

## 最終報告書

表 題：2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの哺乳類培養細胞を用いる  
染色体異常試験

試験番号：SR21140

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者の署名

表 題：2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR21140

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者



2021年12月27日

## 陳 述 書

表題：2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR21140

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) および「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 (令和 2 年 11 月 5 日薬生発 1105 第 2 号・20201015 製局第 1 号・環保企発第 2011055 号 厚生労働省医薬・生活衛生局長・経済産業省製造産業局長・環境省大臣官房環境保健部長連名通知) に準拠した。

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者

 2021 年 12 月 27 日

## 信頼性保証書

表題 : 2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験  
 試験番号 : SR21140

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 への報告日	運営管理者 への報告日
試験計画書	2021年8月30日	2021年8月30日	2021年8月30日
被験物質の管理	2021年9月13日	2021年9月13日	2021年9月13日
被験物質の調製	2021年9月13日	2021年9月13日	2021年9月13日
被験物質処理	2021年9月13日	2021年9月13日	2021年9月13日
標本作製	2021年9月14日	2021年9月16日	2021年9月16日
	2021年9月15日		
	2021年9月16日		
観察	2021年9月17日	2021年9月17日	2021年9月17日
生データ	2021年12月2日	2021年12月2日	2021年12月2日
最終報告書(草案): 図表	2021年12月2日	2021年12月2日	2021年12月2日
最終報告書(草案): 本文	2021年12月2日	2021年12月2日	2021年12月2日
最終報告書	2021年12月27日	2021年12月27日	2021年12月27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

2021年12月27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 考察および結論	20
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	21
8 参考資料	21

## Tables

1	Effects of 2-Ethylhexyl Palmitate on growth rate of CHL/IU with or without S9 in cell-growth inhibition test (preliminary test)	22
2	Effects of 2-Ethylhexyl Palmitate on growth rate of CHL/IU with or without S9 in chromosomal aberration test (main test)	23
3-1	Chromosome analysis of CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours without S9	24
3-2	Chromosome analysis of CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours with S9	25

3-3	Chromosome analysis of CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 24 hours without S9.....	26
-----	--	----

#### Figures

1	Growth rate of CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours without S9.....	27
2	Growth rate of CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours with S9.....	28
3	Growth rate of CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 24 hours without S9.....	29
4	Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours without S9.....	30
5	Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours with S9.....	31
6	Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 24 hours without S9.....	32

#### Annex

1	Historical control data for chromosomal aberration test in CHL/IU (2021).....	33
---	---	----

## 表題

2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

## 試験番号

SR21140

## 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, 2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの *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 (令和 2 年 11 月 5 日薬生発 1105 第 2 号・20201015 製局第 1 号・環保企発第 2011055 号 厚生労働省医薬・生活衛生局長・経済産業省製造産業局長・環境省大臣官房環境保健部長連名通知)

## 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)  
担当者 : XXXXXXXXXX

## 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 : 2021 年 8 月 30 日

実験開始日 : 2021 年 9 月 6 日

## 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

被験物質処理開始 : 2021 年 9 月 6 日

細胞増殖率の測定 : 2021 年 9 月 7 日

## 染色体異常試験 (本試験)

被験物質処理開始 : 2021 年 9 月 13 日

標本作製 : 2021 年 9 月 14 日

標本観察終了日 : 2021 年 10 月 4 日

実験終了日 : 2021 年 10 月 4 日

試験終了日 : 2021 年 12 月 27 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、2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討した。2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートは短時間処理法 -S9 処理，短時間処理法 +S9 処理および連続処理法 24 時間処理の 3 処理条件で試験を実施した。

細胞増殖抑制試験では被験物質 0.4000 g をアセトン 2 mL に定容し，最高濃度調製液 (200 mg/mL) を調製した。200 mg/mL 調製液を公比 2 で希釈し，100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 mg/mL 調製液を調製した。純度換算は実施せず，また反応性 (発熱，変色，発泡等) はみられなかった。

細胞増殖抑制試験 (被験物質の用量 ; 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000  $\mu$ g/mL) の結果，細胞増殖への影響はいずれの処理条件においても増殖抑制はみられなかった。被験物質の析出は，全処理条件の 250  $\mu$ g/mL 以上の用量で認められた。培養液 pH への影響はいずれの処理条件においてもみられなかった。

染色体異常試験では，被験物質 0.4000 g をアセトン 2 mL に定容し，最高濃度調製液 (200 mg/mL) を調製した。200 mg/mL 調製液を希釈し，100, 50 mg/mL 調製液を調製した。純度換算は実施せず，また反応性 (発熱，変色，発泡等) はみられなかった。

染色体異常試験は，予備試験の結果に基づき各処理条件ともに 500, 1000, 2000  $\mu$ g/mL の 3 用量を設定し評価した。その結果，染色体の構造異常および数的異常の出現率は，各処理条件のいずれの用量も 5% 未満であり，結果は陰性であった。細胞増殖への影響では，いずれの処理条件においても被験物質処理による増殖抑制はみられなかった。被験物質の析出は全処理条件の全用量で認められた。培養液 pH への影響では，いずれの処理条件においてもみられなかった。これらの結果は予備試験の結果と一致するもので，その再現性が確認された。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各処理条件において明確な陽性値を示し，本試験系が適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから，2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートは当該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、2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの *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 : 2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタート

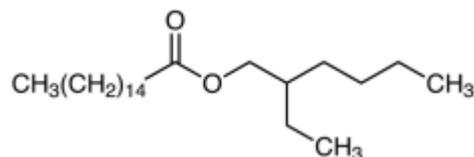
別名<sup>1)</sup> : パルミチン酸 2-エチルヘキシル

2-Ethylhexyl Palmitate

CAS 番号 : 29806-73-3

官報公示整理番号<sup>1)</sup> : (2)-798

構造式<sup>2)</sup> :



化学式<sup>1)2)</sup> : C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>

分子量<sup>2)</sup> : 368.65

物理化学的性質<sup>1)2)3)</sup> : 外観 ; 無色透明液体

比重 ; 0.8597

引火点 ; 204°C

純度<sup>3)</sup> : 98.8% (GC)

ロット番号<sup>3)</sup> :

製造者・供給者 :

試験施設受領日 : 2021年7月30日

保存場所および保存期間 : 被験物質保存室 [2021年7月30日 (試験施設受領) ~  
2021年9月13日 (染色体異常試験の調製)]

保存条件 : 冷蔵 (実測範囲 3.1 ~ 3.6°C), 気密, 遮光, 不活性ガス充填

安定性<sup>1)</sup>(非 GLP) : 適切な条件下においては安定.

被験物質管理責任者からの移管量 : 5.0034 g

使用量 : 0.8000 g

取扱上の注意 : ゴム手袋, マスク, 保護メガネ着用

参考資料 : 1) 安全データシート : 2-Ethylhexyl Palmitate, [REDACTED]

- 2) [REDACTED] 試薬ウェブサイト, 2-Ethylhexyl Palmitate  
 3) 試験成績書: 2-Ethylhexyl Palmitate, [REDACTED]

### 3.2 被験物質の調製

- 調製方法 : 被験物質必要量をメスフラスコに精秤した。媒体を適量加え、被験物質を溶解させた後メスアップした。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。最高濃度調製液を希釈し、必要な調製液を調製した。
- 細胞増殖抑制試験では被験物質 0.4000 g を 2 mL に定容し、最高濃度調製液 (200 mg/mL) を調製した。200 mg/mL 調製液を公比 2 で希釈し、100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 mg/mL 調製液を調製した。
- 染色体異常試験では、被験物質 0.4000 g を 2 mL に定容し、最高濃度調製液 (200 mg/mL) を調製した。200 mg/mL 調製液を希釈し、100, 50 mg/mL 調製液を調製した。
- 調製頻度 : 用時に調製し、調製後、細胞増殖抑制試験では 30 分以内、染色体異常試験では 40 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 1 vol% の割合で添加した。
- 調製上の注意 : ゴム手袋, マスク, 保護メガネ着用。
- 残余調製液の処理 : 残余調製液は、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 : アセトン (Acetone)
- ロット番号 : APP0694
- 製造者 : 和光純薬工業株式会社
- 保存場所 : 被験物質保存室
- 保存条件 : 冷所, 遮光
- 使用量 : 100 mL (モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。)
- 添加容量 : プレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した。
- 媒体の選択理由 : 試験施設において水, ジメチルスルホキシド, アセトンを用いて調製確認 (SR21139 検討) を行った。その結果、被験物質は蒸留水 (20 mg/mL) およびジメチルスルホキシド (200 mg/mL) に不溶, アセトン

(200 mg/mL) には溶解することが確認され、反応性 (発熱, 変色, 発泡等) はみられなかった. このことから, 当該試験の媒体としてアセトンを使用した.

### 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 : ESL7012  
 使用期限 : 2022 年 5 月  
 製造者 : 富士フイルム和光純薬株式会社  
 調製方法 : MMC 1 mg/mL 溶液を日本薬局方生理食塩液 (ロット番号 ; K0I76, 株式会社大塚製薬工場) で 10 倍に希釈した後, 更に希釈し 5 および 10  $\mu\text{g/mL}$  濃度の溶液を調製した (調製日 : 2021 年 2 月 10 日).  
 保存条件 :  $-20^{\circ}\text{C}$  以下で凍結保存  
 調製液の使用期限 : 2022 年 2 月 9 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 : USJAI  
 純度 : 100.0%  
 使用期限 : 2024 年 1 月 21 日 (受入後 5 年)  
 製造者 : 東京化成工業株式会社  
 調製方法 : BP 21.8 mg をジメチルスルホキシド (ロット番号 ; KCR4386, 富士フイルム和光純薬株式会社) 2.2 mL に溶解し, 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 : 2021 年 2 月 10 日). 調製にあたり含量の補正は行わなかった.  
 保存条件 :  $-20^{\circ}\text{C}$  以下で凍結保存  
 調製液の使用期限 : 2022 年 2 月 9 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/IU  
 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	: [REDACTED]
入手年月日	: 2019年7月30日
入手時継代数	: 13
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 ずつバイアルに分注したものを凍結させた後、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-170AICUV-PJ; パナソニックヘルスケア株式会社) 内で培養し、3~4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が行われ、陰性であることが確認されている。
染色体数 (モード)	: 25
倍加時間	: 13.4 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 (細胞増殖抑制試験: 21, 染色体異常試験: 23)

### 3.5 培地

培地	: イーグル MEM 培地 (Code 05900, ロット番号; 77310231, 日水製薬株式会社)
血清	: 牛胎児血清 (ロット番号; 2194384P, 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を秤量し、日本薬局方注射用水 (ロット番号; 0H87, 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、室温まで放冷し7.5%炭酸水素ナトリウム溶液 (ロット番号; 105K1643, 関東化学株式会社) 26.9 mLを添加した。使用前に、29.2 mg/mL L-グルタミン溶液 (ロット番号; CAQ3717, 富士フイルム和光純薬株式会社) 9.3 mL 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	: 家田貿易株式会社
ロット番号	: CAM202106A
製造年月日	: 2021年6月18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 ~ 240 g) の肝ホモジネートから調製した S9 (ロット番号; RAA202106A, S9 中蛋白含量 24.58 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>	(富士フイルム和光純薬株式会社 WDF6052)	5 μmol
KCl	(富士フイルム和光純薬株式会社 SKF5292)	33 μmol
G-6-P	(オリエンタル酵母工業株式会社 118002)	5 μmol
NADP	(オリエンタル酵母工業株式会社 045908)	4 μmol
HEPES 緩衝液	(pH7.2, 株式会社同仁化学研究所 NN219)	4 μmol

保存条件 : -80°C で凍結保存

使用期限 : 製造後 6 ヶ月 (製造より 3 ヶ月以内に使用した)

### 3.7 試験方法

#### 3.7.1 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

##### 3.7.1.1 処理条件

-S9 処理, +S9 処理および 24h 処理の 3 処理条件について実施した.

##### 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 2000 μg/mL とし, 以下公比 2 で低下させた計 8 用量 (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 μg/mL) の試験群を設定した. 更に, 処理条件毎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した.

## 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 3.0 mL、試験液 0.03 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 (-) 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 2.5 mL と S9 mix 0.5 mL (S9 の最終濃度約 5 vol%)、試験液 0.03 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 (-) 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 5.0 mL、試験液 0.05 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 を加えてピペッ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。

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

\* ; PP 2 枚の平均値を用いた。

RICC が 50%以下まで低下した処理条件については、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することとしたが、該当事例は発生しなかった。

## 3.7.2 染色体異常試験 (本試験)

## 3.7.2.1 処理条件

-S9 処理、+S9 処理および 24h 処理の 3 処理条件について実施した。

## 3.7.2.2 試験群

## a 被験物質

細胞増殖抑制試験の結果，全処理条件で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以下の用量を設定した。

-S9 処理：500, 1000, 2000  $\mu\text{g/mL}$

+S9 処理：500, 1000, 2000  $\mu\text{g/mL}$

24h 処理：500, 1000, 2000  $\mu\text{g/mL}$

## b 対照物質

各処理条件について，陰性対照群ならびに次表の陽性対照群を設定した。

処理条件	陽性対照物質	用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )
-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，陽性対照物質についても同様に処理した。

## b +S9 処理

3.7.1.4 の b +S9 処理に準じ，陽性対照物質についても同様に処理した。

## c 24h 処理

3.7.1.4 の c 24h 処理に準じ，陽性対照物質についても同様に処理した。

## 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 ( $\text{IC}_{50}$ ) の算出に準じた。 $\text{IC}_{50}$  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 µg/mL のコルセミド (ロット番号 ; 2229737, 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。なお、24h 処理については被験物質の析出がみられたことから、プレート内の液は廃棄し、新鮮培地 5.0 mL を遠沈管に入れた。プレートを PBS (-) (PBS タブレット ; ロット番号 ; AJ9P003, タカラバイオ株式会社) で細胞を洗い、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 ; 2216350, GIBCO) で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を同上の遠沈管に回収し、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 1000 rpm で 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、穏やかにピペッティングし 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 ; 304Y1097, 関東化学株式会社, 酢酸 : ロット番号 ; ESE2910, 富士フイルム和光純薬株式会社) を加えて細胞を固定した後、1000 rpm で 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 ; EP681, 富士フイルム和光純薬株式会社, インスタント燐酸緩衝液 (pH6.8) : ロット番号 ; D039, 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 ; 210419, 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

観察用量として、3.7.2.7 の細胞増殖率 (RICC) の算出において、全ての処理条件で 50% を超える細胞増殖抑制がみられなかったことから全用量を選択した。

### 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>1)</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) の分裂中期細胞を観察した。

以下に示す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 ± 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た.

- ・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.

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, 倍数体とは区別した.

### 3.7.2.13 観察結果の集計方法

異常細胞数ならびに総異常細胞数 (total) を, プレートおよび用量毎, また構造異常および数的異常の分類毎に求めた. 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 (分裂中期細胞の数) 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ている場合を、試験結果が正しく評価出来る条件とした。試験の結果、いずれの処理条件もその条件を満たしていた。

- a 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。
- b 各処理条件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 $\pm$ 3 SD ; 平均値+3 SD < 1% の場合の上限 : 1%) 内である。
- c 各処理条件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 $\pm$ 3 SD) 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 10.1) および SAS (Version 9.3) 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、該当事例は生じなかった。

##### 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、陽性と判定した。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、その処理条件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、他の処理条件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 細胞増殖抑制試験

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

試験の結果、全ての処理条件の 250 µg/mL 以上の用量で析出が観察された。培養液 pH への影響はいずれの処理条件においてもみられなかった。

細胞増殖への影響では、全ての処理条件で 50% 以上の細胞増殖抑制は認められなかった。

#### 4.2 染色体異常試験

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。

試験の結果、全用量で析出が観察された。培養液 pH への影響はいずれの処理条件においてもみられなかった。

標本観察の結果、被験物質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比較し有意な増加はみられなかった。

各処理条件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 1) 内であった。各処理条件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 1) 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、いずれの処理条件においても陽性対照群の細胞増殖率 (RICC) は 40% 以上であった。

### 5 考察および結論

チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて、2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討した。

試験の結果、被験物質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ず、結果は陰性と判定した。

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、当該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、2-エチルヘキサン-1-イル=パルミタートは当該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

次の資料を試験施設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5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) 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 2-Ethylhexyl Palmitate on growth rate of CHL/IU with or without S9 in cell-growth inhibition test (preliminary test)

Group	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	RICC (%)		
		S9-	S9+	S9-
		6-18 h <sup>b</sup> (Mean)	6-18 h <sup>b</sup> (Mean)	24-0 h <sup>b</sup> (Mean)
Control <sup>a</sup>	—	96.6 , 103.4 (100.0)	90.6 , 109.4 (100.0)	102.5 , 97.5 (100.0)
2-Ethylhexyl Palmitate	15.6	108.5 , 103.4 (106.0)	101.9 , 95.5 ( 98.7)	104.3 , 90.3 ( 97.3)
	31.3	95.1 , 96.0 ( 95.6)	96.2 , 103.8 (100.0)	95.4 , 77.1 ( 86.3)
	62.5	95.1 , 104.0 ( 99.6)	118.1 , 95.5 (106.8)	95.4 , 85.2 ( 90.3)
	125	104.0 , 93.0 ( 98.5)	99.2 , 104.9 (102.1)	100.0 , 93.6 ( 96.8)
	250	98.1 , 98.1 * ( 98.1)	90.6 , 87.9 * ( 89.3)	101.3 , 85.2 * ( 93.3)
	500	98.1 , 84.7 * ( 91.4)	87.9 , 90.6 * ( 89.3)	96.7 , 89.8 * ( 93.3)
	1000	93.0 , 84.7 * ( 88.9)	100.0 , 92.5 * ( 96.3)	98.0 , 78.9 * ( 88.5)
	2000	88.6 , 101.9 * ( 95.3)	95.5 , 84.2 * ( 89.9)	93.6 , 82.7 * ( 88.2)
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )		-	-	-

RICC : Relative increase in cell counts

a : Acetone

b : Treatment time - recovery time

\* : Precipitation was observed at the beginning and end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed

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

Group	RICC (%)					
	S9-		S9+		S9-	
	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	6-18 h <sup>b</sup> (Mean)	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	6-18 h <sup>b</sup> (Mean)	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	24-0 h <sup>b</sup> (Mean)
Control <sup>a</sup>	—	119.9 , 80.1 (100.0)	—	97.2 , 102.8 (100.0)	—	98.2 , 101.8 (100.0)
2-Ethylhexyl Palmitate	500	125.4 , 90.9 * (108.2)	500	105.8 , 114.3 * (110.1)	500	92.8 , 84.1 * ( 88.5)
	1000	106.2 , 102.5 * (104.4)	1000	102.8 , 96.4 * ( 99.6)	1000	82.9 , 77.0 * ( 80.0)
	2000	111.6 , 84.4 * ( 98.0)	2000	104.9 , 86.6 * ( 95.8)	2000	91.6 , 86.9 * ( 89.3)
Mitomycin C	0.1	84.4 , 79.0 ( 81.7)	—	—	0.05	80.5 , 66.4 ( 73.5)
3,4-Benzopyrene	—	—	10	62.3 , 58.8 ( 60.6)	—	—

RICC : Relative increase in cell counts

a : Acetone

b : Treatment time - recovery time

\* : Precipitation was observed at the beginning and end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed

Table 3-1 Chromosome analysis of CHL/U treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours without S9

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	RICC (%)	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations					
					Number of metaphase observed	ctb	cte	csb	cse	others		total (%)	Number of metaphase observed	poly	others	total (%)	
6-18	Control <sup>b</sup>	—	—	100.0	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	
					150	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0		
					300	0	0	0	0	0	0	300	0	0	0	0 ( 0.0)	
		2-Ethylhexyl Palmitate	500*	108.2	150	0	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
					150	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0		
					300	0	0	0	0	0	0	300	0	0	0	0 ( 0.0) NS	
	2000*	104.4	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	
			150	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	150	0	0	
			300	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	300	0	0	0 ( 0.0) NS
	Mitomycin C	0.1	81.7	150	0	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	
				150	0	0	1	0	0	0	1	0	0	150	0	0	
				300	0	0	1	0	0	0	1	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 : Acetone

RICC : Relative increase in cell counts

\* : Precipitation was observed at the beginning and end of treatment

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

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

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

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	RICC (%)	Structural aberrations						Numerical aberrations						
					Number of metaphase observed	ctb	cte	csb	cse	others	total (%)	Gap	Number of metaphase observed	poly	others	total (%)	
6-18	Control <sup>b</sup>	—	100.0		150	0	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
					150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	
					300	0	0	0	0	0	0	0	300	0	0	0	0 ( 0.0)
	2-Ethylhexyl Palmitate	500*	110.1		150	0	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
					150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	
					300	0	0	0	0	0	0	0	300	0	0	0 ( 0.0) NS	
	3,4-Benzopyrene	1000*	99.6		150	0	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
					150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	
					300	0	0	0	0	0	0	0	300	0	0	0 ( 0.0) NS	
	2000*	95.8		150	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
150				1	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0			
300				1	0	1	0	0	0	0	300	0	0	2 ( 0.7) NS			
3,4-Benzopyrene	10	60.6		150	21	24	15	0	0	0	57	0	150	0	0	0	
				150	31	65	14	0	0	78	0	150	0	0	0		
				300	52	89	29	0	0	135 (45.0)**	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 : Acetone

RICC : Relative increase in cell counts

\* : Precipitation was observed at the beginning and end of treatment

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

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

Table 3-3 Chromosome analysis of CHL/U treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 24 hours without S9

Time schedule <sup>a</sup> (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	RICC (%)	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations				
					Number of metaphase observed	ctb	cte	csb	cse	others		total (%)	Number of metaphase observed	poly	others	total (%)
24-0	Control <sup>b</sup>	—	500*	100.0	150	0	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0
					150	0	0	1	0	0	1	150	0	0	0	
					300	0	0	1	0	0	1 ( 0.3)	300	0	0	0 ( 0.0)	
	2-Ethylhexyl Palmitate			88.5	150	0	2	0	0	0	0	2	150	0	0	0
					150	1	0	0	0	0	1	150	0	0	0	
					300	1	2	0	0	0	3 ( 1.0) <sup>NS</sup>	300	0	0	0 ( 0.0) <sup>NS</sup>	
					150	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	
	Mitomycin C	0.05	73.5	150	0	0	0	1	0	0	1 ( 0.3) <sup>NS</sup>	300	0	0	0 ( 0.0) <sup>NS</sup>	
				150	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0		
				300	0	0	0	0	0	0 ( 0.0) <sup>NS</sup>	300	0	0	0 ( 0.0) <sup>NS</sup>		
					150	27	22	8	1	0	54	150	0	0	0	
					150	24	26	16	1	0	62	150	0	0	0	
					300	51	48	24	2	0	116 (38.7) <sup>**</sup>	300	0	0	0 ( 0.0) <sup>NS</sup>	

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

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Acetone

RICC : Relative increase in cell counts

\* : Precipitation was observed at the beginning and end of treatment

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

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

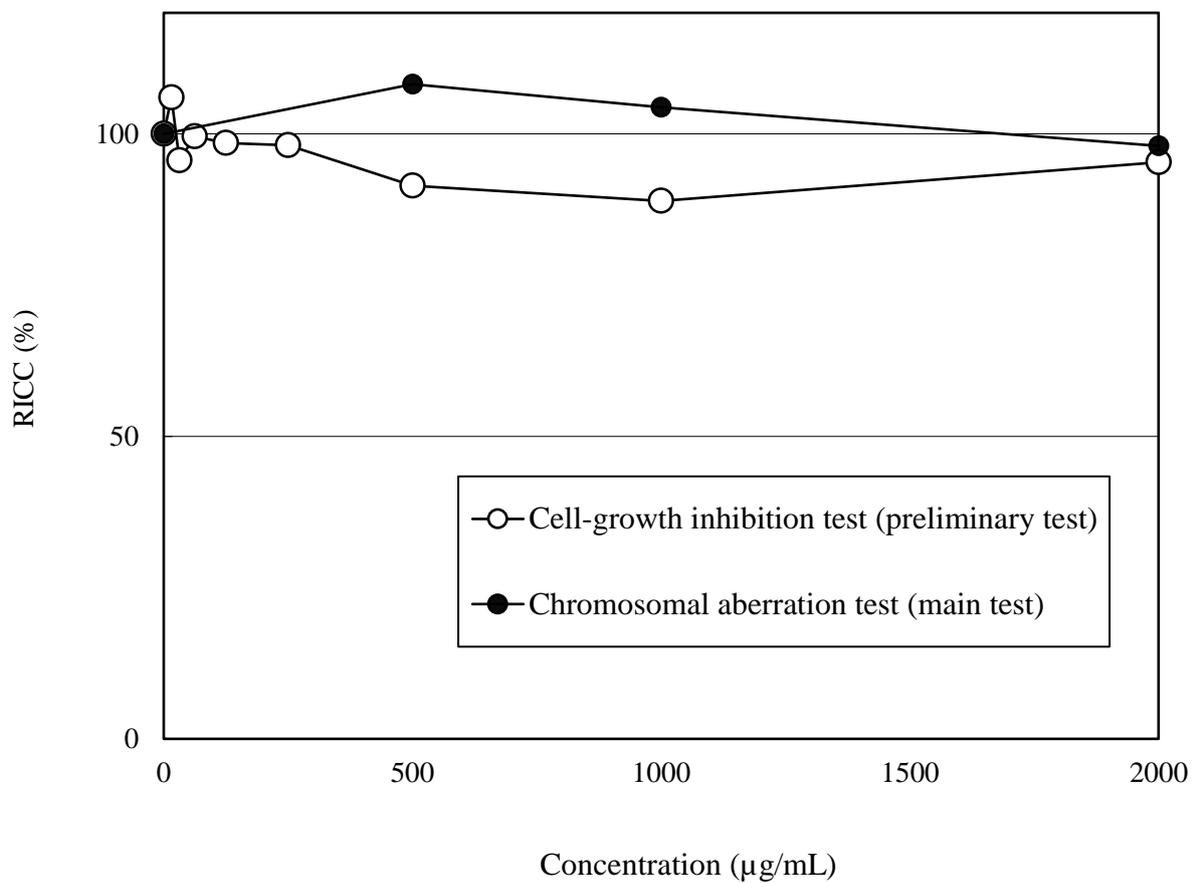


Figure 1 Growth rate of CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours without S9

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

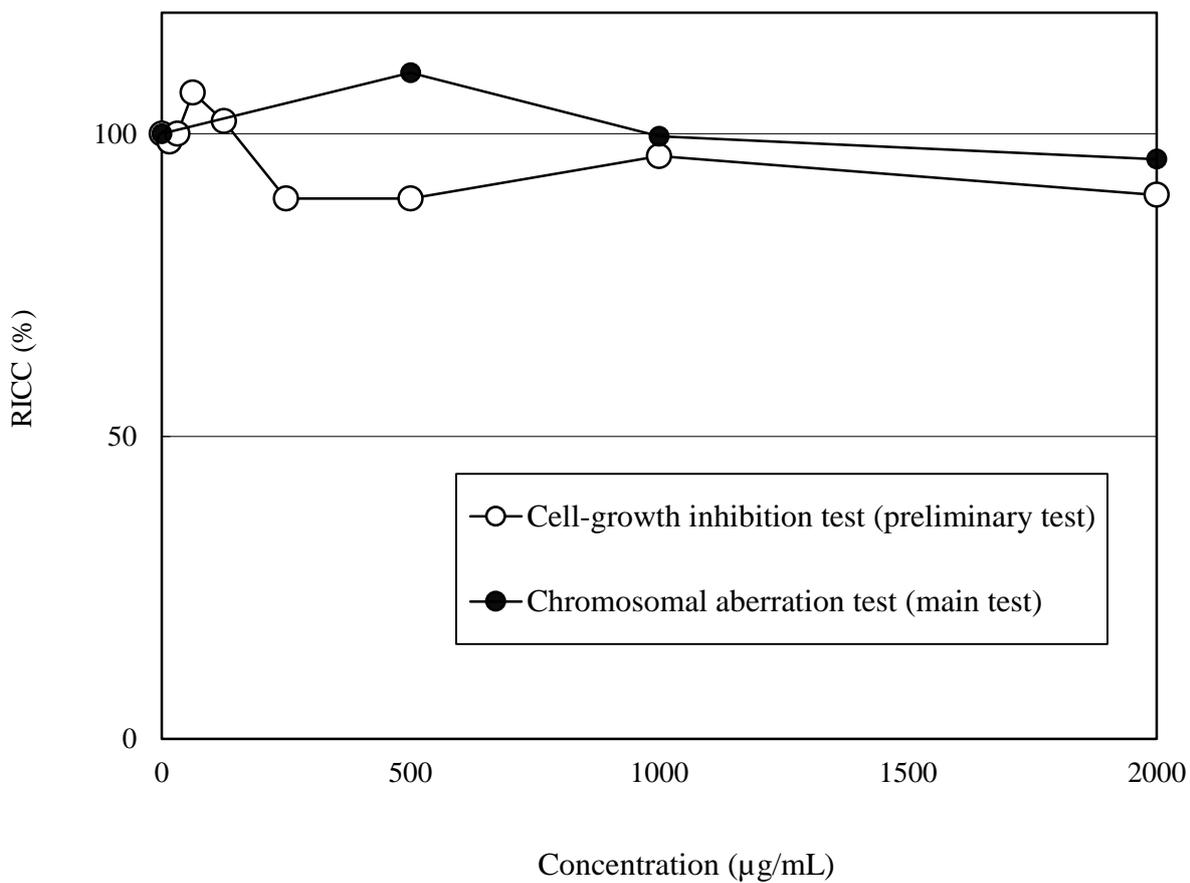


Figure 2 Growth rate of CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours with S9

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

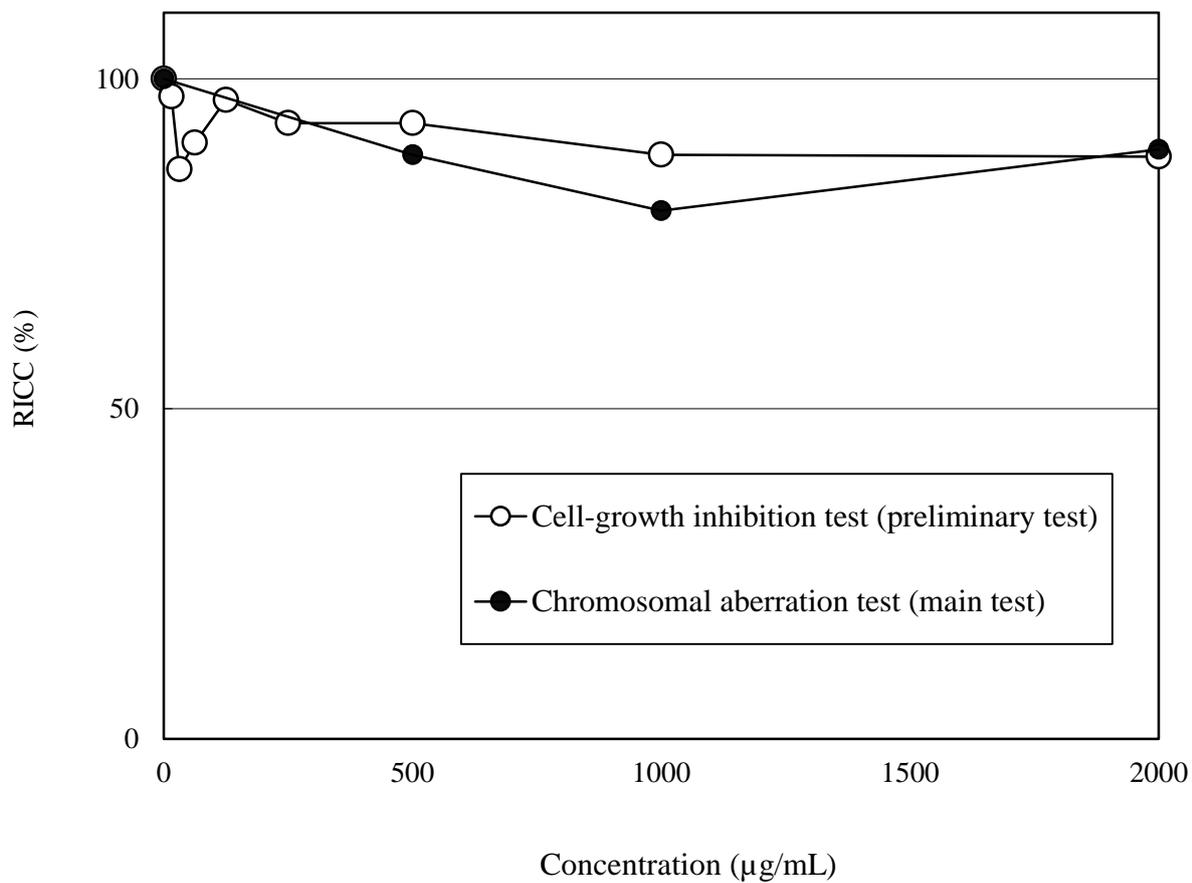


Figure 3 Growth rate of CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 24 hours without S9

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

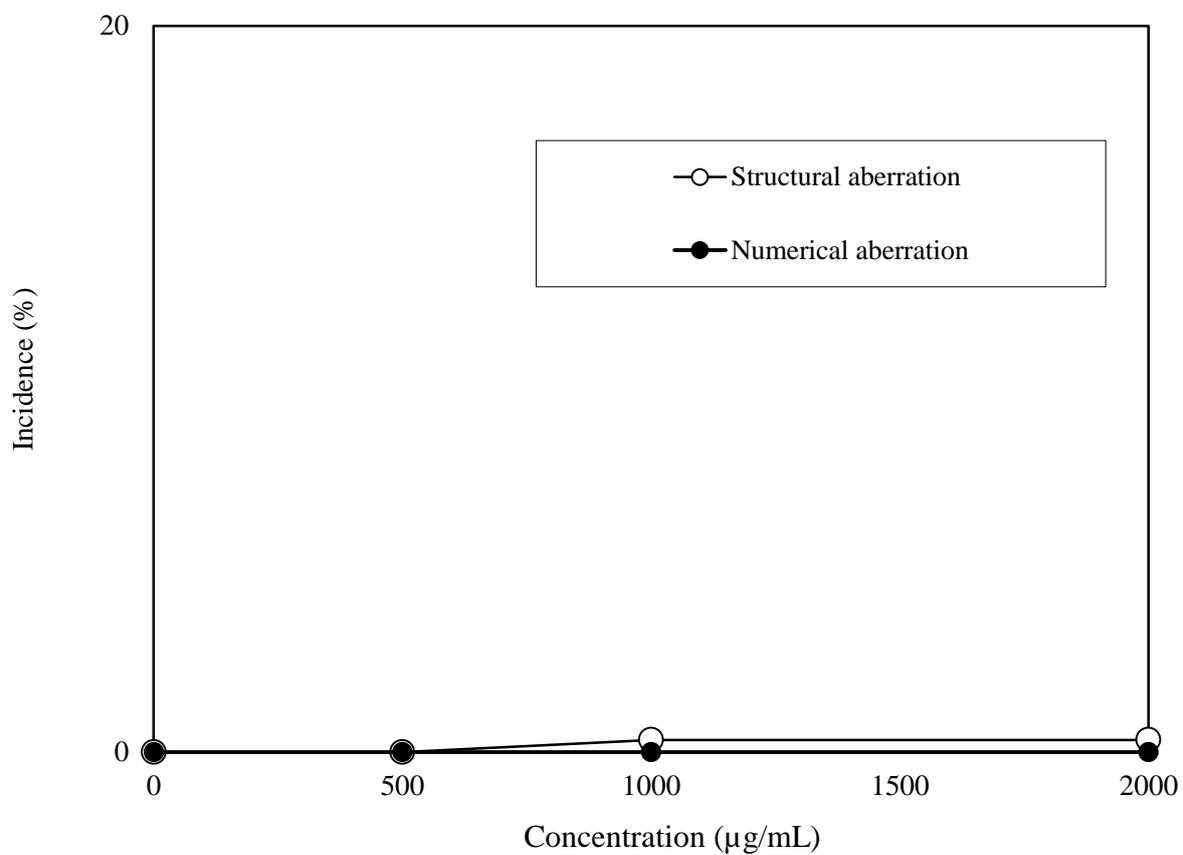


Figure 4 Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours without S9

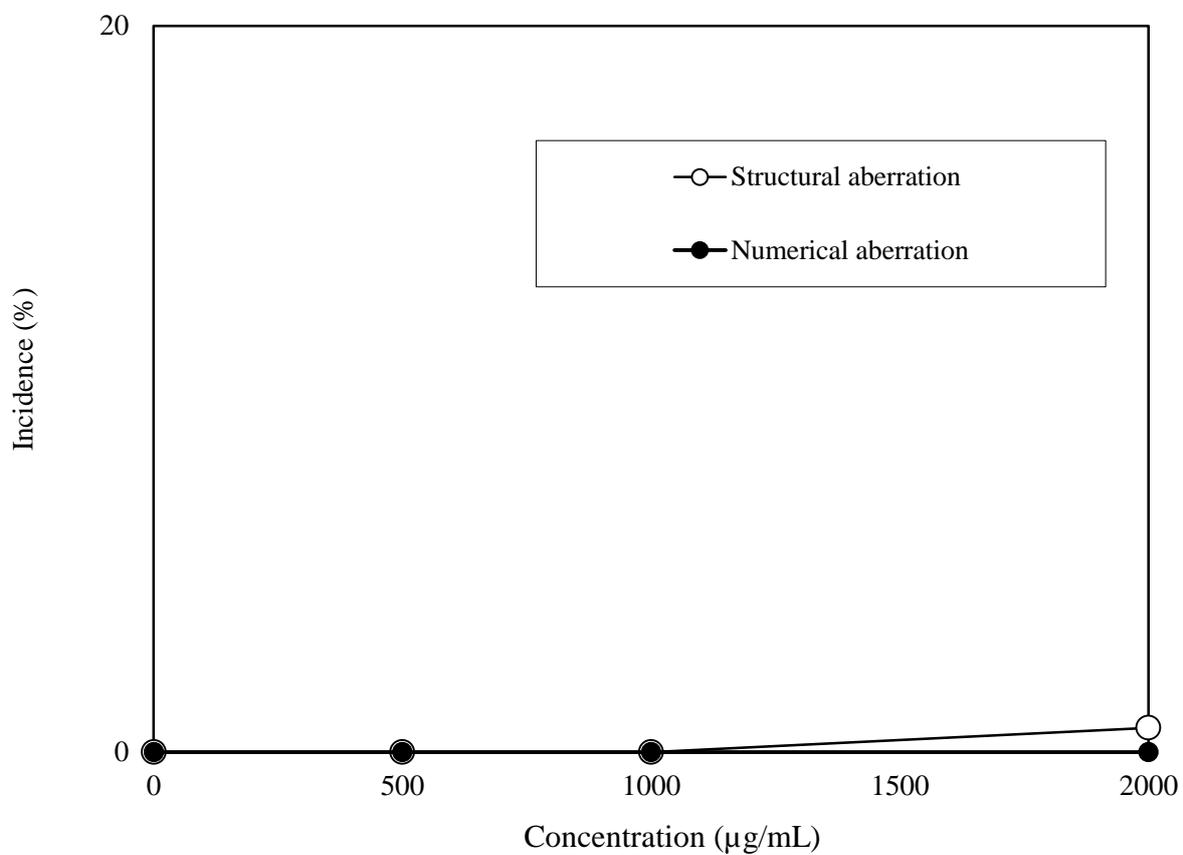


Figure 5 Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 6 hours with S9

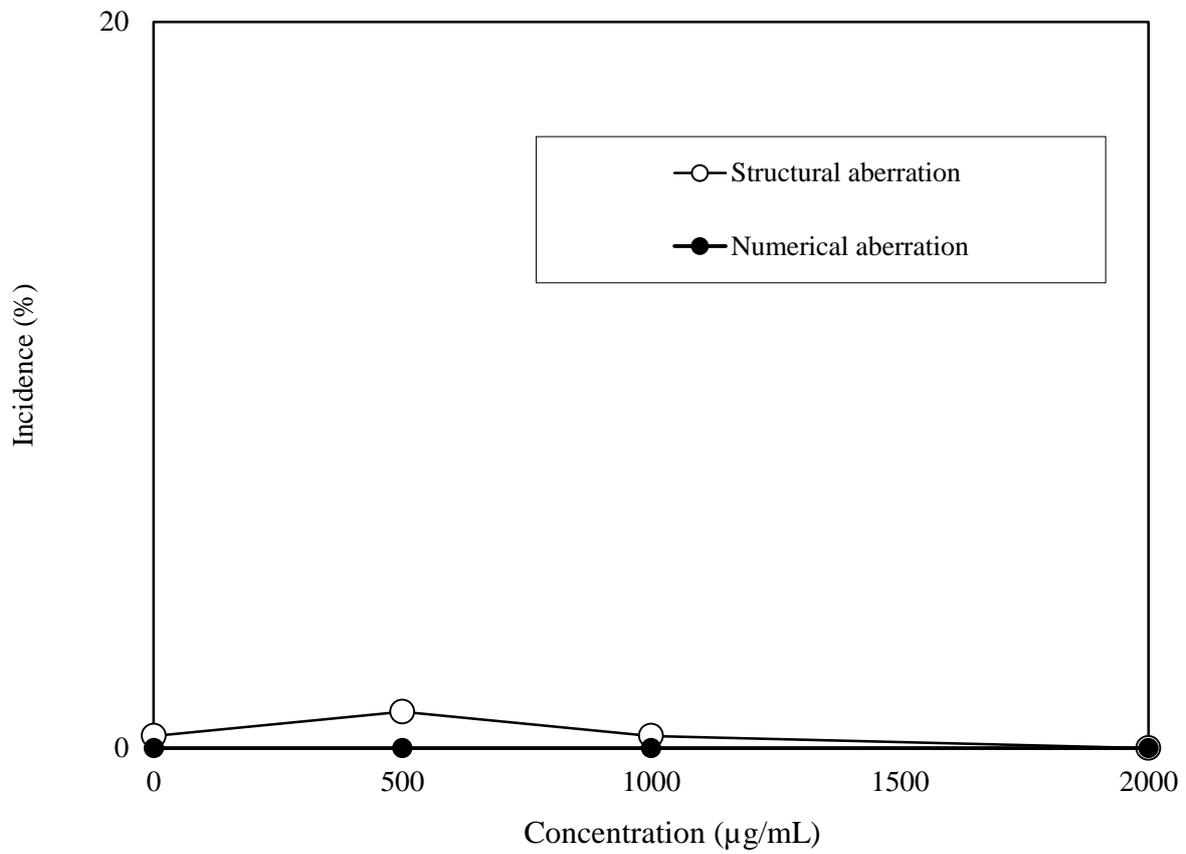


Figure 6 Incidence of chromosome aberrations in CHL/IU treated with 2-Ethylhexyl Palmitate for 24 hours without S9

## Historical control data for chromosomal aberration test in CHL/IU (2021)

Negative control data (Period: January, 2019 - December, 2020)						
Treatment - recovery time	Structural aberration			Numerical aberration		
	6-18 hr		24-0 hr	6-18 hr		24-0 hr
Metabolic activation	-	+	-	-	+	-
No. of data	45	45	45	45	45	45
Mean $\pm$ SD	0.3 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1
Maximum	2.0	1.7	1.3	0.3	0.7	0.3
Minimum	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Acceptance criteria <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup> - 1.5	0.0 <sup>b</sup> - 1.7	0.0 <sup>b</sup> - 1.2	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>
Positive control data (Period: January, 2019 - December, 2020)						
Treatment - recovery time	Structural aberration			Numerical aberration		
	6-18 hr		24-0 hr	6-18 hr		24-0 hr
Metabolic 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	45	45	45	45	45	45
Mean $\pm$ SD	46.4 $\pm$ 3.8	44.7 $\pm$ 4.5	46.6 $\pm$ 3.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 0.0
Maximum	56.0	55.3	54.0	0.3	1.0	0.3
Minimum	38.3	36.7	35.3	0.0	0.0	0.0
Acceptance criteria <sup>a</sup>	35.0 - 57.8	31.2 - 58.2	36.1 - 57.1	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%