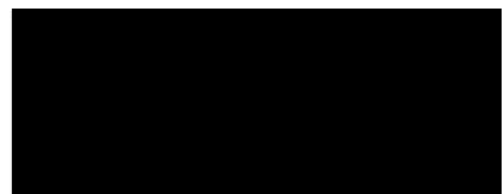
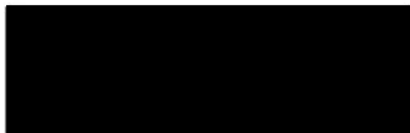




最終報告書

『2,3 - ペンタンジオンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験』

試験番号 



最終報告書の作成

試験名称：2,3 - ペンタンジオンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：[REDACTED]

上記試験は、非 GLP 試験として実施した。

この試験はここに述べられた方法で行われ、この最終報告書は試験実施で得られた生データを正確に反映したものである。

[REDACTED]
試験責任者 [REDACTED]
[REDACTED]



目次

頁

最終報告書の作成	
I. 要約	1
II. 試験の概括	1
III. 材料及び方法	2
IV. 結果及び考察	11
V. 試験関連資料の保存	13
VI. 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	13
VII. 参考文献	13
図 1-1 2,3 - ペンタンジオンが CHL/IU 細胞の増殖に及ぼす影響（短時間処 理法）	14
図 1-2 2,3 - ペンタンジオンが CHL/IU 細胞の増殖に及ぼす影響（連続処理 法）	15
図 2-1 2,3 - ペンタンジオンの染色体異常誘発性、用量—反応曲線（短時間 処理法）	16
図 2-2 2,3 - ペンタンジオンの染色体異常誘発性、用量—反応曲線（連続処 理法）	17
別表 1 細胞増殖抑制試験の結果	18
別表 2 染色体異常試験の結果（短時間処理法）	19
別表 3 染色体異常試験の結果（連続処理法）	20
添付資料 1 背景データ及び適合範囲	21

I. 要約

2,3 - ペンタンジオンの染色体異常誘発性の有無について、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を用いて、短時間処理法の代謝活性化によらない場合として S9 無添加培養系列及び代謝活性化による場合として S9 添加培養系列、並びに連続処理法の 24 時間培養系列で検討した。

その結果、短時間処理法の S9 無添加系列及び連続処理法の 24 時間培養系列において、構造異常細胞の出現頻度が用量依存的に増加した。変異原性の強さに関する相対的比較値である D₂₀ 値は短時間処理法の S9 無添加系列及び連続処理法の 24 時間培養系列で 0.260 及び 0.210 mg/mL と算出された。短時間処理法の S9 添加培養系列の構造異常細胞の出現頻度及び各培養系列の数的異常細胞の出現頻度に陰性対照群と比較して有意な増加は認められなかった。

一方、各培養系列の陽性対照群では、構造異常細胞の出現頻度に顕著な増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下における 2,3 - ペンタンジオンの染色体異常誘発性は陽性と判定された。

II. 試験の概括

1. 試験目的

安全性試験の一環として、ほ乳類培養細胞を用いて 2,3 - ペンタンジオンの染色体異常誘発性の有無を検討する。

2. 遵守した GLP

本試験は、非 GLP として実施した。

3. 準拠したガイドライン

「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」(平成 8 年 3 月 22 日付衛化第 29 号生活衛生局長通知) (以下、ガイドラインとする)

4. 試験委託者

名称 国立医薬品食品衛生研究所

所在地

5. 試験受託者

名称

所在地

6. 試験施設

名称

所在地

7. 試験関係者

試験責任者

所属

所在地

試験担当者

8. 試験スケジュール

試験開始日

実験開始日

実験終了日

最終報告書草案提出日

最終報告書作成日

試験終了日

III. 材料及び方法

1. 被験物質^{注1)}

- | | |
|-------------|---------------|
| (1) 名称 | 2,3 - ペンタンジオン |
| (2) 分子量 | 100.12 g/mol |
| (3) 含量 | 99.7% (GC 法) |
| (4) Lot No. | |
| (5) 比重 | 0.957 (25℃) |
| (6) 屈折率 | 1.403 |
| (7) 引火点 | 18℃ (タグ密閉式) |

注1) : 特性、安定性は試験委託者の情報による (非 GLP)。

- (8) 常温における性状
黄色の流動性のある液体
- (9) 保存条件
室温
- (10) 同一性
提供された情報と被験物質の容器に貼付されたラベル及び被験物質の外観から、目視で同一であることを確認した。
- (11) 製造者
[REDACTED]
- (12) 提供者
名称 国立医薬品食品衛生研究所
所在地 [REDACTED]
- (13) 実験終了後の取扱い
実験終了後、試験物質管理責任者に返却した。

2. 陽性対照物質

- (1) マイトマイシン C (MMC ; Lot No. [REDACTED] 和光純薬工業株式会社)
- (2) ベンゾ[a]ピレン (B[a]P ; Lot No. [REDACTED] Sigma-Aldrich Co.)

3. 試薬

- (1) 培地 (10%ウシ血清 (BS) 添加)
Minimum Essential Medium (MEM) (1×) 液体、(Lot No. [REDACTED]、GIBCO)
500 mL に対し、非働化 (56℃、30 分) した (BS ; Lot No. [REDACTED]、Sigma-Aldrich Co.) を 55.6 mL 加えたもの (以下、培地とする)。
- (2) 生理食塩液 (日本薬局方、Lot No. [REDACTED] 扶桑薬品工業株式会社) (被験物質調製用、陽性対照物質調製用及び細胞洗浄用)
- (3) 注射用水 (日本薬局方、Lot No. [REDACTED] 扶桑薬品工業株式会社) (陽性対照物質調製用)
- (4) ジメチルスルホキシド (DMSO ; 試薬特級、Lot No. [REDACTED] 和光純薬工業株式会社) (陽性対照物質調製用)
- (5) 0.25%トリプシン-EDTA (トリプシン ; Lot No. [REDACTED]、GIBCO)
- (6) 0.4 w/v%トリパンプルー溶液 (Lot No. [REDACTED]、和光純薬株式会社)
- (7) デメコルシン溶液 (コルセミド溶液 ; Lot No. [REDACTED]、和光純薬工業株式会社)
- (8) 塩化カリウム (KCl ; 試薬特級、Lot No. [REDACTED]、和光純薬工業株式会社)
- (9) メタノール (試薬特級、Lot No. [REDACTED]、和光純薬工業株式会社)

- [REDACTED] [REDACTED]
- (10) 酢酸（試薬特級、Lot No. [REDACTED]、和光純薬工業株式会社）
 - (11) ギムザ染色液（Lot No. [REDACTED] MERCK）
 - (12) Gurr バッファー錠剤（Lot No. [REDACTED] GIBCO）
 - (13) S9（Lot No. [REDACTED]、キッコーマンバイオケミファ株式会社）
製造日：[REDACTED]、入荷日：[REDACTED]
蛋白含量：26.09 mg/mL（培地に 5%添加の場合の最終濃度は 1.30 mg/mL）
 - (14) グルコース-6-リン酸（Lot No. [REDACTED]、オリエンタル酵母工業株式会社）
 - (15) NADP（Lot No. [REDACTED]、オリエンタル酵母工業株式会社）

4. 使用機器

- (1) CO₂ インキュベーター、型式：3110 シリーズ、サーモエレクトロン株式会社
MCO-19AIC、三洋電機株式会社
- (2) 超低温フリーザー、型式：VT-208N、日本フリーザー株式会社
- (3) 電子天秤、型式：ER-182A、株式会社エー・アンド・デイ
- (4) 遠心機、型式：5800、久保田商事株式会社
- (5) 倒立型顕微鏡、型式：CK2、オリンパス株式会社
- (6) 生物顕微鏡、型式：BHS-323N、オリンパス株式会社

5. 細胞株

(1) 細胞株及び選択理由

検出感度に優れているため染色体異常試験に汎用されており、また、背景データを多数保有しているチャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を選択した。

(2) 入手先

独立行政法人医薬基盤研究所（所在地：大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8、入手日：[REDACTED]）

(3) 保存方法

凍結保存培地（DMSO を 10%容量比で添加した培地）に細胞を懸濁させ凍結保存細胞液を調製した。これを段階的に凍結した後、液体窒素中で保存した。

(4) マイコプラズマの確認

凍結保存細胞液についてマイコプラズマの有無を確認し、マイコプラズマ汚染のないものを試験に用いた。

(5) 培養方法

培地を用いて、CO₂インキュベーターで温度：37.0±0.5℃、CO₂濃度：5.0±0.5%、加湿条件下で培養した。

6. S9 mix

(1) S9 及び保存法

次表通りに調製された S9 を超低温フリーザー（-70℃以下）で保存し、製造後 6 箇月以内のものを使用時に解凍して使用した。

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	PB 及び 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週令	7 週令	投与期間及び投与用量 (mg/kg 体重)	1 日目 PB 30 mg/kg
体重	196~240 g		2 日目 PB 60 mg/kg
			3 日目 PB 60 mg/kg + 5,6-BF 80 mg/kg
			4 日目 PB 60 mg/kg

PB：フェノバルビタール、5,6-BF：5,6-ベンゾフラボン

(2) S9 mix の組成

組成 (1mL 当たり)		
S9	0.3	mL (30%)
MgCl ₂	5	µmol
KCl	33	µmol
グルコース・6-リン酸	5	µmol
NADP	4	µmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4	µmol
超純水	残量	

S9 mix は前記組成濃度になるように必要量を用時調製とした。

7. 用量

(1) 細胞増殖抑制試験

ガイドラインで定められている 10 mM 相当の 1.001 mg/mL を最高用量とし、以下公比 3 で 0.334、0.111、0.037、0.012、0.004 及び 0.001 mg/mL の計 7 用量を設定した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、全ての培養系列で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) は、短時間処理法の S9 無添加培養系列及び S9 添加培養系列で 0.035 及び 0.150 mg/mL、連続処理法の 24

時間培養系列で 0.040 mg/mL であった。また、全ての培養系列で被験物質の析出は認められなかった。これらの結果に基づき、短時間処理法の S9 無添加培養系列及び連続処理法の 24 時間培養系列では、最高用量を 0.050 mg/mL とし、以下公比 2 で 0.0250、0.0125 及び 0.0063 mg/mL の計 4 用量を設定した。短時間処理法の S9 添加系列では、最高用量を 0.2000 mg/mL とし、以下公比 2 で 0.1000、0.050 及び 0.025 mg/mL の計 4 用量を設定した。

8. 被験物質及び対照物質の調製

(1) 被験物質の調製

① 溶媒及び選択理由

事前に被験物質の生理食塩液及び DMSO に対する 10 mM 相当 (1.001 mg/mL) の濃度における溶解性を確認した結果、被験物質はいずれにも溶解した。また、生理食塩液に対する安定性を目視で確認した結果、いずれの溶媒も発熱、発泡、着色 (変色) は認められなかったため安定と判断した。以上の結果から、試験に用いる溶媒として生理食塩液を選択した。

② 調製方法

細胞増殖抑制試験では、被験物質 100.2 mg に生理食塩液を適量加えて溶解させた後、10 mL に定容して最高用量液を調製した。さらに最高用量液を段階希釈して各用量の被験物質液を用時調製した。

染色体異常試験では、被験物質 5.0 及び 20.2 mg に生理食塩液を適量加えて溶解させた後、それぞれ 10 mL に定容して最高用量液を調製した。さらに最高用量液を段階希釈して各用量の被験物質液を用時調製した。

(2) 陰性対照物質

溶媒として使用する生理食塩液を用いた。

(3) 陽性対照物質の調製

① MMC

MMC を注射用水で溶解し、生理食塩液で希釈して 10 µg/mL (用量 : 0.1 µg/mL) となるように調製後、-10°C 以下で保存して使用時に解凍した。

② B[a]P

B[a]P を DMSO で溶解し、4 mg/mL (用量 : 20 µg/mL) となるように調製後、-70°C 以下に保存して使用時に解凍した。

9. 試験方法

試験は石館の方法¹⁾に従って実施し、短時間処理法の S9 添加及び S9 無添加培養系列並びに連続処理法の 24 時間培養系列の計 3 系列を設定した。

(1) 前培養

凍結保存細胞液を解凍後、25 cm² プラスチックフラスコに播種して培養した。その後、試験に供するまで 3~5 日ごとに継代を行った。なお、細胞増殖抑制試験で継代数 13、染色体異常試験で継代数 18 の細胞を使用した。

(2) 細胞浮遊液の調製

前培養終了後、トリプシン処理して剥離させた細胞を 1000 rpm で 5 分間遠心分離して集め、培地を加えて懸濁させた。これを一部採取して、血球計算盤で細胞数を計数し、細胞数が 1×10^4 個/mL となるように培地で調製した。

(3) 細胞増殖抑制試験

1×10^4 個/mL の細胞懸濁液を 35 mm シャーレ {用量につき 2 枚、試験物質処理開始時の細胞数計数用として 2 枚のシャーレ (処理開始時細胞数測定用シャーレ)} に 2 mL ずつ播き 3 日間培養した。なお、シャーレの蓋に試験を識別する符号を、蓋及び側面にシャーレを識別する通し番号を油性ペンでそれぞれ記入した。

処理開始時に、処理開始時細胞数測定用シャーレの細胞をトリプシン (2 mL/シャーレ) 処理して剥離させ、その細胞懸濁液 20 μ L に 0.4 w/v% トリパンブルー溶液 20 μ L を良く混合し、倒立型顕微鏡及び血球計算盤を用いて生細胞数 (色素に染色されていない細胞) を計数した。

連続処理法の場合には各シャーレに陰性対照物質液又は被験物質液を 0.1 mL/mL ずつ加え、24 時間培養した。なお、被験物質処理時及び培養終了時に、被験物質の析出状況を観察した。

短時間処理法の S9 添加及び S9 無添加培養系列の場合には、はじめに S9 の最終濃度が 5% となる量の S9 mix を S9 添加培養系列に加え、その後、各シャーレに連続処理法と同様の条件で陰性対照物質液又は各被験物質液を加えた。両系列とも連続処理法と同様の条件で 6 時間培養した後、シャーレ内の培地を除去して 37°C に温めた生理食塩液で洗浄後、37°C に温めた培地を加えさらに 18 時間培養した。なお、被験物質処理時及び 6 時間の培養終了時に、被験物質の析出状況を観察した。

培養終了後、処理開始時細胞数測定用シャーレの細胞数を計数した方法と同様の手順で、各用量のシャーレの細胞数を計数した。式を用いて各用量の RICC (Relative Increase Cell Count) を算出した。なお、いずれの用量 (処理開始

時細胞数測定用シャーレを含む)においても各シャーレの平均値を計算に用いた。得られた結果を図示し、概略の IC₅₀ を求めた。

細胞増加数 = 培養終了時の細胞数 - 処理開始時の細胞数

RICC = 各用量群の細胞増加数 / 陰性対照群の細胞増加数 × 100

(4) 染色体異常試験

① 試験の系列

各培養系列につき、被験物質群、陰性対照群及び陽性対照群を設置し、さらに染色体異常試験と併行して RICC を算出した。シャーレ数については、各培養系列及び用量につき標本作製用 2 枚、処理開始時細胞数測定用シャーレ 2 枚とした。

② 細胞の播種、処理及び培養法

a. 細胞の播種

1×10⁴ 個/mL に調整した細胞懸濁液を 60 mm シャーレに 5 mL ずつ播き、3 日間培養した。培養後、細胞の増殖の状態を倒立型顕微鏡で確認した。なお、試験を識別する符号をシャーレの蓋に、シャーレを識別する通し番号を油性ペンで蓋及び側面に記入した。

b. 細胞数の計数 (処理開始時)

処理開始時に、細胞増殖抑制試験と同様に、処理開始時細胞数測定用シャーレの細胞数を計数した。

c. 処理量

被験物質液及び陰性対照物質液の添加量は 0.1 mL/mL、連続処理法及び短時間処理法の S9 無添加培養系列で用いる陽性対照物質液の MMC は 0.01 mL/mL、短時間処理法の S9 添加培養系列で用いる陽性対照物質液の B[a]P は 0.005 mL/mL とした。

d. 処理

短時間処理法の S9 添加培養系列の場合には、はじめに S9 の最終濃度が 5% となる量の S9 mix を加えた後、各用量の被験物質液、陰性対照物質液又は陽性対照物質液を加えた。

短時間処理法の S9 無添加培養系列、連続処理法の 24 時間培養系列の場合には細胞を播種した各シャーレに各用量の被験物質液、陰性対照物質液又は陽性対照物質液を加えた。

被験物質処理時に被験物質の析出状況を観察した。

e. 培養法

短時間処理法では CO₂ インキュベーターを用いて、6 時間培養した後、S9 及び各物質を除去して 37°C に温めた生理食塩液で洗浄後、あらたに培地を加えさらに 18 時間培養した。

連続処理法では短時間処理法と同様な条件で 24 時間培養した。

短時間処理法では 6 時間、連続処理法では 24 時間の培養終了時に被験物質の析出状況を観察した。

③ 細胞の計数（培養終了時）及び染色体標本の作製

全シャーレについて、培養終了 2 時間前にコルセミド溶液を最終濃度が 0.2 µg/mL となるように加え、分裂中期細胞を蓄積させた。培養終了後、トリプシン（2 mL/シャーレ）処理して細胞を剥離させ、細胞増殖抑制試験と同様に細胞数を計数し、RICC を算出した。細胞数の計数に使用しなかった残りの細胞懸濁液を遠沈管に移し、0.075 mol/L KCl で低張処理した。その後、カルノア液（メタノール：酢酸=3：1）で固定後、スライドグラスに 1~2 滴を滴下して風乾させ、ギムザ染色液希釈用緩衝液で 1.5% に調製したギムザ染色液を用いて染色しプレート標本とした。

④ 標本のランダムサイズ

3 桁の乱数を標本の枚数分作りスライド番号とし、シャーレ番号 1 から乱数を割り当てた。

10. 観察

(1) 観察細胞数

各プレート標本当たり 150 個（1 用量当たり 300 個）のよく広がった分裂中期像について、生物顕微鏡で観察し、構造異常細胞及び数的異常細胞の数を記録した。

観察はランダムサイズしたスライド番号に従い実施した。

(2) 分類法

異常が認められた場合は、次に示す様に分類した。また、倍数体、ギャップについては別に記録した。

染色体異常の分類	略称
ギャップ	(g)
構造異常	
染色分体型切断	(ctb)

染色分体型交換 (cte)

染色体型切断 (csb)

染色体型交換 (cse)

その他 (断片化等) (o)

数的異常

倍数体

染色分体幅よりも狭い非染色性部位のものをギャップ (g) とした。また、その他(o)には 1 個の分裂中期像に多数のギャップ、切断などがあつた場合に断片化 (Frg.) として記録した。

11. 統計学的解析方法

染色体異常出現率については、陰性対照群と被験物質群及び陰性対照群と陽性対照群との間で Fisher の正確確率検定を、被験物質群の用量依存性については Cochran-Armitage の傾向検定をそれぞれ実施した。なお、有意水準は危険率 5% とした。

12. 結果の判定

Fisher の正確確率検定で、被験物質群のいずれの用量においても構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度が陰性対照群と比較して有意な増加が認められず、Cochran-Armitage の傾向検定で用量依存性の増加が認められない場合、かつ陰性対照群の背景データの 95% 管理限界内 (ポアソン分布) 又は C 管理図の管理下に収まり、陽性対照群の構造異常細胞又は数的異常細胞の出現頻度が陰性対照群と比較して有意に増加している場合に陰性と判定した。

Fisher の正確確率検定で、少なくとも 1 つの被験物質群の用量で構造異常細胞又は数的異常細胞の出現頻度が陰性対照群と比較して有意な増加が認められ、Cochran-Armitage の傾向検定で用量依存性の増加が認められる場合、かつ Fisher の正確確率検定で有意な増加が認められた用量では、いずれも陰性対照群の背景データの 95% 管理限界内又は C 管理図の管理下から外れており、陽性対照群の構造異常細胞又は数的異常細胞の出現頻度が陰性対照群と比較して有意に増加している場合に陽性と判定した。

なお、ギャップのみを持つ細胞は構造異常細胞に含めなかった。

試験結果を陽性と判定したため、用量依存性から構造異常を持つ細胞又は数的異常を持つ細胞が 20% 出現する推定濃度 (D₂₀ 値) を算出した。

陰性、陽性対照群の染色体異常細胞の出現頻度が、共に背景データのポアソン分布あるいは C 管理図の範囲内（管理下）であれば実験操作が適切に行われたものとした。

(1) D₂₀ 値

陽性結果を示した培養系列について、最小二乗法で以下の式で示される回帰曲線の定数 a 及び b を求めた。

$$Y=a \cdot X+b \quad (Y: \text{異常細胞の出現頻度、} X: \text{用量})$$

求められた定数 a 及び b を上記式に代入し、Y の値が 20%になる時の X の値を D₂₀ 値とした。

IV. 結果及び考察

1. 細胞増殖抑制試験

短時間処理法の S9 無添加及び S9 添加培養系列、並びに連続処理法の 24 時間培養系列について実施した。被験物質の最高用量を 10 mM 相当 (1.001 mg/mL) とし、以下公比 3 で 0.334、0.111、0.037、0.012、0.004 及び 0.001 mg/mL の計 7 用量を設定した。試験結果を図 1-1、1-2、別表 1 に示す。

(1) 細胞増殖率

全ての培養系列で 50%を超える RICC の低下が認められ、各培養系列の IC₅₀ は、短時間処理法の S9 無添加培養系列及び S9 添加培養系列で 0.035 及び 0.150 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列で 0.040 mg/mL と算出された。

(2) 被験物質の析出

全ての培養系列で、被験物質の析出は認められなかった。

2. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果から、短時間処理法の S9 無添加培養系列及び連続処理法の 24 時間培養系列では、最高用量を 0.050 mg/mL とし、以下公比 2 で 0.0250、0.0125 及び 0.0063 mg/mL の計 4 用量を設定した。短時間処理法の S9 添加系列では、最高用量を 0.2000 mg/mL とし、以下公比 2 で 0.1000、0.050 及び 0.025 mg/mL の計 4 用量を設定した。試験結果を図 2-1、2-2、別表 2、3 に示す。

(1) 細胞増殖率

短時間処理法の S9 無添加培養系列では、0.050 mg/mL の用量で細胞増殖抑制が認められた。

短時間処理法の S9 添加系列では、0.1000 mg/mL 以上の用量で細胞増殖抑制が認められた。

連続処理法の 24 時間培養系列では、0.025 mg/mL 以上の用量で細胞増殖抑制が認められた。

(2) 被験物質の析出

全ての培養系列で、被験物質の析出は認められなかった。

(3) 細胞の観察

陰性対照群における構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度は、全ての培養系列で 0% 及び 0~1.0% であった。

被験物質群における構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度は短時間処理法の S9 無添加培養系列で 0~4.3% 及び 0~0.7%、短時間処理法の S9 添加系列で 0~1.0 及び 0.3~1.0%、連続処理法の 24 時間培養系列で 0~4.7% 及び 0.3~1.7% であり、短時間処理法の S9 無添加培養系列及び連続処理法の 24 時間培養系列の構造異常細胞の出現頻度が用量依存的に増加した。一方、短時間処理法の S9 添加培養系列の構造異常細胞の出現頻度及び全ての培養系列の数的異常細胞の出現頻度に、陰性対照群と比較して有意な増加は認められなかった。これらの結果に基づいて算出した D₂₀ 値は、短時間処理法の S9 無添加系列で 0.260 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列で 0.210 mg/mL となった。

各陽性対照群では、構造異常細胞の出現頻度に顕著な増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下における 2,3 - ペンタンジオンの染色体異常誘発性は陽性と判定された。

なお、短時間処理法の S9 無添加系列及び連続処理法の 24 時間培養系列の被験物質群の各 1 用量で構造異常細胞の出現頻度に陰性対照群と比較して Fisher の正確確率検定で有意な増加が認められ、かつ Cochran-Armitage の傾向検定で用量依存的な増加が認められた。また、この用量はいずれも陰性対照群の背景データの 95% 管理限界内又は C 管理図の管理下から外れており、陽性対照群は陰性対照群と比較して有意に増加した。

陰性及び陽性対照群における構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度は、

[REDACTED]

背景データのポアソン分布の95%管理限界内又はC管理図の管理下に収まったため実験操作が適切に行われたと判断した。

V. 試験関連資料の保存

1. 保存期間

試験終了後3年間

2. 保存物及び保存場所

試験計画書(原本)、試験に関する記録文書、試験実施によって得られた生データ類、最終報告書(原本)、資料類、プレート標本：[REDACTED]の資料保存施設

VI. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。

VII. 参考文献

- 1) 石館基：染色体異常による変異原の検出法、変異原と毒性、1(4)、64-73、1978.

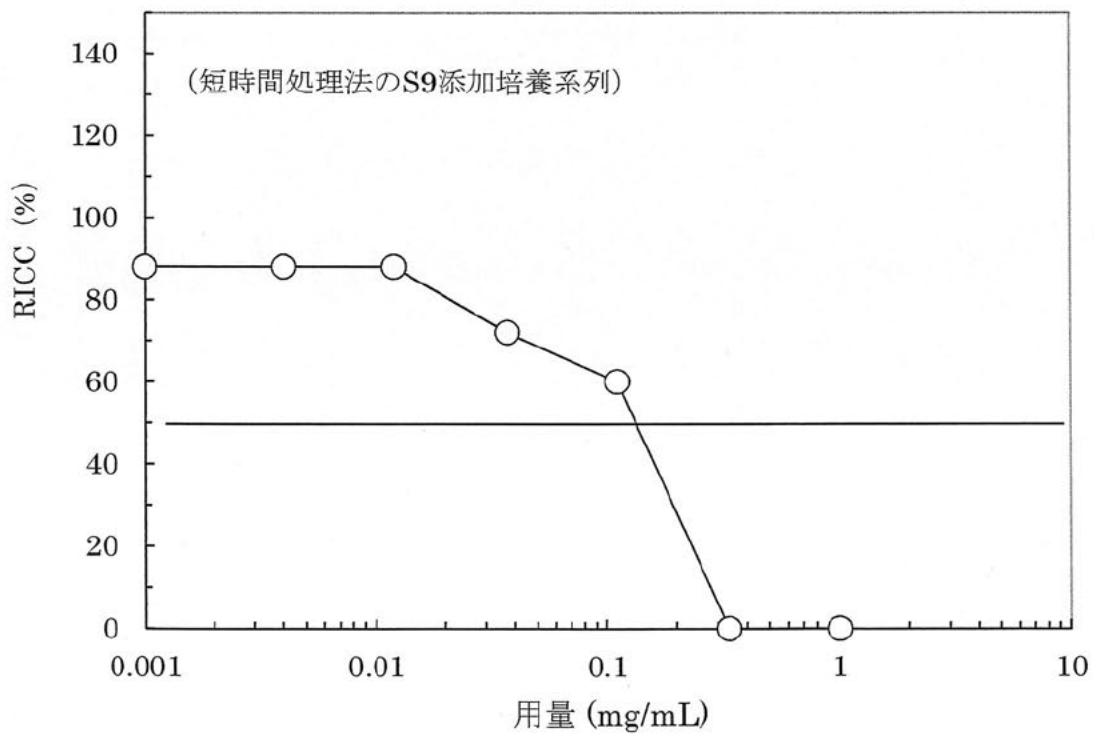
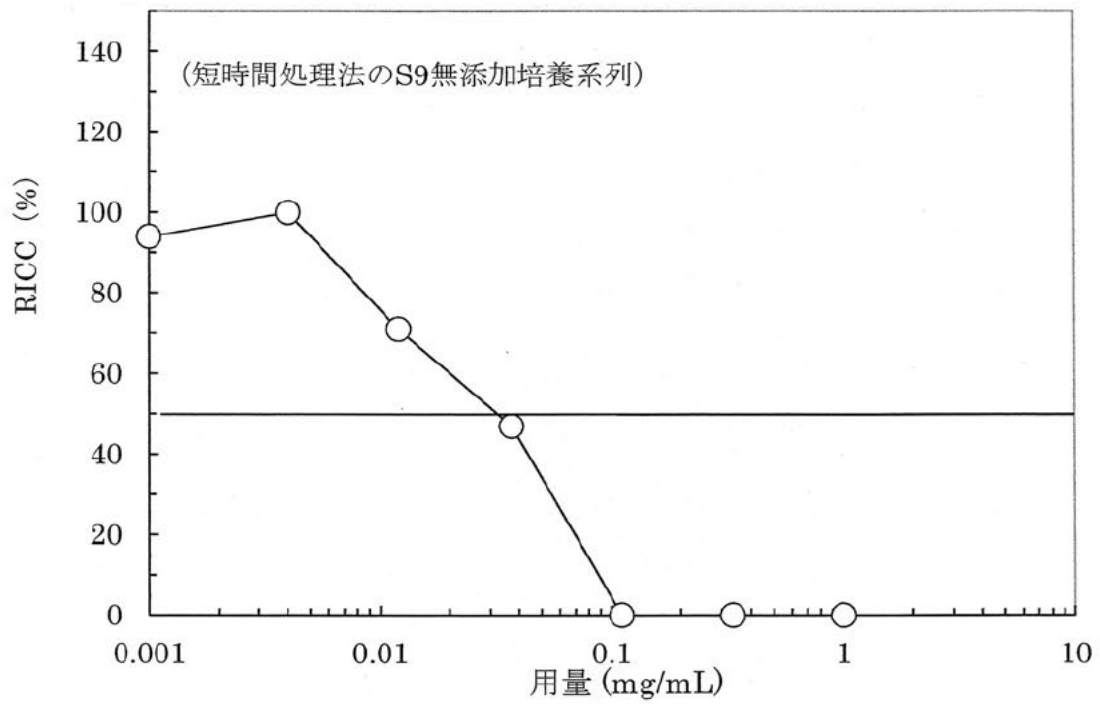


図 1-1 2,3 - ペンタンジオンがCHL/IU細胞の増殖に及ぼす影響 (短時間処理法)
 RICC : Relative Increase Cell Count

試験番号 XXXXXXXXXX

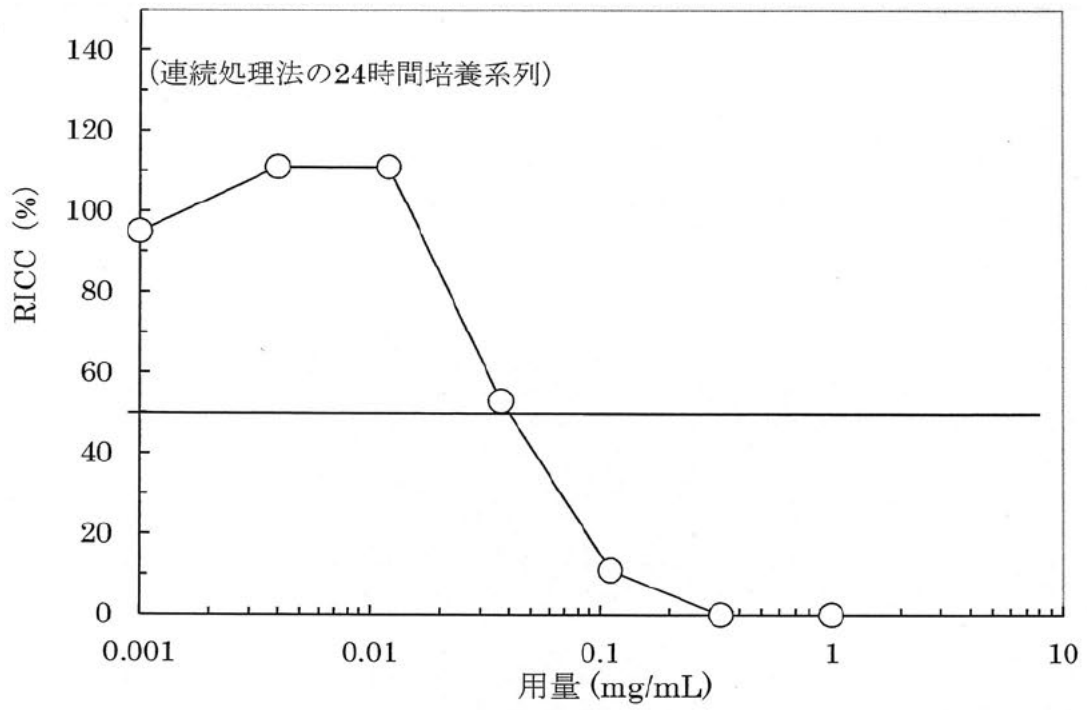


図 1-2 2,3 - ペンタンジオンがCHL/IU細胞の増殖に及ぼす影響 (連続処理法)
RICC : Relative Increase Cell Count

試験番号 XXXXXXXXXX

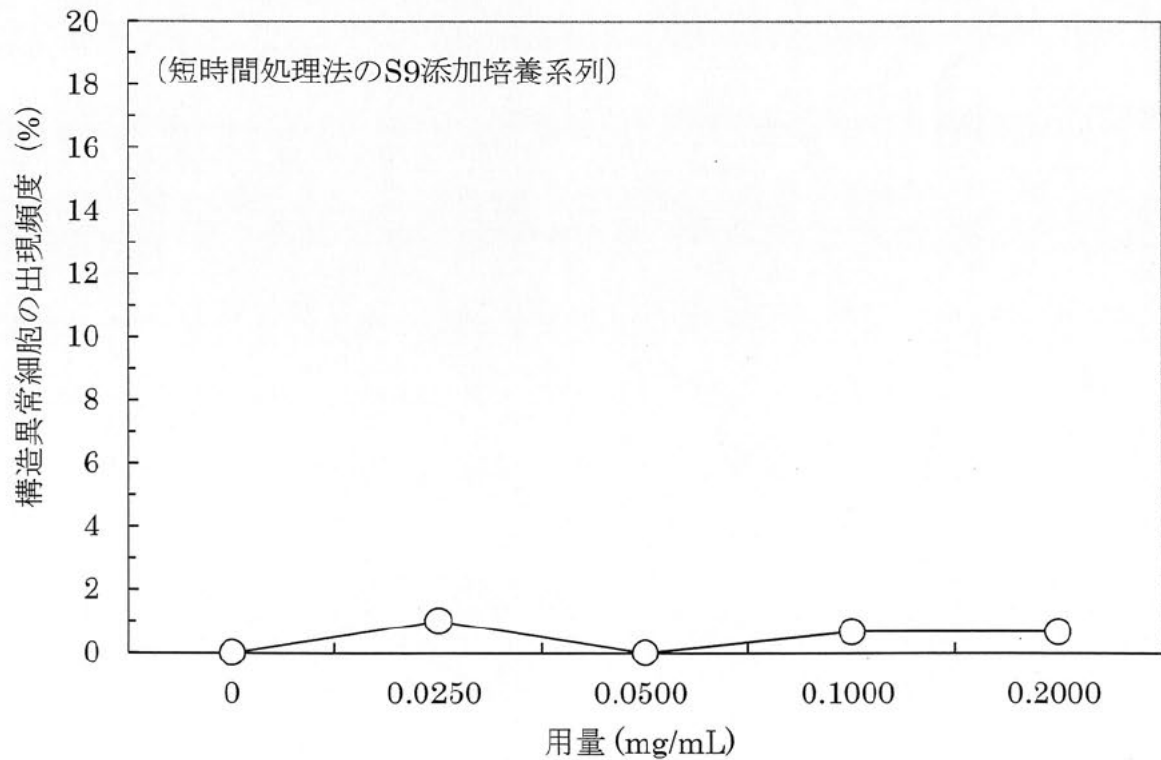
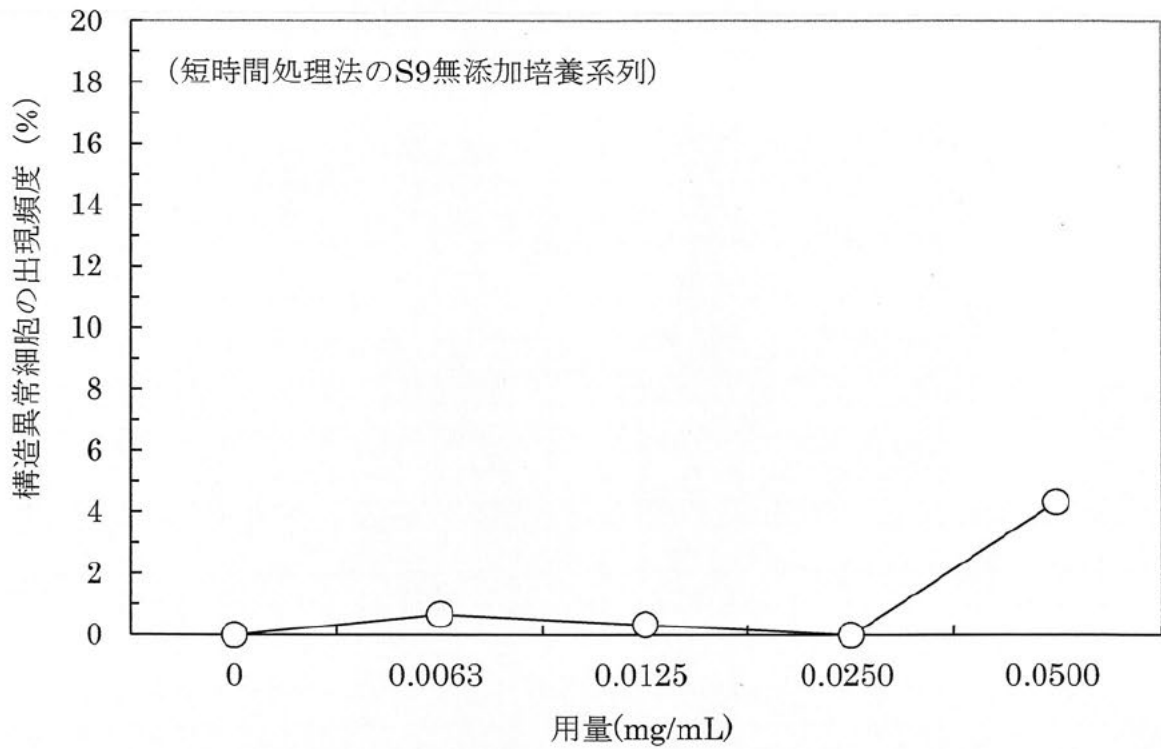


図 2-1 2,3 - ペンタンジオンの染色体異常誘発性、用量-反応曲線 (短時間処理法)

試験番号 XXXXXXXXXX

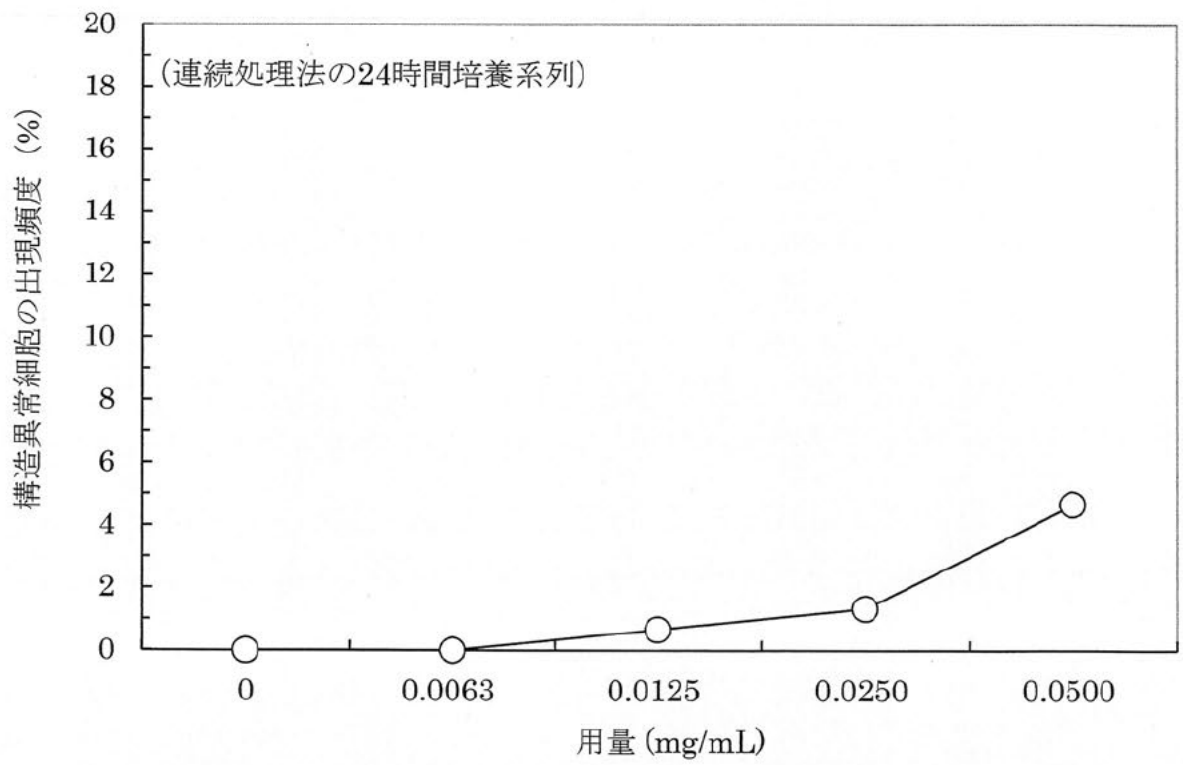


図 2-2 2,3 - ペンタンジオンの染色体異常誘発性、用量-反応曲線 (連続処理法)

試験番号 XXXXXXXXXX

別表 1 細胞増殖抑制試験の結果

被験物質の名称 : 2,3 - ペンタンジオン

用量 (mg/mL)	RICC (%)		
	短時間処理法		連続処理法
	S9無添加培養系列	S9添加培養系列	24時間培養系列
0 (陰性対照物質)	100	100	100
0.001	94	88	95
0.004	100	88	111
0.012	71	88	111
0.037	47	72	53
0.111	0	60	11
0.334	0	0	0
1.001	0	0	0

陰性対照物質：生理食塩液

RICC：Relative Increase Cell Count

試験番号



別表2 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質名称：2,3-ペンタンジオン

処理時間 ^D (hr)	S9 mix	用量 (mg/mL)	染色体構造異常の細胞数（出現頻度 %）							ギャップ の出現数	RICC (%)	染色体の致的異常の細胞数（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	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍染色体	その他	総異常細胞数(%)		
6-18	-	陰性対照 (生理食塩液) 0	150	0	0	0	0	0	0	0	1	100	150	1	0	1	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0		0	150	1	0	1
			300	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		0 (0.0)	300	2 (0.7)	0 (0.0)	2 (0.7)
6-18	-	0.0063	150	0	1	0	0	0	1	0	0	124	150	1	0	1	
			150	0	1	0	0	0	1	0	0		150	1	0	1	
			300	0 (0.0)	2 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	300	2 (0.7)	0 (0.0)	2 (0.7)
6-18	-	0.0125	150	0	0	0	0	0	0	1	1	89	150	1	0	1	
			150	1	0	0	0	0	1	1	1		150	0	0	0	
			300	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	2 (0.7)	2 (0.7)		2 (0.7)	300	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)
6-18	-	0.0250	150	0	0	0	0	0	0	0	0	71	150	1	0	1	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0		150	1	0	1	
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	300	2 (0.7)	0 (0.0)	2 (0.7)
6-18	-	0.0500	150	4	3	0	0	0	7	1	1	67	150	0	0	0	
			150	2	3	1	0	0	6	1	1		150	0	0	0	
			300	6 (2.0)	6 (2.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (4.3)*	2 (0.7)	2 (0.7)		2 (0.7)	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.0001	150	11	43	0	0	0	49	3	3	102	150	1	0	1	
			150	14	50	0	0	0	56	2	2		150	0	0	0	
			300	25 (8.3)	93 (31.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	105 (35.0)*	5 (1.7)	5 (1.7)		5 (1.7)	300	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)
6-18	+	陰性対照 (生理食塩液) 0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	100	150	0	0	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0		150	0	0	0	
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	0.0250	150	0	1	0	0	0	1	0	0	97	150	1	0	1	
			150	1	1	0	0	0	2	0	0		150	0	0	0	
			300	1 (0.3)	2 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	300	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)
6-18	+	0.0500	150	0	0	0	0	0	0	0	0	77	150	1	0	1	
			150	0	0	0	0	0	0	1	1		150	1	0	1	
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)		1 (0.3)	300	2 (0.7)	0 (0.0)	2 (0.7)
6-18	+	0.1000	150	0	1	0	0	0	1	1	1	69	150	1	0	1	
			150	0	1	0	0	0	1	0	0		150	0	0	0	
			300	0 (0.0)	2 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.7)	1 (0.3)	1 (0.3)		1 (0.3)	300	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)
6-18	+	0.2000	150	0	1	0	0	0	1	1	1	57	150	1	0	1	
			150	0	0	0	1	0	1	0	0		150	2	0	2	
			300	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	2 (0.7)	1 (0.3)	1 (0.3)		1 (0.3)	300	3 (1.0)	0 (0.0)	3 (1.0)
6-18	+	陽性対照 (B[a]P) 0.0200	150	4	80	0	1	0	79	1	1	40	150	2	0	2	
			150	5	83	0	1	0	84	0	0		150	0	0	0	
			300	9 (3.0)	163 (54.3)	0 (0.0)	2 (0.7)	0 (0.0)	163 (54.3)*	1 (0.3)	1 (0.3)		1 (0.3)	300	2 (0.7)	0 (0.0)	2 (0.7)

^D 処理時間及び回復時間の順に記載した。
各群のプレートごとの異常細胞数を1及び2行目に記載し、その合計及び出現頻度（括弧内）を3行目に記載した。

RICC : Relative Increase Cell Counts

陽性対照 (MMC) : マイトマイシンC、(B[a]P) : ベンゾ[a]ピレン

* : 陰性対照に対する統計学的有意差 (P<0.05)

試験番号

別表3 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質名称：2,3-ペンタンジオン

処理時間 (hr)	用量 (mg/mL)	染色体構造異常の細胞数（出現頻度 %）							ギャップ の出現数	RICC (%)	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度 %）			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数(%)
24	陰性対照 (生理食塩液) 0	150	0	0	0	0	0	0	2	100	150	1	0	1
		150	0	0	0	0	0	0	1		150	2	0	2
		300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		3 (1.0)	300	3 (1.0)	0 (0.0)
24	0.0063	150	0	0	0	0	0	0	0	82	150	1	0	1
		150	0	0	0	0	0	0	0		150	0	0	0
		300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	300	1 (0.3)	0 (0.0)
24	0.0125	150	0	0	0	0	0	0	0	70	150	2	0	2
		150	2	0	0	0	0	2	1		150	3	0	3
		300	2 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.7)	1 (0.3)		300	5 (1.7)	0 (0.0)	5 (1.7)
24	0.0250	150	2	0	0	0	0	2	0	57	150	2	0	2
		150	0	2	0	0	0	2	0		150	1	0	1
		300	2 (0.7)	2 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.3)	0 (0.0)		300	3 (1.0)	0 (0.0)	3 (1.0)
24	0.0500	150	5	3	0	0	0	8	2	52	150	1	0	1
		150	2	4	0	0	0	6	1		150	0	0	0
		300	7 (2.3)	7 (2.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (4.7)*	3 (1.0)		300	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)
24	陽性対照 (MMC) 0.0001	150	14	63	0	0	0	68	3	77	150	0	0	0
		150	4	50	0	0	0	51	0		150	1	0	1
		300	18 (6.0)	113 (37.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	119 (39.7)*	3 (1.0)		300	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)

各群のプレートごとの異常細胞数を1及び2行目に記載し、その合計及び出現頻度（括弧内）を3行目に記載した。

RICC : Relative Increase Cell Counts

陽性対照 (MMC) : マイトマイシンC

*: 陰性対照に対する統計学的有意差 (P<0.05)

試験番号

添付資料1 背景データ及び適合範囲

培養系列	試験物質	異常の種類	N (試験数)	異常細胞の出現頻度(%)			ポアソン分布(95%管理 限界)による管理(%)	C管理図による管理(%)	適合範囲(%)
				Mean	±	S.D.			
短時間処理法 S9無添加培養系列	陰性対照	構造異常	35	0.3	±	0.3	0.1~0.5	0.0~2.0	0.0~2.0
		数的異常	35	0.3	±	0.4	0.1~0.6	0.0~2.1	0.0~2.1
	(MMC)	構造異常	20	27.8	±	4.9	25.5~30.0	12.0~43.7	12.0~43.7
		数的異常	20	0.2	±	0.4	0.1~0.5	0.0~1.6	0.0~1.6
短時間処理法 S9添加培養系列	陰性対照	構造異常	35	0.2	±	0.2	0.1~0.4	0.0~1.6	0.0~1.6
		数的異常	35	0.3	±	0.3	0.1~0.5	0.0~2.0	0.0~2.0
	(B[a]P)	構造異常	20	39.7	±	6.7	36.9~42.3	20.8~58.5	20.8~58.5
		数的異常	20	0.3	±	0.4	0.1~0.6	0.0~1.9	0.0~1.9
連続処理法 24時間培養系列	陰性対照	構造異常	35	0.3	±	0.5	0.2~0.6	0.0~2.1	0.0~2.1
		数的異常	35	0.4	±	0.3	0.0~0.5	0.0~2.3	0.0~2.3
	(MMC)	構造異常	20	39.9	±	7.0	37.1~42.5	20.9~58.8	20.9~58.8
		数的異常	20	0.3	±	0.4	0.1~0.7	0.0~2.0	0.0~2.0

陰性対照: 生理食塩液、ジメチルスルホキシド、培地(10%ウシ血清添加)をまとめて集計

MMC: マイトマイシン C、B[a]P: ベンゾ[a]ピレン

収集期間:

陰性対照

陽性対照

~

~

試験番号