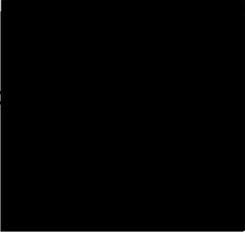


最終報告書

3-メトキシ-n-ブタノールの 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-15-017

被験物質 3-メキシ-n-ブタノール

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10月15日

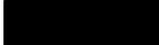
実験開始日 2015年10月19日

実験終了日 2015年12月18日

試験終了日 試験責任者の押印日

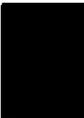
試験資料保存場所 秦野研究所資料保存施設

保存期間 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08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

原体および被験物質調製液中の安定性
培養

検体調製および細胞処理

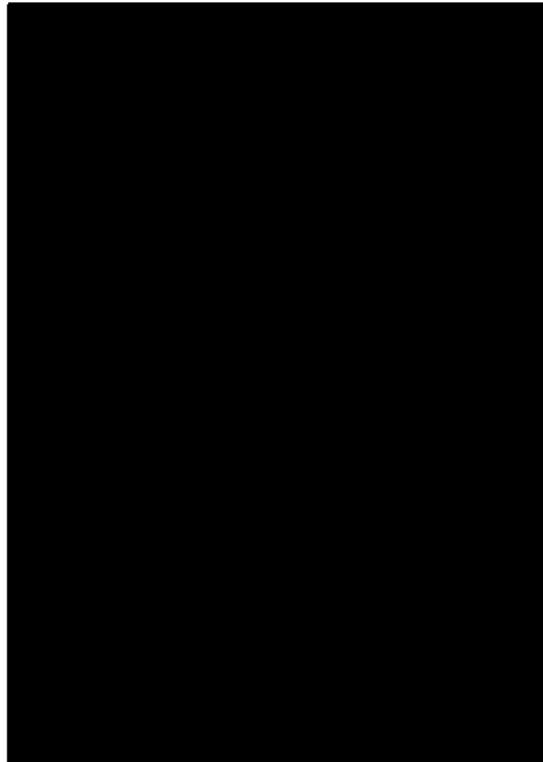
細胞数測定用サンプル作製

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	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	7
3. 細胞と培養条件	7
4. S9 反応液	7
5. 被験物質調製液の調製	7
6. 細胞毒性試験	8
7. 染色体異常試験	9
8. 染色体分析	10
9. 試験成立条件	10
10. 判定	10
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	11
参考文献	11
Figure 1	12
Tables	13
Appendices	16

(最終ページ:21 ページ)

信頼性保証書

要約

3-メトキシ-n-ブタノールの 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、すべての処理条件(S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理、24時間連続処理)で50%を超える細胞毒性(相対細胞数が50%未満)は認められなかった。なお、肉眼観察の結果、処理開始時および処理終了時共に、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。

従って、すべての処理条件で1.0 mg/mL(約10 mmol/L)を最高濃度とし、公比2で以下の4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、1.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL

24時間連続処理:0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL

なお、肉眼観察の結果、処理開始時および処理終了時共に、すべての処理条件の被験物質処理群の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:0.25、0.50、1.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL

24時間連続処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL

染色体分析の結果、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。

以上の結果より、3-メトキシ-n-ブタノー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

3-メトキシ-n-ブタノー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。

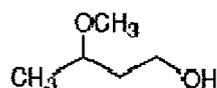
材料と方法

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 | 3-メトキシ-n-ブタノール |
| 2) 別名 | 3-メトキシ-1-ブタノール、3-methoxybutan-1-ol |
| 3) 略称 | MB |
| 4) CAS No. | 2517-43-3 |
| 5) 分子式 | $C_5H_{12}O_2$ |
| 6) 分子量 | 104.15 |
| 7) 物理化学的性質 | 外観、性状:無色～ほとんど無色の透明液体
融点: $-85^{\circ}C$
沸点: $158^{\circ}C$
蒸気圧: $0.738 \text{ mmHg}/25^{\circ}C$
引火点: $64^{\circ}C$
比重: 0.9229
屈折率: 1.4162
溶解性:水、エーテル、アルコール、多くの有機溶剤に可溶 |

8) 構造式



- | | |
|----------|--|
| 9) ロット番号 | FGL01 |
| 10) 純度 | 99.7% (GC) |
| 11) 不純物 | 情報なし |
| 12) 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ないことを確認した(Appendix 3)。 |
| 13) 保管条件 | 冷蔵(実測値: $4\sim 7^{\circ}C$)、遮光、密閉 |

14) 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、CP 共に 2015 年 9 月 30 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 10 代(細胞毒性試験)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、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°C)に保管し、製造後 6 か月以内に使用した。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ジン酸(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°C)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 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 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たことから、溶媒として日局注射用水(ロット番号:K4D76 および K5C00、大塚製薬工場)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(細胞毒性試験および染色体異常試験

ともに 10.0 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 10 vol%添加して処理を行った。

細胞毒性試験:0.156、0.313、0.625、1.25、2.50、5.00、10.0 mg/mL(公比 2)

染色体異常試験:1.25、2.50、5.00、10.0 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冷蔵、遮光条件下で保管した 0.02 mg/mL および 10 mg/mL の試験液について、保管後 24 時間の安定性を確認した(Appendix 4-1、Appendix 4-2、Appendix 4-3)。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 1.0 mg/mL (約 10 mmol/L)を最高処理濃度とする 7 濃度群(0.016~1.0 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 または S9 反応液と交換(2.7 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 10 vol%添加(300 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(4.5 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 10 vol%添加(500 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、すべての処理条件(S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理、24 時間連続処理)で 50%を超える細胞毒性(相対細胞数が 50%未満)は認められなかった。従って、すべての処理条件で 1.0 mg/mL(約 10 mmol/L)を最高濃度とし、公比 2 で 4 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 反応液と交換して日局注射用水を 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。

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 6 枚のスライド標本作製した。

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

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、すべての処理条件(S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理、24 時間連続処理)で被験物質処理群に 50%を超える細胞毒性(相対細胞数が 50%未満)は認められなかった(Figure 1)。なお、肉眼観察の結果、処理開始時および処理終了時ともにすべての処理条件の被験物質処理群の培養液中に沈殿は認められなかった。

以上の結果より、すべての処理条件で 1.0 mg/mL(約 10 mmol/L)を最高濃度とし、公比 2 で下記の 4 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、1.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL

24 時間連続処理:0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL

肉眼観察の結果、処理開始時および処理終了時に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。

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、すべての処理条件で 1.0 mg/mL となった。

以上の結果より、すべての処理条件で 1.0 mg/mL を最高濃度とした以下の計 3 濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL

24 時間連続処理:0.25、0.50、1.0 mg/mL

染色体分析の結果、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。

以上の結果より、3-メトキシ-n-ブタノールは、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)

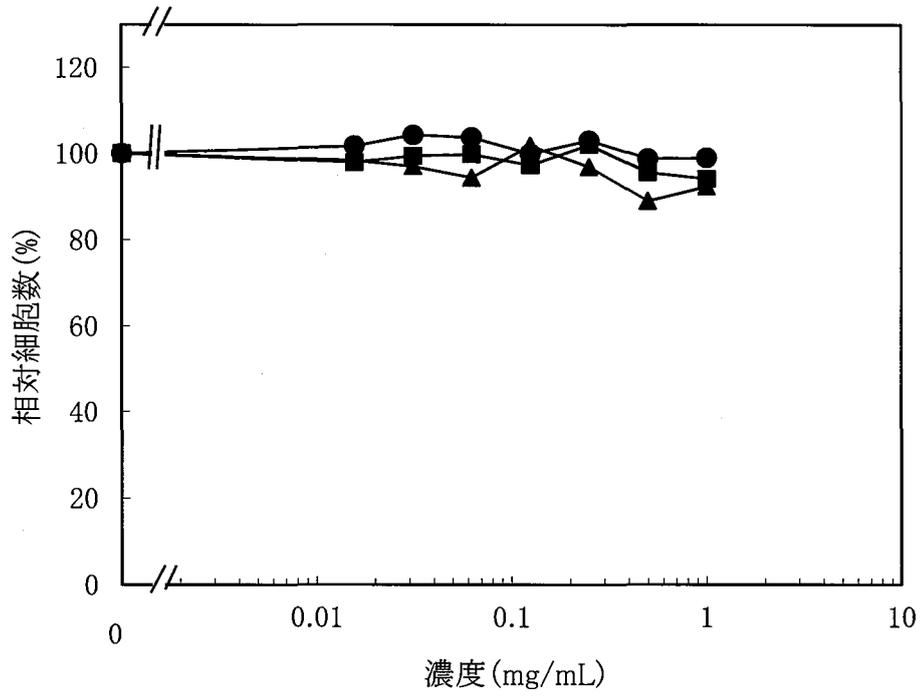


Figure 1 3-メトキシ-n-ブタノールで CHL/IU 細胞を処理したときの細胞毒性作用

- : 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、処理開始時および処理終了時に、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 3-Methoxy-1-butanol (MB) 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	0	0	0	0	0	0	0	2	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
						100	2	6	0	0	0	0	8	3	8 (8.0)	6 (6.0)	0 (0.0)
						200	2	6	0	0	0	0	8	5	8 (4.0)	6 (3.0)	0 (0.0)
MB	0.13	—	6 - (18)	96	NA	not observed											
MB	0.25	—	6 - (18)	96	NA	100	2	2	0	0	0	0	4	0	4 (4.0)	2 (2.0)	2 (0.5)
						100	1	3	0	0	0	0	4	0	3 (3.0)	2 (2.0)	1 (0.3)
						200	3	5	0	0	0	0	8	0	7 (3.5)	4 (2.0)	3 (0.4)
MB	0.50	—	6 - (18)	98	NA	100	1	1	3	0	0	0	5	0	4 (4.0)	4 (4.0)	2 (0.5)
						100	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
						200	3	1	3	0	0	0	7	0	6 (3.0)	4 (2.0)	2 (0.3)
MB	1.0	—	6 - (18)	96	2.4, 3.0	100	1	2	0	0	1	0	4	1	3 (3.0)	2 (2.0)	1 (0.3)
						100	1	3	2	1	0	0	7	0	6 (6.0)	5 (5.0)	3 (0.8)
						200	2	5	2	1	1	0	11	1	9 (4.5)	7 (3.5)	4 (0.5)
MMC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	83	NA	100	3	34	47	5	0	0	89	0	59 (59.0)	58 (58.0)	1 (0.3)
						100	7	40	58	1	0	0	106	1	54 (54.0)	52 (52.0)	1 (0.3)
						200	10	74	105	6	0	0	195	1	113 (56.5)	110*(55.0)	2 (0.3)

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) Distilled water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 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.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 3-Methoxy-1-butanol (MB) 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	0	0	1	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	3 (0.8)
						100	1	2	0	0	1	0	4	1	4 (4.0)	3 (3.0)	0 (0.0)
						200	1	2	0	1	1	0	5	1	5 (2.5)	4 (2.0)	3 (0.4)
MB	0.13	+	6 - (18)	101	NA	not observed											
MB	0.25	+	6 - (18)	107	NA	100	1	1	0	0	1	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)
						100	0	0	0	4	0	0	4	0	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)
						200	1	1	0	4	1	0	7	0	4 (2.0)	3 (1.5)	2 (0.3)
MB	0.50	+	6 - (18)	109	NA	100	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)
						100	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)
						200	0	0	0	1	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	2 (0.3)
MB	1.0	+	6 - (18)	110	6.4, 6.4	100	0	0	0	1	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)	2 (0.5)
						200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	2 (0.3)
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	82	NA	100	2	19	35	2	0	0	58	0	40 (40.0)	38 (38.0)	1 (0.3)
						100	0	11	29	0	0	0	40	0	31 (31.0)	31 (31.0)	0 (0.0)
						200	2	30	64	2	0	0	98	0	71 (35.5)	69*(34.5)	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) Distilled water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 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.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with 3-Methoxy-1-butanol (MB) 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	2	0	2	0	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	2 (0.5)
					100	0	0	4	1	0	5	0	4 (4.0)	4 (4.0)	3 (0.8)	
					200	0	2	4	3	0	9	0	8 (4.0)	8 (4.0)	5 (0.6)	
MB	0.13	24	103	NA	not observed											
MB	0.25	24	104	NA	100	0	2	0	1	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)
					100	1	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	
					200	1	2	1	1	0	5	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0 (0.0)	
MB	0.50	24	104	NA	100	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)
					100	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
					200	0	1	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	
MB	1.0	24	92	4.0, 4.6	100	0	1	1	0	0	0	2	1	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.3)
					100	0	0	2	1	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	2 (0.5)	
					200	0	1	3	1	0	5	1	5 (2.5)	5 (2.5)	3 (0.4)	
MMC	0.05 µg/mL	24	98	NA	100	1	21	32	1	0	0	55	1	38 (38.0)	38 (38.0)	1 (0.3)
					100	4	46	33	1	0	84	0	46 (46.0)	45 (45.0)	0 (0.0)	
					200	5	67	65	2	0	139	1	84 (42.0)	83 *(41.5)	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; 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 number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter®. 3) Mrtphase 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

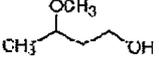
東京化成工業株式会社 品質保証
〒103-0023
東京都中央区日本橋本町4丁目10番
TEL: 03(5640)8860 FAX: 03(5640)8861

製品名：3-Methoxy-1-butanol					
製品コード：M0109 CAS番号：2517-43-3	等級：EP	製品ロット：FGL01	判定：合格		

項目	結果	規格値
純度(GC)	99.7 %	98.0 %以上
比重 (20/20)	0.9229	0.9210 ~ 0.9240
屈折率 n _{20/D}	1.4162	1.4150 ~ 1.4170

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)	3-methoxybutan-1-ol		
別名	3-メトキシ-n-ブタノール、3-メトキシ-1-ブタノール		
C A S 番号	2517-43-3		
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	104.15		
試験に供した新規化学物質の純度 (%)	99.7%(GC)		
試験に供した新規化学物質のロット番号	FGL01		
不純物の名称及び含有率	情報なし		
蒸気圧	0.738 mmHg/25°C		
対水溶解度	10.0 mg/mLで溶解*		
1-オクタノール/水分配係数			
融点	-85°C		
沸点	158°C		
常温における性状	無色〜ほとんど無色の透明液体		
安定性	適切な条件下においては安定(製品安全データシートより)		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性*
	水	10.0 mg/mLで溶解*	10 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。保管後24時間以上の安定性(0.02 mg/mLおよび10 mg/mL、冷蔵、遮光保管)を確認した。
	エーテル	溶解**	
	アルコール	溶解**	
	多くの有機溶媒	溶解**	

*: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

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 試薬

赤外分光用臭化カリウム液体セル 島津製作所

③ 測定条件

測定方法 液膜法

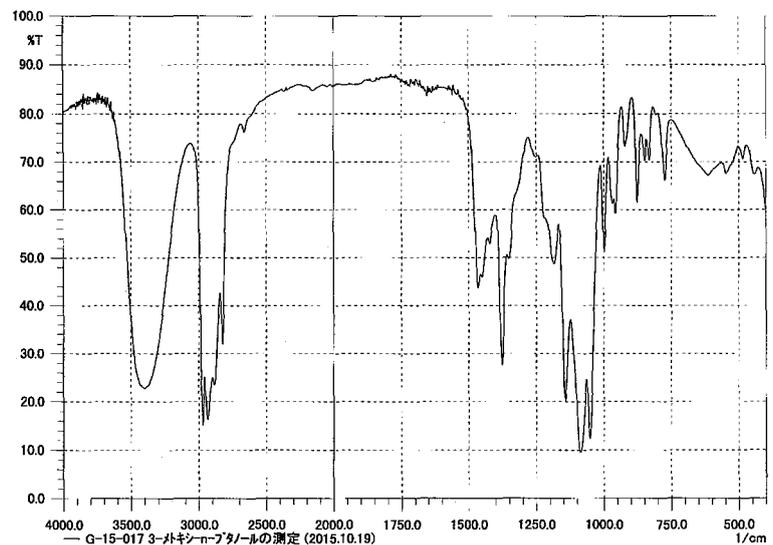
波数範囲 4000~400 cm⁻¹

④ 測定方法

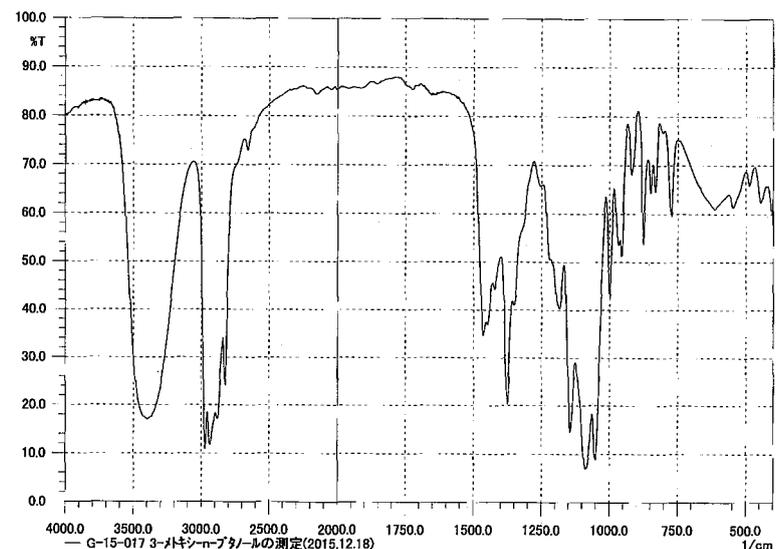
被験物質 2 滴を 2 枚の窓板 (臭化カリウム) の間に挟み、測定した。対照は測定雰囲気のパックグラウンド吸収とした。

3-メキシ-n-ブタノール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 4-1

被験物質調製液中の被験物質濃度測定法

① 試薬

蒸留水(HPLC用、以下、水) 和光純薬工業(ロット番号:ECJ2386)
 アジ化ナトリウム(試薬特級) 和光純薬工業(ロット番号:HWL7223)
 上記の試薬を用いて、0.2%アジ化ナトリウム溶液(移動相)を調製した。

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
高速液体クロマトグラフ	島津製作所

主要構成:LC-10AD VP(ポンプ)、SIL-10AD VP(オートインジェクタ)、CTO-10A(カラムオーブン)、RI SE-61[検出器(昭和電工)], SCL-10A VP(システムコントローラ)、DGU-14A(デガッサ)、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)

10 mg/mL 溶液については、被験物質約 0.2 g を精密に量り取り、溶媒に溶かして正確に 20 mL とした。

0.02 mg/mL 溶液については、10 mg/mL 溶液 1 mL を正確に採り、溶媒を加え混和して正確に 50 mL とした。この液 2 mL を正確に採り、溶媒を加え混和して、正確に 20 mL とした。いずれの溶液についても n=1 で調製した。

④ 標準溶液の調製

被験物質約 50 mg を精密に量り取り、水を加えて正確に 10 mL とした。この液 1 mL を正確に採り、水を加えて正確に 25 mL とし、標準溶液(約 200 µg/mL)とした。この液 1.5、1.5 および 4 mL を正確に採り、それぞれ水を加えて正確に 20、10 および 10 mL として標準溶液(約 15、30、80 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 0.02 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 採取し、そのまま試料溶液とした。約 10 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、水を加えて正確に 50 mL とした。この液 1 mL を正確に採り、水を加えて正確に 10 mL として試料溶液とした(約 20 µg/mL)。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高速液体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 採取)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	示差屈折率検出器
カラム	Unison UK-C18(内径 3.0 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 µm)、 Imtakt

Appendix 4-2

移動相	0.2%アジ化ナトリウム溶液
流速	0.7 mL/min
カラム温度	40°C
試料温度	室温
注入量	50 μ L
オートインジェクタ洗浄溶液	水
システム適合性	測定開始前に水を 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測定終了後の測定対象物質の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

Appendix 4-3

安定性試験結果

被験物質：3-メキシ-n-ブタノール

試験番号：G-15-017

ロット番号：FGL01

溶媒：日局注射用水

調製年月日：2015年10月20日

測定年月日 A：2015年10月20日(調製直後)

B：2015年10月21日(保管後24時間)

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)} (%)
0.0200	1	0.0212	106.0	98.6	7	0.0202	101.0	101.0	94.0
	2	0.0214	107.0	99.5	8	0.0200	100.0	100.0	93.0
	3	0.0219	109.5	101.9	9	0.0197	98.5	98.5	91.6
	平均	0.0215	107.5		平均	0.0200	99.8		92.9
10.0	4	10.4	104.0	99.0	10	10.0	100.0	99.0	95.2
	5	10.7	107.0	101.9	11	10.2	102.0	101.0	97.1
	6	10.3	103.0	98.1	12	9.98	99.8	98.8	95.0
	平均	10.5	104.7		平均	10.1	100.6		95.8

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 3-メトキシ-n-ブタノールのチャイニーズ・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-15-017

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10月15日	2015年10月15日
試験計画書変更書		
G-15-017-No.1	2015年11月4日	2015年11月5日
G-15-017-No.2	2015年11月30日	2015年11月30日
G-15-017-No.3	2015年12月25日	2015年12月25日
G-15-017-No.4	2016年1月15日	2016年1月15日
G-15-017-No.5	2016年1月21日	2016年1月21日
原体の安定性試験(実験開始前)	2015年10月19日	2015年10月19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20日	2015年10月20日
被験物質調製液の調製および細胞処理	2015年11月16日	2015年11月16日
標本観察	2015年12月16日	2015年12月16日
報告書草案および生データ	2016年1月28、29日	2016年1月29日
最終報告書	2016年3月8日	2016年3月8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8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 