最終報告書

N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドの

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 番地の

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-12-006
被験物質	N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド
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 5 日
実験開始日	2012 年 11 月 9 日
実験終了日	2013 年 2 月 25 日
試験終了日	試験責任者の捺印日
試資料保管場所	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 [redacted]

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。

2013 年 04 月 18 日

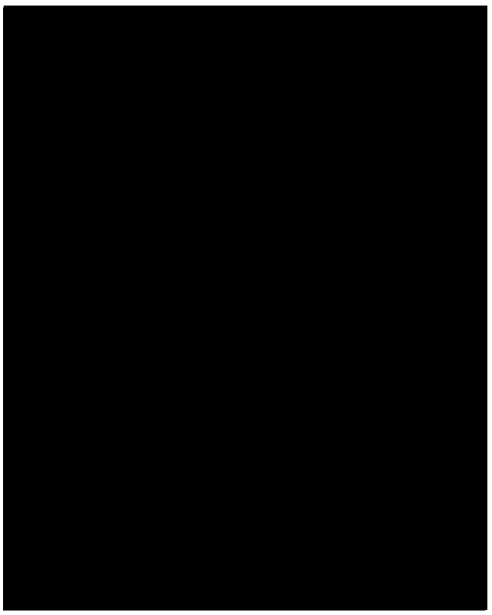
試験責任者 [redacted]

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 6
3. 細胞と培養条件 7
4. S9 反応液 7
5. 被験物質調製液の調製 7
6. 細胞増殖抑制試験 8
7. 染色体異常試験 9
8. 染色体分析 10
予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと 10
試験成績および考察 11
参考文献 12
Figure 13
Tables 14
Appendices 17

(最終ページ:21 ページ)

信頼性保証書

要約

N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドの 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、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 0.015 mg/mL および 0.050 mg/mL を、24 時間連続処理では 0.0029 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 1.5 で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:0.0013、0.0020、0.0029、0.0044、0.0066、0.0099、0.015 mg/mL
S9 mix 存在下の短時間処理:0.0044、0.0066、0.0099、0.015、0.022、0.033、0.050 mg/mL
24 時間連続処理:0.00026、0.00039、0.00058、0.00087、0.0013、0.0020、0.0029 mg/mL

なお、肉眼観察の結果、すべての被験物質処理群の最高処理濃度で処理終了時にのみ培養液中に沈殿が認められた以外は、培養液中に沈殿は認められなかった。

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:0.0029、0.0044、0.0066 mg/mL
S9 mix 存在下の短時間処理:0.0099、0.015、0.022 mg/mL
24 時間連続処理:0.00087、0.0013、0.0020 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非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。一方、S9 mix 存在下の短時間処理では中濃度群および高濃度群でのみ構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加(出現率:4.5%および 8.0%)が認められ、傾向性検定についても有意差が認められた。また、倍数性細胞については、中濃度群でのみ統計学的に有意な増加(出現率:1.5%)が認められたが、傾向性検定では有意差は認められなかった。

S9 mix 存在下の短時間処理について D_{20} 値を求めたところ、構造異常については 0.057 mg/mL となった。一方、倍数性細胞については最高濃度の 10 倍以上となり対象外となった。

以上の結果より、N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドは本試験条件下で CHL/IU 細胞に弱いながらも染色体異常を誘発すると結論した。

試験目的

N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド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。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質であるN-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド(化学名(別名):N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]ステアラミド、ステアリン酸ジメチルアミノプロピルアミド]、英名:N-[3-(dimethylamino)propyl]stearamide、IUPAC名:N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]オクタデカンアミド、略称:N-DPS、CAS No.:7651-02-7、分子式:$C_{23}H_{48}N_2O$、分子量:368.64、ロット番号:TLH9065、含量:98.6%、Appendix 1]は白色の結晶性粉末である。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室温(実測値:18.0～24.3℃)で保管した。

被験物質原体の安定性については、当該試験において、室温保管した被験物質を用いて実験開始前(測定日:2012年10月29日)および実験終了後(測定日:2013年3月5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:R-12-004)。

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℃)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 7 代(細胞増殖抑制試験、1 回目)、2 代(細胞増殖抑制試験、2 回目)、7 代(細胞増殖抑制試験、3 回目)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 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、CO_2 インキュベーター(5%CO_2、37 ℃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 ℃、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%$NaHCO_3$ 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 日製造および RAA-658、2012 年 11 月 1 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℃)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℃)に保管し、使用時(調製後 6 ヶ月以内に使用)はこれに S9、$MgCl_2$ および HEPES(pH 7.2)を加え、S9 mix とした。試験には 10%CS/MEM:S9 mix を 22:5 の割合で混和した S9 反応液を用いた(各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-$NADP^-$、0.83 mmol/L $MgCl_2$、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、ジメチルスルホキシドおよびアセトンのいずれにも溶解しないが、水での懸濁性が良好であったことから、媒体として日局注射用水(ロット番号:C23VS1、光製薬)を用いた。

被験物質を秤量したのち、媒体(日局注射用水)を加えて原液 [細胞増殖抑制試験(1 回目):3.7 mg/mL、細胞増殖抑制試験(2 回目):1.0 mg/mL、細胞増殖抑制試験(3 回目):0.10 mg/mL、染色体異常試験:0.50 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 10 vol%添加して処理を行った。

なお、細胞増殖抑制試験(1 回目)において、37 mg/mL の原液を調製する計画であったが、誤って 1/10 の濃度の 3.7 mg/mL を調製したことから、被験物質調製液の濃度がすべて試験計画書に記載された濃度の 1/10 となった。

実際に調製した被験物質調製液の濃度を次頁に示す。

[細胞増殖抑制試験(1 回目)]

0.058、0.12、0.23、0.46、0.93、1.9、3.7 mg/mL(公比 2)

[細胞増殖抑制試験(2 回目)]

0.031、0.063、0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL(公比 2)

[細胞増殖抑制試験(3 回目)]

0.0016、0.0031、0.0063、0.013、0.025、0.050、0.10 mg/mL(公比 2)

[染色体異常試験]

0.0026、0.0039、0.0058、0.0087、0.013、0.020、0.029、0.044、0.066、0.099、0.15、0.22、0.33、0.50 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。

被験物質の媒体中での安定性については、秦野研究所において冷蔵、遮光下で保管した 0.1、1 および 60 mg/mL の濃度の調製液について、調製後 8 日間の安定性試験を実施した結果、1 および 60 mg/mL については調製後 8 日間安定であることを確認したが、0.1 mg/mL の濃度については調製後 8 日間の安定性が確認できなかった(試験番号:R-12-004)。そこで、当該試験において冷蔵、遮光下で保管(保管温度:4.5～12.1℃)した 0.1 mg/mL および 0.2 mg/mL の濃度の調製液について調製後 4 時間の安定性試験を実施した。その結果、0.1 mg/mL の調製液については調製直後および調製 4 時間後の平均含量が 81.4%および 89.6 %、各測定値のばらつきが 98.7～101.0%、平均残存率は 110.1%となり、試験計画書に記載した許容基準(調製直後および保管後の平均含量が、それぞれ調製濃度の 85.0～115.0%、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0～110.0%以内、調製直後の平均測定値に対する保管後の残存率の平均値が 90.0%以上)の範囲外となった。一方、0.2 mg/mL 溶液については調製直後および調製 4 時間後の平均含量が 92.9%および 101.8%、各測定値のばらつきは 96.6%～103.6%、平均残存率は 109.6%となり、許容基準の範囲内となり、調製後 4 時間の安定性が確認された。

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、0.37 mg/mL を最高処理濃度とする 7 濃度群(0.0058～0.37 mg/mL、公比 2)を設定して細胞増殖抑制試験(1 回目)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(2.7 mL/ディッシュ)した後、媒体(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 10 vol%添加(300 μL/ディッシュ)し 6 時間処理した。処理後、MEM(血清不含)で洗浄し、10%CS/MEM(5 mL/ディッシュ)でさらに 18 時間培養した。連続処理する場合は各ディッシュの培養液を

10%CS/MEM と交換(4.5 mL/ディッシュ)した後、媒体(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 10 vol%添加(500 μL/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。

上記濃度を設定し細胞増殖抑制試験(1 回目)を行った結果、すべての処理条件において設定した最低濃度(0.0058 mg/mL)で 50%未満の細胞増殖率となったことから、6 濃度群(0.0031～0.10 mg/mL、公比 2)を設定して、細胞増殖抑制試験(2 回目)を行った。

24 時間連続処理については、2 回目の細胞増殖抑制試験においても設定した最低濃度(0.0031 mg/mL)で 50%未満の細胞増殖率となったことから、7 濃度群(0.00016～0.010 mg/mL、公比 2)を再設定して、細胞増殖抑制試験(3 回目)を行った。

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 S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 0.015 mg/mL および 0.050 mg/mL、24 時間連続処理では 0.0029 mg/mL を最高濃度とし、公比 1.5 で 7 濃度群を設定した。さらに媒体(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、媒体ないし被験物質調製液の代わりに日局注射用水を 10 vol%加えたのち、MMC(20 μg/mL)を、S9 mix 非存在下の短時間処理では 15 μL/ディッシュ(最終濃度:0.1 μg/mL)、連続処理では 12.5 μL/ディッシュ(最終濃度:0.05 μg/mL)添加した。S9 mix 存在下の短時間処理では CP (1 mg/mL) を 30 μL/ディッシュ(最終濃度:10 μg/mL)添加した。なお、MMC および CP はこれらの濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。また、陰性対照群および被験物質処理群については、処理開始時および処理終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 μg/mL になるように添加した。培養終了後、培養液を捨て 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。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 枚のスライド標本を作製した。

作製したスライド標本を 70 vol%メタノールに軽く浸漬したのち 3 vol%ギムザ液(pH 6.8 の 1/15 mol/L リ

ン酸緩衝液で希釈調製)で8分染色後、水道水ですすいで風乾した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立って、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、その用量依存性に関して、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

試験計画書では 37.0 mg/mL の被験物質調製原液を調製し、細胞増殖抑制試験を実施する計画であったが、秤量値を誤り、原液の濃度が 3.7 mg/mL の原液を調製したことから、被験物質調製液の濃度が試験計画書に記載された最終濃度の 1/10 の濃度(0.0058～0.37 mg/mL)で細胞増殖抑制試験を実施した。しかしながら、処理した最低濃度(0.0058 mg/mL)で強い細胞毒性が認められたことから、その結果をもとに、細胞増殖抑制試験(2 回目および 3 回目)を実施し、それらの試験結果をもとに染色体異常試験の処理濃度を設定していることから、試験結果への影響は無いと判断した。

その他本試験期間中に、「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(1 回目、設定濃度:0.0058～0.37 mg/mL、公比 2)の結果、最低濃度(0.0058 mg/mL)においても細胞増殖率が 50%未満となった。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。

以上の結果より、すべての試験条件について細胞増殖抑制試験(2 回目、設定濃度:0.0031～0.10 mg/mL、公比 2)を実施した結果、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ 0.0070 mg/mL および 0.027 mg/mL と推定された。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 0.050 mg/mL 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められ、処理終了時では S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では 0.050 mg/mL 以上の濃度で、S9 mix 存在下の短時間処理では 0.025 mg/mL 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められた。

24 時間連続処理については、細胞増殖抑制試験(2 回目)においても設定した最低濃度(0.0031 mg/mL)で細胞増殖率が 50%未満となったことから、細胞増殖抑制試験(3 回目、設定濃度:0.00016～0.010 mg/mL、公比 2)を実施した。その結果、50%細胞増殖抑制濃度は 0.0019 mg/mL と推定された。なお、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は認められなかった。

以上の結果より、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理については 50%増殖抑制濃度の約 2 倍の濃度(それぞれ 0.015 mg/mL および 0.050 mg/mL)を、24 時間連続処理では 50%増殖抑制濃度の約 1.5 倍の濃度(0.0029 mg/mL)を最高処理濃度とし、公比 1.5 で下記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:0.0013、0.0020、0.0029、0.0044、0.0066、0.0099、0.015 mg/mL
S9 mix 存在下の短時間処理:0.0044、0.0066、0.0099、0.015、0.022、0.033、0.050 mg/mL
24 時間連続処理:0.00026、0.00039、0.00058、0.00087、0.0013、0.0020、0.0029 mg/mL

なお、肉眼観察の結果、すべての被験物質処理群の最高処理濃度で処理終了時にのみ培養液中に沈殿が認められた以外は、培養液中に沈殿は認められなかった。

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、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:0.0029、0.0044、0.0066 mg/mL
S9 mix 存在下の短時間処理:0.0099、0.015、0.022 mg/mL
24 時間連続処理:0.00087、0.0013、0.0020 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下の短時間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(Table 1)。

S9 mix 存在下の短時間処理では中濃度群(0.015 mg/mL)および高濃度群(0.022 mg/mL)で構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加(出現率:それぞれ 4.5%および 8.0%)が認められ、傾向性検定においても有意差が認められた(Table 2)。また、倍数性細胞については中濃度群(0.015 mg/mL)で統計学的に有意な増加(出現率:1.5%)が認められたが、傾向性検定において有意差は認められなかった。なお、中濃度群(0.015 mg/mL)および高濃度群(0.022 mg/mL)で核内倍加が認められた。

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(Table 3)。なお、高濃度群(0.0020 mg/mL)については、細胞毒性のため、規定の細胞数を分析出来なかった。

陽性の結果となった S9 mix 存在下の短時間処理について D_{20} 値を求めたところ、構造異常については 0.057 mg/mL となった。一方、倍数性細胞については、1.2 mg/mL となり最高濃度の 10 倍以上であり、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)。

N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドは、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-12－017)では陰性の結果が得られている。

以上の結果より、N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドは、本試験条件下で CHL/IU 細胞に弱いながらも染色体異常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)

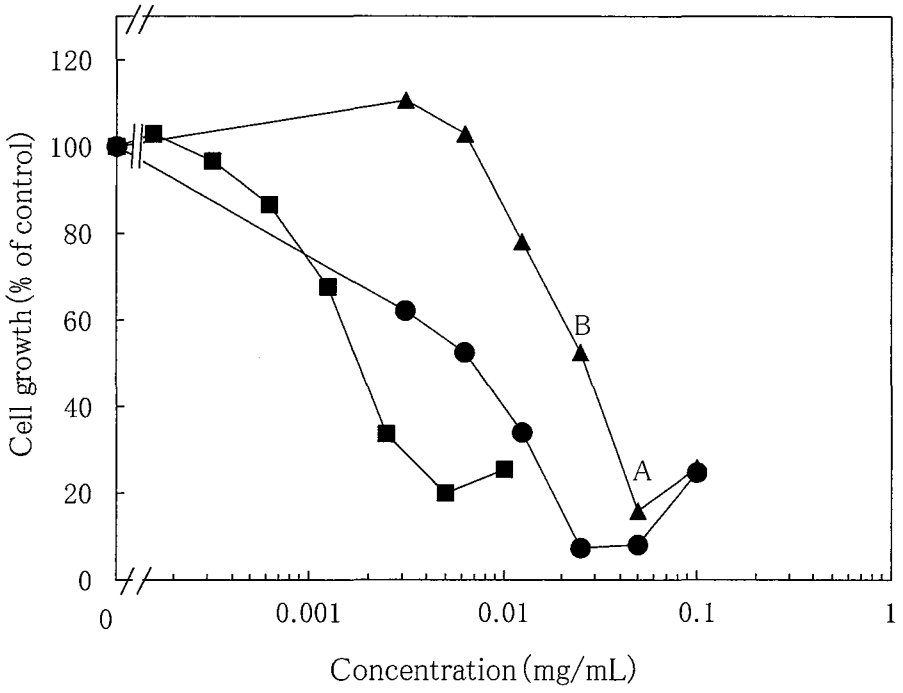


Figure 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with N-[3-(dimethylamino) propyl] stearamide.

●: 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, in the short-term treatment without S9 mix, precipitation was observed at 0.050 mg/mL (A) or more at the beginning and the end of the treatment in the medium. In the short-term treatment with S9 mix, precipitation was observed at 0.050 mg/mL or more at the beginning of the treatment and at 0.025 mg/mL (B) at the end of the treatment in the medium.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with N-[3- (dimethylamino)propyl] stearamide (N-DPS) 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 [4] gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total	Others [5]	Number of cells with aberrations +gap (%)	-gap (%)	Number [6] of polyploid cells (%)	Trend test [7] -gap	POL
Negative [1]	0	−	6 - (18)	100	NA	100	4	3	0	0	0	0	7	1	6 (6.0)	3 (3.0)	3 (0.8)		
						100	2	4	1	1	0	0	8	6	8 (8.0)	6 (6.0)	1 (0.3)		
						200	6	7	1	1	0	0	15	7	14 (7.0)	9 (4.5)	4 (0.5)		
N-DPS	0.0013	−	6 - (18)	87	NA	not observed													
N-DPS	0.0020	−	6 - (18)	76	NA	not observed													
N-DPS	0.0029	−	6 - (18)	68	NA	100	1	7	1	0	0	0	9	1	8 (8.0)	7 (7.0)	0 (0.0)		
						100	1	3	2	4	0	0	10	0	7 (7.0)	6 (6.0)	1 (0.3)		
						200	2	10	3	4	0	0	19	1	15 (7.5)	13 (6.5)	1 (0.1)		
N-DPS	0.0044	−	6 - (18)	56	NA	100	0	3	1	1	0	0	5	0	5 (5.0)	5 (5.0)	0 (0.0)		
						100	2	3	0	0	0	0	5	0	5 (5.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
						200	2	6	1	1	0	0	10	0	10 (5.0)	8 (4.0)	0 (0.0)	NA	NA
N-DPS	0.0066	−	6 - (18)	47	5.8, 5.2	100	3	4	2	0	0	0	9	0	8 (8.0)	5 (5.0)	1 (0.3)		
						100	0	6	1	0	1	0	8	0	8 (8.0)	8 (8.0)	1 (0.3)		
						200	3	10	3	0	1	0	17	0	16 (8.0)	13 (6.5)	2 (0.3)		
N-DPS	0.0099	−	6 - (18)	46	2.2, 1.4	not observed due to the small number of metaphases													
N-DPS	0.015	−	6 - (18)	28	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
MMC	0.1 μg/mL	−	6 - (18)	NA	NA	100	1	27	46	5	0	0	79	0	49 (49.0)	49 (49.0)	0 (0.0)		
						100	7	31	44	1	0	0	83	0	51 (51.0)	49 (49.0)	2 (0.5)		
						200	8	58	90	6	0	0	162	0	100 (50.0)	98 *(49.0)	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; Tox, cytotoxicity.

1) Distilled water for injection JP was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% per 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.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with N-[3- (dimethylamino)propyl] stearamide (N-DPS) for 6hours 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	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.1)		
N-DPS	0.0044	+	6 - (18)	91	NA	not observed													
N-DPS	0.0066	+	6 - (18)	81	NA	not observed													
N-DPS	0.0099	+	6 - (18)	57	NA	100	2	0	0	1	0	0	3	0	3 (3.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.3)		
						200	2	0	0	1	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	6 (0.8)		
N-DPS	0.015	+	6 - (18)	44	NA	100	0	5	2	0	0	0	7	0	7 (7.0)	7 (7.0)	3 (0.8) #		
						100	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	9 (2.3) #	+	−
						200	1	6	3	0	0	0	10	0	10 (5.0)	9 *(4.5)	12 *(1.5)		
N-DPS	0.022	+	6 - (18)	43	8.0, 4.6	100	1	3	0	0	1	0	5	1	5 (5.0)	4 (4.0)	2 (0.5) #		
						100	3	10	4	0	0	0	17	0	15 (15.0)	12 (12.0)	0 (0.0)		
						200	4	13	4	0	1	0	22	1	20 (10.0)	16 *(8.0)	2 (0.3)		
N-DPS	0.033	+	6 - (18)	23	0.2, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
N-DPS	0.050	+	6 - (18)	10	NA, NA	not made chromosome specimen													
CP	10 μg/mL	+	6 - (18)	NA	NA	100	6	44	61	3	1	0	115	0	66 (66.0)	63 (63.0)	0 (0.0)		
						100	3	25	74	0	0	0	102	0	58 (58.0)	56 (56.0)	0 (0.0)		
						200	9	69	135	3	1	0	217	0	124 (62.0)	119 *(59.5)	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; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Distilled water for injection JP was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% per 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.

#, An endreduplicated cells was observed.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with N-[3- (dimethylamino)propyl] stearamide (N-DPS) 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	1	1	0	1	0	0	3	1	3 (3.0)	2 (2.0)	1 (0.3)		
					100	1	3	0	2	1	0	7	1	6 (6.0)	5 (5.0)	0 (0.0)		
					200	2	4	0	3	1	0	10	2	9 (4.5)	7 (3.5)	1 (0.1)		
N-DPS	0.00026	24	89	NA	not observed													
N-DPS	0.00039	24	88	NA	not observed													
N-DPS	0.00058	24	80	NA	not observed													
N-DPS	0.00087	24	77	NA	100	0	4	0	2	1	0	7	0	7 (7.0)	7 (7.0)	1 (0.3)		
					100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
					200	1	5	0	2	1	0	9	0	9 (4.5)	8 (4.0)	1 (0.1)		
N-DPS	0.0013	24	64	NA	100	2	2	2	0	0	0	6	1	6 (6.0)	4 (4.0)	0 (0.0)		
					100	0	3	1	0	0	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	1 (0.3)	NA	NA
					200	2	5	3	0	0	0	10	1	10 (5.0)	8 (4.0)	1 (0.1)		
N-DPS	0.0020	24	59	2.0, 2.8	100	1	1	0	3	0	0	5	0	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)		
					100	0	9	1	0	0	10	20	0	10 (10.0)	10 (10.0)	0 (0.0)		
					200	1	10	1	3	0	10	25	0	15 (7.5)	14 (7.0)	0 (0.0) [8]		
N-DPS	0.0029	24	26	0.0, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
MMC	0.05 μg/mL	24	NA	NA	100	4	29	31	3	0	0	67	0	48 (48.0)	47 (47.0)	1 (0.3)		
					100	3	20	20	3	0	10	56	1	34 (34.0)	33 (33.0)	2 (0.5)		
					200	7	49	51	6	0	10	123	1	82 (41.0)	80 *(40.0)	3 (0.4)		

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; Tox, cytotoxicity.

1) Distilled water for injection JP was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% per 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). 8) Seven hundred and twenty-nine cells were analyzed.

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

Appendix 1

試験成績書

財団法人　食品薬品安全センター　御中

2012年9月24日
和光純薬工業株式会社

品　名　N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]ステアラミド

Code No.　287-15921
Lot No.　TLH9065
数　量　1kg

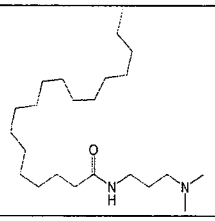
試験項目	測定値	品質目標
外観	白色の結晶性粉末	白色～うすい黄色、結晶性粉末～粉末
ジクロロメタン溶液	澄明	試験適合(ほとんど澄明以内)
水分	0.32%	実測値報告
含量(キャピラリーカラムGC)	98.6%	95.0%以上
定性(IR)	測定	試験適合
定性(^{1}H-NMR)	試験適合	試験適合
定性(LC/MS)	試験適合	試験適合
試験年月日	2012/09/24	

＊上記の通り御報告申し上げます。

試験責任者 [redacted]

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)	N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]オクタデカンアミド		
別名	N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド、 N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]ステアラミド、 ステアリン酸ジメチルアミノプロピルアミド、 N-[3- (Dimethylamino) propyl]stearamide、N-[3-(dimethylamino)propyl]octadecanamide		
CAS番号	7651-02-7		
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	368.64		
試験に供した新規化学物質の純度（%）	98.6%		
試験に供した新規化学物質のロット番号	TLH9065		
不純物の名称及び含有率	水分0.32%		
蒸気圧	――――		
対水溶解度	不溶		
1-オクタノール／水分配係数	――――		
融点	――――		
沸点	――――		
常温における性状	白色の結晶性粉末		
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	53.1 mg/mLで不溶	53.1 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。冷蔵、遮光下で保管した1 mg/mLおよび60 mg/mLの濃度の試験液について調製後8日間、0.2 mg/mLの濃度の試験液について調製後4時間の安定性を確認した(試験番号:R-12-004およびG-12-006)。
	DMSO	377.9 mg/mLで不溶	377.9 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	377.2 mg/mLで不溶	377.2 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。

Appendix 3

投与検体中の被験物質濃度測定法

① 試薬

蒸留水(HPLC 用)	和光純薬工業(ロット番号:TLL2668)
メタノール(HPLC 用)	和光純薬工業(ロット番号:TLE2233)
アセトン(HPLC 用)	和光純薬工業(ロット番号:TLL2122)
過塩素酸ナトリウム一水和物(試薬特級)	和光純薬工業(ロット番号:MPN7444)
りん酸(試薬特級)	和光純薬工業(ロット番号:LAH0238)
中性りん酸塩 pH 標準液第 2 種(pH 6.86、25°C)	和光純薬工業(ロット番号:TLN5872)
フタル酸塩 pH 標準液第 2 種(pH 4.01、25°C)	和光純薬工業(ロット番号:TLR2376)

② 試液の調製(代表例)

1) 移動相

過塩素酸ナトリウム一水和物 7.02307g に蒸留水を加えて 50 mL とした(1 mol/L 過塩素酸ナトリウム溶液)。1 mol/L 過塩素酸ナトリウム溶液及びメタノールを 1:9 (v/v)の割合(採取量:1 mol/L 過塩素酸ナトリウム 50 mL およびメタノール 450 mL)で混合した後、りん酸を加えて pH 2.51 に調整した。

2) 希釈液

アセトン及びメタノールを 1:1 (v/v)の割合(採取量:アセトン、メタノール共に 200 mL)で混合した。

③ 使用機器

電子天秤(R200D)	ザルトリウス
カスタニーLAB pH メーター(F-22)	堀場製作所
高速液体クロマトグラフ(HPLC)システム	島津製作所

主要構成: LC-10AD VP(ポンプ)、SIL-10AD VP(オートインジェクタ)、CTO-10AC VP(カラムオーブン)、SPD-10A VP(検出器)、SCL-10A VP(システムコントローラ)、DGU-20A_3(デガッサ)、C-R7A plus(データ処理装置)

④ 標準溶液の調製

被験物質約 50 mg を精密に量り、希釈液に溶解して正確に 50 mL とした。この液 2 mL を正確にとり、希釈液を加えて正確に 20 mL として、標準原液(約 100 μg/mL)とした。この標準原液 1、2、3 および 4 mL を正確にとり、希釈液を加えてそれぞれ正確に 10 mL とし、標準溶液(約 10、20、30 および 40 μg/mL、各濃度 n=1)を調製した。

⑤ 試料溶液の調製

投与検体の 1 mL を正確にとり、希釈液で適宜希釈し、試料溶液(約 20 μg/mL)を調製した。試料溶液は、投与検体の採取から n=3 で調製した。

⑥ 検量線の作成および被験物質調製液中被験物質濃度の算出

試料溶液および標準溶液を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。標準溶液は n=2 で測定し、得られた N-DPS のピーク面積と調製濃度を基に、最小二乗法により検量線を作成した。試料溶液は、各 n=1 で測定し、得られた N-DPS のピーク面積から、先の検量線を用いて、試料溶液中の N-DPS の濃度を求めた。さらに、希釈係数を乗じて投与検体中の N-DPS 濃度を算出し、調製濃度に対する割合(含量、%)および各測定濃度の平均値に対するばらつき(%)を算出した。

⑦ HPLC 測定条件

検出器　紫外分光光度計(測定波長 210 nm)

分析カラム　　CAPCELL PAK C18 MG II(内径 4.6 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 μm、資生堂)
移動相　1 mol/L 過塩素酸ナトリウム溶液/メタノール混液(1:9 v/v)、pH 2.51
流量　　0.7 mL/min
カラム設定温度　50°C
試料設定温度　　室温
試料注入量　　20 μL
オートインジェクタ洗浄液　メタノール
システムの適合性 標準溶液(約 20 μg/mL)を使用し、SOP/CHE/001 に従って行った。

⑧ 数値の取り扱い

被験物質の秤量:有効数字 3 桁以上

標準物質の秤量:有効数字 4 桁以上

投与検体の濃度:有効数字 3 桁(有効数字 4 桁目を四捨五入)

標準溶液の濃度:有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の濃度およびそれらの平均値:有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の含量(%)、ばらつき(%)、および残存率(%)ならびにそれらの平均値:
小数点以下第 1 位(小数点以下第 2 位を四捨五入)

Appendix 4

安定性試験結果

試験番号	G - 12 - 006

被験(対照)物質：N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド
ロット番号：TLH9065
媒体：日局注射用水

調製年月日　：2012年12月26日
測定年月日 A：2012年12月26日(調製直後)
B：2012年12月26日(調製後 4 時間)
保管条件：冷蔵、遮光

調製濃度	A				B				
(mg/mL)	試料番号	測定濃度 (mg/mL)	含量 a) (%)	ばらつき b) (%)	試料番号	測定濃度 (mg/mL)	含量 a) (%)	ばらつき b) (%)	残存率 c) (%)
0.100	1	0.08164	81.6	100.3	7	0.09051	90.5	101.0	111.2
	2	0.08202	82.0	100.8	8	0.08987	89.9	100.3	110.4
	3	0.08055	80.6	99.0	9	0.08847	88.5	98.7	108.7
	平均	0.08140	81.4		平均	0.08961	89.6		110.1
0.200	4	0.1840	92.0	99.0	10	0.2109	105.5	103.6	113.5
	5	0.1909	95.5	102.7	11	0.2034	101.7	99.9	109.5
	6	0.1826	91.3	98.3	12	0.1966	98.3	96.6	105.8
	平均	0.1858	92.9		平均	0.2036	101.8		109.6

a)：各測定時の測定濃度／調製濃度×100　　b)：各測定時の測定濃度／各測定時の平均測定濃度×100
c)：各測定時の測定濃度／初回の平均測定濃度×100

安定性の判定基準(懸濁液検体)
各試料採取時点の平均含量がそれぞれ調製濃度の85.0～115.0%、また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の90.0～110.0%以内であり、かつ、初回の測定平均値に対する各保管期間後の測定値の比(残存率)の平均値が90.0%以上を示す期間とする

信頼性保証書

表題　　N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドのチャイニーズ・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-12-006

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11月 5日	2012年11月 5日
試験計画書変更書		
G-12-006-No.1	2012年11月20日	2012年11月20日
G-12-006-No.2	2012年12月 6日	2012年12月 6日
G-12-006-No.3	2012年12月19日	2012年12月19日
G-12-006-No.4	2013年 1月29日	2013年 1月29日
G-12-006-No.5	2013年 4月 1日	2013年 4月 1日
被験物質調製液の調製および媒体中での安定性試験	2012年12月26日	2012年12月26日
被験物質調製液の調製および細胞処理	2013年 1月10日	2013年 1月10日
標本観察	2013年 2月 1日	2013年 2月 1日
報告書草案および生データ	2013年 4月1、3、4日	2013年 4月 4日
最終報告書	2013年 4月17、18日	2013年 4月18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、環保企発第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 4月18日

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

信頼性保証部門責任者 [redacted]