NCAS 17-307NG-20180220-2) .....                     | 34 |
| 2 | Historical control data for chromosomal aberration test in CHL/IU (2018)..... | 35 |

最終頁 35

## 表題

$\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

## 試験番号

SR17142

## 試験目的

チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて、 $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討した。

## 試験実施基準および試験法ガイドライン

試験実施基準 (GLP) : 「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 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局  
長・環境省総合環境政策局長連名通知)

試験法ガイドライン : 「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 日薬食  
発 0331 第 7 号・平成 23・03・29 製局第 5 号・環保企発第 110331009 号 厚  
生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策  
局長連名通知)

「新規化学物質等に係る試験の方法についての一部改正について」(平成  
27 年 12 月 21 日薬生発 1221 第 1 号・20151209 製局第 1 号・環保企発第  
1512211 号)

## 試験委託者

名称 : 厚生労働省 医薬・生活衛生局  
所在地 : 東京都千代田区霞が関 1-2-2 (〒100-8916)

## 試験施設

名称 : 株式会社化合物安全性研究所  
所在地 : 札幌市清田区真栄 363 番 24 (〒004-0839)  
運営管理者 : XXXXXXXXXX

## 試験責任者

氏名



所属

：株式会社化合物安全性研究所 安全性研究部

## 試験従事者およびその業務分担

被験物質の調製

：



試験操作・観察

：

## 試験日程

試験開始日 : 2017 年 12 月 8 日

実験開始日 : 2017 年 12 月 18 日

## 予備試験

被験物質処理開始 : 2017 年 12 月 21 日

細胞増殖率の測定 : 2017 年 12 月 22 日

## 本試験

被験物質処理開始 : 2018 年 1 月 25 日

標本作製 : 2018 年 1 月 26 日

標本観察終了日 : 2018 年 2 月 7 日

実験終了日 : 2018 年 2 月 7 日

試験終了日 : 2018 年 3 月 22 日



## 1 要約

チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて、 $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討した。 $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルは短時間処理法 -S9 処理 (-S9 処理)、短時間処理法 +S9 処理 (+S9 処理) および連続処理法 24 時間処理 (24h 処理) の 3 試験系列で実施した。

予備試験 (細胞増殖抑制試験 : 9.38, 18.8, 37.5, 75, 150, 300, 600 および 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の結果、各試験系列のいずれの用量においても析出ならびに培養液 pH への影響はみられなかった。+S9 処理では 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は、1019  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。-S9 処理および 24h 処理では 50%以上の細胞増殖抑制は認められなかった。

本試験 (染色体異常試験) は、予備試験の結果に基づき、+S9 処理では 200, 400, 600, 800, 1000 および 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  , -S9 処理および 24h 処理では 300, 600 および 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量を設定した。各試験系列のいずれの用量においても析出ならびに培養液 pH への影響はみられなかった。

細胞増殖率の測定結果より、+S9 処理では 800, 1000 および 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  , -S9 処理および 24h 処理では 300, 600 および 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  について標本観察を実施した。その結果、いずれの試験系列においても、被験物質群の染色体の構造異常および数的異常の出現率に有意な増加はみられなかった。

陰性対照群の染色体の構造異常および数的異常の出現率ならびに陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は各々の背景データの管理範囲内であった。また、陽性対照群では、染色体の構造異常の出現率に有意な増加が認められ、本試験が適切な条件下で実施されたことが確認された。

以上のことから、 $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの処理による染色体の構造異常および数的異常の出現率の増加はみられず、 $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルは本試験条件下において哺乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

## 2 緒言

チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて、 $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討した。

## 3 材料および方法

## 3.1 被験物質

名称 :  $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチル

別名 : 2-ヒドロキシイソ酪酸メチル<sup>1),2)</sup>

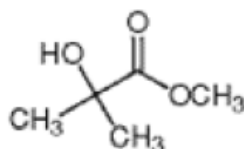
Methyl 2-Hydroxyisobutyrate<sup>1)</sup>

略称<sup>2)</sup> : HBM

CAS 番号 : 2110-78-3

官報公示整理番号(化審法)<sup>1)</sup> : (2)-1404, (2)-1430

構造式<sup>3)</sup> :



化学式<sup>1)</sup> : C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

分子量<sup>3)</sup> : 118.13

物理化学的性質<sup>1)</sup> : 外観 ; 透明液体, 無色 ~ ほとんど無色

沸点/沸騰範囲 ; 137°C

引火点 ; 45°C

比重 ; 1.03

ロット番号 : H3XDK

純度<sup>4)</sup> : 99.9% (GC)

製造業者

試験施設受領日 : 2017 年 6 月 26 日

保存場所および保存期間 : 被験物質保存室 [2017 年 6 月 26 日(試験施設受領) ~ 2018 年 1 月 25 日(本試験の処理日)]

保存条件 : 冷暗所 (実測範囲 5.5 ~ 7.5°C), 密閉

安定性 (非 GLP) : 日曹分析センターから被験物質の安定性分析 (IR 測定) 結果を入手し, 試験実施期間中被験物質が安定であったことを確認した (Annex 1).

被験物質管理責任者

からの移管量 : 10.002 g

使用量 : 0.2402 g

取扱上の注意 : ゴム手袋, マスク, 保護メガネ着用

### 3.2 被験物質の調製

調製方法 : 被験物質をパスツールピペットを用いてメスフラスコに移し入れ、精秤した。媒体を適量加え、溶解した後、さらに媒体を加え定容した。よく混和した後、プラスチック製試験管に移し入れ、最高濃度調製液を調製した。最高濃度調製液をタッチミキサーで混和しながら希釈し、必要な調製液を調製した。

予備試験では被験物質 0.1200 g を 10 mL に定容し、最高濃度調製液 (12 mg/mL) を調製した。最高濃度調製液 (12 mg/mL) を公比 2 で希釈し、6, 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.188 および 0.0938 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では被験物質 0.1202 g を 10 mL に定容し、最高濃度調製液 (12 mg/mL) を調製した。最高濃度調製液 (12 mg/mL) を段階希釈し、10, 8, 6, 4, 3 および 2 mg/mL 調製液を調製した。

調製頻度 : 被験物質調製液は用時に調製し、調製後、予備試験では 35 分以内、本試験では 25 分以内に使用した。

調製液の添加容量 : プレート内の液に対し 10 vol% の割合で添加した。

調製上の注意 : ゴム手袋, マスク, 保護メガネ等を着用して扱い、皮膚との接触を避けた。

残余調製液の処理 : 残余試験液は焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

### 3.3 対照物質およびその調製

#### 3.3.1 陰性対照物質 (媒体)

名称 : 日本薬局方注射用水 (Water)

ロット番号 : K7D73

製造者 : 株式会社大塚製薬工場

使用期限 : 2020 年 4 月

添加容量 : プレート内の液に対し 10 vol% の割合で添加した。

媒体の選択理由 : 試験施設において、日本薬局方注射用水を用いて調製確認を行った。その結果、被験物質は、日本薬局方注射用水 (12 mg/mL) に溶解し、反応性 (発熱, 発泡, 変色等) はみられなかった。このことから、当試験の

媒体として適用ガイドラインで推奨されている日本薬局方注射用水を使用した。

### 3.3.2 陽性対照物質

#### 3.3.2.1 短時間処理法 -S9 処理 (-S9 処理) および連続処理法 24 時間処理 (24h 処理)

|          |   |
|----------|---|
| 名称       | : マイトマイシン C (MMC)   |
| ロット番号    | : 577AEE  |
| 含量       | : 102.6%  |
| 使用期限     | : 2019 年 5 月  |
| 製造者      | : 協和発酵キリン株式会社   |
| 調製方法     | : MMC 2 mg の入ったバイアル瓶に日本薬局方注射用水 (ロット番号 ; K6C71, 株式会社大塚製薬工場) 5 mL を加え溶解した後, 日本薬局方生理食塩液 (ロット番号 ; K7A87, 株式会社大塚製薬工場) を用いて希釈し 5 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製した (調製日 : 2017 年 6 月 7 日). 調製の際には 1 mg (力価) を 1 mg として換算した. |
| 保存条件     | : 0.3 mL ずつ分注し, $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存した.  |
| 調製液の使用期限 | : 2018 年 6 月 6 日 (調製後 1 年)  |
| 調製液の添加容量 | : プレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した.   |

#### 3.3.2.2 短時間処理法 +S9 処理 (+S9 処理)

|          |  |
|----------|--|
| 名称       | : 3,4-ベンゾピレン (BP)  |
| ロット番号    | : NPEZF  |
| 純度       | : 97.4%  |
| 使用期限     | : 2021 年 7 月 25 日 (購入後 5 年)  |
| 製造者      | : 東京化成工業株式会社   |
| 調製方法     | : BP 21.7 mg をジメチルスルホキシド (ロット番号 ; DSJ0526, 和光純薬工業株式会社) 2.2 mL に溶解し, これをさらにジメチルスルホキシドを用いて 10 倍希釈し, 1 mg/mL の濃度に調製した (調製日 : 2017 年 6 月 7 日). 調製に際して含量の補正は行わなかった. |
| 保存条件     | : 0.3 mL ずつ分注し, $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存した.   |
| 調製液の使用期限 | : 2018 年 6 月 6 日 (調製後 1 年)   |
| 調製液の添加容量 | : プレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した.  |

### 3.4 細胞

|          |                                      |
|----------|--------------------------------------|
| 細胞名      | : CHL/TU                             |
| 種 (由来組織) | : チャイニーズハムスター (新生チャイニーズハムスター (雌) の肺) |

|            |   |
|------------|---|
| 細胞の選択理由    | : 増殖速度, 継代における染色体の安定性, 染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮し選択した.  |
| 入手先        | : DS ファーマバイオメディカル株式会社   |
| 入手年月日      | : 2016年8月2日   |
| 入手時継代数     | : 14  |
| 凍結条件       | : 10 vol% ジメチルスルホキシドを含む培地を用いて $1 \times 10^6$ cells/mL 細胞浮遊液を調製し, 1 mL ずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結させた後, 液体窒素内で保存した.  |
| 培養条件       | : 75 cm <sup>2</sup> 培養フラスコを用いて, 5.0%CO <sub>2</sub> , 37.0 °C に設定した CO <sub>2</sub> インキュベーター [MCO-18AIC (UV); パナソニック ヘルスケア株式会社] 内で培養し, 3日あるいは4日毎に継代を行った. |
| マイコプラズマ    | : 供試細胞と同時に凍結保存した細胞を用いて蛍光染色法によりマイコプラズマチェックを行なわれ, 陰性であることを確認されている.  |
| 染色体数 (モード) | : 25  |
| 倍加時間       | : 13.6 時間 (供試細胞と同時に保存した細胞での測定結果)  |
| 供試細胞の継代数   | : 30 以下 (予備試験: 22, 本試験: 21)   |

### 3.5 培地

|      |   |
|------|---|
| 培地   | : イーグル MEM 培地 (Code 05900, ロット番号; 739703, 739707, 739709, 日水製薬株式会社)   |
| 血清   | : 牛胎児血清 (ロット番号; 1860672, GIBCO) を, 56°Cで30分間非働化した後, 使用した.   |
| 調製方法 | : イーグルMEM培地7.52 gに, 日本薬局方注射用水 (ロット番号; 7A93, 7F96, 株式会社大塚製薬工場) 800 mLを加え溶解させた. オートクレーブ滅菌後, 室温まで冷却し, 滅菌済みの7.5%炭酸水素ナトリウム溶液 (ロット番号; 606H1849, 関東化学株式会社) 26.9 mLを添加した. 使用前に, ろ過除菌したL-グルタミン溶液 (ロット番号; LKK2032, 和光純薬工業株式会社) 0.292 g/Lおよび牛胎児血清を10%となるように添加した. |

### 3.6 S9 mix

|       |                     |
|-------|---------------------|
| 製造者   | : キッコーマンバイオケミファ株式会社 |
| ロット番号 | : CAM201710A        |
| 製造年月日 | : 2017年10月6日        |

製造方法 : フェノバルビタール (1 日目 30 mg/kg を 1 回腹腔内投与, 2 日目以降 60 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与) および 5,6-ベンゾフラボン (フェノバルビタール投与 3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与) で酵素誘導を行った Slc : SD ラット (雄, 7 週齢, 体重 ; 184 ~ 227 g) の肝ホモジネートから調製した S9 (ロット番号 ; RAA201710A, S9 中蛋白含量 21.28 mg/mL, 細胞処理時の最終蛋白含量 : 1.06 mg/mL) 1.05 mL に, コファクターミックス 2.45 mL を加え調製されている. S9 mix 1 mL 中のコファクターの成分濃度を次表に示す.

| S9 mix 1 mL 中のコファクターの成分濃度 |                            |         |
|---------------------------|----------------------------|---------|
| MgCl <sub>2</sub>         | (和光純薬工業株式会社 SAL6750)       | 5 μmol  |
| KCl                       | (和光純薬工業株式会社 LKQ2606)       | 33 μmol |
| G-6-P                     | (オリエンタル酵母工業株式会社 118503)    | 5 μmol  |
| NADP                      | (オリエンタル酵母工業株式会社 045407)    | 4 μmol  |
| HEPES 緩衝液                 | (pH7.2, 株式会社同仁化学研究所 JR060) | 4 μmol  |

保存条件 : -80°C で凍結保存

使用期限 : 製造後 6 カ月 (製造より 4 カ月以内に使用した)

### 3.7 試験方法

#### 3.7.1 予備試験 (細胞増殖抑制試験)

##### 3.7.1.1 試験系列

-S9 処理, +S9 処理および 24h 処理の 3 試験系列について実施した.

##### 3.7.1.2 試験群

最高用量を試験法ガイドラインの規定 (10 mM 又は 2 mg/mL の低い濃度) に従い 1200 μg/mL (約 10 mM に相当) とし, 以下公比 2 で低下させた計 8 用量 (1200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.8 および 9.38 μg/mL) の試験群を設定した. 更に, 試験系列ごとに陰性対照群を設定した.

処理開始前プレート (Pretreatment Plate ; PP) および各群に 2 枚のプレートを使用し, プレートには識別番号を明記した.

##### 3.7.1.3 細胞の播種

直径 60 mm のプレートに,  $0.4 \times 10^4$  cells/mL の濃度の細胞浮遊液を 5 mL ずつ播種し, 5.0% CO<sub>2</sub>, 37.0°C に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター [MCO-175 ; パナソニック ヘルスケア株式会社] 内で培養した.

## 3.7.1.4 試験液の処理

試験液の処理は下記方法で実施し、陰性対照物質についても同様に処理を行った。

## a -S9 処理

細胞播種後 3 日目にプレートの培養液を除去し、新鮮培地 2.7 mL、試験液 0.3 mL を加え 6 時間培養した。6 時間経過後にプレートの液を除去して PBS (-) 3 mL で 3 回細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて 18 時間培養した。

## b +S9 処理

細胞播種後 3 日目にプレートの培養液を除去し、新鮮培地 2.2 mL と S9 mix 0.5 mL (S9 の最終濃度約 5 vol%)、試験液 0.3 mL を加え 6 時間培養した。6 時間経過後にプレートの液を除去して PBS (-) 3 mL で 3 回細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて 18 時間培養した。

## c 24h 処理

細胞播種後 3 日目にプレートの培養液を除去し、新鮮培地 4.5 mL、試験液 0.5 mL を加え、24 時間培養した。

## 3.7.1.5 試験液による析出の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、試験液による析出の有無を目視確認した。

## 3.7.1.6 試験液による培養液 pH への影響の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、pH の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化が認められない場合には、試験液処理による培養液 pH への影響は無いものと判断した。

3.7.1.7 細胞増殖率 (RICC) の算出および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) の算出

PP および処理終了後のプレート毎に以下の処理を行った。プレートの液を除去して PBS (-) 3.0 mL で細胞を洗い、0.02% EDTA-0.25% トリプシン 0.5 mL を加えて細胞を剥離し、新たに培地 5.0 mL を加えてピペティングし細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液の一部を採取し、血球計算盤を用いて細胞数を計数した。

各プレートの細胞数より、次式により Relative increase in cell counts (RICC) を算出し、試験群毎にその平均値を算出した。なお、RICC が負の値となった場合は 0 とすることとしたが、当該事例は生じなかった。

$$\text{RICC} = \frac{\text{処理プレートの細胞増加数 (処理終了時の細胞数 - PP の細胞数*)}}{\text{対照プレートの細胞増加数 (処理終了時の細胞数 - PP の細胞数*)}} \times 100$$

\* ; PP 2 枚の平均値を用いた。

RICC が 50% 以下まで低下した試験系列については、50%細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。IC<sub>50</sub> は、RICC が 50% となる点を挟む 2 用量の結果を用いて算出した。

### 3.7.2 本試験 (染色体異常試験)

#### 3.7.2.1 試験系列

-S9 処理, +S9 処理および 24h 処理の 3 試験系列について実施した.

#### 3.7.2.2 試験群

##### a 被験物質

予備試験の結果, +S9 処理の IC<sub>50</sub> は, 1019 µg/mL, -S9 処理および 24h 処理では 50% 以上の細胞増殖抑制は認められなかった. この結果に基づき, 染色体異常試験の用量は全ての試験系列において 1200 µg/mL を最高用量とし, 以下の用量を設定した.

-S9 処理 : 300, 600 および 1200 µg/mL

+S9 処理 : 200, 400, 600, 800, 1000 および 1200 µg/mL

24h 処理 : 300, 600 および 1200 µg/mL

##### b 対照物質

各試験系列について, 陰性対照群ならびに次表の陽性対照群を設定した.

| 試験系列   | 陽性対照物質 | 用量 (µg/mL) |
|--------|--------|------------|
| -S9 処理 | MMC    | 0.1        |
| +S9 処理 | BP     | 10         |
| 24h 処理 | MMC    | 0.05       |

##### c プレート数

PP および各群に 2 枚のプレートを使用した. プレートには識別番号を明記した.

#### 3.7.2.3 細胞の播種

##### 3.7.1.3 細胞の播種に準じた.

#### 3.7.2.4 試験液の処理

##### a -S9 処理

3.7.1.4 の a -S9 処理に準じた. 陽性対照物質は, 細胞播種後 3 日目にプレートの培養液を除去し, 新鮮培地 3.0 mL および陽性対照物質調製液 30 µL を加え 6 時間培養した. 6 時間経過後にプレートの液を除去して PBS (-) で 3 回細胞を洗い, 新鮮な培地 5 mL を加えて 18 時間培養した.

##### b +S9 処理

3.7.1.4 の b +S9 処理に準じた. 陽性対照物質は, 細胞播種後 3 日目にプレートの培養液を除去し, 新鮮培地 2.5 mL, S9 mix 0.5 mL (S9 の最終濃度約 5 vol%) および陽性対照物質調製液 30 µL を加え 6 時間培養した. 6 時間経過後にプレートの液を除去して PBS (-) で 3 回細胞を洗い, 新鮮な培地 5 mL を加えて 18 時間培養した.



## c 24h 処理

3.7.1.4 の c 24h 処理に準じた。陽性対照物質は、細胞播種後 3 日目にプレートの培養液を除去し、新鮮培地 5.0 mL および陽性対照物質調製液 50  $\mu$ L を加え、24 時間培養した。

## 3.7.2.5 試験液による析出の有無の確認

3.7.1.5 試験液による析出の有無の確認に準じた。

## 3.7.2.6 試験液による培養液 pH への影響の有無の確認

3.7.1.6 試験液による培養液 pH への影響の有無の確認に準じた。

## 3.7.2.7 細胞増殖率 (RICC) の算出

3.7.2.8 で得られた細胞浮遊液を使用し、その測定方法は 3.7.1.7 細胞増殖率 (RICC) の算出および 50%細胞増殖抑制濃度 ( $IC_{50}$ ) の算出に準じた。 $IC_{50}$  の算出は行わなかった。

## 3.7.2.8 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前に、プレートに最終濃度 0.2  $\mu$ g/mL のコルセミド (ロット番号; 1861402, GIBCO) を加えた。培養終了時間に、プレートの液を遠沈管に回収した。プレートを 0.02 % EDTA-0.25 % トリプシン (0.5M EDTA : ロット番号; 1852916, GIBCO, 2.5% トリプシン : ロット番号; 1861534, GIBCO) で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を上記の遠沈管に回収し、細胞浮遊液の一部を細胞計数用に採取した。細胞浮遊液を約 1000 rpm で約 5 分間遠心した。上清を除去し、0.075 mol/L 塩化カリウム (ロット番号; 811H1490, 関東化学株式会社) を加え、穏やかにピペティングし 37°C で 15 分間細胞を膨満化 (低張処理) させた。氷冷したカルノア固定液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1, メタノール : ロット番号; 910B1074, 関東化学株式会社, 酢酸 : ロット番号; TWN2665, 和光純薬工業株式会社) を加えて細胞を固定した後、約 1000 rpm で約 5 分間遠心して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。この固定操作を 3 回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、乾燥させた。各プレートより 2 枚の染色体標本を作製した。スライドは、3% ギムザ液 [ギムザ液 : ロット番号; TP732, 和光純薬工業株式会社, インスタントリン酸緩衝液 (pH6.8) : ロット番号; M616, 株式会社 LSI メディエンス] で 20 分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤 (マリノール, ロット番号; 1700201, 武藤化学薬品株式会社) で封入した。

## 3.7.2.9 観察用量の選択

観察用量は、-S9 処理および 24h 処理では設定した全ての用量、+S9 処理では 3.7.2.7 の細胞増殖率 (RICC) の算出において細胞増殖率が陰性対照群の 40~50% の間を最高用量とする用量を最高用量にそれぞれ下記用量を選択した。

-S9 処理 : 300, 600 および 1200  $\mu$ g/mL

+S9 処理 : 800, 1000 および 1200  $\mu$ g/mL

24h 処理 : 300, 600 および 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$

### 3.7.2.10 標本の確認

3.7.2.9 で選択した用量の標本ならびに対照群の標本について実施した。

作製した 1 枚の標本あたり約 75 個以上の分裂中期細胞が得られることを確認した。

### 3.7.2.11 染色体標本のコード化

選択した観察用量の標本について、1 プレートにつき 1 枚の標本を選択しコード化した。

### 3.7.2.12 染色体標本の観察<sup>5)</sup>

総合倍率 1000 倍の顕微鏡 (BX53F ; オリンパス株式会社) で、1 枚あたり 150 個 (用量あたり 300 個) の分裂中期像を選択して観察した。

以下の分類に従って染色体異常の判定を行った。なお、構造異常については  $25\pm 2$  の染色体をもつものを観察対象とした。

#### a 構造異常 (structural aberration)

- ・ 染色分体切断 (ctb : chromatid break)

染色分体のはっきりした不連続部分 (切断部分) で、不連続部分が染色分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色分体の長軸線上から外れている場合。

- ・ 染色分体交換 (cte : chromatid exchange)

染色分体の 2 ヶ所以上の切断部位が相互に交換 (結合反応) しているもの。

- ・ 染色体切断 (csb : chromosome break)

両方の染色分体の同じ位置に切断が生じている場合、切断の判定基準は、染色分体切断に準じる。

- ・ 染色体交換 (cse : chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合。

- ・ その他 (others)

その他の構造異常として、断片化 (fragmentation) がある。一つの分裂中期細胞のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化とする。

#### b ギャップ (gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分 (染色性が全くみられない部分) で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合。

#### c 数的異常 (numerical aberration)

- ・ 倍数体 (poly : polyploid)

染色体数 ( $25\pm 2$ ) が倍加し、染色体数が 36 以上 (三倍体、四倍体等) となったもの。

- ・その他 (others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加 (end : endoreduplication) と判定し、倍数体とは区別する。

### 3.7.2.13 観察結果の集計方法

プレートおよび用量毎に、構造異常および数的異常それぞれについて、分類毎の異常細胞数ならびに総異常細胞数 (total) を求めた。また、各用量の総異常細胞の出現率を求めた。出現率 (%) は観察した細胞数 (分裂中期像の数) に対する出現数の百分率で算出した。なお、構造異常は1個の細胞に複数の構造異常がある場合にも構造異常を有する細胞数は1として計数し、ギャップは構造異常には含めなかった。

#### a 構造異常について

- ・ctb : 染色分体切断をもつ細胞数
- ・cte : 染色分体交換をもつ細胞数
- ・csb : 染色体切断をもつ細胞数
- ・cse : 染色体交換をもつ細胞数
- ・others : その他の構造異常をもつ細胞数
- ・total : 何らかの構造異常をもつ細胞数

#### b ギャップについて

- ・gap : ギャップをもつ細胞数

#### c 数的異常について

- ・poly : 倍数体の細胞数
- ・others : その他の数的異常をもつ細胞数
- ・total : 何らかの数的異常をもつ細胞数

### 3.7.2.14 観察結果の採用基準

観察可能な分裂中期細胞数がプレートあたり150個 (用量あたり300個) の標本のデータを採用データとした。

### 3.7.2.15 試験の成立条件

以下の基準を満たした場合を、試験結果が正しく評価出来る条件とした。試験の結果、全ての試験系列でその条件を満たした。

- 陰性対照群および陽性対照群ならびに3用量以上の被験物質群について、観察結果の採用基準を満たしている。
- 各試験系列の陰性対照群の染色体の構造異常および数的異常の出現率が背景データに基づく管理範囲 (平均値  $\pm$  3SD ; 平均値 + 3SD < 1% の場合の上限 : 1%) 内である。

- c 各試験系列の陽性対照群の染色体の構造異常の出現率が背景データに基づく管理範囲 (平均値 ± 3SD) 内であり、陰性対照群と比較して有意な増加がみられる。かつ、RICC が 40%以上である。

#### 3.7.2.16 試験結果の評価

##### a 統計処理

染色体の構造異常または数的異常の出現率 (%) について、EXSUS (Version 8.1, CAC Croit Corporation) および SAS (Version 9.3, SAS Institute Japan Ltd.) を用いて統計処理を行った。

陰性対照群と被験物質群および陽性対照群の比較には Fisher の正確検定を用いた (有意水準は両側 5% とし、1% と 5% を区別して示した)。Fisher の正確検定で陰性対照群と被験物質群に有意差が認められた場合は、Cochran-Armitage 検定により用量依存性を確認することとしたが、当該事例は生じなかった (有意水準 5% とし、1% と 5% を区別して示すこととした)。

##### b 結果の判定

被験物質群における染色体異常の出現率が陰性対照群と比較して有意に増加し、かつ陰性対照群の背景データに基づく管理範囲 (3.7.2.15 b) の上限を超えており、また、その増加に用量依存性がみられる場合を陽性とした。被験物質群において染色体異常の出現率に有意な増加がみられない場合、陰性と判定した。

#### 3.7.2.17 再試験

以下のいずれかの場合、その試験系列について確認試験を実施することとしたが、該当事例は生じなかった。

- a 陰性あるいは陽性の判定基準 (3.7.2.16) に合致せず、結果判定ができない場合。ただし、他の試験系列等において陽性判定される場合には実施しない。
- b 試験結果より再確認が必要と判断された場合。

## 4 成績

### 4.1 予備試験

細胞増殖率の結果を Table 1 および Figure 1 ~ 3 に示す。

各試験系列のいずれの用量においても析出ならびに培養液 pH への影響はみられなかった。+S9 処理では 1200 µg/mL の用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) は、1019 µg/mL であった。-S9 処理および 24h 処理では 50%以上の細胞増殖抑制は認められなかった。

### 4.2 本試験

染色体異常試験の結果を Table 2, Table 3-1 ~ 3-3 および Figure 1 ~ 6 に示す。

各試験系列のいずれの用量においても析出ならびに培養液 pH への影響はみられなかった。

細胞増殖率 (RICC) の測定結果より, +S9 処理では 800, 1000 および 1200  $\mu\text{g/mL}$ , -S9 処理および 24h 処理では 300, 600 および 1200  $\mu\text{g/mL}$  を選択し, 選択標本ならびに対照群の標本について標本の確認を実施した。その結果, いずれの試験系列のいずれの用量においても 75 個以上の分裂中期細胞が認められたため, 引き続き標本観察を実施した。標本観察の結果, いずれの試験系列においても, 被験物質群の染色体の構造異常および数的異常の出現率は陰性対照群との比較で統計学的に有意な増加はみられなかった。

各試験系列の陰性対照群の染色体の構造異常および数的異常の出現率は, 背景データに基づく管理範囲 (Annex 2) 内であった。各試験系列の陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は, 背景データに基づく管理範囲 (Annex 2) 内であり, 陰性対照群と比較し統計学的に有意な増加が認められた。また, 全ての試験系列において陽性対照群の細胞増殖率 (RICC) は 40%以上であった。

## 5 考察

チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて,  $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討した。

本試験の結果, いずれの試験系列においても, 被験物質の処理による染色体の構造異常および数的異常の出現率に有意な増加はみられず, 結果は陰性と判定した。

各試験系列の陰性対照群および陽性対照群の染色体の構造異常および数的異常の出現率は, 試験施設の背景データの管理範囲内であり, 陽性対照群では陰性対照群と比較して有意な増加がみられたことから本試験が適切な条件下で実施されたことが確認された。

以上のことから,  $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルの処理により染色体の構造異常および数的異常の出現率の増加はみられず,  $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチルは本試験条件において哺乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

## 6 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

## 7 資料の保存

### 7.1 資料の種類

以下の資料を，株式会社化合物安全性研究所の資料保存室に保存する．

1. 試験計画書
2. 生データその他の記録文書
3. 最終報告書
4. 染色体標本

### 7.2 保存期間

試験終了後 10 年間保存し，その後の保存については試験委託者との協議により決定する．

## 8 参考資料

- 1) 安全データシート Methyl 2-Hydroxyisobutyrate. 東京化成工業株式会社
- 2) 製品データ 2-ヒドロキシイソ酪酸メチル. 日本化学工業協会
- 3) 東京化成工業株式会社ホームページ. オンラインカタログ  
Methyl 2-Hydroxyisobutyrate.
- 4) 試験成績書 Methyl 2-Hydroxyisobutyrate. 東京化成工業株式会社
- 5) 化学物質による染色体異常アトラス；日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編，  
1988 年，朝倉書店

Table 1 Effects of HBM on growth rate of CHL/IU with or without S9 in preliminary test (cell-growth inhibition test)

| Group                | Concentration<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | RICC (%)                      |                               |                               |
|----------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                      |                                       | S9-                           | S9+                           | S9-                           |
|                      |                                       | 6-18 h <sup>b</sup><br>(Mean) | 6-18 h <sup>b</sup><br>(Mean) | 24-0 h <sup>b</sup><br>(Mean) |
| Control <sup>a</sup> | —                                     | 106.8 , 93.2<br>(100.0)       | 107.8 , 92.2<br>(100.0)       | 105.8 , 94.2<br>(100.0)       |
|                      | 9.38                                  | 101.4 , 104.0<br>(102.7)      | 112.2 , 95.3<br>(103.8)       | 105.1 , 95.4<br>(100.3)       |
|                      | 18.8                                  | 105.8 , 91.4<br>( 98.6)       | 99.8 , 94.4<br>( 97.1)        | 93.0 , 102.2<br>( 97.6)       |
|                      | 37.5                                  | 89.6 , 88.8<br>( 89.2)        | 116.7 , 83.3<br>(100.0)       | 100.2 , 87.7<br>( 94.0)       |
| HBM                  | 75                                    | 97.8 , 95.0<br>( 96.4)        | 95.3 , 88.6<br>( 92.0)        | 84.5 , 85.7<br>( 85.1)        |
|                      | 150                                   | 100.4 , 88.8<br>( 94.6)       | 104.2 , 93.1<br>( 98.7)       | 82.8 , 90.6<br>( 86.7)        |
|                      | 300                                   | 89.6 , 86.0<br>( 87.8)        | 86.4 , 85.5<br>( 86.0)        | 79.7 , 82.8<br>( 81.3)        |
|                      | 600                                   | 88.8 , 95.0<br>( 91.9)        | 85.5 , 77.5<br>( 81.5)        | 88.1 , 85.7<br>( 86.9)        |
|                      | 1200                                  | 94.2 , 85.3<br>( 89.8)        | 41.0 , 39.6<br>( 40.3)        | 77.2 , 92.5<br>( 84.9)        |
|                      | IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) | -                             | 1019                          | -                             |

RICC : Relative increase in cell counts

a : Water

b : Treatment time - recovery time

Precipitation was not observed.

Change of pH in culture medium was not observed.

Table 2 Effects of HBM on growth rate of CHL/IU with or without S9 in main test  
(chromosomal aberration test)

| Group                | RICC (%)                              |                               |                                       |                               |                                       |                               |
|----------------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
|                      | S9-                                   |                               | S9+                                   |                               | S9-                                   |                               |
|                      | Concentration<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 6-18 h <sup>b</sup><br>(Mean) | Concentration<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 6-18 h <sup>b</sup><br>(Mean) | Concentration<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 24-0 h <sup>b</sup><br>(Mean) |
| Control <sup>a</sup> | —                                     | 97.3 , 102.7<br>(100.0)       | —                                     | 98.4 , 101.6<br>(100.0)       | —                                     | 98.6 , 101.4<br>(100.0)       |
| HBM                  | 300                                   | 91.8 , 78.3<br>( 85.1)        | 200                                   | 82.4 , 90.7<br>( 86.6)        | 300                                   | 103.5 , 89.2<br>( 96.4)       |
|                      | 600                                   | 90.8 , 90.8<br>( 90.8)        | 400                                   | 90.7 , 79.2<br>( 85.0)        | 600                                   | 95.3 , 86.4<br>( 90.9)        |
|                      | 1200                                  | 102.7 , 88.0<br>( 95.4)       | 600                                   | 74.8 , 85.6<br>( 80.2)        | 1200                                  | 99.4 , 106.7<br>(103.1)       |
|                      |                                       |                               | 800                                   | 79.2 , 72.8<br>( 76.0)        |                                       |                               |
|                      |                                       |                               | 1000                                  | 58.8 , 78.0<br>( 68.4)        |                                       |                               |
|                      |                                       |                               | 1200                                  | 62.0 , 34.5<br>( 48.3)        |                                       |                               |
| Mitomycin C          | 0.1                                   | 58.2 , 52.7<br>( 55.5)        | —                                     |                               | 0.05                                  | 52.5 , 50.5<br>( 51.5)        |
| 3,4-Benzopyrene      | —                                     |                               | 10                                    | 44.1 , 47.3<br>( 45.7)        | —                                     |                               |

RICC : Relative increase in cell counts

a : Water

b : Treatment time - recovery time

Precipitation was not observed.

Change of pH in culture medium was not observed.



Table 3-1 Chromosome analysis of CHL/U treated with HBM for 6 hours without S9

| Time schedule <sup>a</sup><br>(hours) | S9                   | Group | Concentration<br>(µg/mL) | RICC<br>(%)   | Structural aberrations             |     |     |     |     |               | Numerical aberrations |     |                                    |      |            |            |   |
|---------------------------------------|----------------------|-------|--------------------------|---|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|---------------|-----------------------|-----|------------------------------------|------|------------|------------|---|
|                                       |                      |       |                          |   | Number of<br>metaphase<br>observed | ctb | cte | csb | cse | others        | total (%)             | Gap | Number of<br>metaphase<br>observed | poly | others     | total (%)  |   |
| 6-18                                  | Control <sup>b</sup> |       | —                        | 100.0   | 150                                | 2   | 0   | 0   | 0   | 0             | 0                     | 2   | 0                                  | 150  | 0          | 0          | 0 |
|                                       |                      |       |                          |   | 150                                | 1   | 0   | 1   | 0   | 0             | 2                     | 0   | 150                                | 1    | 0          | 1          |   |
|                                       |                      |       |                          |   | 300                                | 3   | 0   | 1   | 0   | 0             | 4 (1.3)               | 0   | 300                                | 1    | 0          | 1 (0.3)    |   |
|                                       |                      |       |                          |   | 150                                | 1   | 1   | 0   | 0   | 0             | 2                     | 0   | 150                                | 0    | 0          | 0          |   |
|                                       |                      |       |                          |   | 150                                | 1   | 0   | 0   | 0   | 0             | 1                     | 0   | 150                                | 1    | 0          | 1          |   |
|                                       |                      |       |                          |   | 300                                | 2   | 1   | 0   | 0   | 0             | 3 (1.0) NS            | 0   | 300                                | 1    | 0          | 1 (0.3) NS |   |
|                                       | HBM                  |       | 600                      | 90.8  | 150                                | 2   | 0   | 0   | 0   | 0             | 0                     | 2   | 0                                  | 150  | 1          | 0          | 1 |
|                                       |                      |       |                          |   | 150                                | 1   | 0   | 0   | 0   | 0             | 1                     | 0   | 150                                | 0    | 0          | 0          |   |
|                                       |                      |       |                          |   | 300                                | 3   | 0   | 0   | 0   | 0             | 3 (1.0) NS            | 0   | 300                                | 1    | 0          | 1 (0.3) NS |   |
|                                       |                      |       |                          |   | 150                                | 1   | 1   | 0   | 0   | 0             | 2                     | 0   | 150                                | 1    | 0          | 1          |   |
|                                       |                      |       |                          |   | 150                                | 0   | 0   | 0   | 0   | 0             | 0                     | 0   | 150                                | 1    | 0          | 1          |   |
|                                       |                      |       |                          |   | 300                                | 1   | 1   | 0   | 0   | 0             | 2 (0.7) NS            | 0   | 300                                | 2    | 0          | 2 (0.7) NS |   |
| Mitomycin C                           |                      | 0.1   | 55.5                     | 150   | 27                                 | 55  | 2   | 0   | 0   | 0             | 76                    | 0   | 150                                | 1    | 0          | 1          |   |
|                                       |                      |       |                          | 150   | 35                                 | 50  | 0   | 0   | 0   | 75            | 0                     | 150 | 1                                  | 0    | 1          |            |   |
|                                       |                      |       |                          | 300   | 62                                 | 105 | 2   | 0   | 0   | 151 (50.3) ** | 0                     | 300 | 2                                  | 0    | 2 (0.7) NS |            |   |
|                                       |                      |       |                          | ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid |                                    |     |     |     |     |               |                       |     |                                    |      |            |            |   |
|                                       |                      |       |                          | a : Time schedule ; treatment time-recovery time  |                                    |     |     |     |     |               |                       |     |                                    |      |            |            |   |
|                                       |                      |       |                          | b : Water   |                                    |     |     |     |     |               |                       |     |                                    |      |            |            |   |

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Water

RICC : Relative increase in cell counts

Precipitation was not observed

NS : No significant difference (Fisher's exact test)

\*\*\* : Statistically significantly different from the negative control,  $p < 0.01$  (Fisher's exact test)

Table 3-2 Chromosome analysis of CHL/1U treated with HBM for 6 hours with S9

| Time schedule <sup>a</sup><br>(hours) | S9   | Group                | Concentration<br>(µg/mL) | RICC<br>(%) | Structural aberrations             |     |     |             |     |        | Gap          | Numerical aberrations |                                    |      |        |             |          |   |   |
|---------------------------------------|------|----------------------|--------------------------|-------------|------------------------------------|-----|-----|-------------|-----|--------|--------------|-----------------------|------------------------------------|------|--------|-------------|----------|---|---|
|                                       |      |                      |                          |             | Number of<br>metaphase<br>observed | ctb | cte | csb         | cse | others |              | total (%)             | Number of<br>metaphase<br>observed | poly | others | total (%)   |          |   |   |
|                                       |      | Control <sup>b</sup> | —                        | 100.0       | 150                                | 2   | 0   | 0           | 0   | 0      | 0            | 2                     | 0                                  | 150  | 0      | 0           | 0        |   |   |
|                                       |      |                      | 200                      | 86.6        | 150                                | 2   | 0   | 0           | 0   | 0      | 0            | 2                     | 0                                  | 150  | 0      | 0           | 0        |   |   |
|                                       |      |                      | 400                      | 85.0        | 300                                | 4   | 0   | 0           | 0   | 0      | 0            | 4 ( 1.3)              | 0                                  | 300  | 0      | 0           | 0 ( 0.0) |   |   |
|                                       |      |                      | 600                      | 80.2        | ND                                 |     |     |             |     |        |              |                       |                                    |      |        |             |          |   |   |
|                                       |      |                      | 800                      | 76.0        | ND                                 |     |     |             |     |        |              |                       |                                    |      |        |             |          |   |   |
|                                       |      |                      | 1000                     | 68.4        | ND                                 |     |     |             |     |        |              |                       |                                    |      |        |             |          |   |   |
| 6-18                                  | +    | HBM                  | 800                      | 76.0        | 150                                | 1   | 0   | 0           | 0   | 0      | 0            | 1                     | 0                                  | 150  | 1      | 0           | 1        |   |   |
|                                       |      |                      |                          |             | 150                                | 1   | 0   | 0           | 0   | 0      | 1            | 0                     | 150                                | 0    | 0      | 0           |          |   |   |
|                                       |      |                      |                          |             | 300                                | 2   | 0   | 0           | 0   | 0      | 2 ( 0.7) NS  | 0                     | 300                                | 1    | 0      | 1 ( 0.3) NS |          |   |   |
|                                       |      |                      | 1200                     | 48.3        | 150                                | 0   | 1   | 0           | 0   | 0      | 0            | 0                     | 0                                  | 1    | 0      | 150         | 0        | 0 | 0 |
|                                       |      |                      |                          |             | 150                                | 2   | 0   | 0           | 0   | 0      | 2            | 0                     | 150                                | 0    | 0      | 0           |          |   |   |
|                                       |      |                      |                          |             | 300                                | 2   | 1   | 0           | 0   | 0      | 3 ( 1.0) NS  | 0                     | 300                                | 0    | 0      | 0 ( 0.0) NS |          |   |   |
| 3,4-Benzopyrene                       | 45.7 | 150                  | 1                        | 1           | 0                                  | 0   | 0   | 0           | 0   | 0      | 2            | 0                     | 150                                | 1    | 0      | 1           |          |   |   |
|                                       |      | 150                  | 1                        | 0           | 0                                  | 0   | 0   | 1           | 0   | 150    | 1            | 0                     | 1                                  |      |        |             |          |   |   |
|                                       |      | 300                  | 2                        | 1           | 0                                  | 0   | 0   | 3 ( 1.0) NS | 0   | 300    | 2            | 0                     | 2 ( 0.7) NS                        |      |        |             |          |   |   |
|                                       |      |                      | 10                       | 45.7        | 150                                | 37  | 56  | 1           | 0   | 0      | 75           | 0                     | 150                                | 0    | 0      | 0           |          |   |   |
|                                       |      |                      | 10                       | 45.7        | 150                                | 36  | 50  | 1           | 1   | 0      | 75           | 0                     | 150                                | 0    | 0      | 0           |          |   |   |
|                                       |      |                      | 10                       | 45.7        | 300                                | 73  | 106 | 2           | 1   | 0      | 150 (50.0)** | 0                     | 300                                | 0    | 0      | 0 ( 0.0) NS |          |   |   |

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Water

RICC : Relative increase in cell counts

Precipitation was not observed

ND : Not determined

NS : No significant difference (Fisher's exact test)

\*\* : Statistically significantly different from the negative control, p &lt; 0.01 (Fisher's exact test)

Table 3-3 Chromosome analysis of CHL/U treated with HBM for 24 hours without S9

| Time schedule <sup>a</sup><br>(hours) | S9                   | Group | Concentration<br>(µg/mL) | RICC<br>(%) | Structural aberrations             |     |     |     |     |              | Gap        | Numerical aberrations |                                    |      |            |            |   |
|---------------------------------------|----------------------|-------|--------------------------|-------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------|------------|-----------------------|------------------------------------|------|------------|------------|---|
|                                       |                      |       |                          |             | Number of<br>metaphase<br>observed | ctb | cte | csb | cse | others       |            | total (%)             | Number of<br>metaphase<br>observed | poly | others     | total (%)  |   |
| 24-0                                  | Control <sup>b</sup> |       | —                        | 100.0       | 2                                  | 0   | 1   | 0   | 0   | 0            | 3          | 0                     | 150                                | 0    | 0          | 0          |   |
|                                       |                      |       |                          |             | 0                                  | 1   | 0   | 0   | 0   | 1            | 0          | 150                   | 1                                  | 0    | 1          |            |   |
|                                       |                      |       |                          |             | 2                                  | 1   | 1   | 0   | 0   | 4 (1.3)      | 0          | 300                   | 1                                  | 0    | 1 (0.3)    |            |   |
|                                       |                      |       |                          |             | 0                                  | 2   | 0   | 0   | 0   | 2            | 0          | 150                   | 0                                  | 0    | 0          |            |   |
|                                       |                      |       |                          |             | 0                                  | 1   | 0   | 0   | 0   | 1            | 0          | 150                   | 1                                  | 0    | 1          |            |   |
|                                       |                      |       |                          |             | 0                                  | 3   | 0   | 0   | 0   | 3 (1.0) NS   | 0          | 300                   | 1                                  | 0    | 1 (0.3) NS |            |   |
|                                       | HBM                  |       |                          | 600         | 90.9                               | 2   | 0   | 0   | 0   | 0            | 0          | 2                     | 0                                  | 150  | 0          | 0          | 0 |
|                                       |                      |       |                          |             |                                    | 1   | 0   | 1   | 0   | 0            | 2          | 0                     | 150                                | 2    | 0          | 2          |   |
|                                       |                      |       |                          |             |                                    | 3   | 0   | 1   | 0   | 0            | 4 (1.3) NS | 0                     | 300                                | 2    | 0          | 2 (0.7) NS |   |
|                                       |                      |       |                          |             |                                    | 1   | 0   | 0   | 0   | 0            | 1          | 0                     | 150                                | 0    | 0          | 0          |   |
|                                       |                      |       |                          |             |                                    | 1   | 0   | 0   | 0   | 0            | 1          | 0                     | 150                                | 2    | 0          | 2          |   |
|                                       |                      |       |                          |             |                                    | 2   | 0   | 0   | 0   | 0            | 2 (0.7) NS | 0                     | 300                                | 2    | 0          | 2 (0.7) NS |   |
| Mitomycin C                           |                      |       | 0.05                     | 51.5        | 41                                 | 53  | 0   | 0   | 0   | 0            | 78         | 0                     | 150                                | 0    | 0          | 0          |   |
|                                       |                      |       |                          |             | 35                                 | 51  | 1   | 0   | 0   | 81           | 0          | 150                   | 0                                  | 0    | 0          |            |   |
|                                       |                      |       |                          |             | 76                                 | 104 | 1   | 0   | 0   | 159 (53.0)** | 0          | 300                   | 0                                  | 0    | 0 (0.0) NS |            |   |
|                                       |                      |       |                          |             |                                    |     |     |     |     |              |            |                       |                                    |      |            |            |   |
|                                       |                      |       |                          |             |                                    |     |     |     |     |              |            |                       |                                    |      |            |            |   |
|                                       |                      |       |                          |             |                                    |     |     |     |     |              |            |                       |                                    |      |            |            |   |

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Water

RICC : Relative increase in cell counts

Precipitation was not observed

NS : No significant difference (Fisher's exact test)

\*\* : Statistically significantly different from the negative control, p &lt; 0.01 (Fisher's exact test)

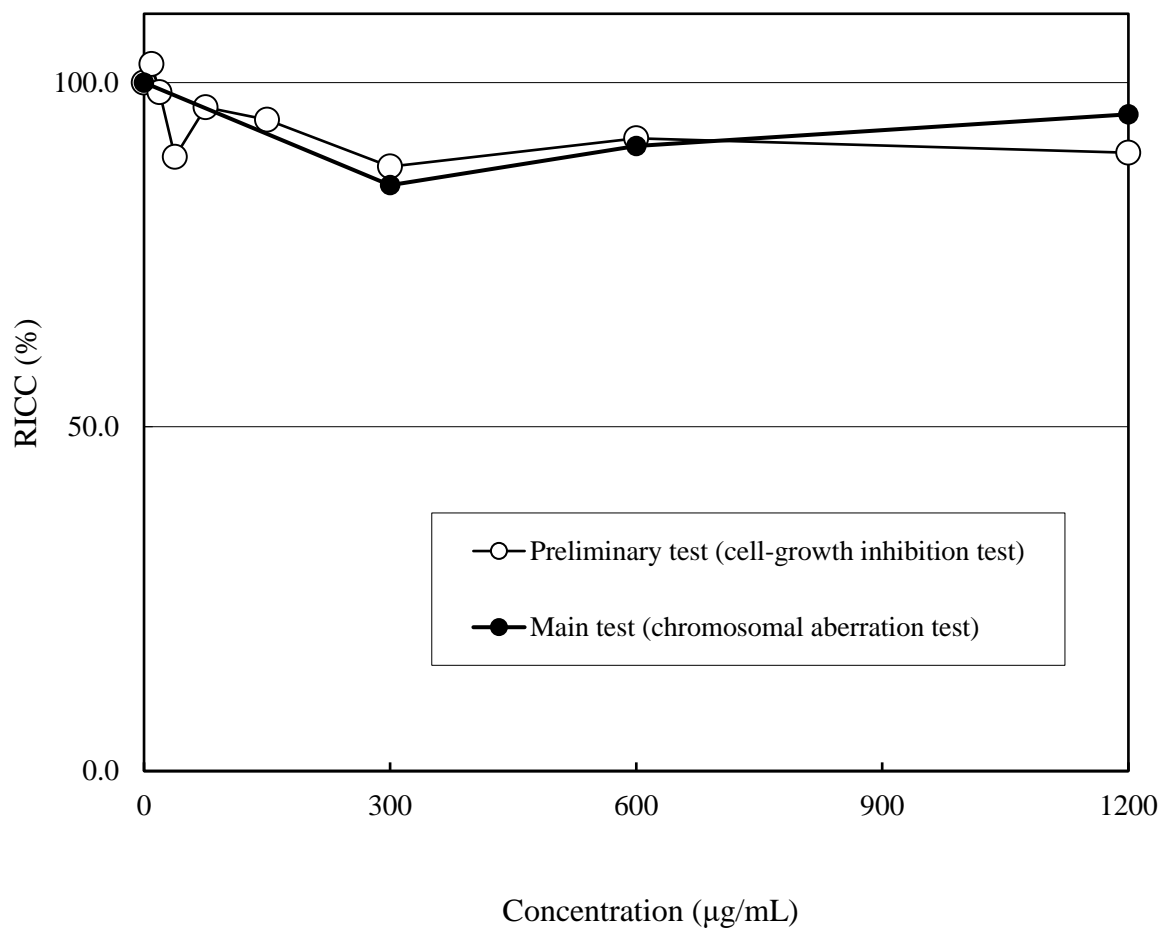


Figure 1 Growth rate of CHL/IU treated with HBM for 6 hours without S9

Each point represents mean value (n=2).

RICC: Relative increase in cell counts

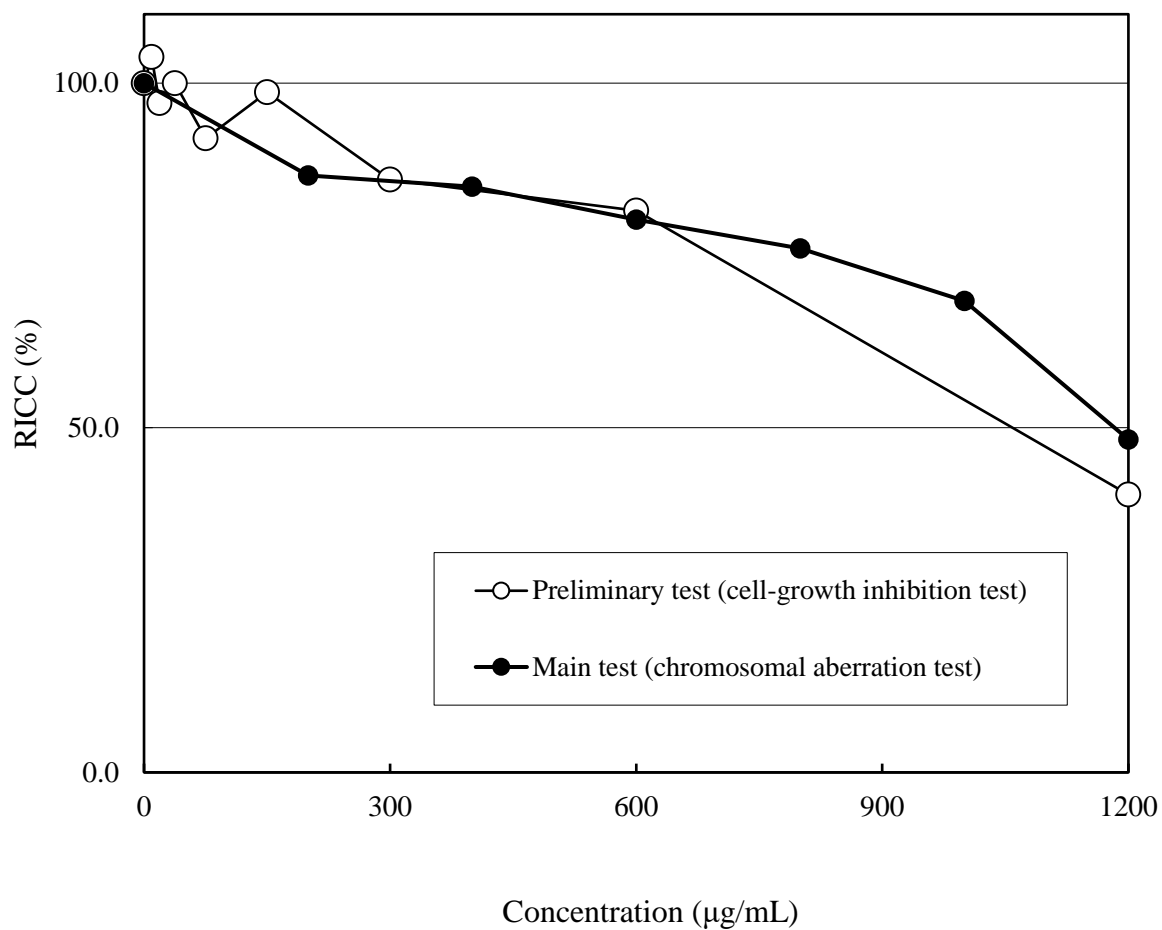


Figure 2 Growth rate of CHL/IU treated with HBM for 6 hours with S9

Each point represents mean value (n=2).  
RICC: Relative increase in cell counts

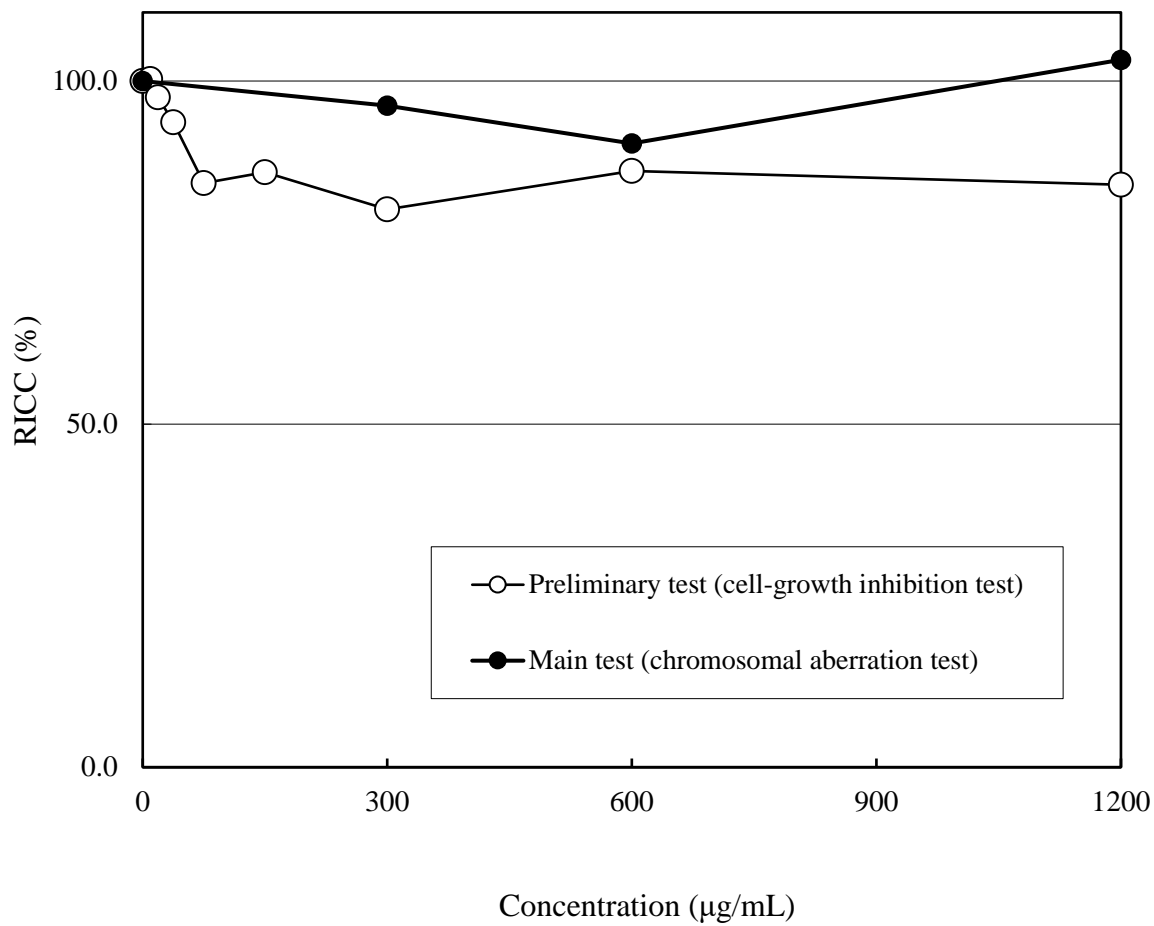


Figure 3 Growth rate of CHL/IU treated with HBM for 24 hours without S9

Each point represents mean value (n=2).

RICC: Relative increase in cell counts

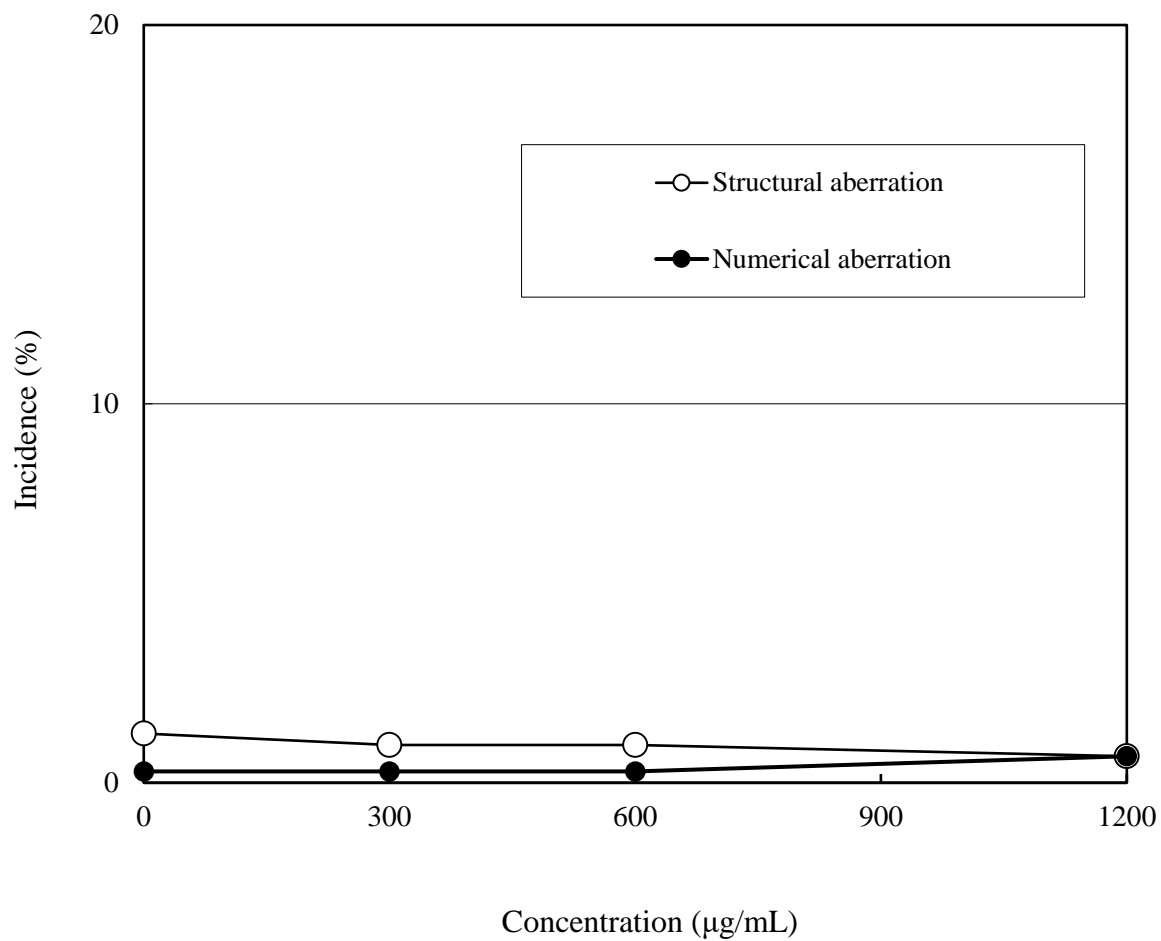


Figure 4 Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with HBM for 6 hours without S9

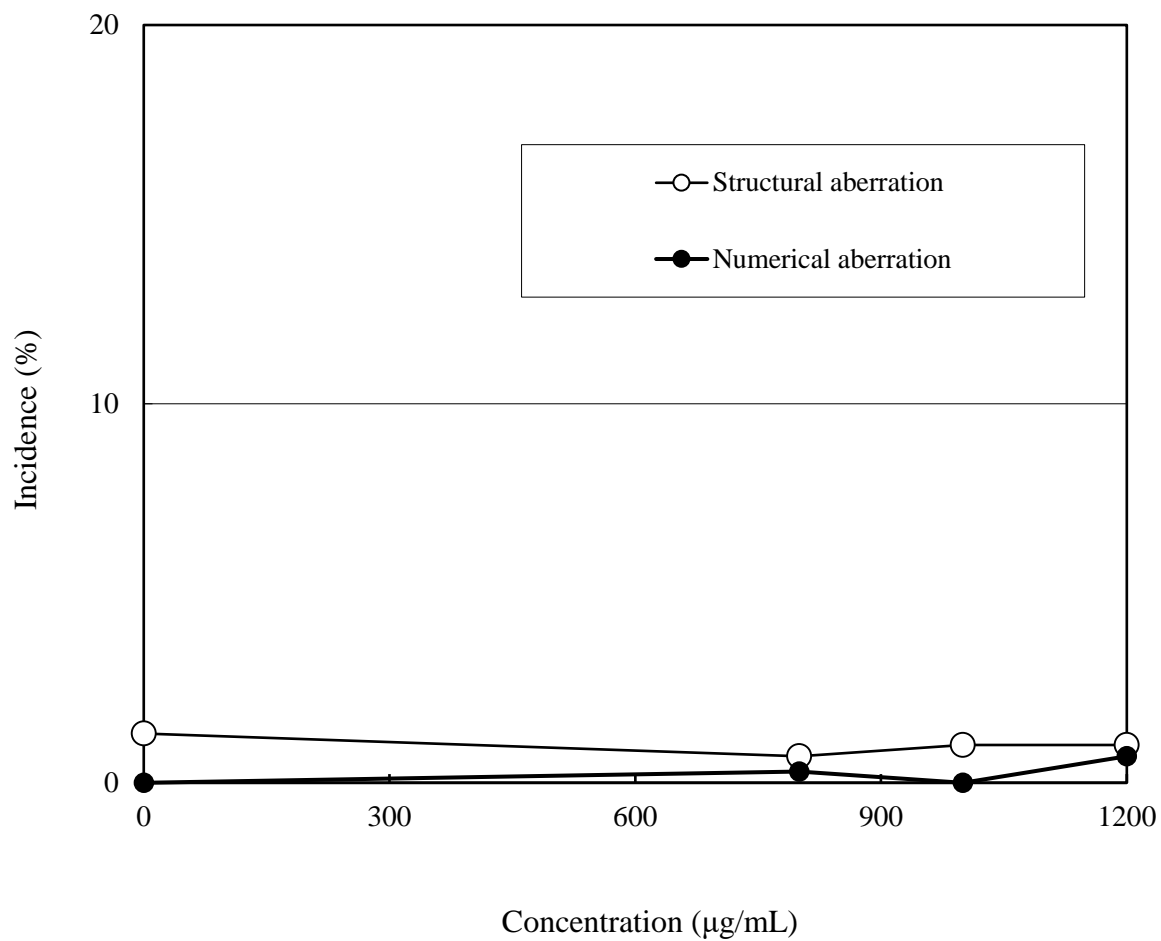


Figure 5 Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with HBM for 6 hours with S9



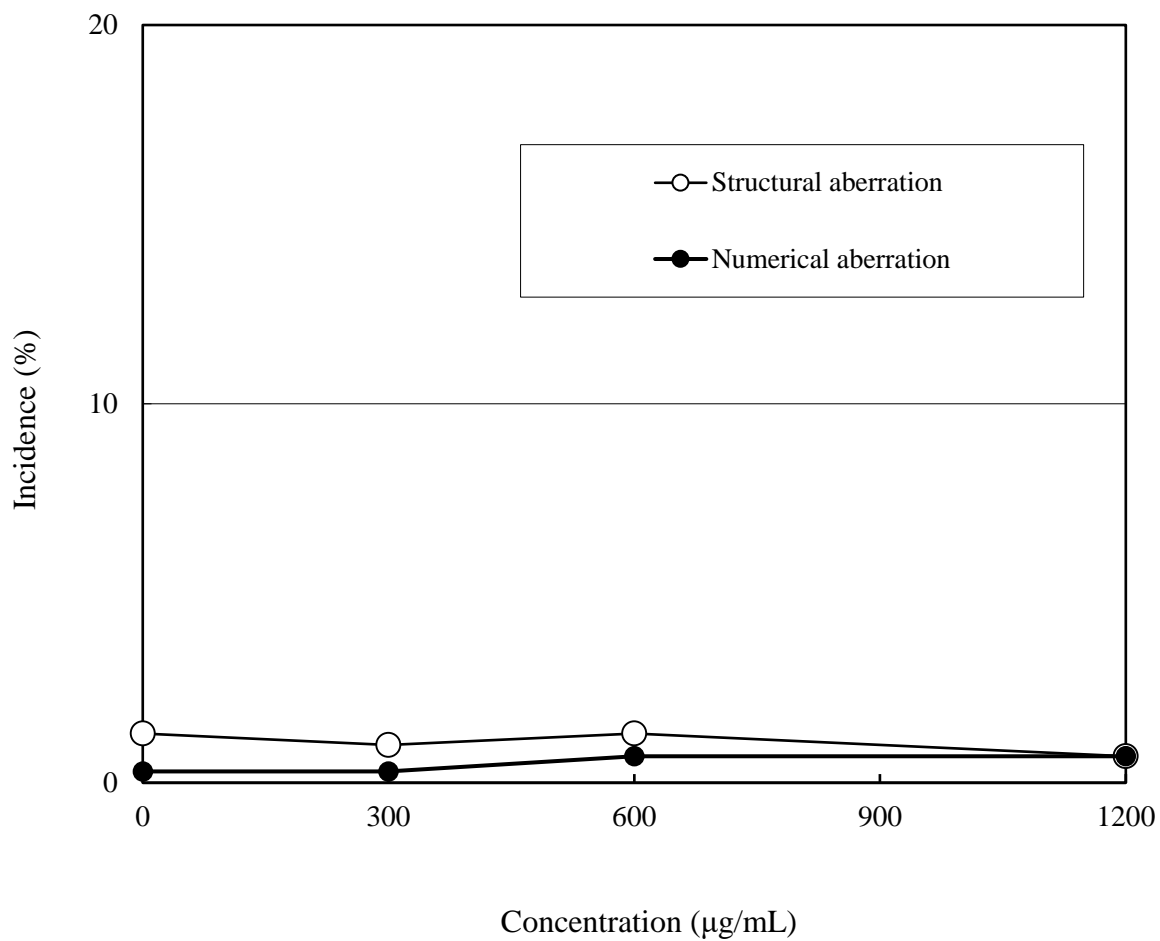


Figure 6 Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with HBM for 24 hours without S9

NCAS 17-307NG-20180220-2

## 簡易報告書

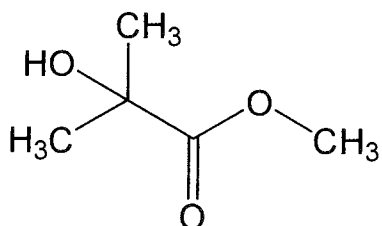
化合物名： $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチル

Lot No. : H3XDK

分子式：  $C_5H_{10}O_3$ 

分子量： 118.13

構造式：



試験番号： NCAS 17-307NG

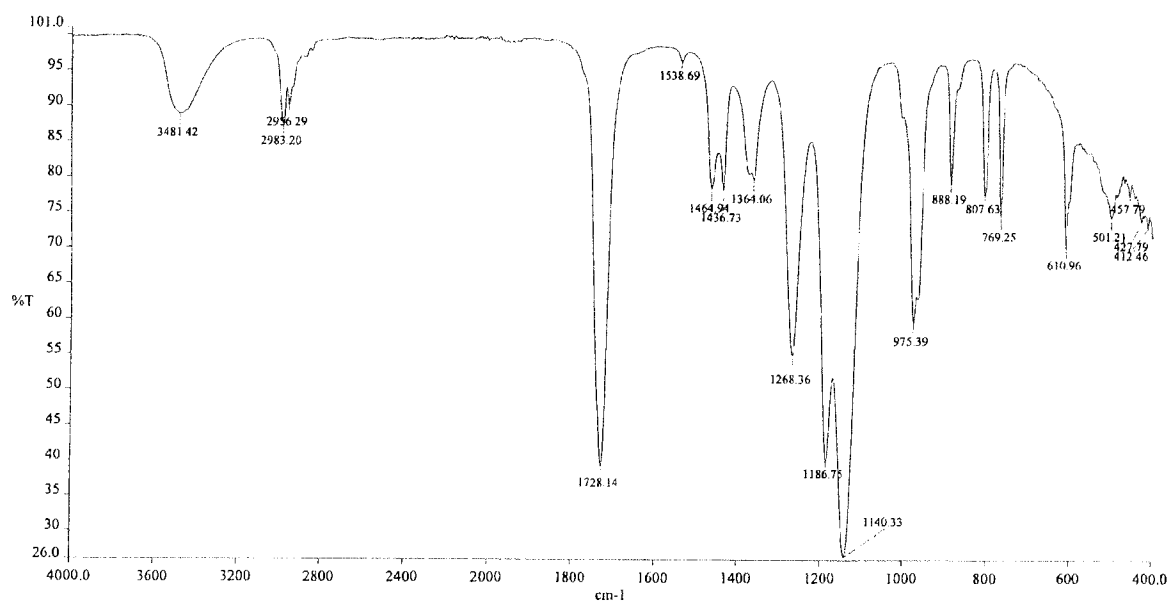
分析方法： ATR 法 (FT-IR)

測定波数： 4000~400  $cm^{-1}$ 分解能： 4  $cm^{-1}$ 

測定日： February 20, 2018

安定性評価：

試験番号 NCAS 17-211 において 2017 年 9 月 15 日に測定された IR スペクトルと比較した結果、本被験物質における 2017 年 9 月 15 日から 2018 年 2 月 20 日までの安定性が確認された。

 $\alpha$ -ヒドロキシイソラク酸メチル (Lot No. H3XDK) の IR スペクトル

測定日： 2018 年 2 月 20 日

株式会社日曹分析センター (NCAS) 小田原事業所

〒250-0216 神奈川県小田原市高田 345 番地

署名：

2018 年 2 月 22 日

TRUE COPY OF ORIGINAL

2018 年 2 月 22 日

署名

## Historical control data for chromosomal aberration test in CHL/IU (2018)

| Negative control data (Period: January, 2017 - December, 2017) |                        |                        |                        |                                     |                                     |                                     |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Treatment -<br>recovery time                                   | Structural aberration  |                        |                        | Numerical aberration                |                                     |                                     |
|  | 6-18 hr                |                        | 24-0 hr                | 6-18 hr                             |                                     | 24-0 hr                             |
| Metabolic<br>activation  | -                      | +                      | -                      | -                                   | +                                   | -                                   |
| No. of data  | 27                     | 27                     | 27                     | 27                                  | 27                                  | 27                                  |
| Mean $\pm$ SD  | 0.81 $\pm$ 0.42        | 0.84 $\pm$ 0.55        | 0.99 $\pm$ 0.47        | 0.21 $\pm$ 0.31                     | 0.18 $\pm$ 0.23                     | 0.19 $\pm$ 0.34                     |
| Maximum  | 1.3                    | 1.7                    | 1.7                    | 1.0                                 | 0.7                                 | 1.0                                 |
| Minimum  | 0.0                    | 0.0                    | 0.0                    | 0.0                                 | 0.0                                 | 0.0                                 |
| Acceptance<br>criteria <sup>a</sup>                            | 0.0 <sup>b</sup> - 2.1 | 0.0 <sup>b</sup> - 2.5 | 0.0 <sup>b</sup> - 2.4 | 0.0 <sup>b</sup> - 1.1              | 0.0 <sup>b</sup> - 1.0 <sup>b</sup> | 0.0 <sup>b</sup> - 1.2              |
| Positive control data (Period: January, 2017 - December, 2017) |                        |                        |                        |                                     |                                     |                                     |
| Treatment -<br>recovery time                                   | Structural aberration  |                        |                        | Numerical aberration                |                                     |                                     |
|  | 6-18 hr                |                        | 24-0 hr                | 6-18 hr                             |                                     | 24-0 hr                             |
| Metabolic<br>activation  | -                      | +                      | -                      | -                                   | +                                   | -                                   |
|  | Mitomycin C            | Benzopyrene            | Mitomycin C            | Mitomycin C                         | Benzopyrene                         | Mitomycin C                         |
| ( $\mu$ g/mL)  | 0.1                    | 10                     | 0.05                   | 0.1                                 | 10                                  | 0.05                                |
| No. of data  | 27                     | 27                     | 27                     | 27                                  | 27                                  | 27                                  |
| Mean $\pm$ SD  | 49.7 $\pm$ 4.3         | 48.5 $\pm$ 6.4         | 52.4 $\pm$ 4.7         | 0.1 $\pm$ 0.1                       | 0.1 $\pm$ 0.2                       | 0.1 $\pm$ 0.1                       |
| Maximum  | 58.0                   | 57.7                   | 58.7                   | 0.3                                 | 0.7                                 | 0.3                                 |
| Minimum  | 41.3                   | 37.0                   | 40.7                   | 0.0                                 | 0.0                                 | 0.0                                 |
| Acceptance<br>criteria <sup>a</sup>                            | 36.8 - 62.6            | 29.3 - 67.7            | 38.3 - 66.5            | 0.0 <sup>b</sup> - 1.0 <sup>c</sup> | 0.0 <sup>b</sup> - 1.0 <sup>c</sup> | 0.0 <sup>b</sup> - 1.0 <sup>c</sup> |

a: Mean  $\pm$  3SD

b: Lower limit is set at not less than 0.0%

c: Upper limit is set at not less than 1.0%