

最終報告書

1,2-メチレンジオキシベンゼンの

チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

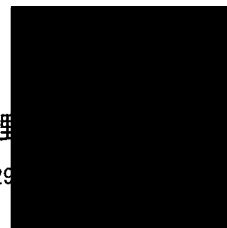
厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室 委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター秦野

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729

TEL 0463-82-4751



試験委託者 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
(東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2)

試験番号 G-12-010

被験物質 1,2-メチレンジオキシベンゼン

試験項目 チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

試験開始日 2012年8月2日


実験開始日 2012年8月20日

実験終了日 2013年2月7日

試験終了日 試験責任者の捺印日


試験資料保管場所 秦野研究所資料保存室

保管期間 試験終了後10年間
その後の保管については試験委託者と協議する。

運営管理者 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
所長 

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成23年3月31日付け、薬食発0331第7号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環境企発第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日付け、薬食発0331第8号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第6号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施したものである。

2013年03月27日

試験責任者  

試験従事者

試験責任者



試験担当者

培養

検体調製および細胞処理

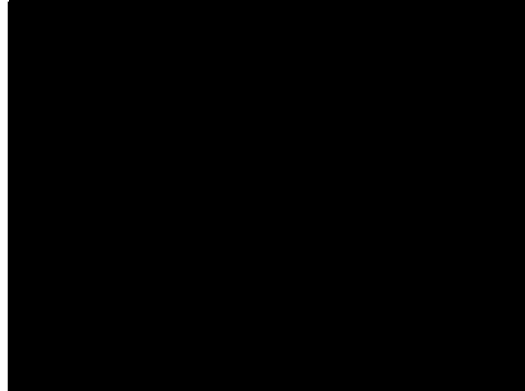
細胞数測定用サンプル作製

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 | 6 |
| 3. 細胞と培養条件 | 6 |
| 4. S9 反応液 | 7 |
| 5. 被験物質調製液の調製 | 7 |
| 6. 細胞増殖抑制試験 | 8 |
| 7. 染色体異常試験 | 8 |
| 8. 染色体分析 | 9 |
| 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に 従わなかったこと | 10 |
| 試験成績および考察 | 10 |
| 参考文献 | 11 |
| Figure | 12 |
| Tables | 13 |
| Appendices | 16 |

(最終ページ:17 ページ)

信頼性保証書

要約

1,2-メチレンジオキシベンゼンの CHL/IU 細胞(チャイニーズ・ハムスター、雌肺由来)を用いる染色体異常試験を実施し、その染色体異常誘発性を調べた。

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、すべての試験条件(S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理、24時間連続処理)で1.2 mg/mL(約10 mmol)を最高処理濃度とした以下の濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.48、0.58、0.69、0.83、1.0、1.2 mg/mL(公比1.2)

S9 mix 存在下の短時間処理:0.48、0.58、0.69、0.83、1.0、1.2 mg/mL(公比1.2)

24時間連続処理:0.16、0.24、0.36、0.53、0.80、1.2 mg/mL(公比1.5)

なお、肉眼観察の結果、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理の1.0 mg/mL以上の濃度群、および24時間連続処理の1.2 mg/mL濃度群で処理開始時に培養液中に沈殿が認められた。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析結果をもとに分析可能な最高濃度を決定し、その濃度を含む以下の3濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.58、0.69、0.83 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.69、0.83、1.0 mg/mL

24時間連続処理:0.36、0.53、0.80 mg/mL

染色体分析の結果、構造異常についてはすべての処理条件で統計学的に有意な増加は認められなかった。倍数性細胞についてはすべての処理条件において統計学的に有意な増加(出現率:1.1~2.6%)が認められ、24時間連続処理については用量依存性も認められた。

なお、類縁物質である saftrole について染色体異常試験で陽性の結果が得られている。以上の結果より、1,2-メチレンジオキシベンゼンは本試験条件下で CHL/IU 細胞に構造異常は誘発しないが、倍数性細胞を誘発すると結論した。

試験目的

1,2-メチレンジオキシベンゼンの染色体異常誘発作用を調べるため、その CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

試験ガイドラインと GLP

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 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 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 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

被験物質である 1,2-メチレンジオキシベンゼン[化学名(IUPAC 名):1,3-ベンゾジオキソール、英名:1,2-methylenedioxybenzene、略称:1,2-MD、CAS 番号:274-09-9、分子式:C₇H₆O₂、分子量:122.12、ロット番号:CRETG、純度:99.9%(GC)、Appendix 1 参照]は無色〜ごく薄い黄色で無臭の透明液体である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 2 に示す。被験物質は [REDACTED] から購入し、使用時まで密閉容器で冷蔵(実測値:3〜7°C)、遮光下で保管した。

被験物質原体の安定性については、製品安全性データシート中に、適切な条件下においては安定であることが記載されている。また、秦野研究所において実験開始前(測定日:2012 年 8 月 3 日)および実験終了後(測定日:2013 年 2 月 19 日)にフーリエ変換赤外分光光度計を用いて赤外吸収スペクトルを測定し、両者の測定結果に変化の無いことを確認した(試験番号:M-12-021)。

2. 陽性対照物質

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理用の陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC、ロット番号:558AAA、協和醗酵キリン)を用いた。また、S9 mix 存在下の短時間処理用の陽性対照物質としてシクロホスファミド(CP、ロット番号:120M1253V、Sigma Chemical)を用いた。

試験には、これらの陽性対照物質を日局注射用水(ロット番号:K2B90、大塚製薬工場)に溶かし、凍結保存(-30°C)した原液(MMC:20 µg/mL、CP:1 mg/mL、調製日:MMC および CP 共に 2012 年 10 月 5 日)を用時解凍して、調製後 6 ヶ月以内に試験に用いた。

3. 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で、我が国においては染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手(1988 年 2 月 10 日入手、入手時の継代数 4)し、継代後、液体窒素(気相)中に凍結保存(現在の継代数 23)した。その細胞(倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし)を、解凍後、継代 10 代(細胞増殖抑制試験)および 2 代(染色体異常試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清(CS、ロット番号:522123、Biological Industries)を10 vol%添加したイーグル MEM 培養液(10%CS/MEM)を用い、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:RAA-647、2012年3月30日製造、およびRAA-653、2012年7月20日製造、キッコーマン)は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した7週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽(-80°C)に保管し、製造後6ヶ月以内に使用した。グルコース-6-リン酸(G-6-P、Sigma)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(β-NADP⁺、オリエンタル酵母工業)およびKClを精製水に溶かし、混合液として超低温槽(-80°C)に保管し、使用時(調製後6ヶ月以内に使用)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

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度で水に溶解しないが、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したことから、溶媒としてDMSO(ロット番号:KWK3063、和光純薬工業、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(120 mg/mL)を用時調製した。その原液を溶媒で段階希釈して下記の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を1 vol%添加して処理を行った。

[細胞増殖抑制試験]

0.938、1.88、3.75、7.50、15.0、30.0、60.0、120 mg/mL(公比2)

[染色体異常試験]

S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理:48.2、57.9、69.4、83.3、100、120 mg/mL(公比1.2)

24時間連続処理:15.8、23.7、35.6、53.3、80.0、120 mg/mL(公比1.5)

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

被験物質の溶媒中での安定性については、秦野研究所において室温、遮光下で保管した0.01 mg/mLおよび120 mg/mLの濃度の試験液について調製後24時間の安定性を確認した(試験番号:M-12-021)。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、試験法ガイドラインに従い1.2 mg/mL (約 10 mmol)を最高処理濃度とする8濃度群(0.0094~1.2 mg/mL、公比2)を設定して細胞増殖抑制試験を実施した。

CHL/IU細胞を0.25%トリプシン溶液を用いてはがした後、 4×10^3 個/mLの細胞懸濁液とし、その5 mL (2×10^4 個)をガラスディッシュ(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 およびS9反応液と交換(3 mL/ディッシュ)した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を1 vol%添加(30 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)した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を1 vol%添加(50 μ L/ディッシュ)し24時間処理した。各群2枚のディッシュを用いた。また、処理開始時および終了時における培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了後、培養液を捨て、5 mLの0.02 w/v%EDTA含有PBS(Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含)を加え、ピペッティングにより細胞をはがした。はがした細胞を遠沈管に移し、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)で細胞数を測定し、増殖抑制の指標とした。

7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験とほぼ同じ試験条件で染色体異常試験を行った。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、すべての処理条件で1.2 mg/mL(約 10 mmol/L)を最高処理濃度として、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理については公比1.2で6濃度群を設定し、24時間連続処理については、公比1.5で計6濃度群を設定した。さらに溶媒(陰性)対照群および陽性対照群も設けた。1濃度あたり2枚のディッシュを用いた。

陽性対照群については、培養液を10%CS/MEMまたはS9反応液と交換した後、MMC(20 μ g/mL)を、S9 mix 非存在下の短時間処理では15 μ L/ディッシュ(最終濃度:0.1 μ g/mL)、連続処理では12.5 μ L/ディッシュ(最終濃度:0.05 μ g/mL)添加した。S9 mix 存在下の短時間処理ではCP(1 mg/mL)を30 μ L/ディッシュ(最終濃度:10 μ g/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 μ g/mLになるように添加した。培養終了後、培養液を捨て0.02 w/v% EDTA含有PBS(Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含)をディッシュあたり5 mL加えてピペッティングにより細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。陰性(溶媒)対照群および被験物質処理群については、

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、増殖抑制の指標とした。残りの細胞懸濁液は遠沈 (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、約 30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール: 氷酢酸=3:1 (v/v)) を 6 mL 加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作をさらに 1 回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス (あらかじめフロスト部分に試験番号、コード番号およびスライド番号を記入) 上に滴下し、そのまま風乾した。1 ディッシュあたり 6 枚のスライド標本作製した。なお、20%未満の相対増殖率 (80%を超える増殖抑制) となった被験物質処理群については染色体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。

8. 染色体分析

染色体分析に先立って、1 ディッシュから得られた 1 枚の標本を用いて濃度の高い方から分裂指数の分析 (500 細胞/標本) を行い、0.5%未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断し、分析可能な最高濃度とそれより低い 2 濃度を観察対象とした。また、標本あたりの分析可能な分裂中期細胞数が少ない場合は、その数を考慮して観察対象群を決定した。

ディッシュ 1 枚から得られたスライド標本 4 枚を、4 人の観察者がそれぞれ処理条件が分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1 群あたり 200 個 (100 細胞/ディッシュ、25 細胞/観察者) の分裂中期細胞 (染色体数: 23~27 本) について構造異常の種類と数を、1 群あたり 800 個 (400 細胞/ディッシュ、100 細胞/観察者) の分裂中期細胞について倍数性細胞 (染色体数が 38 本以上) の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断を除く構造異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会¹⁾による分類法に基づいて行った。ギャップおよび切断については染色分体幅よりも狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

染色体の構造異常 (ギャップを除く) を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法 ($p < 0.01$ 、片側) により有意差検定を実施した。また、有意差が認められた処理条件については、統計解析ソフトウェア SAS®を用いてコクラン・アーミテッジの傾向性検定 ($p < 0.01$ 、片側) を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を総合的に行った。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

本試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

試験成績および考察

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果、50%の細胞増殖抑制濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ 0.90 mg/mL および 0.91 mg/mL、24 時間連続処理では 0.71 mg/mL と推定された。肉眼観察の結果、すべての処理条件で 0.60 mg/mL 以上の濃度で処理開始時に培養液中に沈殿が認められた (Figure 1)。

以上の結果より、すべての処理条件で 1.2 mg/mL (約 10 mmol) を最高処理濃度として下記の濃度群を設定し、染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.48、0.58、0.69、0.83、1.0、1.2 mg/mL (公比 1.2)

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.48、0.58、0.69、0.83、1.0、1.2 mg/mL (公比 1.2)

24 時間連続処理: 0.16、0.24、0.36、0.53、0.80、1.2 mg/mL (公比 1.5)

なお、肉眼観察の結果、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理の 1.0 mg/mL 以上の濃度群と 24 時間連続処理の 1.2 mg/mL 濃度群で、処理開始時に培養液中に沈殿が認められた。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析の結果、分析可能な最高濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 0.83 mg/mL および 1.0 mg/mL、24 時間連続処理では 0.80 mg/mL となった。したがって各処理条件で、その濃度を含む下記の 3 濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.58、0.69、0.83 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.69、0.83、1.0 mg/mL

24 時間連続処理: 0.36、0.53、0.80 mg/mL

染色体分析の結果、構造異常を有する細胞はすべての処理条件で統計学的に有意な増加は認められなかった。倍数性細胞については S9 mix 非存在下の短時間処理では低濃度群 (0.58 mg/mL) および中濃度群 (0.69 mg/mL) で統計学的に有意な増加 (出現率: それぞれ 1.6% および 2.6%) が認められたが、用量依存性は認められなかった。なお、中濃度群では核内倍加が認められた (Table 1)。S9 mix 存在下の短時間処理では低濃度群 (0.69 mg/mL) および中濃度群 (0.83 mg/mL) で統計学的に有意な増加 (出現率: それぞれ 1.9% および 1.1%) が認められたものの、用量依存性は認められなかった。なお、中濃度群

では核内倍加が認められた (Table 2)。24 時間連続処理では高濃度群 (0.80 mg/mL) で統計学的に有意な増加 (出現率: 2.3%) が認められ、用量依存性も認められた (Table 3)。

倍数性細胞が陽性の結果となった処理条件について D_{20} 値を求めたところ、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では、それぞれ 11.2 mg/mL および 9.3 mg/mL となった。また、S9 mix 存在下の短時間処理については最高濃度の 10 倍以上 (21.6 mg/mL) となり対象外となった。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下の短時間処理および連続処理において染色体の構造異常を誘発し、CP は S9 mix 存在下の短時間処理において染色体の構造異常を誘発した。これらの結果より、本実験系の成立が確認された (Table 1、Table 2、Table 3)。

1,2-メチレンジオキシベンゼンは、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験 (試験番号: M-12-021) では陰性の結果が得られている。なお、類縁物質である 1'-hydroxysafrole では復帰突然変異試験で陰性²⁾、Safrole では復帰突然変異試験では陰性、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では陽性の結果が報告がされている³⁾。

以上の結果より、1,2-メチレンジオキシベンゼンは、本試験条件下で CHL/IU 細胞に構造異常は誘発しないが、倍数性細胞を誘発すると結論した。

参考文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編:「化学物質による染色体異常アトラス」, 朝倉書店, 東京 (1988)
- 2) 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)、p225-226
- 3) 祖父尼俊雄 監修、染色体異常試験データ集、改定 1998 年版、Life-Science Information Center、東京 (1998)、p438

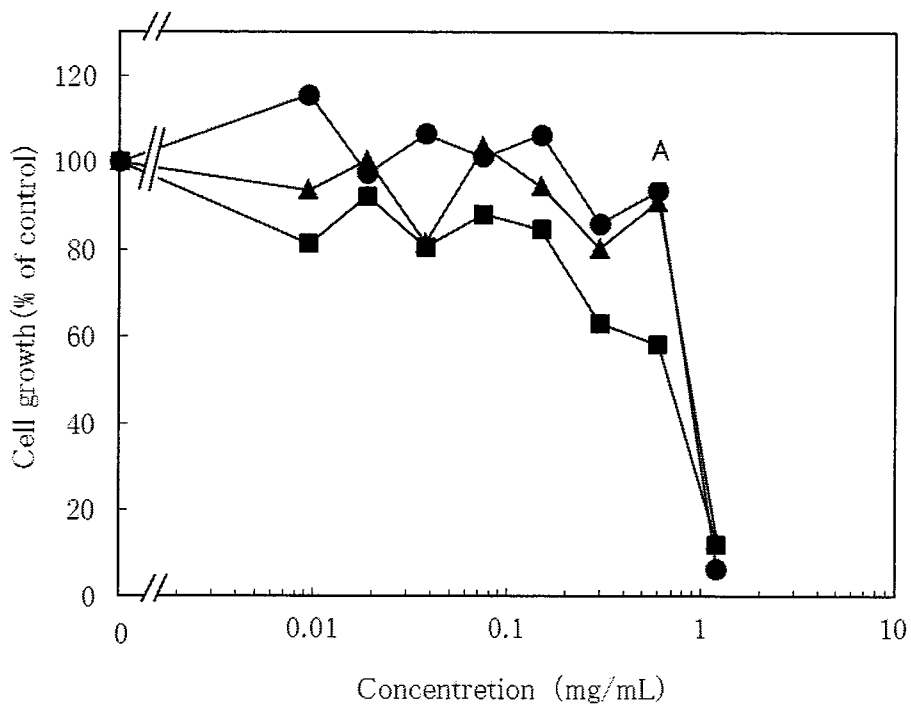


Figure1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1, 2-methylenedioxybenzene

- : Short-term treatment without S9 mix
- ▲: Short-term treatment with S9 mix
- : Continuous treatment (24 hours)

As the results of observation by the naked eyes, precipitation was observed at 0.60 mg/mL (A) or more at the beginning of the treatment in the medium under all treatment conditions.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 1,2-Methylenedioxybenzene (1,2-MD) 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 (%) | Trend test ⁷⁾ | | |
|------------------------|-----------------------|---------|------------------------|--|---------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|----------------------------------|-------------------------|---|--------------------------|-----|--|
| | | | | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ⁴⁾ | total | | +gap (%) | -gap (%) | | -gap | POL | |
| Negative ¹⁾ | 0 | — | 6 - (18) | 100 | NA | 100 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (1.0) | 1 (1.0) | 0 (0.0) | NA | — | |
| | | | | | | 100 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (1.0) | 1 (1.0) | 2 (0.5) | | | | |
| | | | | | | 200 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 2 (1.0) | 2 (0.3) | | | | |
| 1,2-MD | 0.48 | — | 6 - (18) | 81 | NA | not observed | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,2-MD | 0.58 | — | 6 - (18) | 82 | NA | 100 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (1.0) | 1 (1.0) | 6 (1.5) | NA | — | |
| | | | | | | 100 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 (5.0) | 5 (5.0) | 7 (1.8) | | | | |
| | | | | | | 200 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 6 | 0 | 6 (3.0) | 6 (3.0) | 13 *(1.6) | | | | |
| 1,2-MD | 0.69 | — | 6 - (18) | 73 | NA | 100 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (1.0) | 1 (1.0) | 7 (1.8) | NA | — | |
| | | | | | | 100 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 (2.0) | 2 (2.0) | 14 (3.5) [#] | | | | |
| | | | | | | 200 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 3 (1.5) | 3 (1.5) | 21 *(2.6) | | | | |
| 1,2-MD | 0.83 | — | 6 - (18) | 65 | 10.6, 10.4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 4 (1.0) | NA | — | |
| | | | | | | 100 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (1.0) | 1 (1.0) | 4 (1.0) | | | | |
| | | | | | | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 8 (1.0) | | | | |
| 1,2-MD | 1.0 ^{pb} | — | 6 - (18) | 13 | NA | not made chromosome specimen | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,2-MD | 1.2 ^{pb} | — | 6 - (18) | 7 | NA | not made chromosome specimen | | | | | | | | | | | | | | |
| MMC | 0.1 µg/mL | — | 6 - (18) | NA | NA | 100 | 7 | 38 | 54 | 1 | 0 | 0 | 100 | 0 | 57 (57.0) | 54 (54.0) | 0 (0.0) | NA | — | |
| | | | | | | 100 | 2 | 31 | 78 | 2 | 0 | 0 | 113 | 1 | 62 (62.0) | 61 (61.0) | 0 (0.0) | | | |
| | | | | | | 200 | 9 | 69 | 132 | 3 | 0 | 0 | 213 | 1 | 119 (59.5) | 115 *(57.5) | 0 (0.0) | | | |

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide 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. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

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

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

#, An endoreduplicated cells was observed.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 1,2-Methylenedioxybenzene (1,2-MD) 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 (%) | Trend test ⁷⁾ | | |
|------------------------|-----------------------|---------|------------------------|--|---------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|----------------------------------|--------------|---|--------------------------|-----|--|
| | | | | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ⁴⁾ | total | | +gap (%) | -gap (%) | | -gap | POL | |
| Negative ¹⁾ | 0 | + | 6 - (18) | 100 | NA | 100 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (1.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | | |
| | | | | | | 100 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (1.0) | 1 (1.0) | 0 (0.0) | | | |
| | | | | | | 200 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 1 (0.5) | 0 (0.0) | | | |
| 1,2-MD | 0.48 | + | 6 - (18) | 83 | NA | not observed | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,2-MD | 0.58 | + | 6 - (18) | 95 | NA | not observed | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,2-MD | 0.69 | + | 6 - (18) | 86 | NA | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 4 (1.0) | | |
| | | | | | | 100 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 (2.0) | 2 (2.0) | 11 (2.8) | | | |
| | | | | | | 200 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 (1.0) | 2 (1.0) | 15 *(1.9) | | | |
| 1,2-MD | 0.83 | + | 6 - (18) | 82 | NA | 100 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 (2.0) | 2 (2.0) | 4 (1.0) | NA | - | |
| | | | | | | 100 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (2.0) | 1 (1.0) | 5 (1.3) # | | | |
| | | | | | | 200 | 1 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 4 (2.0) | 3 (1.5) | 9 *(1.1) | | | |
| 1,2-MD | 1.0 ^{pb} | + | 6 - (18) | 54 | 16.6, 17.4 | 100 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 3 (3.0) | 3 (3.0) | 2 (0.5) | | | |
| | | | | | | 100 | 0 | 3 | 1 | 2 | 1 | 0 | 7 | 0 | 5 (5.0) | 5 (5.0) | 2 (0.5) | | | |
| | | | | | | 200 | 0 | 6 | 2 | 2 | 1 | 0 | 11 | 0 | 8 (4.0) | 8 (4.0) | 4 (0.5) | | | |
| 1,2-MD | 1.2 ^{pb} | + | 6 - (18) | 11 | NA | not made chromosome specimen | | | | | | | | | | | | | | |
| CP | 10 µg/mL | + | 6 - (18) | NA | NA | 100 | 1 | 15 | 11 | 0 | 1 | 0 | 28 | 0 | 21 (21.0) | 20 (20.0) | 1 (0.3) | | | |
| | | | | | | 100 | 0 | 12 | 17 | 3 | 1 | 0 | 33 | 0 | 27 (27.0) | 27 (27.0) | 1 (0.3) | | | |
| | | | | | | 200 | 1 | 27 | 28 | 3 | 2 | 0 | 61 | 0 | 48 (24.0) | 47 *(23.5) | 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; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide 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. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

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

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

#, An endoreduplicated cells was observed.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with 1,2-Methylenedioxiobenzene (1,2-MD) 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 (%) | Trend test ⁷⁾ | | | |
|------------------------|-----------------------|------------------------|--|---------------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|----------------------------------|---------------|---|--------------------------|-----|--|--|
| | | | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ⁴⁾ | total | | +gap (%) | -gap (%) | | -gap | POL | | |
| Negative ¹⁾ | 0 | 24 | 100 | NA | 100 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (2.0) | 2 (2.0) | 5 (1.3) | | | | |
| | | | | | 100 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 (1.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | | | | | |
| | | | | | 200 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 3 (1.5) | 2 (1.0) | 5 (0.6) | | | | | |
| 1,2-MD | 0.16 | 24 | 87 | | | not observed | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,2-MD | 0.24 | 24 | 84 | NA | | not observed | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,2-MD | 0.36 | 24 | 82 | NA | 100 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 (3.0) | 2 (2.0) | 11 (2.8) | | | | |
| | | | | | 100 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 3 (3.0) | 2 (2.0) | 0 (0.0) | | | | |
| | | | | | 200 | 2 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 6 | 0 | 6 (3.0) | 4 (2.0) | 11 (1.4) | | | | |
| 1,2-MD | 0.53 | 24 | 64 | NA | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 7 (1.8) | NA | + | | |
| | | | | | 100 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (1.0) | 1 (1.0) | 8 (2.0) | | | | |
| | | | | | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 15 (1.9) | | | | |
| 1,2-MD | 0.80 | 24 | 54 | 9.2, 8.4 | 100 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (2.0) | 1 (1.0) | 11 (2.8) | | | | |
| | | | | | 100 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (1.0) | 0 (0.0) | 7 (1.8) | | | | |
| | | | | | 200 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 (1.5) | 1 (0.5) | 18 *(2.3) | | | | |
| 1,2-MD | 1.2 ^{pb} | 24 | 12 | NA | | not made chromosome specimen | | | | | | | | | | | | | | |
| MMC | 0.05 µg/mL | 24 | NA | NA | 100 | 4 | 38 | 85 | 2 | 0 | 0 | 129 | 1 | 75 (75.0) | 74 (74.0) | 0 (0.0) | | | | |
| | | | | | 100 | 2 | 46 | 100 | 1 | 0 | 0 | 149 | 1 | 62 (62.0) | 62 (62.0) | 0 (0.0) | | | | |
| | | | | | 200 | 6 | 84 | 185 | 3 | 0 | 0 | 278 | 2 | 137 (68.5) | 136 *(68.0) | 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; POL, polyploid;

MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide 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. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

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

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

Appendix 1



試験成績書

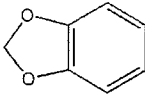
2012年07月03日

東京化成工業株式会社 品質保証部
〒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 : 1,2-Methylenedioxybenzene | | | |
|---------------------------------|---------|-----------------|---------|
| 製品コード : M0658 | 等級 : GR | 製品ロット : CRETG | 判定 : 合格 |
| 項目 | 結果 | 規格値 | |
| 純度(GC) | 99.9 % | 99.0 %以上 | |
| 比重 (20/20) | 1.1873 | 1.1850 ~ 1.1890 | |
| 屈折率 n _{20/D} | 1.5397 | 1.5380 ~ 1.5420 | |

Appendix 2

被験物質の一般的事項

| | | | |
|----------------------------------|---|---------------|--|
| 新規化学物質の名称 (IUPACの命名法による) | 1,3-ベンゾジオキソール | | |
| 別名 | 1,2-メチレンジオキシベンゼン、1,2-Methylenedioxybenzene | | |
| CAS番号 | 274-09-9 | | |
| 構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要) |  | | |
| 分子量 | 122.12 | | |
| 試験に供した新規化学物質の純度 (%) | 99.9%(GC) | | |
| 試験に供した新規化学物質のロット番号 | CRETG | | |
| 不純物の名称及び含有率 | ————— | | |
| 蒸気圧 | 0.1 kPa/20℃ | | |
| 対水溶解度 | 水に難溶 | | |
| 1-オクタノール/水分配係数 | 2.08 | | |
| 融点 | -10℃ | | |
| 沸点 | 172℃ | | |
| 常温における性状 | 無色〜ごく薄い黄色の透明液体、無臭 | | |
| 安定性 | 適切な条件下においては安定(製品安全データシートより) | | |
| 溶媒に対する溶解度等 | 溶媒 | 溶解度* | 溶媒中の安定性* |
| | 水 | 50.0 mg/mLで不溶 | 50.0 mg/mLの濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった(試験番号:M-12-021)。 |
| | DMSO | 120 mg/mLで溶解 | 120 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。調製後24時間の安定性(0.01 mg/mLおよび120 mg/mL、室温、遮光保管)を確認した。 |
| | アセトン | 120 mg/mLで溶解 | 120 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。 |

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

*:(財)食品薬品安全センター秦野研究所において確認した。

信頼性保証書

表題 1,2-メチレンジオキシベンゼンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 G-12-010

この試験に関する信頼性保証部門による査察および監査状況等は下記のとおりであった。

| 査察・監査項目 | 査察・監査年月日 | 運営管理者および試験責任者への報告年月日 |
|---------------|-------------|----------------------|
| 試験計画書 | 2012年8月2日 | 2012年8月2日 |
| 試験計画書変更書 | | |
| G-12-010-No.1 | 2012年10月1日 | 2012年10月1日 |
| G-12-010-No.2 | 2012年10月11日 | 2012年10月11日 |
| G-12-010-No.3 | 2012年10月22日 | 2012年10月22日 |
| G-12-010-No.4 | 2012年10月25日 | 2012年10月25日 |
| G-12-010-No.5 | 2013年1月21日 | 2013年1月21日 |
| 検体調製および細胞処理 | 2012年10月25日 | 2012年10月25日 |
| 標本観察 | 2013年1月30日 | 2013年1月31日 |
| 報告書草案および生データ | 2013年3月15日 | 2013年3月15日 |
| 最終報告書 | 2013年3月26日 | 2013年3月26日 |

試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成23年3月31日、薬食発0331第8号、平成23・03・29製局第6号、環企発第110331010号)を遵守して実施され、また、この報告書は試験に使用された方法および手順を正確に記載し、記載された結果は試験の生データを正確に反映していることを保証する。

2013年3月26日

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

信頼性保証部門責任者