

最終報告書

テルピネオールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号:T-G059

試験期間: 2012年10月4日-2013年3月22日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

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 〒100-8916 東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

> 株式会社ボゾリサーチセンター 〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. GLP 陳述書

試験番号 : T-G059

試験表題: テルピネオールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

• 「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、薬食発0331第8号、平成23·03·29製局第6号、 環保企発第 110331010 号)

2013 年 3 月 22 日

試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

2. 目次

1.	GLP	東述書	. 2
2.	目次		. 3
3.	試験等	実施概要	. 7
	3.1	試験番号	. 7
	3.2	試験表題	. 7
	3.3	試験目的	. 7
	3.4	試験委託者	. 7
	3.5	試験受託者	. 7
	3.6	試験実施施設	. 7
	3.7	試験日程	. 7
	3.8	試験責任者	. 7
	3.9	試験担当者	. 8
	3.10	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	
	3.11	資料保存	
	3.12	試験責任者の記名・捺印及びその日付	. 9
4.	要約		10
5.	緒言		11
6.	試験	材料及び方法	12
	6.1	被験物質及び溶媒	12
	6.1.1	120,40,100,30	
	6.1.2	溶媒	13
	6.2	被験液の調製	
	6.2.1	調製方法	13
	6.2.2	調製頻度	14
	6.3	対照物質	
	6.3.1	陰性対照	
		陽性対照	
	6.4	使用細胞株	
	6.4.1	細胞株	
	6.4.2		
	6.4.3		
	6.5	S9 mix 及び培養液の調製	
	6.5.1	S9 mix	
	6.5.2		
	6.6	試験方法	17

	6.6.1	識別方法	
	6.6.2	用量の設力	定17
	6.6.3	細胞増殖	印制試験
	6.6.4	染色体異	常試験18
	6.6.5	標本の観	察
	6.6.6	染色体異	常の分類 20
	6.6.7	判定基準	21
7.	. 試験結果		
	7.1 細胞	包増殖抑制	試験22
	7.2 染色	色体異常試!	験 22
8.	. 考察		
9.	. 文献		
添	付資料		
	Attached Dat		試験成績書[テルピネオールの特性]25
	Attached Dat	a 2	CERTIFICATE OF ANALYSIS (Stability of Test Article)
			(1/2, 2/2)
_	_		
<u>兴</u>	•		
	Fig. 1		Results of the chromosome aberration test in cultured
			Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol
	F: 0		[Short-term treatment: +S9 mix]
	Fig. 2		Results of the chromosome aberration test in cultured
			Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol
	E' 2		[Short-term treatment:-S9 mix]
	Fig. 3		Results of the chromosome aberration test in cultured
			Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol
	T: - 4		[Continuous treatment: 24hr]
	Fig. 4		Results of the chromosome aberration test in cultured
			Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol
			[Continuous treatment: 48hr]
表	Ē		
11	Table 1		Chromosome aberration in cultured Chinese hamster
	14010 1		(CHL/IU) cells treated with Terpineol
			[Short-term treatment: +S9 mix]
	Table 2		Chromosome aberration in cultured Chinese hamster
	14010 2		(CHL/IU) cells treated with Terpineol
			(= == . z =) = = z = z = z = z = z = z = z = z

	[Short-term treatment: -S9 mix]33
Table 3	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster
	(CHL/IU) cells treated with Terpineol
	[Continuous treatment: 24hr]
Table 4	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster
	(CHL/IU) cells treated with Terpineol
	[Continuous treatment: 48hr]
<i></i> .→ =	
付表	Describes Cales will asset the Salata State and Cales asset
Appendix 1	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese
	hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol
Appendix 2-1	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in
	cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with
	Terpineol
	[Short-term treatment: +S9 mix]
Appendix 2-2	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in
	cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with
	Terpineol
	[Short-term treatment: -S9 mix]
Appendix 2-3	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in
	cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with
	Terpineol
	[Continuous treatment: 24hr]
Appendix 2-4	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in
	cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with
	Terpineol
	[Continuous treatment: 48hr]
Appendix 3-1	Results of observation in the chromosome aberration test in
	cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with
	Terpineol
	[Short-term treatment: +S9 mix]41
Appendix 3-2	Results of observation in the chromosome aberration test in
	cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with
	Terpineol
	[Short-term treatment: -S9 mix]
Appendix 3-3	Results of observation in the chromosome aberration test in
1.1	cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with
	Terpineol
	respinedi

	[Continuous treatment: 24hr]
Appendix 3-4	Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with
	Terpineol
	[Continuous treatment: 48hr]44
信頼性保証書	45

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

T-G059

3.2 試験表題

テルピネオールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3.3 試験目的

ほ乳類の培養細胞(CHL/IU 細胞株)を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

3.4 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 〒100-8916 東京都千代田区霞が関1丁目2番2号 TEL:03-3595-2298 (課直通) FAX:03-3593-8913

3.5 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター 〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

3.6 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

3.7 試験日程

試験開始日 : 2012 年 10 月 4 日 被験物質受領日 : 2012 年 7 月26 日及び

2012年 8月 2日

実験開始日: 2012年 10月 12日実験終了日: 2012年 12月 12日試験終了日: 2013年 3月 22日

3.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

3.9 試験担当者

被験物質保存責任者: 化学分析責任者:

試験担当者:



3.10 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

本試験において、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。

3.11 資料保存

試験計画書原本(変更書含む)、試験に関する記録文書、生データ、染色体標本及び報告書類(最終報告書は原本)は、株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所の資料保存施設に最終報告書提出後10年間保存する。期間終了後の保存については、厚生労働省と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

3.12 試験責任者の記名・捺印及びその日付

2013 年 3 月 22 日

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

4. 要約

テルピネオールの染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞(CHL/IU)を用いた染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 800 μ g/mL以上の用量で非代謝活性化及び連続処理法では 400 μ g/mL以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。この結果より、短時間処理法の代謝活性化では 500 μ g/mLを最高用量とし、以下等差 100 μ g/mLで希釈した 5 用量を、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 400 μ g/mLを最高用量とし、以下等差 100 μ g/mLで希釈した 4 用量を設定して染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率(TA値)及び倍数体の出現率は、いずれの処理法においても、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び 倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対 照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施され たと考えられた。

以上の結果から、テルピネオールは本試験条件下において、染色体構造異常及び染 色体数的異常は誘発しないと結論した。

5. 緒言

厚生労働省の依頼により、テルピネオールの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞(CHL/IU)を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

1) 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」 (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)

2) 遺伝毒性試験ガイドライン

- 「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)
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 473」 (OECD 理事会: 1997年7月21日)

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

製造元 : Sigma-Aldrich Co. 名称 : テルピネオール

英名:TerpineolCAS 番号:8000-41-7官報公示整理番号:3-2323

構造式又は示性式 :

 $\mathbf{H_{3}C} \longrightarrow \begin{matrix} \mathbf{OH} \\ \mathbf{C-CH_{3}} \\ \mathbf{CH_{3}} \end{matrix}$

分子式 : C₁₀H₁₈O 分子量 : 154.25

常温における性状 (概観)

無色透明な粘稠液

融点/凝固点 : 31~36°C* 沸点 : 213~218°C*

引火点 : 91°C*

ロット番号 : BCBD6481V

純度

Alpha-terpineol : 62.8%
Beta-terpineol : 8.7%
Gamma-terpineol : 20.6%
不純物 : 不明

比重(20°C) : 0.934 g/mL*

屈折率 (20°C) : 1.484 赤外線スペクトル : 適合

水分 : 0.1%未満

試験期間中の安定性

実験終了後、株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場

研究所で被験物質の安定性を確認し、安定であったこ

とを確認した。

入手量 : 25.00 g

保存条件 : 密栓、冷所(冷蔵庫内、許容值:1~10°C、実測温度:

 $1.7 \sim 7.0^{\circ} C$

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び

東京研究所 被験物質調製保存室

取り扱い上の注意 : 作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護

手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。 取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。

使用後の処理: 被験物質の残量は安定性を確認後、すべて廃棄した。

*:シグマアルドリッチジャパン株式会社発行の製品安全データシートに基づく

6.1.2 溶媒

名称: DMSOロット番号: PEH5762規格: 試薬特級

製造元 : 和光純薬工業株式会社

保存方法 : 室温

保存場所 : 東京研究所 標本作製室

溶媒の選択理由 : 供試前試験の結果、注射用水(16.0 mg/mL)に不溶、

DMSO (160 mg/mL) に溶解であったため、溶媒とし

て DMSO を用いた。

6.2 被験液の調製

6.2.1 調製方法

1) 細胞增殖抑制試験

被験物質 0.3200 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を添加し、溶解した後に、メスアップして最高濃度の 160 mg/mL 溶液(プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度: 1600 μ g/mL)を調製した。次いで、160 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL:溶媒 1 mL)で順次 7 段階希釈し、80.0、40.0、20.0、10.0、5.00、2.50 及び 1.25 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.2500 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を添加し、溶解した後に、メスアップして最高濃度の 50.0 mg/mL 溶液(プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度: 500 μ g/mL) を調製した。次いで、50.0 mg/mL 溶液 0.8、0.6、0.4 及び 0.2 mL に対して、溶媒をそれぞれ 0.2、0.4、0.6 及び 0.8 mL 添加し、40.0、30.0、20.0 及び 10.0 mg/mL の被験液を調製した。

連続処理法では、被験物質 0.2000 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。溶媒を添加し、溶解した後に、メスアップして最高濃度の 40.0 mg/mL 溶液(プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度: 400 μ g/mL)を調製した。次いで、40.0 mg/mL 溶液の 0.75、0.5 及び 0.25 mL に対して、溶媒をそれぞれ 0.25、0.5 及び 0.75 mL

添加し、30.0、20.0 及び10.0 mg/mLの被験液を調製した。

6.2.2 調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

6.3 対照物質

6.3.1 陰性対照

溶媒として用いる DMSO を陰性対照とした。

6.3.2 陽性対照

1) 代謝活性化

シクロフォスファミド (CP)

ロット番号 : LAR5348

製造元 : 和光純薬工業株式会社純度 : 生化学用(97%以上)

保存方法 : 冷蔵、遮光

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

2) 非代謝活性化

マイトマイシン C (MMC)

ロット番号 : 562AAH

製造元 : 協和発酵キリン株式会社

力価 : 2 mg (力価)/瓶

保存方法 : 室温、遮光

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室

3) 調製方法

調製はすべて用時に行い、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

- (1) 染色体異常試験 短時間処理法 代謝活性化
 - CP 0.0140 g を γ 線滅菌済プラスチック遠沈管(50 mL)に秤取した。これに生理食塩液(日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: K2G71)を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した(培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度は 14 μ g/mL)。
- (2) 染色体異常試験 短時間処理法 非代謝活性化及び連続処理法 MMCの2 mg 充填バイアルに生理食塩液(日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: K2G71)を注射筒で2 mL 加えて溶解した(1 mg/mL)。次に、この溶液を公比20で順次2段階希釈(溶液0.250 mL:生理食塩液4.750 mL)し、0.050及び0.0025 mg/mLの溶液を調製した(短時間処理法では培養液4.850 mLに0.0025 mg/mL溶液0.150 mLを、連続処理法では培養液4.900 mLに0.0025 mg/mL溶液0.100 mLを加えた。この時の最終濃度はそれぞれ0.075及び0.050

 $\mu g/mL$) \circ

4) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験ガイドライン(前述 5.2)項)に使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

6.4 使用細胞株

6.4.1 細胞株

チャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞(CHL/IU)を用いた。ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 2010 年 10 月 13 日に入手し、凍結保存した細胞について定期的に細胞の性状検査を実施して、性状が適正であること(培養形態、細胞倍加時間 15~20 時間以内、染色体数の平均が 25 本、マイコプラズマ等の汚染がない)が確認されたものを 30 継代以内で試験に使用した。使用時の細胞継代数は細胞増殖抑制試験では 19 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 25 継代、連続処理法では 8 継代であった。

6.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常出現率が低いこと、種々の化学物質に対して感受性が高いこと、背景データも多いこと及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられていることから、本細胞株を選択した。

6.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、 CO_2 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で培養した。継代は $1\sim4$ 日ごとに行った。

6.5 S9 mix 及び培養液の調製

6.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素(S9/コファクターC セット、ロット番号: C120713041、オリエンタル酵母工業株式会社)を混合し、S9 mix を調製した。調製は使用時に行った。

1) S9

名称 : S9

ロット番号 : 12071304

製造日 : 2012年7月13日

種・系統 : ラット·SD系

 性
 :
 雄

 週齡
 :
 7 週齡

誘導物質: フェノバルビタール (PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン

(BE)

投与法: 腹腔内投与

投与期間及び投与量: PB 4日間 30+60+60 mg/kg body weight

BF 1 目 80 mg/kg body weight

保存方法 : 冷凍(-70°C以下の冷凍庫)

使用期限 : 2013年1月12日

保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室 超低温フリーザー

2) 補酵素

名称 : コファクターC

ロット番号 : C12071104

製造日 : 2012年7月11日

保存方法 : 冷凍(-70°C以下の冷凍庫)

使用期限 : 2013年1月10日

保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室 超低温フリーザー

3) S9mix の組成

S9 2 mL

補酵素 4.7 mL 20 mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2) 1.34 mL

50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液0.67 mL330 mmol/L 塩化カリウム水溶液0.67 mL50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液0.67 mL

40 mmol/L 酸化型ニコチンアミドアデニン

ジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液 0.67 mL

精製水 0.67 mL

6.5.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM)(GIBCOTM、Cat.No.11095)に非働化(56°C、30分)した牛血清(bovine serum、BS) を 10 v/v%添加した培養液(BS-MEM)を用いた。 調製後の培養液は冷蔵保存した。

1) 牛血清

ロット番号 : 8155322

製造元 : Invitrogen Corporation

保存方法 : 冷凍 (-20°C 以下の冷凍庫)

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷凍庫

2) MEM

ロット番号: 1147285、1179276製造元: Invitrogen Corporation

保存方法 : 冷蔵

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

6.6 試験方法 1)-5)

試験は以下に示したステージの順に実施した。

# 1.5 tion 5. 1 - 1 - 1		
1. 細胞增殖抑制試驗	短時間処理法	代謝活性化
		非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理
		48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化
		非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理
		48 時間処理

6.6.1 識別方法

以下のように定めた記号又は数字を記したラベルを、シャーレ及びスライドグラス に貼付して識別を行った。

対 象	内容	記号又は数字					
シ	短時間処理法 代謝活性化	+					
+	短時間処理法 非代謝活性化	_					
	連続処理法 24 時間処理	24-					
	連続処理法 48 時間処理	48-					
	陰性対照群	NC					
	被験物質処理群	高濃度から1、2、3···nの枝番号					
	陽性対照群	PC					
同一	処理群内での識別	①、②、③、④					
染色体標本	盲検法によってランダムに コード化した処理内容	試験番号とコンピュータが無作為に割り振った「01」~「99」までの 2 桁の番号及びスライドの枚数を表す枝番号					

6.6.2 用量の設定

1) 細胞增殖抑制試験

最高用量を $1600 \,\mu\text{g/mL}$ ($10 \,\text{mM}$ 相当) とし、以下公比 $2 \,\text{で希釈した} 800 \,$ 、 $400 \,$ 、 $200 \,$ 、 $100 \,$ 、 $50.0 \,$ 、 $25.0 \,$ 及び $12.5 \,$ $\mu\text{g/mL}$ の計 $8 \,$ 用量を設定した。これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

短時間処理法の代謝活性化では最高用量を $500~\mu g/mL$ とし、以下等差 $100~\mu g/mL$ で希釈した 400、300、200 及び $100~\mu g/mL$ の計 $5~\Pi$ 量を、短時間処理法の非代 謝活性化、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では最高用量を $400~\mu g/mL$ とし、以下等差 $100~\mu g/mL$ で希釈した 300、200 及び $100~\mu g/mL$ の計 $4~\Pi$ 量を設定した。これに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

6.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。なお、以下の試験操作のうち、無菌性を必要とした場合は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

- 1) 短時間処理法の代謝活性化と非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理と 48 時間 処理のそれぞれに、陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレはプラス チックプレート(直径 60 mm)を用い、各群 2 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10⁴個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種した。
- 3) 培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認して から、下表に従い、培養液の除去及び処理を行った。

	短時間	処理法	連続処理法				
	代謝活性化	非代謝活性化	24 時間処理	48 時間処理			
培養液除去量	0.883 mL	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL			
S9 mix 添加量	0.833 mL						
溶媒・被験液 添加量	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL			

- 4) 各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、短時間処理法については6時間、連続処理法については24時間及び48時間培養した。
- 5) 短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化については、培養6時間後に肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液5.0 mLを加え、更に18時間培養を続けた。
- 6) 培養終了後、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、確認した(短時間処理法の培養終了時の結果は、参考データとした)。 次いで、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール(純度 99%以上)で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。
- 7) 単層細胞密度測定装置(モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社)を用いて 細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、それぞれについて被験物質 の 50%細胞増殖抑制濃度(概略値)を求めた。

6.6.4 染色体異常試験

以下の試験操作のうち、無菌性を必要とした場合は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

- 1) 短時間処理法
- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに、陰性対照群、被験物質処理群及び陽性 対照群を設けた。シャーレ(プレート)はプラスチックプレート(直径 60 mm) を用い、プレートは各群 4 枚とした。

- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞(培養液 5.0 mL) を播種した。
- (3) 培養3日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、下表に従い、培養液の除去及び処理を行った。

	代謝活性化	非代謝活性化
培養液除去量	0.883 mL (0.933 mL)*	0.050 mL (0.150 mL)*
S9 mix 添加量	0.833 mL	
溶媒・被験液・ 陽性対照物質液 添加量	0.050 mL (CP: 0.100 mL)*	0.050 mL (MMC: 0.150 mL)*

- *:()内は、陽性対照群の培養液除去量及び陽性対照物質液添加量を示す。
- (4) 各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、記録した後に、 6時間培養した。
- (5) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差 顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩 液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- (6) 各群 2 枚のプレート (枝番号-①及び-②) について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド (デメコルシン溶液、10 μg/mL、Invitrogen Co.) を 0.1 mL 加えた。
- (7) 培養終了後、0.25%トリプシン溶液(Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.)で細胞を 剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間 低張処理し、メチルアルコール:酢酸=3:1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作 製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色 体標本を作製した。
- (8) 残る各群 2 枚のプレート(枝番号-③及び-④)は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下 で観察し、細胞の状態を確認した(培養終了時の結果は、参考データとした)。 その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、 単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。
- 2) 連続処理法
- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対 照群を設けた。シャーレ(プレート)はプラスチックプレート(直径 60 mm) を用い、プレートは各群 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10⁴個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種した。
- (3) 培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、下表に従い、培養液の除去及び処理を行った。

	24 時間処理	48 時間処理
培養液除去量	0.050 mL (0.100 mL)*	0.050 mL (0.100 mL)*
溶媒・被験液・ 陽性対照物質液 添加量	0.050 mL (MMC: 0.100 mL)*	0.050 mL (MMC: 0.100 mL)*

- *:()内は、陽性対照群の培養液除去量及び陽性対照物質液添加量を示す。
- (4) 各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、記録した後に、 24 時間及び 48 時間培養した。
- (5) 各群 2 枚のプレート (枝番号-①及び-②) について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド (デメコルシン溶液、10 μg/mL、Invitrogen Co.) を 0.1 mL 加えた。
- (6) 培養終了後、0.25%トリプシン溶液(Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.)で細胞を 剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間 低張処理し、メチルアルコール:酢酸=3:1 液で固定した。固定した細胞をス ライドガラス1枚につき2箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり2枚作 製した。細胞滴下後、約1日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約15分間染色して 染色体標本を作製した。
- (7) 残る各群 2 枚のプレート(枝番号-③及び-④)は、24 時間及び 48 時間の培養の終了時に肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

6.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。

6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更に以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップと

は染色体又は染色分体の同軸上に断片があるもの(非 染色部分が染色分体の同軸上にある)であって、その 長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認めら

れるもの。

染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非

染色部位が染色分体の同軸上にあっても、その長さが

染色分体の幅以上に離れているもの。

染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。

染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認め

られないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。

染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。

その他(other) : 断片化(frg)など。

2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数(二倍体)と異なり、倍化した 場合を数的異常と定義した。

倍数性 : polyploidy (核内倍加体: endoreduplication を含む)

6.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準¹⁾に従い染色体の構造並びに 数的異常を持つ細胞の出現率(%)によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5%未満	陰 性 (-)
5%以上10%未満	疑陽性(±)
10%以上	陽 性(+)

構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合(TAG)と含まない場合(TA)とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験の結果を Appendix 1、Appendix 2-1 ~ Appendix 2-4 に示した。 被験液添加直後の観察において、すべての処理法で $400 \, \mu g/mL$ 以上の用量で析出が認められた。培養液の色調変化は認められなかった。

処理終了時の観察において、短時間処理法の代謝活性化では 400 μg/mL 以上の用量で、非代謝活性化及び連続処理法では 800 μg/mL 以上の用量で析出が認められた。

各処理法における 50% 細胞増殖抑制濃度(概略値)は、短時間処理法の代謝活性化で 449 μ g/mL、非代謝活性化で 295 μ g/mL、連続処理法の 24 時間処理で 276 μ g/mL、48 時間処理で 242 μ g/mL と算定された。

7.2 染色体異常試験

染色体異常試験の結果を Fig.1 ~ Fig.4、Table 1 ~ Table 4 及び Appendix 3-1 ~ Appendix 3-4 に示した。

被験液添加直後の観察において、すべての処理法で 400 μg/mL以上の用量で析出が 認められた。培養液の色調変化は認められなかった。

処理終了時の観察の際、短時間処理法の代謝活性化では $500 \, \mu g/mL$ の用量で、非代謝活性化では $400 \, \mu g/mL$ の用量で析出が認められ、連続処理法では認められなかった。

染色体標本の観察の結果、構造異常の出現率 (ギャップを含まない場合)及び倍数 性異常ともに、いずれの処理法においても増加は認められなかった。

8. 考察

テルピネオールの染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞(CHL/IU)を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率(TA値)及び倍数体の出現率は、いずれの処理法においても、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

本被験物質は細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性⁶⁾、Ames試験で陰性、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験で陰性と報告されている。⁷⁾

以上の結果より、テルピネオールは本試験条件下において、染色体構造異常及び染 色体数的異常は誘発しないと結論した。

9. 文献

- 1) 石館基監修 (1987): <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
- Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, Mutat. Res., 48, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M and Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, Mutat. Res., **66**, 277-290
- 4) 石館 基 (1982): 哺乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment Mammalian Cell Systems), 日本香粧品科学会誌, 6, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271
- 6) (2013): テルピネオールの細菌を用いる復帰突然変異試験(試験番号: T-1111)、 株式会社ボゾリサーチセンター
- 7) US Environmental Protection Agency, http://www.epa.gov/oppt/tsca8e/pubs/8ehq/2011/feb11/8ehq-0211-18270a.pdf, (accessed 2013-02-07)

試験番号: A-2515

試験成績書 [テルピネオールの特性]

ステージ

被験物質の使用前

測定日

2012年8月17日

被験物質

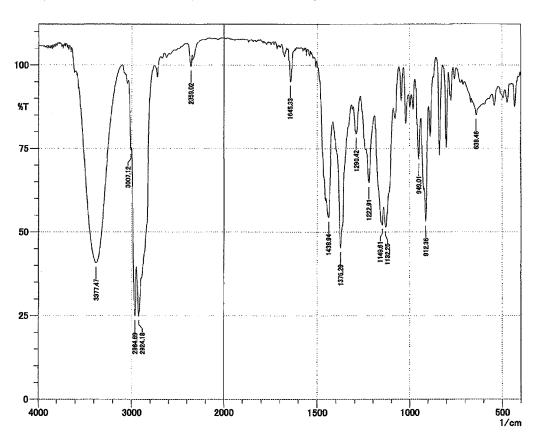
テルピネオール (ロット番号: BCBD6481V)

試験項目

赤外吸収スペクトルの確認(液膜法)

結果:

特性のスペクトルを以下に示す。



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」(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)

2012年 8月 29日

試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

Study number: T-G059

CERTIFICATE OF ANALYSIS (Stability of Test Article)

Stage:

After the end of an experiment

Date of Analysis:

January 23, 2013

Test Article:

Terpineol

(Lot Number: BCBD6481V)

Test Item:

Infrared spectrophotometry

(Liquid film method)

Acceptance Criteria:

The spectrum for stability is comparable with that for

characteristics¹⁾.

Validation of an analytical method for the determination of Terpineol and its stability study (vehicle: corn oil) by HPLC, and characteristic test and stability study by IR (Study number: A-2515, Gotemba Laboratory, Bozo Research

Center Inc.)

Results:

The spectrum for stability was comparable with that for

characteristics.

The IR spectra are shown on the next page.

Judgment:

Passed

Regulation:

"Regulations of Testing Facilities for Studies on New Chemical

Substances etc.", March 31, 2011, YakuShokuHatsu 0331 No. 8, Heisei 23-03-29 SeiKyoku No. 6, KanHoKiHatsu No.

Jebruary 7, 2018
Date

110331010

Person Responsible for Analysis

Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.

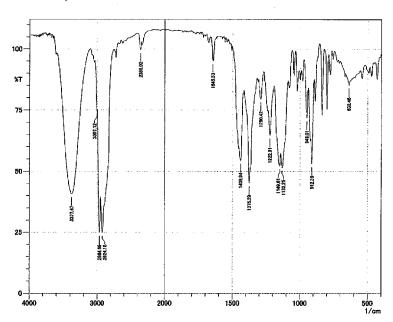
1/2

Study number: T-G059

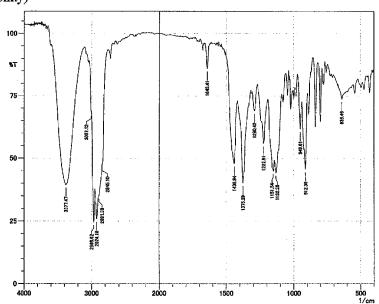
Results:

Infrared spectra

(Characteristics)



(Stability)



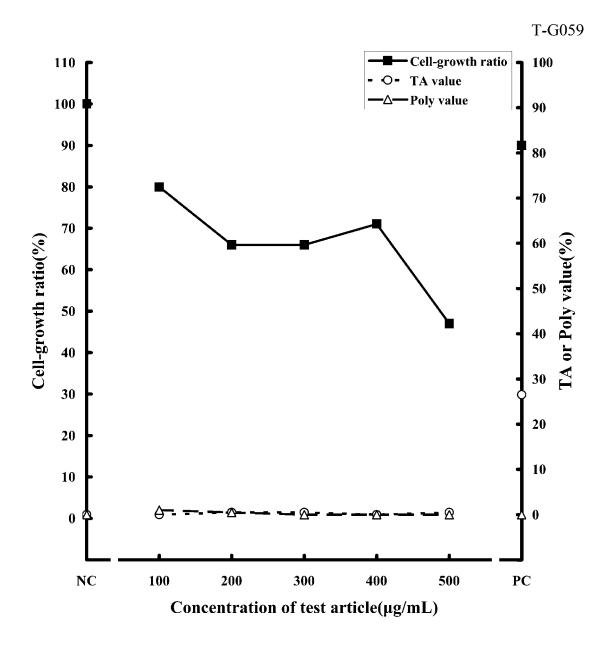


Fig. 1
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control (DMSO)

 $PC:Positive\;control\;(cyclophosphamide:14\;\mu g/mL)$

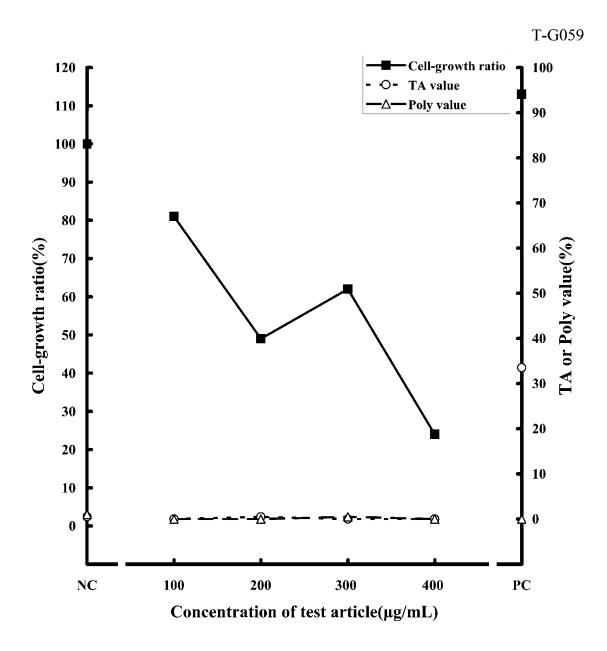
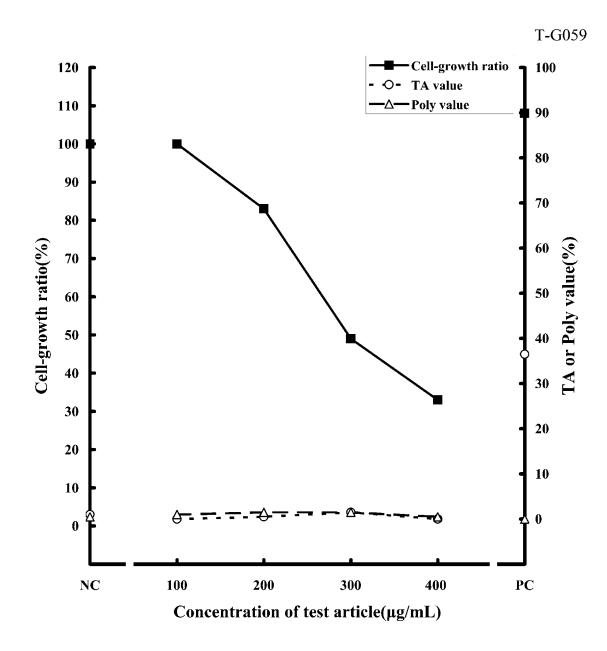


Fig. 2
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Short-term treatment : -S9 mix]

NC: Negative Control (DMSO)

 $PC: Positive \ control \ (mitomycin \ C: 0.075 \ \mu g/mL)$



 $Fig.\ 3$ Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Continuous treatment : 24hr]

NC: Negative Control (DMSO)

 $PC: Positive \ control \ (mitomycin \ C: 0.050 \ \mu g/mL)$

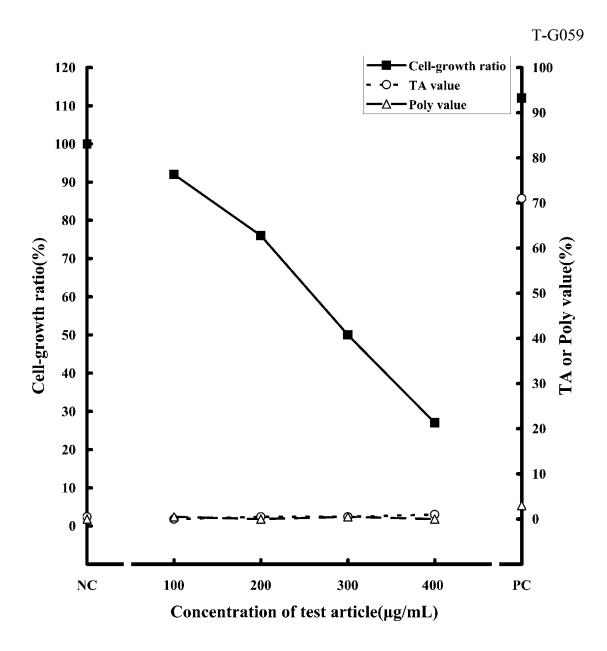


Fig. 4
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control (DMSO)

 $PC: Positive \ control \ (mitomycin \ C: 0.050 \ \mu g/mL)$

Table 1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol [Short-term treatment:+S9 mix]

		Conc. of	nc. of Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Cell-	Cell- Number of cells with numerical chron								
Time	S9	test article											growth		aberration (%)					
(h)	mix		('ells	etb	cte	csb	cse	other	TA(%)	σ	TAG(%)	Judge-	ratio	Cells	Polyploid	other	Total (%)	Judge-		
		(μg/mL)	observed	Cib	Cic	CSU	CSC	other	1A(70)	g	1AO(70)	ment	(%)	observed	cells	ouici	10tai (70)	ment		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	0	0	0			
		NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	109	100	0	0	0	-		
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
			100	0	0	0	0	0	0	2	2		89	100	1	0	1			
		100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	79	100	1	0	1	-		
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)		(80)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)			
		200	100	0	1	0	0	0	1	0	1		69	100	0	0	0			
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	69	100	1	0	1	-		
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(66)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)			
		300	100	0	0	0	0	0	0	0	0		69	100	0	0	0			
6-18	+		100	1	0	0	0	0	1	1	2	-	69	100	0	0	0	-		
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	2(1.0)		(66)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		79	100	0	0	0			
		400	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	69	100	0	0	0	-		
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(71)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
			100	0	1	0	0	0	1	0	1		49	100	0	0	0			
		500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	49	100	0	0	0	-		
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(47)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
			100	4	24	0	0	0	28	0	28		89	100	0	0	0			
		PC	100	3	22	0	0	0	25	0	25	+	99	100	0	0	0	-		
			200	7(3.5)	46(23.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	53(26.5)	0(0.0)	53(26.5)		(90)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μg/mL)

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol [Short-term treatment:-S9 mix]

	S9 mix	test article	ne. of Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell-	Number of cells with numerical chromosome					
Time (h)			Cells observed	ctb	cte	csb	csc	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment	growth ratio (%)	Cells observed	Polyploid cells	rration (% other	6) Total (%)	Judge- ment
			100	0	1	0	0	0	1	0	1		100	100	2	0	2	
		NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	-
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(100)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	
		200	100	0	0	0	0	0	0	0	0		74	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	87	100	0	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(81)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1		49	100	0	0	0	
6-18	-		100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	49	100	0	0	0	-
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(49)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		49	100	0	0	0	
		300	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	74	100	1	0	1	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(62)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		24	100	0	0	0	
		400	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	24	100	0	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(24)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	3	28	0	0	0	31	0	31		112	100	0	0	0	
		PC	100	4	32	0	0	0	36	1	37	+	112	100	0	0	0	-
		1 1	200	7(3.5)	60(30.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	67(33.5)	1(0.5)	68(34.0)		(113)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 µg/mL)

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol [Continuous treatment:24hr]

Time	S9	Conc. of	•		Number o	f cells witl	n structural	chromoso	me aberrati	ion (%)			Cell- growth			ith numer rration (%	rical chromo	osome
(h)	mix	test article (μg/mL)	Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment	ratio (%)	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge- ment
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	1	0	1	
		NC	100	2	0	0	0	0	2	0	2	-	100	100	0	0	0	-
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		(100)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
			100	0	0	0	0	0	0	1	1		100	100	1	0	1	
		100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	1	0	1	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		(100)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1		83	100	2	0	2	
24-0	-	200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	83	100	1	0	1	-
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(83)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	
			100	0	1	0	0	0	1	0	1		49	100	1	0	1	
		300	100	0	2	0	0	0	2	0	2	-	49	100	2	0	2	-
			200	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		(49)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		33	100	1	0	1	
		400	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	33	100	0	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(33)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
			100	14	24	0	0	0	38	0	38		100	100	0	0	0	
		PC	100	11	24	0	0	0	35	0	35	+	116	100	0	0	0	-
			200	25(12.5)	48(24.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	73(36.5)	0(0.0)	73(36.5)		(108)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 µg/mL)

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol [Continuous treatment:48hr]

Time	S9	Conc. of			Number of	cells witl	n structural	chromos	ome aberrati	on (%)			Cell- growth			ith numer rration (%	rical chromo	osome
(h)	mix	test article (μg/mL)	Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment	ratio (%)	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge- ment
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	0	0	0	
		NC	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	99	100	0	0	0	-
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		92	100	1	0	1	
		100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	92	100	0	0	0	-
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(92)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
			100	0	1	0	0	0	1	0	1		76	100	0	0	0	
48-0	-	200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	76	100	0	0	0	-
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(76)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1		46	100	0	0	0	
		300	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	53	100	1	0	1	-
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(50)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
			100	0	1	0	0	0	1	1	2		23	100	0	0	0	
		400	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	30	100	0	0	0	-
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)		(27)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	13	56	0	0	0	69	0	69	·	107	100	3	0	3	
		PC	100	5	68	0	0	0	73	0	73	+	115	100	3	0	3	-
			200	18(9.0)	124(62.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	142(71.0)	0(0.0)	142(71.0)		(112)	200	6(3.0)	0(0.0)	6(3.0)	

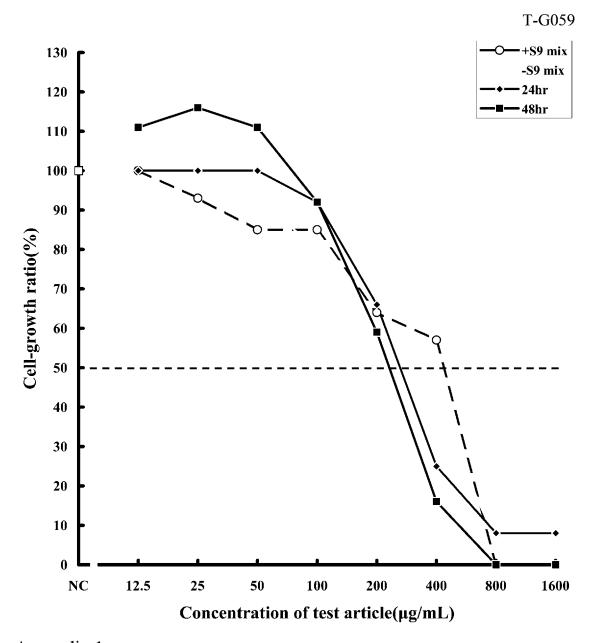
g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 µg/mL)

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.



 $\label{lem:appendix} Appendix \ 1$ Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

NC: Negative Control (DMSO)

Appendix 2-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Short-term treatment: +S9 mix]

					Cell-gro	wth inhibition t	est				
Stud	y type	Treat	ment and	Cell-gr	owth ratio		Observ	ation ^{c)}			
S9	time	Conc	entration	Plate	Mean (%) ^{b)}	Condition of	Color of		s/Crystals ^{f)}		
mix	(hr)	(μg/mL)		1 and 2	ivicali (76)	cells ^{d)}	medium ^{e)}	1)	2)		
		0 (NC)		100 ^{a)} 100	100	-	-	-	-		
12.5 100 100									-		
25.0 85 93											
		50.0		85 85	85	-	-	-	-		
+	6-18	article	100	85 85	85	+ +	-	-	-		
		Test a	200	71 57	64	++	-	-			
			400	57 57	57	++	-	+ +	+ +		
	800 0 0 +++ - + + +										
			1600	0	0	TOX TOX	-	+ +	+ +		
	Concentration of 50% cell-growth inhibition : 449 μg/mL										

NC: Negative Control (DMSO)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 - + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - ++++: Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - TOX: There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates
 - + : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 2-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Short-term treatment : -S9 mix]

					Cell-gro	wth inhibition t	est				
Stud	y type	Treat	ment and	Cell-gr	owth ratio		Observ	ration ^{c)}			
S9	time	Conc	entration	Plate	Mean (%) ^{b)}	Condition of	Color of		es/Crystals ^{f)}		
mix	(hr)	(μg/mL)		1 and 2	ivicali (76)	cells ^{d)}	medium ^{e)}	1)	2)		
		0 (NC)		100 ^{a)} 87	100	-	-	-			
			12.5	99 99	106	-	-	-			
			25.0	87 99	99	-	-	-	-		
		50.0		87 87	93	+ +	-	-			
-	6-18	rticle	Test article	100	62 87	80	++	-	-	-	
		lest a	200	37 74	59	++	-	-			
		J	400	49 25	40	+++	-	+ +			
800 12 6 TOX - +								· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	+ +		
			1600	12	6	TOX TOX	-	+ +	+ +		
	Concentration of 50% cell-growth inhibition : 295 μg/mL										

NC: Negative Control (DMSO)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 - + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - ++++: Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - TOX: There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates
 - + : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 2-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Continuous treatment: 24hr]

					Cell-gro	wth inhibition t	est		
Stud	y type	Treat	ment and	Cell-gr	owth ratio		Obser	vation ^{c)}	
S9	time	Conc	entration	Plate	1 (0/2b)	Condition of	Color of		s/Crystals ^{f)}
mix	(hr)	(μ	g/mL)	1 and 2	Mean (%) ^{b)}	cells ^{d)}	medium ^{e)}	1)	2)
		0	(NC)	100 a)	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-
			12.5	100	100	-	-	-	-
100									
			25.0	100 100	100	-	<u>-</u>	-	-
			50.0	100	100	-	-	-	-
			30.0	100		-	-	-	_
l .	24-0	cle	100	100	92	+	-	-	-
	24-0] <u>:</u>	100	100 83	72	+	-	-	-
		Test article	200	66	66	++	-	-	-
		Ĕ		66		++	-	-	-
			400	16	25	+++	-	+	-
			700	33	23	+++	-	+	-
	800 16 8 TOX - + +								+
			000	0	G	TOX	=	+	+
			1600	0	8	TOX	-	+	+
			1000	16	0	TOX	_	+	+
			Concent	ration of 5	50% cell-grov	wth inhibition:	276	μg/mL	

NC: Negative Control (DMSO)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 - + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - ++++: Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - TOX: There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates
 - + : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 2-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Continuous treatment: 48hr]

					Cell-gro	wth inhibition to	est				
Stud	y type	Treat	ment and	Cell-gr	owth ratio		Observ	ration ^{c)}			
S9	time	Concentration		Plate	Mean (%) ^{b)}	Condition of	Color of		es/Crystals ^{f)}		
mix	(hr)	(μg/mL)		1 and 2	ivicali (76)	cells ^{d)}	medium ^{e)}	1)	2)		
		0 (NC)		100 ^{a)} 92	100	-	-	-			
	12.5			107 107	111	-	-	-			
			25.0	115 107	116	-	-	-	-		
		50.0	107 107	111	-	-	-				
-	48-0	ırticle	100	92 84	92	+ +	-	-			
		Test article	200	61 53	59	++	-	-			
			400	15 15	16	+++	-	+ +			
			800	0	0	TOX TOX	-	+ +	+ +		
			1600	0	0	TOX TOX	-	+ +	+ +		
	Concentration of 50% cell-growth inhibition : 242 µg/mL										

NC: Negative Control (DMSO)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment.
- d) : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 - + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - +++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - ++++: Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - TOX: There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.
- e) : No changes of color
- f) : Absence of precipitates
 - + : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 3-1

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Short-term treatment : +S9 mix]

				Chromo	some aberration test																		
Stud	y type	Treat	ment and	Observation ^{a)}																			
S9	time	Conc	entration	Condition of cells ^{b)}	C 1 C 1; c)	Precipitate	s/Crystals ^{d)}																
mix	(hr)	(μ	g/mL)	Condition of cells	Color of medium	1)	2)																
		Λ	(NC)	-	-	-	-																
		U	(NC)	-	•	•	-																
			100	++	-	-	-																
			100	++	-	-	-																
		40	200	++	-	-	-																
		cle	200	++	-	-	-																
+	6-18	article	300	++	-	-	-																
ı i	0 10	st :	200	++	-	-	-																
		Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Tes	Test	Tes	400	++	-	+	-
			100	++	-	+	-																
		500		++	-	+	+																
				++	-	+	+																
			PC	-	-	-	-																
				-	-	-	-																

NC: Negative Control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide: 14 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed immediately after addition of the test solutions and 2 at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 - ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) : No changes of color
- d) : Absence of precipitates
 - + : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 3-2

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Short-term treatment : -S9 mix]

				Chromo	some aberration test								
Stud	Study type Treatment and				Observation ^{a)}								
S9	time	Conc	entration	Condition of cells ^{b)}	(C.1 f 1:c)	Precipitate	s/Crystals ^{d)}						
mix	(hr)	(μ	g/mL)	Condition of cells	Color of medium	1)	2)						
		٥	(NC)	•	-	-	-						
		U	(IVC)	-	-	-	-						
			100	+	-	-	-						
			100	+	-	-	-						
		article	200	++	-	-	-						
	6-18	urti	200	++	=	-	-						
-	0-10	st 8	300	++	-	-	-						
		Test	300	++	=	-	-						
		400		+++	-	+	+						
		400		+++	-	+	+						
			PC	-	-	-	-						
		PC		-	-	-	-						

NC: Negative Control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C: 0.075 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed¹⁾immediately after addition of the test solutions and²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 - + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) : No changes of color
- d) : Absence of precipitates
 - + : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 3-3

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Continuous treatment: 24hr]

				Chromo	some aberration test								
Stud	Study type Treatment and				Observation ^{a)}								
S9	time		entration	Condition of cells ^{b)}	C-1	Precipitate	s/Crystals ^{d)}						
mix	(hr)	(μ	g/mL)	Condition of cens	Color of medium	1)	2)						
		٥	(NC)	ı	-	-	-						
			(110)	-	-	-	-						
			100	-	-	-	-						
		4.	100	-	-	-	-						
		article	200	-	-	-	-						
	24-0	urti	200	-	ı	-	-						
l -	27-0	st 8	300	+	=	-	-						
		Test	500	+	ı	-	-						
			400	++	•	+	-						
		400		++		+	-						
			PC	•	-	-	-						
		PC		-	-	-	-						

NC: Negative Control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C: 0.050 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 - + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) : No changes of color
- d) : Absence of precipitates
 - + : Presence of precipitates floating in the medium.

Appendix 3-4

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Terpineol

[Continuous treatment: 48hr]

				Chromo	some aberration test								
Stud	y type	Treat	ment and		Observation ^{a)}								
S9	time		entration	Condition of cells ^{b)}	C-1	Precipitate	s/Crystals ^{d)}						
mix	(hr)	(μ	g/mL)	Condition of cells	Color of medium	1)	2)						
		٥	(NC)	ı	-	-	-						
			(110)	-	-	-	-						
			100	-	-	-	-						
		4.	100	-	-	-	-						
		article	200	-	-	-	-						
	48-0	urti	200	-	ı	-	-						
-	70-0	st 8	300	+	=	-	-						
		Test	300	+	ı	-	-						
			400	++	•	+	-						
		400		++		+	-						
			PC	•	-	-	-						
		PC		-	-	_	-						

NC: Negative Control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C: 0.050 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 - + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 - ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) : No changes of color
- d) : Absence of precipitates
 - + : Presence of precipitates floating in the medium.

信頼性保証書(1/2)

試験番号

: T-G059

試験表題

テルピネオールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常

試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

 「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、薬食発0331第8号、平成23・03・29製局第6号、 環保企発第110331010号)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

26/3年3月22日株式会社ボゾリサーチセンター信頼性保証部門

	試験におけ	る調査	
項目	担当者	調査日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
試験計画書		2012年 10月 4日	2012年 10月 4日
試験計画書変更書(1)		2012年11月 1日	2012年 11月 1日
細胞播種		2012年 11月 2日	2012年 11月 2日
調製・保存(被験物質・陽性		2012年11月 5日	2012年 11月 6日
対照物質)、被験物質の処理			
染色体標本作製 (固定)		2012年11月 6日	2012年 11月 6日
染色体標本作製 (染色)		2012年11月 7日	2012年 11月 8日
染色体標本観察		2012年11月 9日	2012年 11月 9日

T-G059

信頼性保証書(2/2)

項目	担当者	調査日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
染色体標本観察 (連続処理法)		2012年 12月 3日	2012年 12月 3日
被験物質の安定性		2013年 1月 23日	2013年 1月 24日
生データ		2013年 2月 7日	2013年 2月 7日
改善確認		2013年 2月 8日	2013年 2月 8日
最終報告書草案・図・表・付表		2013年 2月 7日	2013年 2月 7日
改善確認		2013年 2月 8日	2013年 2月 8日
試験計画書変更書(2)		2013年 3月 4日	2013年 3月 5日
生データ(被験物質の安定性・		2013年 3月 19日	2013年 3月19日
被験物質関係)			
最終報告書		2013年 3月22日	2013年 3月22日

施設調査

項 目	担当者	調査日	部門責任者及び 運営管理者への 報告日
培養細胞の性状検査		2012年 8月 31日	
		2012年 9月 3日	
		2012年 9月 5日	
		2012年 9月 6日	
		2012年 9月10日	2012年 9月10日