

最終報告書

試験表題：ポリアルキル(C 1～18)[アミノアルキル(C 2～9)]シロキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：17K5208G

試験期間：2017年11月16日 ～ 2018年3月27日

シミックファーマサイエンス株式会社

試験責任者署名：



2018年 3月 27日

本報告書は表紙を含む22枚

目次

| | (頁) |
|----------------------------|-----|
| 1. 要約..... | 4 |
| 2. 試験表題..... | 5 |
| 3. 試験番号..... | 5 |
| 4. 試験目的..... | 5 |
| 5. 試験委託者..... | 5 |
| 6. 試験施設..... | 5 |
| 7. 試験責任者..... | 5 |
| 8. 担当責任者..... | 5 |
| 9. 試験実施..... | 5 |
| 10. GLP 及びガイドライン..... | 6 |
| 11. 試験関係資料の保存..... | 6 |
| 12. 被験物質及び対照物質..... | 7 |
| 12.1. 被験物質..... | 7 |
| 12.2. 陰性対照物質..... | 7 |
| 12.3. 陽性対照物質..... | 7 |
| 13. 被験物質液の調製..... | 8 |
| 13.1. 溶媒..... | 8 |
| 13.2. 調製方法..... | 8 |
| 14. 陽性対照物質の調製..... | 8 |
| 15. 使用細胞..... | 9 |
| 16. 培養液及び培養条件..... | 9 |
| 17. S9 mix..... | 9 |
| 17.1. S9..... | 9 |
| 17.2. コファクター溶液の調製..... | 10 |
| 17.3. S9 mix の調製..... | 10 |
| 18. 試験方法..... | 10 |
| 18.1. 試験構成..... | 10 |
| 18.2. 細胞増殖率..... | 11 |
| 18.3. 細胞増殖抑制試験..... | 11 |
| 18.4. 染色体異常試験..... | 11 |
| 18.5. 識別..... | 13 |
| 18.6. 統計学的処理..... | 13 |
| 18.7. 試験の成立条件..... | 13 |
| 18.8. 結果の評価..... | 13 |
| 19. 試験結果及び考察..... | 13 |
| 20. 結論..... | 14 |
| 21. 試験の信頼性に影響をおよぼした要素..... | 14 |

| | |
|------|-----------------------------|
| 表 1 | 細胞増殖抑制試験結果表 |
| 表 2 | 細胞増殖抑制試験結果表 (再試験) |
| 表 3 | 染色体異常試験結果表 (細胞増殖率) |
| 表 4 | 染色体異常試験結果表 (短時間処理法) |
| 表 5 | 染色体異常試験結果表 (連続処理法) |
| 図 1 | 用量反応曲線 (染色体異常試験) |
| 添付資料 | 陰性対照値及び陽性対照値の背景データから算出した基準値 |

1. 要約

ポリアルキル(C 1～1 8)[アミノアルキル (C 2～9)]シロキサンの染色体異常誘発性を、雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞を用い、短時間処理法の代謝活性化非存在下、代謝活性化存在下及び連続処理法 24 時間処理により検討した。

細胞増殖抑制試験において本被験物質は短時間処理法の代謝活性化存在下において 1000 µg/mL の用量で、再度実施した細胞増殖抑制試験において短時間処理法の代謝活性化非存在下及び連続処理法 24 時間処理において 500 µg/mL の用量で RPD が 50% 付近となる増殖抑制が認められた。染色体異常試験の用量段階は 1000 または 500 µg/mL を最高用量とした以下公比 1.5 または 1.2 の計 5 用量にて実施した。

染色体の観察は、染色体異常試験においてすべての処理条件にて RPD が 50% 以下となる増殖抑制が認められなかったことから、最高用量から連続した 3 用量で行った。また対照として、すべての処理条件に陰性対照及び陽性対照を設けた。その結果を以下に要約する。

1. 被験物質処理群の染色体の観察において、染色体の構造異常を有する細胞及び数的異常を有する細胞の出現頻度は 0.0～1.7% 及び 0.0～0.8% であり、いずれも背景データの陰性対照の変動範囲内であった。また、いずれの処理法においても陰性対照と比較して統計学的に有意な構造異常及び数的異常の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。
2. 陰性対照の染色体の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は、すべての処理条件において、背景データから算出した陰性対照の変動範囲内を示した。
3. 陽性対照の染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、すべての処理条件において背景データから算出した陽性対照の変動範囲内を示した。また、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を示した。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。

以上の結果より、本試験条件下において本被験物質は染色体異常誘発性を有しないと判定した。

2. 試験表題

ポリアルキル(C 1～1 8)[アミノアルキル (C 2～9)]シロキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験番号

17K5208G

4. 試験目的

ポリアルキル(C 1～1 8)[アミノアルキル (C 2～9)]シロキサンの染色体異常誘発性を、雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞を用いて検討した。

5. 試験委託者

厚生労働省

医薬・生活衛生局医薬品審査管理課 化学物質安全対策室

〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

TEL 03-5253-1111 FAX 03-3593-8913

6. 試験施設

シミックファーマサイエンス株式会社 シミックバイオリサーチセンター

〒408-0044 山梨県北杜市小淵沢町 10221 番地

TEL 0551-36-2455 FAX 0551-36-3895

7. 試験責任者

小川光英

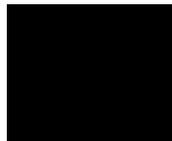
非臨床事業部, 研究本部, シミックファーマサイエンス株式会社

8. 担当責任者

試験操作

統計学的処理

被験物質管理

**9. 試験実施**

試験期間 2017年11月16日 ～ 2018年3月27日

試験開始日 2017年11月16日

実験開始日 2017年11月16日

実験終了日 2018年2月14日

細胞解凍日 2017年11月23日, 2018年1月11日

溶解性試験実施日 2017年11月30日

細胞増殖抑制試験

細胞播種日

2017年12月1日, 8日

被験物質処理日 2017年12月4日, 11日
毒性評価日 2017年12月5日, 12日

染色体異常試験
細胞播種日 2018年1月19日
被験物質処理日 2018年1月22日
標本作製日 2018年1月23, 24日
試験終了日 2018年3月27日

10. GLP及びガイドライン

遵守した 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」(薬食発 0331 第 8 号, 平成 23・03・29 製局第 6 号, 環企発第 110331010 号, 平成 23 年 3 月 31 日)

適用したガイドライン :

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発 0331 第 7 号, 平成 23・03・29 製局第 5 号, 環企発第 110331009 号, 平成 23 年 3 月 31 日, 薬生発 1221 第 1 号, 20151209 製局第 1 号, 環企発第 1512211 号, 平成 27 年 12 月 21 日による一部改正)

11. 試験関係資料の保存

保存場所： 当試験施設, 資料保存施設

保存資料： 試験計画書 (原本)

被験物質の受領, 廃棄, 管理に関する記録

被験物質の使用に関する記録

細胞の管理に関する記録

試験の実施に関する記録

最終報告書 (原本)

その他 GLP に規定される記録文書

保存期間： 試験終了後 10 年間保存

12. 被験物質及び対照物質

12.1. 被験物質

名称：ポリアルキル(C 1～1 8)[アミノアルキル (C 2～9)]シロキサン

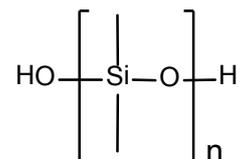
別名：Poly(dimethylsiloxane), hydroxy terminated

CAS 番号：70131-67-8

化審法官報公示整理番号：なし

示性式：HO[(CH₃)₂SiO]_nH

構造式：



ロット番号：MKCB2541V

製造元及び入手日 XXXXXXXXXX 2017年10月30日

使用量：870.08 mg

純度：不明（混合物としての被験物質純度 100%として試験を実施する）

不純物の名称及び濃度：不明

分子量：～550（平均）

常温における性状：無色液体

安定性：保管条件下で安定

溶解性：水に分散，ジメチルスルホキシドに不溶¹⁾

溶媒中での安定性：水及びジメチルスルホキシドに安定¹⁾

取扱い上の注意：なし

保存条件：密封，冷蔵（2～8℃）

保存場所：第3動物実験棟，検体調製室，低温保管庫（許容範囲：2～8℃）

保存期間：2017年10月30日～2018年1月22日

保存期間中の温度（実測値）：5～7℃

残余被験物質の管理：試験操作終了後，被験物質管理責任者に移管

1) 溶解性試験の結果による

12.2. 陰性対照物質

陰性対照物質は，被験物質液の調製に使用した下記の溶媒とした。

名称：日本薬局方注射用水

ロット番号：61101D（細胞増殖抑制試験），70201D（染色体異常試験）

供給元：扶桑薬品工業株式会社

12.3. 陽性対照物質

陽性対照物質は，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に汎用されている下記のものを使用した。

名称：Mitomycin C（以下 MMC と略す）

ロット番号：577AEE

供給元：協和発酵キリン株式会社

名称：Cyclophosphamide（以下 CP と略す）

ロット番号：4427

供給元：塩野義製薬株式会社

13. 被験物質液の調製

13.1. 溶媒

本被験物質の溶媒は、溶解性試験の結果より設定した。溶解性試験は、日本薬局方注射用水及びジメチルスルホキシド（以下 DMSO と略す）を溶媒に実施した。溶解性試験の調製濃度は、日本薬局方注射用水の場合は 20 mg/mL、DMSO の場合は 200 mg/mL とした。

所定量の被験物質を用時秤量した。これに 20 または 200 mg/mL の濃度になるよう各溶媒を加え、目視により発熱、発煙等の反応性の有無及び溶解性を確認した。その結果、本被験物質は日本薬局方注射用水に対し超音波処理により一様に分散し、培養液への添加でも一様に分散した。一方、DMSO に対しては超音波処理によっても一様に分散しなかった。また、被験物質と溶媒との反応性については、いずれの溶媒においても認められなかった。従って、本被験物質はこれらの溶媒に対して安定であると判断した。

以上の結果より、被験物質の溶媒は分散液が得られること、培養液への添加で分散したこと、また反応が認められず本被験物質が安定であると判断されることから日本薬局方注射用水とした。

13.2. 調製方法

調製時期：用時調製した。

純度換算：純度換算は行わなかった。

液量換算：秤量した被験物質の液量を添加する溶媒の液量から除いた。

調製方法：所定量の被験物質を秤量し、これに日本薬局方注射用水を加えて分散させ 20 mg/mL 液を調製した。低用量の被験物質液は、最高濃度の被験物質液を同様の日本薬局方注射用水を使用して段階希釈し調製した。使用後の残余被験物質液は、感染性廃棄物として廃棄した。

試験ごとの被験物質の秤量値、液量及び溶媒の添加量を下記に示す。

| 試験区分 | 秤量値(mg) | 液量(mL) | 添加量(mL) |
|-------------|---------|--------|---------|
| 細胞増殖抑制試験 | 141.23 | 0.150 | 6.912 |
| 細胞増殖抑制試験（再） | 139.43 | 0.150 | 6.822 |
| 染色体異常試験 | 482.54 | 0.500 | 23.627 |

14. 陽性対照物質の調製

陽性対照物質は、あらかじめ日本薬局方生理食塩液（Lot No. 60215D または Lot No. 7D261A、扶桑薬品工業株式会社）に MMC の場合は 5 µg/mL、CP の場合は 0.5 mg/mL の濃度で溶解させ

-80°Cに凍結保存したものを、用時に解凍して使用した。陽性対照物質液の培養液への添加量は1%の割合とし、処理濃度は、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に汎用されている下記の濃度とした。使用後の残余陽性対照物質液は、感染性廃棄物として廃棄した。

| 処 理 条 件 | 陽性対照物質 | 処理濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|---------------------------|--------|-------------------------------------|
| 短時間処理法の代謝活性化非存在下 | MMC | 0.05 |
| 短時間処理法の代謝活性化存在下 | CP | 5.0 |
| 連続処理法の代謝活性化非存在下 (24 時間処理) | MMC | 0.05 |

15. 使用細胞

試験には、自然発生の染色体異常発現率が低く、細胞の安定性及び再現性が良く、染色体が比較的大きく数も少なく（染色体数モード 25 本）、多くの化学物質に対して感受性が高く、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に汎用されている下記の細胞を使用した。

細胞：雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞

購入先：DS ファーマバイオメディカル株式会社

受領日：2017年8月22日

細胞周期：11.2 時間

マイコプラズマ：陰性

染色体数モード：25 本

継代数：21

16. 培養液及び培養条件

試験に使用した培養液の組成を、下記に示す。細胞は、60 mm プレートを用い 37°C、CO₂ 濃度 5%の炭酸ガス培養器 (BAN-111, タバイエスベック) で培養した。

| | |
|---|--------|
| Eagle の MEM 液体培地, Lot No. TWL7005, TWJ7025 (和光純薬工業株式会社) | 445 mL |
| ペニシリン (5000 units/mL) 及びストレプトマイシン (5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Lot No. 1864851, 1881461 (Gibco) | 5 mL |
| 牛胎児血清, 非働化済 Lot No. AZM197211 (Hyclone) | 50 mL |

17. S9 mix

17.1. S9

S9 は、オリエンタル酵母工業株式会社より購入した下記のラット肝 S9 を用いた。S9 は、使用するまで -80°C に保存した。

| | |
|-----------|---|
| 使用動物 | ラット：Sprague-Dawley系 |
| 性，週齢／体重範囲 | 雄，7週齢／204.4±8.2g |
| ロット番号 | 17080405 |
| 製造日 | 2017年8月4日 |
| 誘導物質 | Phenobarbital (PB) 及び 5,6-Benzoflavone (BF) |
| 投与量及び投与回数 | PB: 30 mg/kg 1回 (1日目) 60 mg/kg 3回 (2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3日目) |
| 投与方法 | 腹腔内投与 |
| 蛋白含量 | 19.8 mg/mL S9 |

17.2. コファクター溶液の調製

コファクターは、グルコース-6-リン酸 (G-6-P) 及び NADP (オリエンタル酵母工業株式会社) を使用した。所定量のコファクターを用時に秤量し、それぞれ日本薬局方注射用水に溶解して MgCl₂ 溶液、KCl 溶液及び HEPES 緩衝液 (pH 7.2) と下記の割合で混合し、濾過滅菌 (φ 0.22 μm, Millipore) した。調製したコファクター溶液は、使用するまで冷蔵下で保存した。

| | |
|------------------------------|------|
| 20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 7.2) | 2 mL |
| 50 mmol/L MgCl ₂ | 1 mL |
| 330 mmol/L KCl | 1 mL |
| 50 mmol/L G-6-P | 1 mL |
| 40 mmol/L NADP | 1 mL |
| 日本薬局方注射用水 | 1 mL |

17.3. S9 mixの調製

-80°C に凍結保存した S9 を用時に解凍し、コファクターと 3 : 7 の割合で混合し S9 mix とした。S9 mix 1 mL 中の組成を以下に示す。調製した S9 mix は、使用するまで冷蔵下で保存した。

| | |
|--------------------|---------|
| S9 | 0.3 mL |
| MgCl ₂ | 5 μmol |
| KCl | 33 μmol |
| G-6-P | 5 μmol |
| NADP | 4 μmol |
| HEPES 緩衝液 (pH 7.2) | 4 μmol |

18. 試験方法

18.1. 試験構成

試験は、細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験により実施し、染色体異常試験の用量段階は、細胞増殖抑制試験の結果より設定した。

細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験は、短時間処理法の代謝活性化非存在下、代謝活性化存在下及び連続処理法 24 時間処理により実施した。細胞増殖抑制試験では、被験物質処理の用量あたりのプレート数は 1 枚とし、対照として陰性対照を設けた。染色体異常試験では、被験物質処理の用量あたりのプレート数は 3 枚とし、2 枚を染色体標本の作製に、1 枚を細胞増殖率

の算出に用いた。対照として、すべての処理条件に陰性対照及び陽性対照を設けた。同日に他の試験を実施した場合は、陽性対照は共有した。陰性対照及び陽性対照のプレート数は、被験物質処理と同様とした。

18.2. 細胞増殖率

細胞増殖率は、被験物質処理開始時及び被験物質処理後の培養終了時の細胞数から算出する相対的細胞集団倍加指数 (RPD) とした。被験物質処理開始時の細胞数は、陰性対照、被験物質及び陽性対照とは異なる、被験物質処理開始時の細胞数測定用に用意した 1 プレートで計測した。

$$RPD = (\text{細胞集団倍加数 T} \div \text{細胞集団倍加数 C}) \times 100$$

細胞集団倍加数： $[\log(\text{培養終了時細胞数} \div \text{処理開始時細胞数})] / \log 2$

細胞集団倍加数 T：被験物質処理群の細胞集団倍加数

細胞集団倍加数 C：陰性対照の細胞集団倍加数

18.3. 細胞増殖抑制試験

18.3.1. 用量段階

細胞増殖抑制試験の用量段階は、2000 µg/mL を最高用量とした以下公比 2 の計 10 用量とした。陰性対照及び被験物質液の添加量は、培養液の 10% とした。

18.3.2. 被験物質処理

4×10^3 細胞/mL の細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養後、用意した細胞数計測用のプレートの細胞数を計測した。短時間処理法の代謝活性化非存在下では培養液を抜き取り 2.7 mL とし、これに被験物質液を 0.3 mL 添加した。短時間処理法の代謝活性化存在下では、培養液を抜き取り 2.2 mL とし、これに S9 mix 0.5 mL 及び被験物質液を 0.3 mL 添加した。被験物質添加後細胞を 6 時間培養し、6 時間後に細胞をダルベッコリン酸緩衝液 (pH 7.1) で洗い、新鮮な培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した後細胞数を計測した。連続処理法 24 時間処理では、培養液を 4.5 mL とした後に被験物質液を 0.5 mL 添加し、24 時間培養した後細胞数を計測した。被験物質の析出の有無は被験物質添加時及び培養終了時に観察し、培養終了時の観察を析出の評価とした。

18.3.3. 細胞増殖率の算出

0.1% EDTA-1.25% トリプシンで細胞を回収し、細胞数を計測した。得られた細胞数より、各用量の RPD を算出した。50% 以下の RPD が観察された場合は、50% の RPD を挟む 2 点間を結ぶ直線から概略の 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) を算出した。

18.4. 染色体異常試験

18.4.1. 用量段階

細胞増殖抑制試験の結果を表 1 に示した。

すべての処理条件において 2000 µg/mL の用量で被験物質の析出が認められた。また短時間処

理法の代謝活性化存在下において 1000 µg/mL の用量で RPD が 50% 付近となる増殖抑制が認められた。短時間処理法の代謝活性化非存在下及び連続処理法 24 時間処理では、500 µg/mL の用量で急激な細胞毒性が認められ、50% 付近の細胞毒性が予測できなかったため 500 µg/mL を最高用量に以下公比 1.2 の 5 用量にて再度細胞増殖抑制試験を実施した。

細胞増殖抑制試験（再試験）の結果を表 2 に示した。

短時間処理法の代謝活性化非存在下及び連続処理法 24 時間処理において 500 µg/mL の用量で RPD が 50% 付近となる増殖抑制が認められた。

以上の結果より染色体異常試験の用量段階は、短時間処理法の代謝活性化存在下では 1000 µg/mL を最高用量とした以下公比 1.5 の 5 用量、短時間処理法の代謝活性化非存在下及び連続処理法 24 時間処理では 500 µg/mL を最高用量とした以下公比 1.2 の 5 用量とした。

18.4.2. 試験操作

被験物質処理及び細胞増殖率の算出は、18.3.2. 項及び18.3.3. 項と同様に行った。

18.4.3. 染色体標本の作製

細胞の回収約 2 時間前に、コルセミド (Gibco) を 0.2 µg/mL の濃度で添加した。約 2 時間後 0.1% EDTA 添加 1.25% トリプシン処理で細胞を回収し、1000 rpm で 5 分間遠心して上清を取り除いた。0.075 mol/L 塩化カリウム液を加えて約 10 分低張処理し、カルノア固定液 (メタノール 3 : 酢酸 1) で固定した。固定した細胞をスライドガラス上に滴下し、空気乾燥させた。プレート当たり 2 枚の染色体標本作製した。スライドガラスには、プレート番号を記入し、乾燥後 2% ギムザ液で 20 分間染色した。

18.4.4. 観察対象

染色体の観察は、すべての処理条件において 50% を超える細胞増殖抑制が認められなかったことから、すべての処理条件において最高用量から連続した 3 用量で行った。

18.4.5. 染色体観察

染色体の観察は、乱数を用いたコード番号を付した盲検法で行った。また、染色体の観察は短時間処理法を先に、次に連続処理法の順で行った。染色体の構造異常は、1 プレート当たり 150 個、1 用量あたり 300 個の良く拡がった分裂中期細胞 (染色体数 : 23~27 本) を倍率 1000 倍の顕微鏡下で観察した。数的異常は、倍率 200 倍以上の顕微鏡下でプレートあたり 200 個、1 用量あたり 400 個を観察した。染色体異常の分類及び型を以下に示す。構造異常を持つ細胞は、ギャップのみを有する細胞を含めた場合 (+gap) と、含めない場合 (-gap) に区別して集計し、染色体観察結果の評価は、ギャップのみを有する細胞を含めない染色体異常を有する細胞の出現頻度 (-gap) により行った。

| 染色体異常の分類 | | 異常の型 |
|---------------------|---------|------------------------------|
| 構造異常 | 染色分体型異常 | 染色分体型切断 (ctb), 染色分体型交換 (cte) |
| | 染色体型異常 | 染色体型切断 (csb), 染色体型交換 (cse) |
| | その他の異常 | 断片化 (frg), 多数の異常 (mul) |
| 数的異常 (モード数が 38 本以上) | | 倍数体 (pol), 核内倍加 (end) |

18.5. 識別

プレートには、外側面に油性インキペンを用いてプレート番号を表示した。スライドグラスには試験番号、処理条件、プレート番号及び標本作製日を表示したラベルを貼付した。また、観察対象のスライドには、試験番号、処理条件、コード番号及び標本作製日を表示したラベルを貼付した。コード番号は、乱数 (Microsoft® Excel) を用いて無作為に割り付けた。

18.6. 統計学的処理

被験物質処理及び陽性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度について、用量ごとに Yates の補正を伴う χ^2 検定を使用し、陰性対照との差の有意性を有意水準片側 5% で解析した。被験物質処理については、用量反応性を Cochran-Armitage trend test (有意水準片側 5%, 陰性対照を含む) で解析した。

18.7. 試験の成立条件

下記の条件を満たしている場合に、試験は成立とした。

- 1) 陰性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度が、背景データの陰性対照 (添付資料) の変動範囲内にある。
- 2) 陽性対照の構造異常を有する細胞の出現頻度が、背景データの陽性対照 (添付資料) の変動範囲内にある。
- 3) 陽性対照の構造異常を有する細胞の出現頻度が、陰性対照と比較して統計学的に有意に増加している。
- 4) 被験物質処理において、分裂中期細胞 300 個を観察した用量が 3 用量以上ある。

18.8. 結果の評価

構造異常及び数的異常は、構造異常を有する細胞または倍数体の出現頻度が背景データの陰性対照の変動範囲を超え、かつ陰性対照と比較して統計学的に有意に増加し、その増加に用量依存性が認められた場合に陽性と判定した。構造異常を有する細胞または倍数体の出現頻度が背景データの陰性対照の変動範囲内で、かつ陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められず、用量反応性も認められない場合は陰性と判定した。

19. 試験結果及び考察

ポリアルキル(C 1 ~ 18)[アミノアルキル (C 2 ~ 9)]シロキサンの染色体異常誘発性を、雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞を用い、短時間処理法の代謝活性化非存在下、代謝活性化存在下及び連続処理法 24 時間処理により検討した。

本被験物質は、染色体異常試験においてすべての処理条件で RPD が 50% 以下となる増殖抑制が認められず、析出も観察されなかったことから、短時間処理法の代謝活性化存在下では 1000 $\mu\text{g/mL}$ を、短時間処理法の代謝活性化非存在下及び連続処理法 24 時間処理では 500 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とした 3 用量 (444, 667, 1000 $\mu\text{g/mL}$ または 347, 417, 500 $\mu\text{g/mL}$) にて染色体の観察を行った。またすべての処理条件に陰性対照及び陽性対照を設けた。染色体異常試験の細胞増殖率を表 3 に、染色体異常試験の結果を表 4, 5 及び図 1 に示す。

標本観察の結果、被験物質処理群の構造異常を有する細胞及び数的異常を有する細胞の出現頻度は0.0～1.7%及び0.0～0.8%であり、いずれも背景データの陰性対照の変動範囲内であった。また、いずれの処理法においても陰性対照と比較して統計学的に有意な構造異常及び数的異常の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

陰性対照の構造異常出現頻度は0.7～1.0%、数的異常出現頻度は0～0.5%を示し、いずれの処理条件においても背景データから算出した陰性対照の変動範囲内であった。陽性対照の構造異常出現頻度は、12.7～36.0%を示し、いずれの処理条件においても背景データの陽性対照の変動範囲内であった。また、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を示した。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。

20. 結論

ポリアルキル(C 1～18)[アミノアルキル (C 2～9)]シロキサンの雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

21. 試験の信頼性に影響をおよぼした要素

該当する事項はなかった。

表1 ポリアルキル (C1~18) [アミノアルキル (C2~9)] シロキサンの細胞増殖抑制試験

Study No. 17K5208G

| 用量 ($\mu\text{g/mL}$) | 短時間処理法 | | | | | | 連続処理法24時間処理 | | |
|----------------------------|---------------------------------|---------|--|---------------------------------|---------|--|---------------------------------|---------|--|
| | S9 mix (-) | | | S9 mix (+) | | | 細胞増加数 ($\times 10^4$ cells) | RPD (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) |
| | 細胞増加数 ($\times 10^4$ cells) | RPD (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | 細胞増加数 ($\times 10^4$ cells) | RPD (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
| 陰性対照 | 95.0 | 100 | 329 | 90.0 | 100 | 896 | 130.0 | 100 | 313 |
| 3.91 | 102.5 | 105.2 | | 88.8 | 99.1 | | 146.3 | 107.5 | |
| 7.81 | 100.0 | 103.5 | | 75.0 | 88.0 | | 116.3 | 93.2 | |
| 15.6 | 77.5 | 86.9 | | 80.0 | 92.2 | | 105.0 | 87.2 | |
| 31.3 | 102.5 | 105.2 | | 95.0 | 103.7 | | 90.0 | 78.6 | |
| 62.5 | 92.5 | 98.3 | | 60.0 | 74.8 | | 88.8 | 77.9 | |
| 125 | 77.5 | 86.9 | | 65.0 | 79.4 | | 88.8 | 77.9 | |
| 250 | 67.5 | 78.7 | | 66.3 | 80.5 | | 78.8 | 71.7 | |
| 500 | 3.8 | 6.1 | | 73.8 | 87.0 | | 3.8 | 4.9 | |
| 1000 | 0.0 | --- | | 30.0 | 43.0 | | 0.0 | --- | |
| 2000 # | 0.0 | --- | | 0.0 | --- | | 0.0 | --- | |

陰性対照: 日本薬局方注射用水

RPD: 相対的細胞集団倍加指数

#: 析出

表2 ポリアルキル(C1~18)[アミノアルキル(C2~9)]シロキサンの細胞増殖抑制試験(再試験)

Study No. 17K5208G

| 用量 ($\mu\text{g/mL}$) | 短時間処理法 | | | 連続処理法24時間処理 | | |
|----------------------------|---------------------------------|---------|--|---------------------------------|---------|--|
| | S9 mix (-) | | | | | |
| | 細胞増加数 ($\times 10^4$ cells) | RPD (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | 細胞増加数 ($\times 10^4$ cells) | RPD (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) |
| 陰性対照 | 126.3 | 100 | --- | 111.3 | 100 | --- |
| 241 | 88.8 | 79.7 | | 121.3 | 105.6 | |
| 289 | 92.5 | 81.9 | | 102.5 | 94.9 | |
| 347 | 72.5 | 69.3 | | 93.8 | 89.5 | |
| 417 | 113.8 | 93.7 | | 95.0 | 90.2 | |
| 500 | 51.3 | 53.7 | | 42.5 | 50.3 | |

陰性対照: 日本薬局方注射用水

RPD: 相対的細胞集団倍加指数

表3 ポリアルキル (C1~18) [アミノアルキル (C2~9)] シロキサンの染色体異常試験 (細胞増殖率)

Study No. 17K5208G

| 短時間処理法 | | | | | | | | 連続処理法24時間処理 | | | |
|----------------------------|---------------------------------|---------|--|----------------------------|---------------------------------|---------|--|----------------------------|---------------------------------|---------|--|
| S9 mix (-) | | | | S9 mix (+) | | | | | | | |
| 用量 ($\mu\text{g/mL}$) | 細胞増加数 ($\times 10^4$ cells) | RPD (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | 用量 ($\mu\text{g/mL}$) | 細胞増加数 ($\times 10^4$ cells) | RPD (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | 用量 ($\mu\text{g/mL}$) | 細胞増加数 ($\times 10^4$ cells) | RPD (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) |
| 陰性対照 | 96.3 | 100 | --- | 陰性対照 | 92.5 | 100 | --- | 陰性対照 | 123.8 | 100 | --- |
| 241 | 83.8 | 90.8 | | 198 | 85.0 | 94.3 | | 241 | 87.5 | 79.3 | |
| 289 | 57.5 | 68.9 | | 296 | 97.5 | 103.7 | | 289 | 83.8 | 77.0 | |
| 347 | 68.8 | 78.8 | | 444 | 71.3 | 83.1 | | 347 | 81.3 | 75.3 | |
| 417 | 53.8 | 65.5 | | 667 | 65.0 | 77.7 | | 417 | 70.0 | 67.6 | |
| 500 | 42.5 | 54.4 | | 1000 | 42.5 | 55.9 | | 500 | 51.3 | 53.4 | |

陰性対照: 日本薬局方注射用水

RPD: 相対的細胞集団倍加指数

表4 染色体異常試験の結果(短時間処理法)

被験物質の名称 ポリアルキル(C1~18)[アミノアルキル(C2~9)]シロキサン

Study No. 17K5208G

| 処理時間 (h) | S9 mix | 被験物質の 用量 (µg/mL) | 染色体構造異常の細胞数(出現頻度%) | | | | | | | | ギャップ の出現数 | 細胞増殖率 RPD(%) | 染色体の数的異常の細胞数(出現頻度%) | | | |
|-------------|--------|-------------------------|--------------------|--------|--------|-------|-------|-----|---------|-------|--------------|-----------------|---------------------|-----|-----------|---|
| | | | 観察細胞数 | 染色分体切断 | 染色分体交換 | 染色体切断 | 染色体交換 | その他 | 総異常数(%) | 観察細胞数 | | | 倍数体 | その他 | 総異常細胞数(%) | |
| 6-18 | - | 陰性対照 (日本薬局方 注射用水) | 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 150 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 200 | | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 合計 | 300 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0.7 | | 0 | 400 | 0 | 0 |
| 6-18 | - | 347 | 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 78.8 | 200 | 1 | 0 | 1 |
| | | | 150 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 200 | | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 合計 | 300 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0.7 | | 0 | 400 | 1 | 0 |
| 6-18 | - | 417 | 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 65.5 | 200 | 2 | 0 | 2 |
| | | | 150 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 200 | | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 合計 | 300 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0.7 | | 0 | 400 | 2 | 0 |
| 6-18 | - | 500 | 150 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 54.4 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 150 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 200 | | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 合計 | 300 | 3 | 1 | 3 | 0 | 0 | 4 | 1.3 | | 0 | 400 | 0 | 0 |
| 6-18 | - | 陽性対照 (MMC) 0.05 | 150 | 10 | 11 | 10 | 0 | 0 | 21 | 0 | 0 | 64.3 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 150 | 9 | 8 | 9 | 0 | 0 | 17 | 0 | 200 | | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 合計 | 300 | 19 | 19 | 19 | 0 | 0 | 38 | 12.7 * | | 0 | 400 | 0 | 0 |
| 6-18 | + | 陰性対照 (日本薬局方 注射用水) | 150 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 100 | 200 | 1 | 0 | 1 |
| | | | 150 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 200 | | 1 | 0 | 1 | |
| | | | 合計 | 300 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 1.0 | | 0 | 400 | 2 | 0 |
| 6-18 | + | 444 | 150 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 83.1 | 200 | 2 | 0 | 2 |
| | | | 150 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 200 | | 1 | 0 | 1 | |
| | | | 合計 | 300 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 1.0 | | 0 | 400 | 3 | 0 |
| 6-18 | + | 667 | 150 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 77.7 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 150 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 200 | | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 合計 | 300 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 4 | 1.3 | | 0 | 400 | 0 | 0 |
| 6-18 | + | 1000 | 150 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 55.9 | 200 | 1 | 1 | 2 |
| | | | 150 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 200 | | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 合計 | 300 | 4 | 1 | 4 | 0 | 0 | 5 | 1.7 | | 1 | 400 | 1 | 1 |
| 6-18 | + | 陽性対照 (CP) 5.0 | 150 | 11 | 51 | 11 | 0 | 0 | 55 | 0 | 2 | 74.3 | 200 | 1 | 0 | 1 |
| | | | 150 | 13 | 50 | 13 | 0 | 0 | 53 | 0 | 200 | | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 合計 | 300 | 24 | 101 | 24 | 0 | 0 | 108 | 36.0 * | | 2 | 400 | 1 | 0 |

陰性対照: 日本薬局方注射用水

RPD: 相対的細胞集団倍加指数

*: $p < 0.05$

表 5 染色体異常試験の結果(連続処理法)

被験物質の名称 ポリアルキル(C1~18)[アミノアルキル(C2~9)]シロキサン

Study No. 17K5208G

| 処理時間 (h) | 被験物質の 用量 (µg/mL) | 染色体構造異常の細胞数(出現頻度%) | | | | | | | ギャップ の出現数 | 細胞増殖率 RPD(%) | 染色体の数的異常の細胞数(出現頻度%) | | | | |
|-------------|-----------------------------|--------------------|--------|--------|-------|-------|-----|---------|--------------|-----------------|---------------------|-----|-----|-----------|---|
| | | 観察細胞数 | 染色分体切断 | 染色分体交換 | 染色体切断 | 染色体交換 | その他 | 総異常数(%) | | | 観察細胞数 | 倍数体 | その他 | 総異常細胞数(%) | |
| 24-0 | 陰性対照 (日本薬局 方 注射用水) | | 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 150 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | 合計 | 300 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | (0.7) | | 0 | 400 | 0 | 0 |
| 24-0 | 347 | | 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 75.3 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 200 | 1 | 0 | 1 |
| | | 合計 | 300 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | (0.0) | | 0 | 400 | 1 | 0 |
| 24-0 | 417 | | 150 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 67.6 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 150 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | 合計 | 300 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | (0.7) | | 0 | 400 | 0 | 0 |
| 24-0 | 500 | | 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53.4 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 150 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | 200 | 1 | 0 | 1 |
| | | 合計 | 300 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | (0.3) | | 0 | 400 | 1 | 0 |
| 24-0 | 陽性対照 (MMC) 0.05 | | 150 | 13 | 29 | 3 | 0 | 0 | 38 | 0 | 58.4 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 150 | 14 | 27 | 1 | 0 | 0 | 33 | 1 | | 200 | 0 | 0 | 0 |
| | | 合計 | 300 | 27 | 56 | 4 | 0 | 0 | 71 | (23.7) * | | 1 | 400 | 0 | 0 |

陰性対照: 日本薬局方注射用水

RPD: 相対的細胞集団倍加指数

MMC: Mitomycin C

*: $p < 0.05$

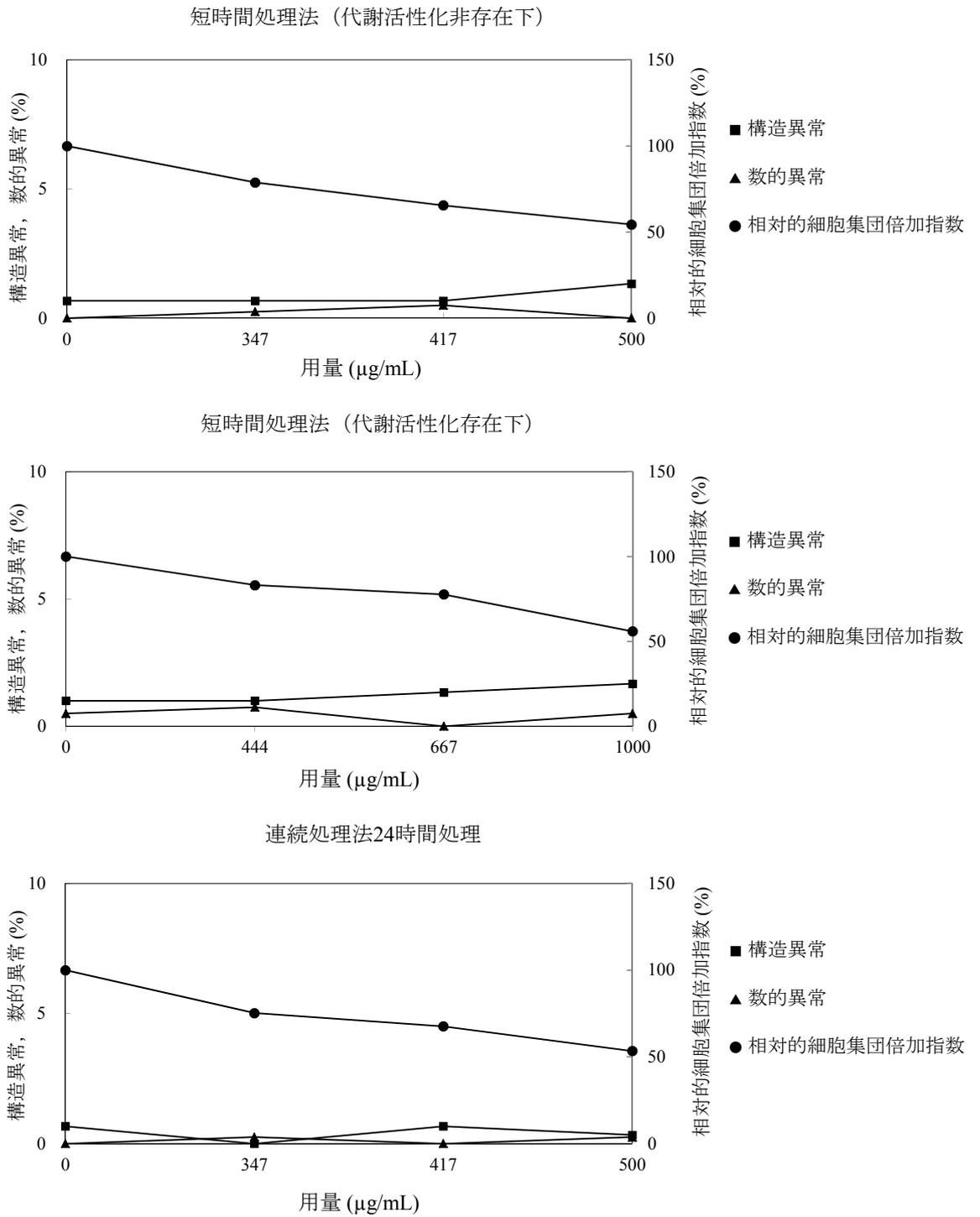


図1 ポリアルキル(C1~18)[アミノアルキル(C2~9)]シロキサン の染色体異常試験 (Study No. 17K5208G)

添付資料

陰性対照値及び陽性対照値の背景データから算出した基準値

データ集計期間: 2007年10月～2017年3月

構造異常出現頻度 (%)

| 処理方法 | 陽性対照物質 | 濃度 (µg/mL) | 背景データ | | | | 変動範囲(%) | |
|----------------------------|--------|---------------|-------|------|------|------|---------|-------------|
| | | | 試験数 | 最小値 | 最大値 | 平均値 | | 標準偏差 |
| 短時間処理法 (-S9 mix) | MMC | 0 | 100 | 0.0 | 2.5 | 0.9 | 0.6 | 0.0 ~ 2.1 |
| | | 0.05 | 73 | 11.0 | 59.0 | 23.0 | 8.3 | 6.4 ~ 39.6 |
| 短時間処理法 (+S9 mix) | CP | 0 | 129 | 0.0 | 2.5 | 0.7 | 0.6 | 0.0 ~ 1.9 |
| | | 5.0 | 97 | 16.0 | 59.5 | 31.9 | 8.8 | 14.3 ~ 49.5 |
| 連続処理 (-S9 mix) 24hrs | MMC | 0 | 119 | 0.0 | 2.5 | 0.9 | 0.6 | 0.0 ~ 2.1 |
| | | 0.05 | 63 | 19.3 | 68.0 | 32.2 | 9.3 | 13.6 ~ 50.8 |

数的異常出現頻度 (%)

| 処理方法 | 陽性対照物質 | 濃度 (µg/mL) | 背景データ | | | | 変動範囲(%) | |
|----------------------------|--------|---------------|-------|-----|-----|-----|---------|-----------|
| | | | 試験数 | 最小値 | 最大値 | 平均値 | | 標準偏差 |
| 短時間処理法 (-S9 mix) | MMC | 0 | 100 | 0.0 | 1.8 | 0.4 | 0.4 | 0.0 ~ 1.2 |
| | | 0.05 | 73 | 0.0 | 1.8 | 0.5 | 0.4 | 0.0 ~ 1.3 |
| 短時間処理法 (+S9 mix) | CP | 0 | 129 | 0.0 | 2.0 | 0.5 | 0.4 | 0.0 ~ 1.3 |
| | | 5.0 | 97 | 0.0 | 2.3 | 0.5 | 0.5 | 0.0 ~ 1.5 |
| 連続処理 (-S9 mix) 24hrs | MMC | 0 | 119 | 0.0 | 2.0 | 0.4 | 0.4 | 0.0 ~ 1.2 |
| | | 0.05 | 63 | 0.0 | 1.3 | 0.4 | 0.4 | 0.0 ~ 1.2 |

処理条件ごとに、平均値(M)、標準偏差(S.D.)を算出し、変動範囲(M±2S.D.)を設定した。
ただし、変動範囲の下限値が0以下になった場合は、最小値を下限値とした。

陽性対照 MMC : Mitomycin C , CP : Cyclophosphamide

信頼性保証陳述書

試験表題：ポリアルキル（C1～18）[アミノアルキル（C2～9）] シロキサンの
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：17K5208G

標記試験は下記 GLP を適用して実施され、最終報告書に試験の実施方法が正確に記載され、
かつ生データが正確に反映されていることを確認した。
信頼性保証部門による調査及び報告は、下表の日程で実施した。

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）

| 調査項目 | 調査日 | 試験責任者 報告日 | 運営管理者 報告日 |
|----------------|------------------|------------------|------------------|
| 試験計画書 | 2017 年 11 月 16 日 | 2017 年 11 月 16 日 | 2017 年 11 月 16 日 |
| 細胞解凍* | 2017 年 11 月 16 日 | 2017 年 11 月 24 日 | 2017 年 11 月 24 日 |
| 細胞播種 | 2017 年 12 月 1 日 | 2017 年 12 月 1 日 | 2017 年 12 月 1 日 |
| 被験物質の配布・秤量 | 2017 年 12 月 4 日 | 2017 年 12 月 4 日 | 2017 年 12 月 4 日 |
| 検体調製/検体添加・培養 | 2017 年 12 月 4 日 | 2017 年 12 月 4 日 | 2017 年 12 月 4 日 |
| 毒性評価/染色体標本作製 | 2018 年 1 月 23 日 | 2018 年 1 月 24 日 | 2018 年 1 月 24 日 |
| 染色体標本作製(コード化) | 2018 年 1 月 24 日 | 2018 年 1 月 24 日 | 2018 年 1 月 24 日 |
| 染色体標本観察 | 2018 年 2 月 6 日 | 2018 年 2 月 6 日 | 2018 年 2 月 6 日 |
| 報告書第 1 稿及び生データ | 2018 年 2 月 28 日 | 2018 年 2 月 28 日 | 2018 年 2 月 28 日 |
| 最終報告書 | 2018 年 3 月 27 日 | 2018 年 3 月 27 日 | 2018 年 3 月 27 日 |

*：プロセス調査

(信頼性保証部門責任者)

2018 年 3 月 27 日

シミックファーマサイエンス株式会社 シミックバイオリサーチセンター