

最終報告書訂正版

2-Decyltetradecanol 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

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 729-5

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-12-012

被験物質 2-Decyltetradecanol

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11月7日

実験開始日 2012年11月12日

実験終了日 2013年3月22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 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。

最終報告書作成 2013年3月28日

訂正版作成 2013年4月9日

試験責任者  

試験従事者

試験責任者

試験担当者

化学分析

培養

検体調製および細胞処理

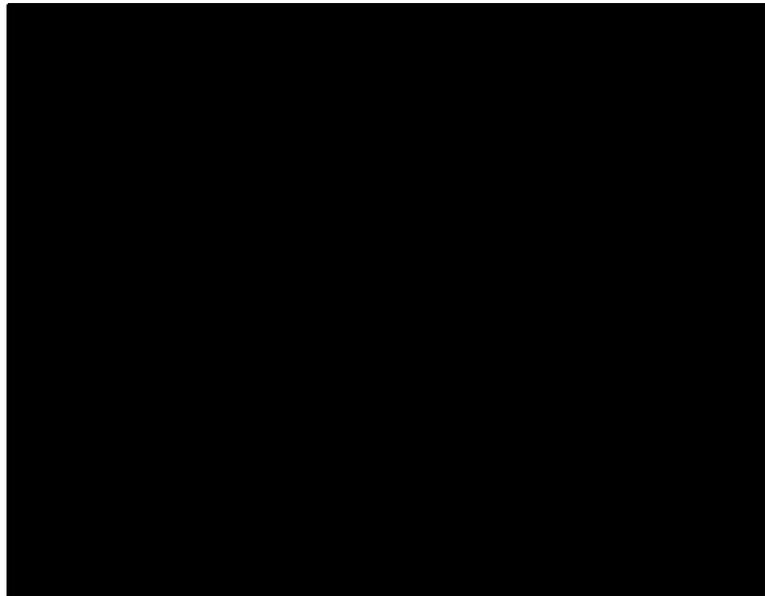
細胞増殖率測定用サンプル作製

細胞増殖率測定

染色体標本作製

染色体分析

被験物質管理



目次

要約	5
試験目的	6
試験ガイドラインと GLP	6
材料と方法	6
1. 被験物質	6
2. 陽性対照物質	7
3. 細胞と培養条件	7
4. S9 反応液	7
5. 被験物質調製液の調製	8
6. 細胞増殖抑制試験	8
7. 染色体異常試験	9
8. 染色体分析	9
予見することができなかつ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 従わなかつたこと	10
試験成績および考察	10
参考文献	12
Figure	13
Tables	14
Appendices	18

(最終ページ:21 ページ)

要約

2-Decyltetradecanol 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) において 3.5 mg/mL (約 10 mmol) を最高処理濃度とし、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: 0.44、0.88、1.8、3.5 mg/mL (公比 2)

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.44、0.88、1.8、3.5 mg/mL (公比 2)

24 時間連続処理: 0.44、0.88、1.8、3.5 mg/mL (公比 2)

なお、肉眼観察の結果、すべての被験物質処理群で処理開始時および処理終了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: 0.88、1.8、3.5 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理: 0.88、1.8、3.5 mg/mL

24 時間連続処理: 0.88、1.8、3.5 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では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。

S9 mix 非存在下の短時間処理では、陰性対照群の構造異常を有する細胞の出現率が 6.5% となり、秦野研究所の標準操作手順書で定める試験成立条件 (陰性対照群の構造異常の出現率が 5.0% を超えた場合は再試験の実施を検討する) が適用され、再試験実施の検討を行い、被験物質処理群の構造異常を有する細胞の出現率は陰性対照群と同程度 (出現率: 5.5~6.5%) であるが、陰性対照群の構造異常を有する細胞の出現率が高く、被験物質処理群の構造異常誘発性の判断が難しいことから、以下の濃度群を設定し、染色体異常試験の再試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.44、0.88、1.8、3.5 mg/mL (公比 2)

なお、肉眼観察の結果、すべての被験物質処理群で処理開始時および処理終了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:0.88、1.8、3.5 mg/mL

染色体分析の結果、すべての被験物質処理群で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。

類縁物質である12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetateに関して、復帰突然変異試験およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験で陰性の報告がされている。

以上の結果より、2-decyltetradecanol 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

2-Decyltetradecanol 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2-decyltetradecanol[化学名(別名):2-デシル-1-テトラデカノール、デシルテトラデカノール、IUPAC名:2-デシルテトラデカン-1-オール、略称:2-DT、CAS No.:58670-89-6、分子式:C₂₄H₅₀O、分子量:354.65、ロット番号:08403DOV、含量:98.4%(GC)、Appendix 1 参照]は粘性のある無色の液体である。被験物質の物理化学的性状等をAppendix 2に示す。被験物質は[]から購入し、使用時まで密閉容器にて冷蔵(実測値:3~7°C)で保管した。

被験物質原体の安定性については、秦野研究所において、冷蔵保管した被験物質を用いて実験開始前(測定日:2012年9月20日)および実験終了後(測定日:2013年3月22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(実験開始前は試験番号:M-12-023、実験終了後は試験番号:G-12-012 で実施、Appendix 3 参照)。

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 および K2E84、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は2012年10月5日および2013年2月7日、CPは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8代(細胞増殖抑制試験)、9代(染色体異常試験)および7代(染色体異常試験再試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清(CS、ロット番号:522123、Biological Industries および 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RAA-655、2012年9月14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およびジメチルスルホキシドには不溶であったが、アセトンに溶解したことから溶媒としてアセトン(ロット番号:EPE1169、和光純薬工業、試薬特級)を用いた。

被験物質を秤量したのち、溶媒(アセトン)を加えて原液(350 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]

5.47、10.9、21.9、43.8、87.5、175、350 mg/mL(公比2)

[染色体異常試験]

43.8、87.5、175、350 mg/mL(公比2)

[染色体異常試験再試験]

43.8、87.5、175、350 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0.05 mg/mL溶液および350 mg/mL溶液について被験物質調製液の調製後24時間の安定性を確認した(試験番号:M-12-023)。

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3.5 mg/mL(約10 mmol)を最高処理濃度とする7濃度群(0.055~3.5 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、10 vol%ホルマリン水溶液で細胞を固定したのち、0.1%クリスタルバイオレ

ット液で染色し、陰性対照群に対する被験物質処理群の細胞密度を単層培養細胞密度計 (MI-60、オリンパス光学工業) で測定し、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 3.5 mg/mL (約 10 mmol) を最高濃度とし、公比 2 で 4 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 4 枚のディッシュ (ただし陽性対照群は染色体標本作製用 2 枚のみ) を用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製し、残りの 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

陽性対照群については、培養液を 10% CS/MEM または S9 反応液と交換した後、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。

染色体標本作製のディッシュについては、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 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。細胞懸濁液を遠沈 (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。

作製したスライド標本を 70 vol%メタノールに軽く浸漬したのち 3 vol%ギムザ液 (pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製) で 8 分染色後、水道水ですすいで風乾した。

なお、S9 mix 非存在下の短時間処理については、上述と同じ条件で再試験を行った。

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。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、すべての試験条件で 3.5 mg/mL (10 mmol) においても 50%を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。なお、肉眼観察の結果、処理開始時にはすべての処理条件で 0.22 mg/mL 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められ、処理終了時には S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではすべての被験物質処理群で、24 時間連続処理群では 0.11 mg/mL 以上の被験物質処理群で培養液中に沈殿が認められた(Figure 1)。

以上の結果より、すべての試験条件で 3.5 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:0.44、0.88、1.8、3.5 mg/mL (公比 2)

S9 mix 存在下の短時間処理:0.44、0.88、1.8、3.5 mg/mL (公比 2)

24 時間連続処理:0.44、0.88、1.8、3.5 mg/mL (公比 2)

なお、肉眼観察の結果、すべての被験物質処理群で処理開始時および処理終了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、すべての試験条件で 3.5 mg/mL となったことから、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:0.88、1.8、3.5 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.88、1.8、3.5 mg/mL

24 時間連続処理:0.88、1.8、3.5 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 存在下の短時間処理および 24 時間連続処理については、構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計的に有意な増加は認められなかった (Table 1、Table 2)。

S9 mix 非存在下の短時間処理は、陰性対照群において構造異常を有する細胞の出現率が 6.5%となり、被験物質処理群の構造異常を有する細胞の出現率は陰性対照群と同程度 (出現率:5.5~6.5%) となった (Table 3)。この出現率は秦野研究所の標準操作手順書に定める試験成立条件 (陰性対照群の構造異常の出現率が 5.0%以上となった場合には再試験の検討を行う) が適用され、再試験の実施を検討した。陰性対照群の構造異常の出現率が秦野研究所の背景データより高値 ($2.2 \pm 1.31\%$ 、最大値 5.0%、Appendix 4) であり、被験物質処理群の構造異常誘発性の判断が困難と判断し、以下の濃度を設定して再試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理 (再試験):0.44、0.88、1.8、3.5 mg/mL (公比 2)

なお、肉眼観察の結果、すべての被験物質処理群で処理開始時および処理終了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、3.5 mg/mL となったことから、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 (再試験):0.88、1.8、3.5 mg/mL

染色体分析の結果、すべての試験条件において、構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計的に有意な増加が認められなかった (Table 4)

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 4)。

2-Decyltetradecanol 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-12-023) では陰性の結果が得られている。なお、類縁物質である 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate については、復帰突然変異試験およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性

の結果が得られている²⁾。

以上の結果より、2-decyltetradecanol は、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

参考文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編:「化学物質による染色体異常アトラス」, 朝倉書店, 東京(1988)
- 2) 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)、p485-486

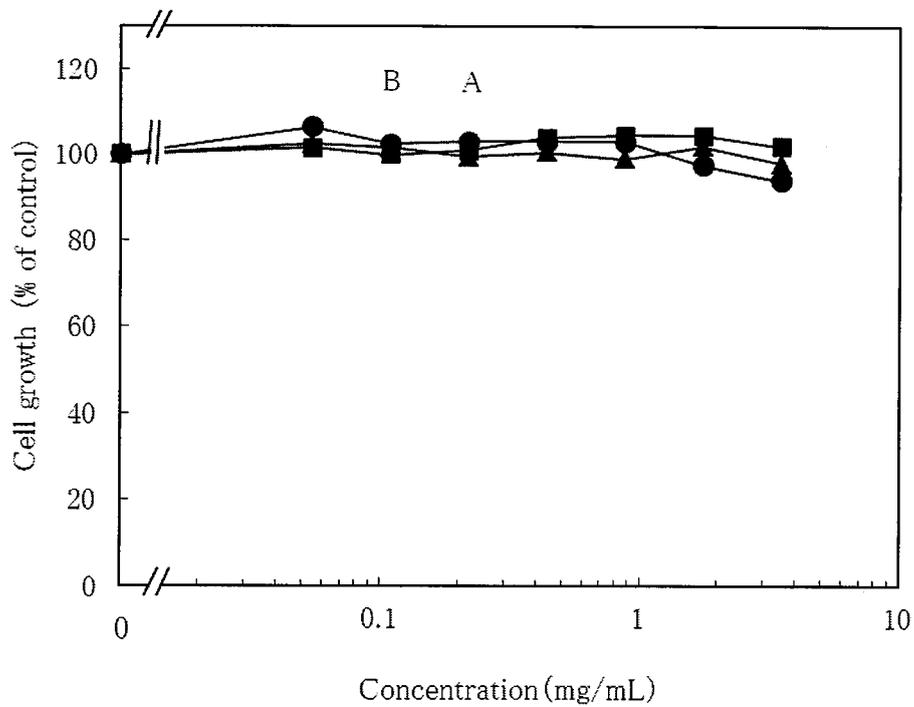


Figure1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-decyltetradecanol

- : 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 0.22 mg/mL (A) and more at the beginning in the medium under all treatment conditions. At the end of the treatment period precipitation was observed in the medium at 0.11 mg/mL (B) and more for continuous treatment, and at all concentrations for short-term treatment with and without S9 mix.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 2-decyltetradecanol (2-DT) 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	0	2	0	3	0	0	5	0	3 (3.0)	3 (3.0)	3 (0.8)	NA	NA	
						100	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)				
						200	0	2	0	3	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	4 (0.5)			
2-DT	0.44 ^{pbc}	+	6 - (18)	93	NA	not observed														
2-DT	0.88 ^{pbc}	+	6 - (18)	91	NA	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	3 (0.8)	NA	NA	
						100	0	3	0	1	0	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	1 (0.3)			
						200	1	4	0	1	0	0	6	0	6 (3.0)	5 (2.5)	4 (0.5)			
2-DT	1.8 ^{pbc}	+	6 - (18)	91	NA	100	2	0	2	0	0	0	4	0	3 (3.0)	2 (2.0)	2 (0.5)	NA	NA	
						100	0	1	0	1	1	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)			
						200	2	1	2	1	1	0	7	0	6 (3.0)	5 (2.5)	3 (0.4)			
2-DT	3.5 ^{pbc}	+	6 - (18)	86	10.0, 11.2	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)	NA	NA	
						100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)			
						200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	1 (0.1)			
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	NA	NA	100	3	29	49	4	1	0	86	2	53 (53.0)	51 (51.0)	0 (0.0)	NA	NA	
						100	0	27	36	4	1	0	68	2	45 (45.0)	45 (45.0)	0 (0.0)			
						200	3	56	85	8	2	0	154	4	98 (49.0)	96 *(48.0)	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; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 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.
pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with 2-decyltetradecanol (2-DT) for 24 hours without S9 mix

Group	Concentration (µg/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	1	3	0	9	0	0	13	1	7 (7.0)	6 (6.0)	1 (0.3)		
					100	1	3	0	0	0	4	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)			
					200	2	6	0	9	0	17	1	9 (4.5)	8 (4.0)	1 (0.1)			
2-DT	0.044 ^{pbe}	24	105	NA	not observed													
2-DT	0.088 ^{pbc}	24	105	NA	100	1	5	1	1	0	0	8	1	6 (6.0)	5 (5.0)	2 (0.5)		
					100	4	6	0	0	0	10	1	8 (8.0)	4 (4.0)	1 (0.3)			
					200	5	11	1	1	0	18	2	14 (7.0)	9 (4.5)	3 (0.4)			
2-DT	1.8 ^{pbe}	24	103	NA	100	0	3	0	1	0	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	1 (0.3)	NA	NA
					100	0	1	0	2	0	3	1	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)			
					200	0	4	0	3	0	7	1	7 (3.5)	7 (3.5)	2 (0.3)			
2-DT	3.5 ^{pbe}	24	103	8.4, 10.0	100	1	3	3	1	0	0	8	0	6 (6.0)	5 (5.0)	2 (0.5)		
					100	2	2	0	0	0	4	0	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)			
					200	3	5	3	1	0	12	0	9 (4.5)	7 (3.5)	2 (0.3)			
MMC	0.05 µg/mL	24	NA	NA	100	4	51	61	5	0	10	131	7	67 (67.0)	67 (67.0)	1 (0.3)		
					100	6	32	31	1	1	20	91	3	48 (48.0)	46 (46.0)	1 (0.3)		
					200	10	83	92	6	1	30	222	10	115 (57.5)	113* (56.5)	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; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM.

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.

pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 2-decyltetradecanol(2-DT) for 6 hours without S9 mix (result of not adoption data)

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	2	0	2	0	0	5	0	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)				
						100	0	7	1	4	0	0	12	2	9 (9.0)	9 (9.0)	1 (0.3)				
						200	1	9	1	6	0	0	17	2	14 (7.0)	13 (6.5)	1 (0.1)				
2-DT	0.44 ^{pbc}	—	6 - (18)	101	NA	not observed															
2-DT	0.88 ^{pbc}	—	6 - (18)	96	NA	100	0	5	0	0	1	0	6	10	6 (6.0)	6 (6.0)	1 (0.3)				
						100	1	5	0	0	0	0	6	3	6 (6.0)	5 (5.0)	1 (0.3)				
						200	1	10	0	0	1	0	12	13	12 (6.0)	11 (5.5)	2 (0.3)				
2-DT	1.8 ^{pbc}	—	6 - (18)	95	NA	100	1	4	1	3	0	0	9	3	7 (7.0)	6 (6.0)	2 (0.5)	NA	NA		
						100	1	11	1	0	0	0	13	3	8 (8.0)	7 (7.0)	1 (0.3)				
						200	2	15	2	3	0	0	22	6	15 (7.5)	13 (6.5)	3 (0.4)				
2-DT	3.5 ^{pbc}	—	6 - (18)	98	8.2, 6.6	100	2	5	0	6	1	0	14	2	9 (9.0)	8 (8.0)	1 (0.3)				
						100	1	2	1	0	1	0	5	1	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)				
						200	3	7	1	6	2	0	19	3	14 (7.0)	12 (6.0)	1 (0.1)				
MMC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	NA	NA	100	6	85	62	5	0	10	168	5	74 (74.0)	73 (73.0)	1 (0.3)				
						100	7	77	71	5	1	0	161	2	72 (72.0)	69 (69.0)	1 (0.3)				
						200	13	162	133	10	1	10	329	7	146 (73.0)	142 *(71.0)	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; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 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.
pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 4 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 2-decyltetradecanol(2-DT) for 6 hours without S9 mix (Retest)

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	2	0	2	0	0	5	1	5 (5.0)	4 (4.0)	2 (0.5)			
						100	1	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (0.3)				
						200	2	3	0	2	0	7	1	7 (3.5)	5 (2.5)	3 (0.4)				
2-DT	0.044 ^{pbc}	—	6 - (18)	100	NA	not observed														
2-DT	0.088 ^{pbc}	—	6 - (18)	99	NA	100	1	2	0	1	0	0	4	3	4 (4.0)	3 (3.0)	0 (0.0)			
						100	3	4	2	1	1	0	11	0	9 (9.0)	7 (7.0)	1 (0.3)			
						200	4	6	2	2	1	0	15	3	13 (6.5)	10 (5.0)	1 (0.1)			
2-DT	1.8 ^{pbc}	—	6 - (18)	103	NA	100	1	3	1	0	0	0	5	1	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)	NA	NA	
						100	0	2	0	1	0	0	3	1	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)			
						200	1	5	1	1	0	0	8	2	8 (4.0)	7 (3.5)	1 (0.1)			
2-DT	3.5 ^{pbc}	—	6 - (18)	98	5.4, 6.8	100	2	1	0	1	0	0	4	0	4 (4.0)	2 (2.0)	0 (0.0)			
						100	3	2	1	1	0	0	7	2	7 (7.0)	4 (4.0)	1 (0.3)			
						200	5	3	1	2	0	0	11	2	11 (5.5)	6 (3.0)	1 (0.1)			
MMC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	NA	NA	100	4	50	63	0	0	0	117	5	60 (60.0)	59 (59.0)	1 (0.3)			
						100	11	54	59	2	0	0	126	6	63 (63.0)	59 (59.0)	0 (0.0)			
						200	15	104	122	2	0	0	243	11	123 (61.5)	118 *(59.0)	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; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 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.
pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Appendix 1

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH®

Product Name	2-Decyl-1-tetradecanol, 97%
Product Number	464503
Product Brand	ALDRICH
CAS Number	<u>58670-89-6</u>
Molecular Formula	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CH[(CH ₂) ₉ CH ₃]CH ₂ OH
Molecular Weight	354.65

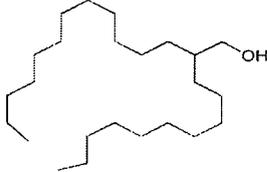
TEST	LOT 08403DOV RESULTS
APPEARANCE	VISCOUS COLORLESS LIQUID
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE.
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE.
GAS LIQUID	98.4 %
CHROMATOGRAPHY	
QUALITY CONTROL	APRIL 2001
ACCEPTANCE DATE	



Supervisor
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin USA

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)	2-デシルテトラデカン-1-オール		
別名	2-Decyltetradecanol、2-Decyltetradecan-1-ol 2-デシル-1-テトラデカノール、デシルテトラデカノール		
C A S 番号	58670-89-6		
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	354.65		
試験に供した新規化学物質の純度 (%)	98.4%(GC)		
試験に供した新規化学物質のロット番号	08403DOV		
不純物の名称及び含有率	_____		
蒸気圧	_____		
対水溶解度	不溶*		
1-オクタノール/水分配係数	_____		
融点	17~20°C		
沸点	271~275°C/33 mmHg		
常温における性状	粘性のある無色液体		
安定性	_____		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度*	溶媒中の安定性*
	水	50 mg/mLで不溶	50 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。
	DMSO	350 mg/mLで不溶	350 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。
	アセトン	350 mg/mLで溶解	350 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。また、室温、遮光下で保管した0.05 mg/mLおよび350mg/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-12-023)。

[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。

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 測定条件

測定方法 液膜法

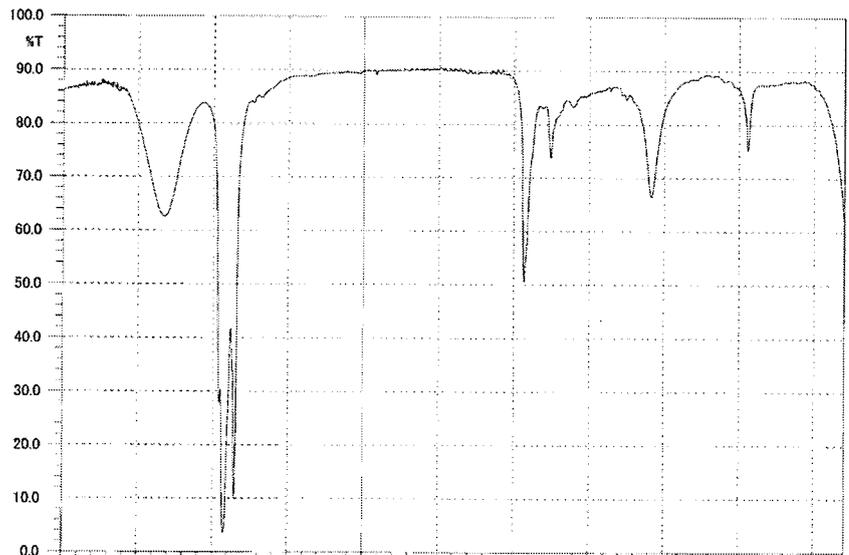
波数範囲 4000~400cm⁻¹

③ 測定方法

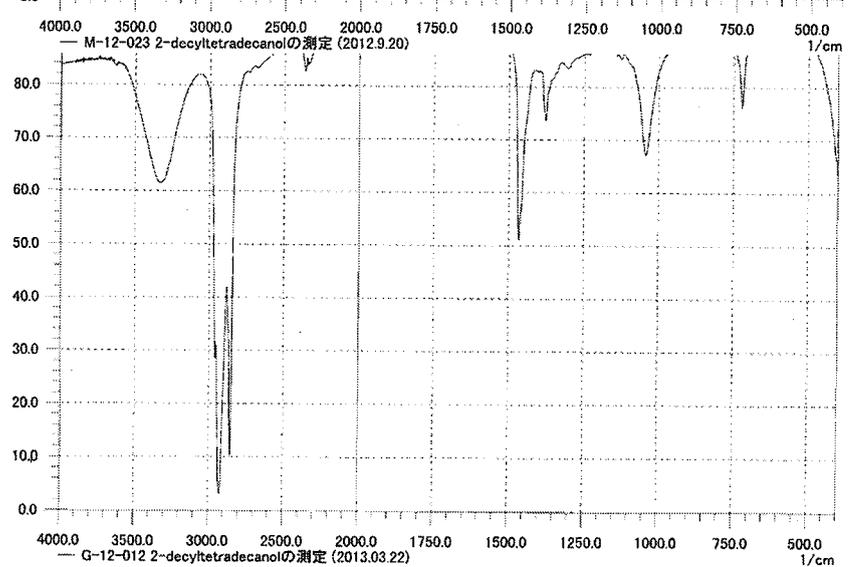
被験物質 1~2 滴を 2 枚の窓板 (臭化カリウム) の間に挟み測定した。対照は測定雰囲気のパックグラウンド吸収とした。

2-Decyltetradecanol 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

CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験における秦野研究所の背景データ

(2011年6月～2012年1月)

群	試験数	S9 mix の 有無	処理 時間 (hrs)	異常細胞の出現率 (%)		
				平均± S.D.	最大	最小
〈構造異常(ギャップを除く)〉						
陰性対照 ¹⁾	76	—	—	2.2 ± 1.31	5.0	0.0
MMC (0.1 µg/mL)	24	無	6-(18)	53.0 ± 11.6	76.0	30.0
CP (10 µg/mL)	24	有	6-(18)	29.1 ± 5.55	44.0	21.5
MMC (0.05 µg/mL)	24	無	24-(0)	50.0 ± 11.3	71.5	30.0
〈倍数性細胞 ²⁾ 〉						
陰性対照	76	—	—	0.20 ± 0.17	0.63	0.00
MMC (0.1 µg/mL)	23	無	6-(18)	0.11 ± 0.11	0.38	0.00
CP (10 µg/mL)	24	有	6-(18)	0.14 ± 0.18	0.50	0.00
MMC (0.05 µg/mL)	23	無	24-(0)	0.10 ± 0.14	0.50	0.00

1) 無処理 (培養液)と溶媒(注射用水、ジメチルスルフォキシド、0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液、アセトンなど)の全データを合わせた。

2) 800 細胞分析した。