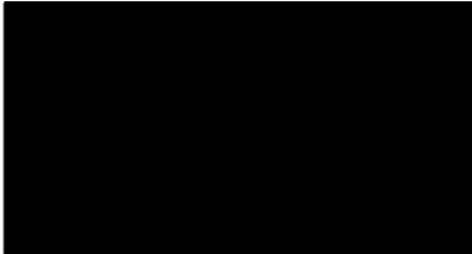




最 終 報 告 書

5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験



陳 述 書

試験委託者 国立医薬品食品衛生研究所

試験の表題 5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号

上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

「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）（ただし、信頼性保証部門による査察は実施しない）

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

試験責任者

目 次

	頁
1. 表 題	5
2. 試験番号	5
3. 試験委託者	5
4. 試験施設	5
5. 試験目的	5
6. 試験法	5
7. GLP 基準	5
8. 試験日程	5
9. 試験関係者	6
10. 試験資料の保管	6
11. 最終報告書作成者の承認	6
12. 要 約	7
13. 試験材料	8
13.1 被験物質及び対照物質	8
13.2 使用細胞	9
13.3 培地及び S9 mix	10
13.4 細胞の前培養	11
13.5 被験物質液及び陽性対照物質溶液の調製	11
14. 試験方法	11
14.1 細胞増殖抑制試験	11
14.2 染色体異常試験	13
14.3 D ₂₀ 値	14
15. 結果の判定基準	14
16. 試験の成立条件	14
17. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	14
18. 試験結果	14
18.1 細胞増殖抑制試験	14
18.2 染色体異常試験	15
18.3 代表的な写真	16
19. 背景データ	16
20. 考 察	16
21. 結 論	16
22. 参考文献	16

表 1	5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの細胞増殖抑制試験結果	17
表 2	染色体異常試験の結果（短時間処理法の S9 mix 非存在下）	18
表 3	染色体異常試験の結果（短時間処理法の S9 mix 存在下）	19
表 4	染色体異常試験の結果（連続処理法）	20
図 1	5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの細胞増殖抑制試験結果	21
図 2	5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの染色体異常試験における細胞増殖率	22
図 3	5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの短時間処理法による染色体異常試験結果	23
図 4	5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの短時間処理法による染色体異常試験結果	24
写真 1	正常細胞	25
写真 2	5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールにより誘発された構造異常	25
添付資料 1	試験施設における背景データ	26

1. 表 題

5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験番号

3. 試験委託者

名 称 国立医薬品食品衛生研究所

所在地

試験委託責任者

電 話

4. 試験施設

名 称

所在地

電 話

5. 試験目的

チャイニーズハムスターの肺線維芽細胞（CHL/IU 細胞）を用いて、被験物質の染色体異常誘発能の有無を検索する。

6. 試験法

「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、衛化第 29 号）の別添に定める「変異原性試験」の「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」

7. GLP 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について」（平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23-03-29 製局第 6 号、環企発第 110331010 号）（ただし、信頼性保証部門による査察は実施しない）

8. 試験日程

試験開始日

実験開始日

実験終了日

試験終了日

9. 試験関係者

試験責任者:

試験担当者:

(被験物質液の調製、細胞の処理及び標本観察)

(標本観察)

試験物質管理責任者:

10. 試験資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、契約書、被験物質に関する情報、その他の記録及び標本は試験施設に保管する。保管期間は試験終了後 10 年間とする。保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

11. 最終報告書作成者の承認

試験責任者:

12. 要 約

チャイニーズハムスターの肺線維芽細胞（CHL/TU 細胞）を用い、5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの染色体異常誘発能の有無を検討した。

短時間処理法の S9 mix 非存在下では、60.0、70.0 及び 80.0 $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix 存在下では 140、160 及び 180 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間連続処理法では、40.0、50.0 及び 60.0 $\mu\text{g/mL}$ の標本を観察した。

構造異常を持つ細胞の出現頻度は、短時間処理法の S9 mix 存在下では観察したすべての被験物質用量で 5%未満であったが、短時間処理法の S9 mix 非存在下では最大で 8.5%と 5%を超え、構造異常の誘発が疑われた。24 時間連続処理法では、最大で 11.5%と 10%を超え、その出現に用量依存性がみられたため、構造異常は陽性と判定した。

一方、数的異常細胞の出現頻度は、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び存在下並びに 24 時間連続処理法のいずれにおいても、観察したすべての被験物質用量で 5%未満であったため、数的異常は陰性と判定した。

以上の結果から、5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールは、本試験条件下では数的異常を誘発しないものの、構造異常を誘発するものと判断した。

13. 試験材料

13.1 被験物質及び対照物質

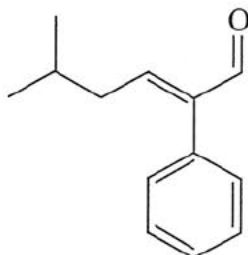
a) 被験物質 (試験委託者提供資料)

1) 名称等

名称 5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナール
CAS番号 21834-92-4

2) 構造式等

構造式



分子式 $C_{13}H_{16}O$
分子量 188.27

3) 純度等

被験物質純度 96.5% (混合異性体)
不純物 6-Phenylundecane 0.37%
1-Phenyl-1-hexanone 0.14%

製造者

供給者

ロット番号

被験物質は純度 100%として取り扱った。

4) 物理化学的性状

沸点 290~291°C
対水溶解度 < 18.8 mg/mL (試験施設で確認)
常温における性状 黄色液体
溶媒に対する溶解度等

溶 媒	溶解度	溶媒中の安定性
ジメチルスルホキシド (DMSO)	$\geq 188 \text{ mg/mL}^{*1}$	安定 ^{*1,2}

*1: 試験施設で確認

*2: 調製後 2 時間までの発熱・発泡の有無及び色調の変化で確認

5) 保管条件

気密容器に入れ、XXXXXXXXXXで室温 (許容範囲: 10~30°C) 保管した。

6) 取扱い上の注意

手袋、マスク、帽子、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入をさけた。また、被験物質は臭気があるため、局所排気装置内で取り扱った。

b) 陰性対照物質 (媒体)

1) 名称

ジメチルスルホキシド (DMSO)

2) 製造元、ロット番号、純度及びグレード

製造元 同仁化学研究所

ロット番号

純度 100.0%

グレード 紫外部吸収スペクトル用純溶媒

3) 媒体選択の理由

被験物質は、蒸留水では 18.8 mg/mL で懸濁状態不良、DMSO では 188 mg/mL で溶解した。DMSO で調製した 188 mg/mL の被験物質液は、室温で調製後 2 時間まで発熱・発泡及び色調の変化がなく、安定と判断されたため、DMSO を媒体に選択した。

4) 保管条件

で冷凍 (許容範囲: -30~-10°C) 保管した。

c) 陽性対照物質

1) 名称等

名称	製造元	ロット番号	含量	グレード
マイトマイシン C (MMC)	協和発酵キリン		99.0%	注射用
シクロホスファミド一水和物 (CPA)	和光純薬工業		99.2%	生化学用

2) 保管条件

MMC は で室温 (許容範囲: 10~30°C) 保管した。CPA は遮光し、 で冷所 (許容範囲: 1~10°C) 保管した。

3) 取扱い上の注意

手袋、マスク、帽子、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入をさけた。

13.2 使用細胞

a) 種類及び選択理由等

使用細胞 チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞 (CHL/IU 細胞)

入手先 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、ヒューマンサイエンス研究資源バンク

入手年月日

モード染色体数 25 本

倍加時間 約 15 時間

マイコプラズマ 陰性

構造異常を持つ細胞あるいは数的異常細胞の自然発生頻度 < 5%

選択理由 適用試験法において推奨されている。

b) 保 管

10 vol%DMSO を含む培養液[イーグル MEM 培地 (日水製薬) + 10 vol%の非働化した新生仔ウシ血清 (NBCS、三光純薬)]に懸濁して液体窒素内に凍結保管した。

c) 培養条件 (設定値)

培養器	炭酸ガス細胞培養装置 (MCO-18AIC、三洋電機)
温度	37°C
湿度	加湿条件下
炭酸ガス濃度	5%

d) 継 代

培養容器	直径 90 mm のプラスチック製ディッシュ (ヌンク)
頻度	週に 2 回
継代数	細胞増殖抑制試験 5 代 染色体異常試験 8 代

13.3 培地及び S9 mix

a) 培 地

イーグル MEM 培地 (ロット番号 [REDACTED] 日水製薬) に L-グルタミン (最終濃度: 0.292 g/L) 及び炭酸水素ナトリウム (最終濃度: 約 1.95 g/L) を添加し、基礎培地 (MEM 培地) を調製した。培養には、MEM 培地に非働化した NBCS (ロット番号 [REDACTED]、HyClone Laboratories) を 10 vol% 添加した培地を使用した。

b) S9 mix

1) ラット肝 S9

製造元	オリエンタル酵母工業
製造年月日	[REDACTED]
ロット番号	[REDACTED]
S9 蛋白量	21.5 mg/mL
使用動物	
種・系統	ラット・SD 系
性	雄
週令	7 週
体重	210.4±8.7 g
誘導物質	
名称	Phenobarbital (PB) 及び 5,6-benzoflavone (5,6-BF)
投与方法	腹腔内投与
投与期間及び投与量 (mg/kg 体重)	
	PB 30 mg/kg 1 回
	60 mg/kg 3 回
	5,6-BF 80 mg/kg 1 回
保管場所	[REDACTED]
保管温度	≤ -80°C (許容範囲)
使用方法	用時解凍

2) S9 mix の組成

成分	S9 mix 1 mL 中の量	成分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.3 mL	NADP	4 μmol
MgCl ₂	5 μmol	Na-リン酸緩衝液	—
KCl	33 μmol	HEPES (pH7.2)	4 μmol
グルコース -6-リン酸	5 μmol	その他 (—)	—

S9 mix は用時に調製し、使用時まで氷冷下で保管した。

13.4 細胞の前培養

培養容器 底面積 25 cm² のプラスチック製培養フラスコ (グライナー)
 細胞懸濁液濃度 5×10³ cells/mL
 細胞懸濁液量 5 mL
 期間 3 日間

13.5 被験物質液及び陽性対照物質溶液の調製

a) 被験物質液の調製

1) 調製法

被験物質を秤量した後、DMSO を加え攪拌 (チューブミキサー) して溶解させ、被験物質原液を調製した。被験物質原液を同媒体で希釈して、培地中の被験物質用量の 100 倍の濃度の被験物質液を調製した。

なお、純度が 95%以上であるため、純度補正せずに調製した。

2) 調製時期

用時に調製した後、室温で保管し、2 時間以内に使用した。

b) 陽性対照物質溶液の調製

1) 調製法及び保管

あらかじめ、MMC 及び CPA をそれぞれ蒸留水 (ロット番号 [REDACTED]、注射用、大塚製薬工場) に溶解させ、0.01 及び 1.00 mg/mL に調製し、[REDACTED] で凍結 (許容範囲: -80°C 以下) 保管した。

2) 調製時期

用時に解凍した後、室温で保管し、2 時間以内に使用した。

14. 試験方法

14.1 細胞増殖抑制試験

a) 操作手順

用量当たり 1 個の培養容器を用いた。被験物質は臭気を有するため、培養容器には培養フラスコを用いた。染色体異常試験の用量設定の参考になると判断された被験物質用量については、標本作製を実施した。

1) 処理

(1) 短時間処理法の S9 mix 非存在下 (-S9 mix) では、前培養した培地を除き、新しい培地 3 mL に 30 μL の被験物質液又は媒体を加え、よく混合したものを細胞に添加した。

- (2) 短時間処理法の S9 mix 存在下 (+ S9 mix) では、前培養した培地を除き、新しい培地 2.5 mL に 30 μ L の被験物質液又は媒体を加え、さらに S9 mix 0.5 mL を加え、よく混合したものを細胞に添加した。
- (3) - S9 mix 及び + S9 mix では 6 時間処理した後、培地を除き、Ca²⁺、Mg²⁺を含まないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液 2 mL で細胞を 3 回洗浄し、新たに培地 5 mL を加え、18 時間培養した。
- (4) 連続処理法では、前培養した培地を除き、新しい培地 5 mL に 50 μ L の被験物質液又は媒体を加え、よく混合したものを細胞に添加し、24 時間処理した。
- 2) いずれの処理法においても、処理中は密栓して、それ以外はかるく栓をした状態で培養した。
- 3) 培養終了 2 時間前に 10 μ g/mL のデメコルシン溶液を培養容器当たり 50 μ L 加えた。
- 4) 処理開始時、処理終了時及び培養終了時に、目視により被験物質の析出の有無、培地色の変化及び培養容器の腐食を観察した。
- 5) 培養終了後、0.25 w/v% トリプシン 2 mL で細胞を剥離させ、細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を 200 μ L 採取し、10 mL のセルパック (シスメックス) で希釈した後、Microcell counter (CDA-500、シスメックス) で細胞数を計測し、細胞増殖率及び 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) を求めた。IC₅₀ は、細胞増殖率が 50% 未満となる最低用量と、その用量の次に低い用量との細胞増殖率から得られる直線により算出した。
- 6) 標本作製
- (1) 残りの細胞懸濁液について、1000 rpm で 5 分間遠心後、細胞を回収し、0.075 mol/L KCl を 3 mL 加え、37°C で 15 分間低張処理した。低張処理した細胞に固定液 (メタノール: 酢酸 = 3:1) を約 0.3 mL 加えて半固定し、さらに、固定液 3 mL で 2 回取り替え、細胞を固定した。その後、固定液で適当な濃度の細胞懸濁液を作り、スライドに滴下した。用量当たり 1 枚の染色体標本作製した。
- (2) 自然乾燥後、1/15 mol/L のリン酸緩衝液 (pH6.8) で希釈調製した 2 vol% ギムザ染色液で約 15 分間染色した。

b) 用量段階

最高用量: 適用試験法に細胞毒性がみられない場合の上限と記載されている
10 mmol/L 相当の 1880 μ g/mL

処理法		被験物質の設定用量
短時間 処理	- S9 mix	29.4、58.8、118、235、470、940 及び 1880 μ g/mL (公比 2)
	+ S9 mix	
24 時間連続処理		

c) 標本観察

染色体異常試験の用量設定のために参考となる用量では、分裂細胞の有無を調べるとともに、分裂中期細胞を 50 個観察し、染色体異常細胞の出現頻度を求めた。

1) 構造異常

ギャップを除く下記の構造異常を持つ細胞数を記録した。なお、ギャップは染色分体幅より狭い非染色性部位とした。

- ・ 染色分体型切断
- ・ 染色分体型交換
- ・ 染色体型切断
- ・ 染色体型交換（二動原体、環状染色体、転座）
- ・ 断片化

2) 数的異常

3 倍体以上の倍数性細胞（染色体を 38 本以上持つ）及び核内倍加細胞数を記録した。

14.2 染色体異常試験

a) 操作手順

表に示す陽性対照を設置して、14.1 a)と同様の手順で実施した。なお、陰性対照、陽性対照及びすべての被験物質用量において、標本作製を実施した。使用する培養容器は用量当たり 2 個、作製する染色体標本は用量当たり 4 枚（培養容器当たり 2 枚）とした。

陽性対照は、培養容器当たり次表に示す添加量を添加した。

処理法		物質名	凍結保管液濃度	添加量	処理用量
短時間処理	- S9 mix	MMC	0.01 mg/mL	30 μ L	0.1 μ g/mL
	+ S9 mix	CPA	1.00 mg/mL	18 μ L	6.00 μ g/mL
24 時間連続処理		MMC	0.01 mg/mL	25 μ L	0.05 μ g/mL

b) 用量段階

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、被験物質の用量を設定した。以下に設定用量及びその理由を記載する。なお、細胞増殖率が陰性対照の 50%未満となった場合、細胞毒性がみられたと判断した。

いずれの処理法においても、細胞毒性がみられたため、 IC_{50} 以上の用量を被験物質の最高用量とし、-S9 mix 及び 24 時間連続処理法では公差 10、+S9 mix では公差 20 で希釈した次表に示す用量を設定した。

処理法		被験物質の設定用量
短時間 処理	- S9 mix	40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、110 及び 120 μ g/mL
	+ S9 mix	80.0、100、120、140、160、180、200 及び 220 μ g/mL
24 時間連続処理		10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0 及び 90.0 μ g/mL

c) 標本観察

1) 観察用量

対照として設置した陰性対照及び陽性対照の標本は、すべて観察した。

- S9 mix 及び 24 時間連続処理法では、細胞毒性がみられたため、次表に示す用量を被験物質の標本観察用量とした。

+S9 mix では、 IC_{50} 以上の用量の中で最も低い 200 μ g/mL において、強い細胞毒性がみられており、その下位の用量である 180 μ g/mL における細胞増殖率は 53.6%と約 50%であったことから、180 μ g/mL を最高用量とし、次表に示す用量を被験物質の標本観察用量とした。

処理法		被験物質の標本観察用量
短時間処理	- S9 mix	60.0、70.0 及び 80.0 µg/mL
	+ S9 mix	140、160 及び 180 µg/mL
24 時間連続処理		40.0、50.0 及び 60.0 µg/mL

観察する標本すべてにランダムに割り付けたスライド番号を付してブラインド法により観察した。

2) 構造異常

染色体数（動原体数）が 25 ± 2 本の分裂中期細胞を、用量当たり 200 個（標本当たり 50 個）観察した。構造異常を持つ総細胞数を記録するとともに、構造異常の種類別に細胞数を記録した。

3) 数的異常

分裂中期細胞を用量当たり 200 個（標本当たり 50 個）観察し、3 倍体以上の倍数性細胞（染色体を 38 本以上持つ）及び核内倍加細胞数をそれぞれ記録した。

14.3 D₂₀ 値

陰性と判定した処理法を除き、染色体異常細胞が 5%以上出現した処理法では、D₂₀ 値（細胞の 20%に異常が認められる濃度）を求めた。

15. 結果の判定基準

以下の場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。

- 染色体異常細胞の出現頻度が 10%以上であり、その出現に用量依存性がみられる場合
- 染色体異常細胞の出現頻度が、染色体異常試験と確認試験で 5%以上である場合
- 48 時間連続処理法による確認試験の結果、染色体異常細胞の出現頻度が 5%以上である場合

16. 試験の成立条件

- 陰性対照での染色体異常細胞の出現頻度が 5%未満
- 陽性対照での構造異常を持つ細胞の出現頻度が 20%以上

17. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験計画書からの逸脱を含む当該要因はなかった。

18. 試験結果

18.1 細胞増殖抑制試験

試験結果を表 1 及び図 1 に示す。

IC₅₀ は、- S9 mix では 81 µg/mL、+ S9 mix では 170 µg/mL、24 時間連続処理法では 53 µg/mL と算出された。

処理開始時及び処理終了時に、いずれの処理法においても 940 µg/mL 以上で被験物質の析出がみられた。いずれの処理法においても、培地色の変化及び培養容器の腐食はみられなかった。

18.2 染色体異常試験

a) 短時間処理法

試験結果を表 2、3 及び図 2、3 に示す。

1) - S9 mix

(1) IC₅₀

79 µg/mL

(2) 被験物質の析出、培地色の変化及び培養容器の腐食

被験物質の析出、培地色の変化及び培養容器の腐食はみられなかった。

(3) 構造異常を持つ細胞の出現頻度

陰性対照: < 5%

陽性対照: ≥ 20%

被験物質: 5%以上となり、誘発が疑われた。

(4) 数的異常細胞の出現頻度

全群とも 5%未満であったため、陰性と判定した。

(5) D₂₀ 値

構造異常: 0.20 mg/mL (参考値)

2) + S9 mix

(1) IC₅₀

180 µg/mL

(2) 被験物質の析出、培地色の変化及び培養容器の腐食

被験物質の析出、培地色の変化及び培養容器の腐食はみられなかった。

(3) 構造異常を持つ細胞の出現頻度

陰性対照: < 5%

陽性対照: ≥ 20%

被験物質: 5%未満であったため、陰性と判定した。

(4) 数的異常細胞の出現頻度

全群とも 5%未満であったため、陰性と判定した。

b) 24 時間連続処理法

試験結果を表 4 及び図 2、4 に示す。

1) IC₅₀

53 µg/mL

2) 被験物質の析出、培地色の変化及び培養容器の腐食

被験物質の析出、培地色の変化及び培養容器の腐食はみられなかった。

3) 構造異常を持つ細胞の出現頻度

陰性対照: < 5%

陽性対照: ≥ 20%

被験物質: 10%以上となり、その出現に用量依存性がみられたため、陽性と判定した。

4) 数的異常細胞の出現頻度

全群とも 5%未満であったため、陰性と判定した。

5) D₂₀ 値

構造異常: 0.11 mg/mL

18.3 代表的な写真

正常な細胞を写真 1、5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールによって誘発された構造異常を持つ細胞を写真 2 に示す。

19. 背景データ

試験施設の陰性対照及び陽性対照の背景データを添付資料 1 として添付した。

20. 考 察

いずれの処理法においても、陰性対照での染色体異常細胞の出現頻度が 5%未満であり、陽性対照での構造異常を持つ細胞の出現頻度が 20%以上であったことから、試験は適正に行われたと判断した。

染色体異常試験の結果、構造異常を持つ細胞の出現頻度は、+ S9 mix では観察したすべての被験物質用量で 5%未満であったが、- S9 mix では最大で 8.5%と 5%を超え、構造異常の誘発が疑われた。24 時間連続処理法では、最大で 11.5%と 10%を超え、その出現に用量依存性がみられたため、構造異常は陽性と判定した。

一方、数的異常細胞の出現頻度は、- S9 mix 及び+ S9 mix 並びに 24 時間連続処理法のいずれにおいても、観察したすべての被験物質用量で 5%未満であったため、数的異常は陰性と判定した。

21. 結 論

本試験条件下では、5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールは数的異常を誘発しないものの、構造異常を誘発するものと判断された。

22. 参考文献

1. 祖父尼俊雄監修、染色体異常試験データ集 (改訂 1998 年版)、エル・アイ・シー (1999)
2. 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 (1988)

表1 5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの細胞増殖抑制試験結果

物質	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	処理-回復 時間(h)	S9 mix	細胞増殖率 (%)	培地中の被験物質の 析出 ^{a)}			分裂細胞の 出現度合	異常細胞の出現頻度 (%) ^{b)}	
					処理 開始時	処理 終了時	培養 終了時		構造異常	数的異常
DMSO	0	6-18	-	100	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
5-メチル-2- フェニル-2- ヘキセナール	29.4	6-18	-	97.9	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	58.8	6-18	-	78.1	-	-	-	abundant	2.0	2.0
	118	6-18	-	1.7	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	235	6-18	-	0.2	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	470	6-18	-	0.5	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	940	6-18	-	1.4	+	+	-	n.s.	n.s.	n.s.
	1880	6-18	-	1.2	+	+	-	n.s.	n.s.	n.s.
IC ₅₀ : 81 $\mu\text{g/mL}$										
DMSO	0	6-18	+	100	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
5-メチル-2- フェニル-2- ヘキセナール	29.4	6-18	+	91.1	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	58.8	6-18	+	92.9	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	118	6-18	+	87.9	-	-	-	abundant	2.0	0.0
	235	6-18	+	10.0	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	470	6-18	+	0.4	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	940	6-18	+	0.6	+	+	-	n.s.	n.s.	n.s.
	1880	6-18	+	0.3	+	+	-	n.s.	n.s.	n.s.
IC ₅₀ : 170 $\mu\text{g/mL}$										
DMSO	0	24-0	-	100	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
5-メチル-2- フェニル-2- ヘキセナール	29.4	24-0	-	85.9	-	-	-	abundant	10.0	2.0
	58.8	24-0	-	42.0	-	-	-	abundant	10.0	0.0
	118	24-0	-	1.4	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	235	24-0	-	0.9	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	470	24-0	-	1.9	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	940	24-0	-	4.8	+	+	-	n.s.	n.s.	n.s.
	1880	24-0	-	5.2	+	+	-	n.s.	n.s.	n.s.
IC ₅₀ : 53 $\mu\text{g/mL}$										

DMSO: ジメチルスルホキシド

n.s.: 標本作製せず、abundant: 分裂細胞が十分に出現

a) 被験物質の析出は、有りを+、無しを-とした。

b) 用量当たり50個の分裂細胞を観察し、染色体異常細胞の出現頻度を求めた。

注) 適用試験法に細胞毒性のみられない場合の上限と記載されている10 mmol/L相当の1880 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量に、公比2で希釈した上記用量を設定した。

表 2 染色体異常試験の結果 (短時間処理法のS9 mix非存在下)

被験物質名:5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナール

処理時間 (h)	S9 mix	用量 (µg/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップの出現数 (出現頻度%)	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数
6-18	-	陰性対照 (DMSO) 0	100	1	1	0	0	0	2	0	100	100	0	0	0
			100	1	1	0	0	0	2	0		100	0	0	0
			200	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	0 (0.0)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	40.0	0								89.4	0			
			0								93.1	0			
			0								(91.3)	0			
6-18	-	50.0	0								84.3	0			
			0								87.5	0			
			0								(85.9)	0			
6-18	-	60.0	100	0	0	0	0	0	1	73.3	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	63.1	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)	(68.2)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	-	70.0	100	1	0	0	0	0	1	58.5	100	2	0	2	
			100	4	0	0	0	0	4	0	57.7	100	1	0	1
			200	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0 (0.0)	(58.1)	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6-18	-	80.0	100	9	0	0	0	0	9	0	50.7	100	1	0	1
			100	8	0	0	0	0	8	0	48.2	100	0	0	0
			200	17 (8.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (8.5)	0 (0.0)	(49.5)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	-	90.0	0								36.5	0			
			0								40.2	0			
			0								(38.4)	0			
6-18	-	100	0								26.3	0			
			0								21.0	0			
			0								(23.7)	0			
6-18	-	110	0	TOX (no metaphases)							2.8	0	TOX (no metaphases)		
			0								3.0	0			
			0								(2.9)	0			
6-18	-	120	0	TOX (no metaphases)							1.7	0	TOX (no metaphases)		
			0								0.8	0			
			0								(1.3)	0			
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.1	100	47	39	0	0	0	62	1		100	0	0	0
			100	34	36	0	0	0	55	0		100	3	0	3
			200	81 (40.5)	75 (37.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	117 (58.5)	1 (0.5)		200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)

処理時間は処理時間-回復時間を表す。

異常細胞数は各群のプレートごとのデータを1及び2行目、その合計を3行目に表す。

細胞増殖率は各被験物質群のプレートごとの数値を1及び2行目、その平均を3行目に表す。

DMSO:ジメチルスルホキシド、MMC:マイトマイシンC

no metaphases: 分裂細胞の出現がみられない

40.0、50.0、90.0及び100 µg/mLの標本は観察しなかった。

表3 染色体異常試験の結果（短時間処理法のS9 mix存在下）

被験物質名:5-メチル-2-フェニル-2-ヘキサノール

処理時間 (h)	S9 mix	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数 (出現頻度%)	細胞 増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数
6-18	+	陰性対照 (DMSO) 0	100	0	1	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	2	0	2
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)		200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6-18	+	80.0	0								92.0	0			
			0								95.4	0			
			0								(93.7)	0			
6-18	+	100	0								90.7	0			
			0								91.6	0			
			0								(91.2)	0			
6-18	+	120	0								90.7	0			
			0								92.3	0			
			0								(91.5)	0			
6-18	+	140	100	0	1	0	0	0	1	0	80.8	100	0	1	1
			100	2	2	0	0	0	4	1	78.5	100	1	1	2
			200	2 (1.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	1 (0.5)	(79.7)	200	1 (0.5)	2 (1.0)	3 (1.5)
6-18	+	160	100	2	1	0	0	0	2	0	73.7	100	0	1	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	74.8	100	1	0	1
			200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(74.3)	200	1 (0.5)	1 (0.5)	2 (1.0)
6-18	+	180	100	1	3	0	0	0	4	1	52.9	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	1	54.2	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	2 (1.0)	(53.6)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	200	0								28.5	0			
			0								25.7	0			
			0								(27.1)	0			
6-18	+	220	0	TOX (no metaphases)							6.2	0	TOX (no metaphases)		
			0								8.1	0			
			0								(7.2)	0			
6-18	+	陽性対照 (CPA) 6	100	10	9	0	1	0	20	1		100	1	0	1
			100	16	14	0	0	0	29	0		100	0	0	0
			200	26 (13.0)	23 (11.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	49 (24.5)	1 (0.5)		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)

処理時間は処理時間-回復時間を表す。

異常細胞数は各群のプレートごとのデータを1及び2行目、その合計を3行目に表す。

細胞増殖率は各被験物質群のプレートごとの数値を1及び2行目、その平均を3行目に表す。

数的異常のその他は、核内倍加を示す。

DMSO:ジメチルスルホキシド、CPA:シクロホスファミド水和物

no metaphases: 分裂細胞の出現がみられない

80.0、100、120及び200 $\mu\text{g/mL}$ の標本は観察しなかった。

表 4 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

被験物質名: 5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナール

処理時間 (h)	用量 (µg/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップの出現数 (出現頻度%)	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数
24 - 0	陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	1	0	1
		100	4	0	0	0	0	4	0		100	0	0	0
		200	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0 (0.0)		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24 - 0	10.0	0								100.8	0			
		0								97.4	0			
		0								(99.1)	0			
24 - 0	20.0	0								97.9	0			
		0								91.9	0			
		0								(94.9)	0			
24 - 0	30.0	0								82.0	0			
		0								75.5	0			
		0								(78.8)	0			
24 - 0	40.0	100	4	0	0	0	0	4	2	74.0	100	1	0	1
		100	6	1	0	0	0	7	0	65.4	100	5	0	5
		200	10 (5.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (5.5)	2 (1.0)	(69.7)	200	6 (3.0)	0 (0.0)	6 (3.0)
24 - 0	50.0	100	6	0	0	1	0	6	1	50.8	100	0	0	0
		100	10	0	0	0	0	10	0	53.4	100	0	0	0
		200	16 (8.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	16 (8.0)	1 (0.5)	(52.1)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	60.0	100	16	0	0	0	0	16	0	45.6	100	2	0	2
		100	7	0	0	0	0	7	0	45.8	100	0	0	0
		200	23 (11.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	23 (11.5)	0 (0.0)	(45.7)	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
24 - 0	70.0	0								44.5	0			
		0								42.4	0			
		0								(43.5)	0			
24 - 0	80.0	0	TOX (no metaphases)							31.5	0	TOX (no metaphases)		
		0								32.8	0			
		0								(32.2)	0			
24 - 0	90.0	0	TOX (no metaphases)							3.4	0	TOX (no metaphases)		
		0								2.3	0			
		0								(2.9)	0			
24 - 0	陽性対照 (MMC)	100	45	38	0	0	0	64	2		100	0	0	0
		100	33	37	0	0	0	58	2		100	2	0	2
		200	78 (39.0)	75 (37.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	122 (61.0)	4 (2.0)		200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)

処理時間は処理時間-回復時間を表す。

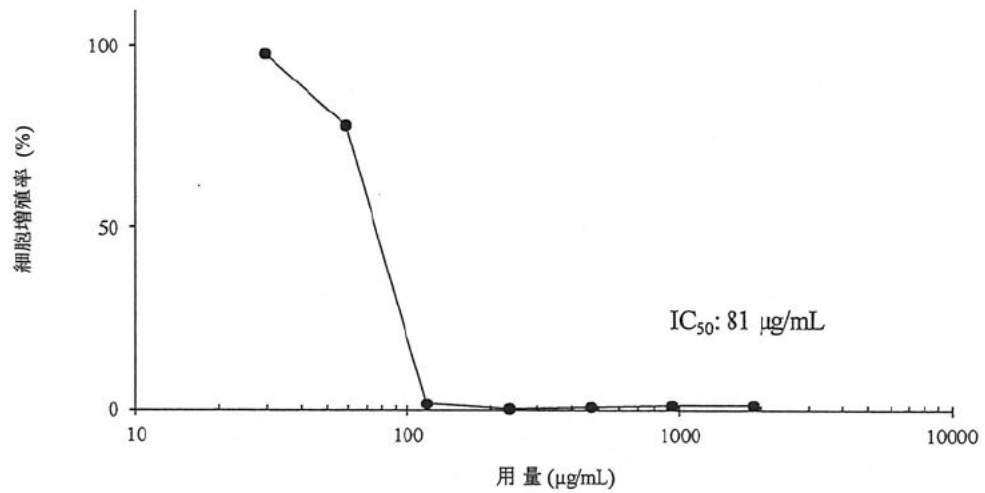
異常細胞数は各群のプレートごとのデータを1及び2行目、その合計を3行目に表す。

細胞増殖率は各被験物質群のプレートごとの数値を1及び2行目、その平均を3行目に表す。

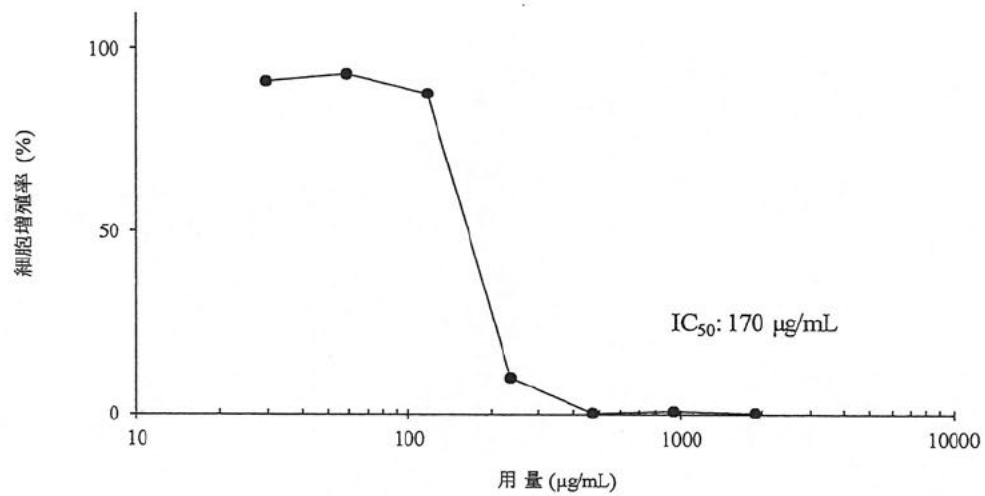
DMSO:ジメチルスルホキシド、MMC:マイトマイシンC

no metaphases: 分裂細胞の出現がみられない

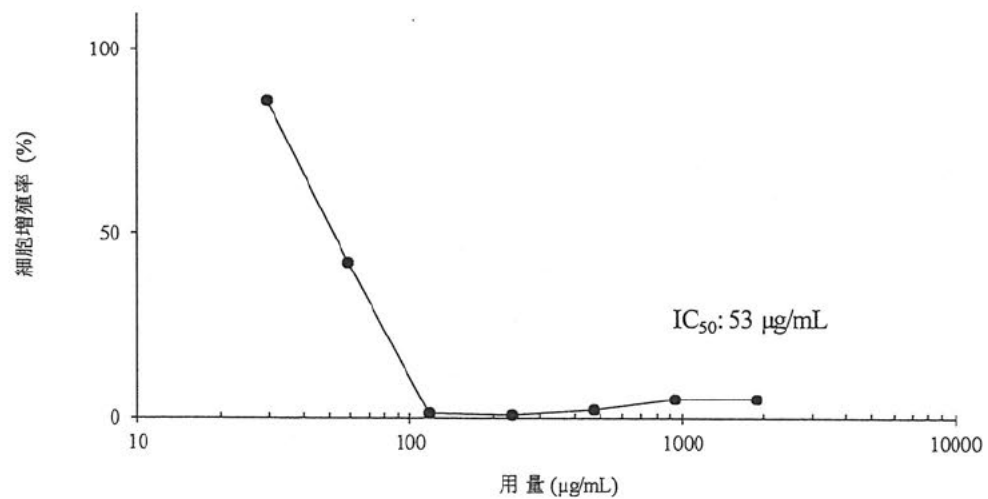
10.0、20.0、30.0及び70.0 µg/mLの標本は観察しなかった。



短時間処理・-S9 mix



短時間処理・+S9 mix



24時間連続処理

図1 5-メチル-2-フェニル-2-ヘキサナールの細胞増殖抑制試験結果

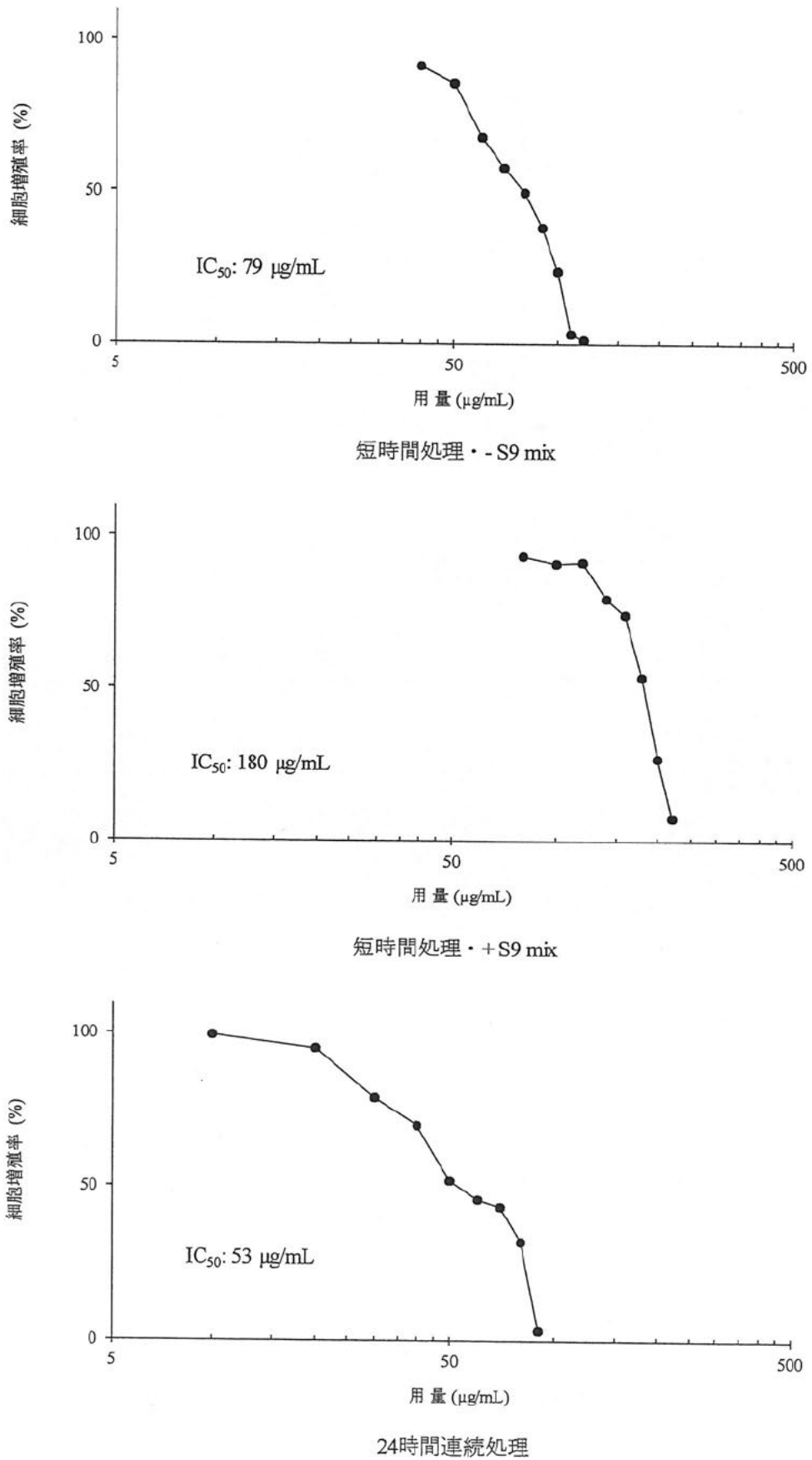


図2 5-メチル-2-フェニル-2-ヘキサナールの染色体異常試験における細胞増殖率

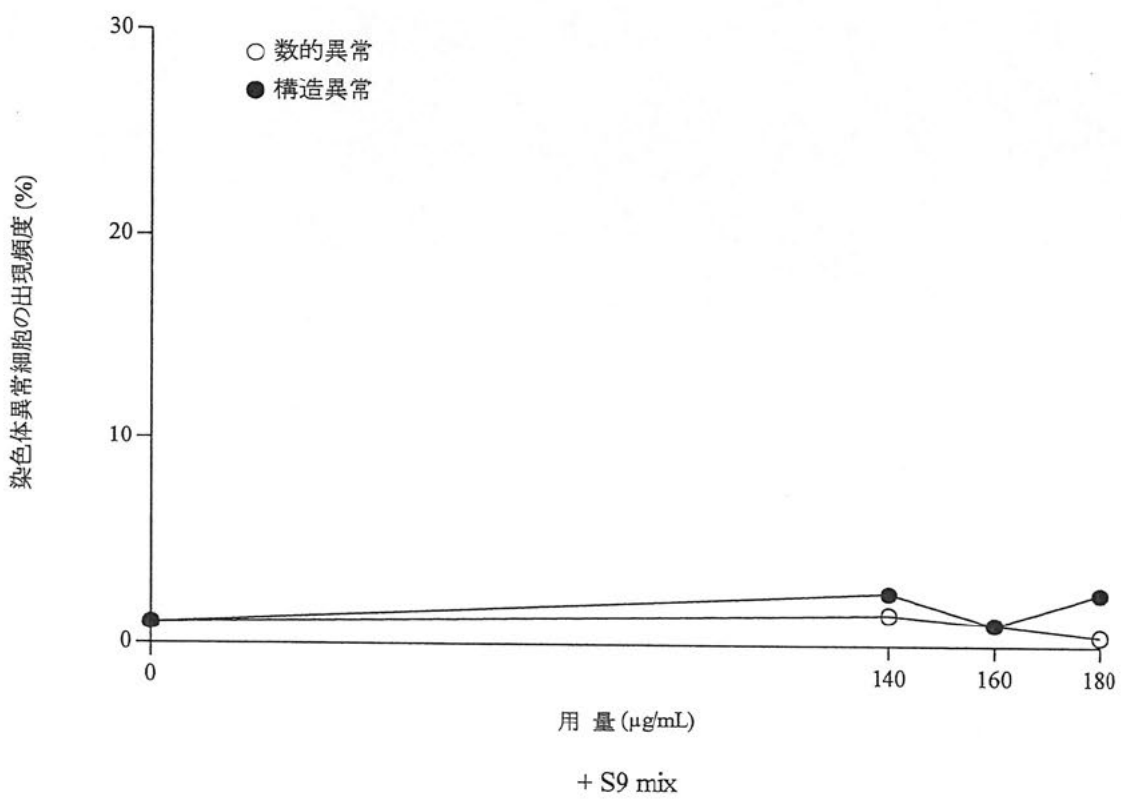
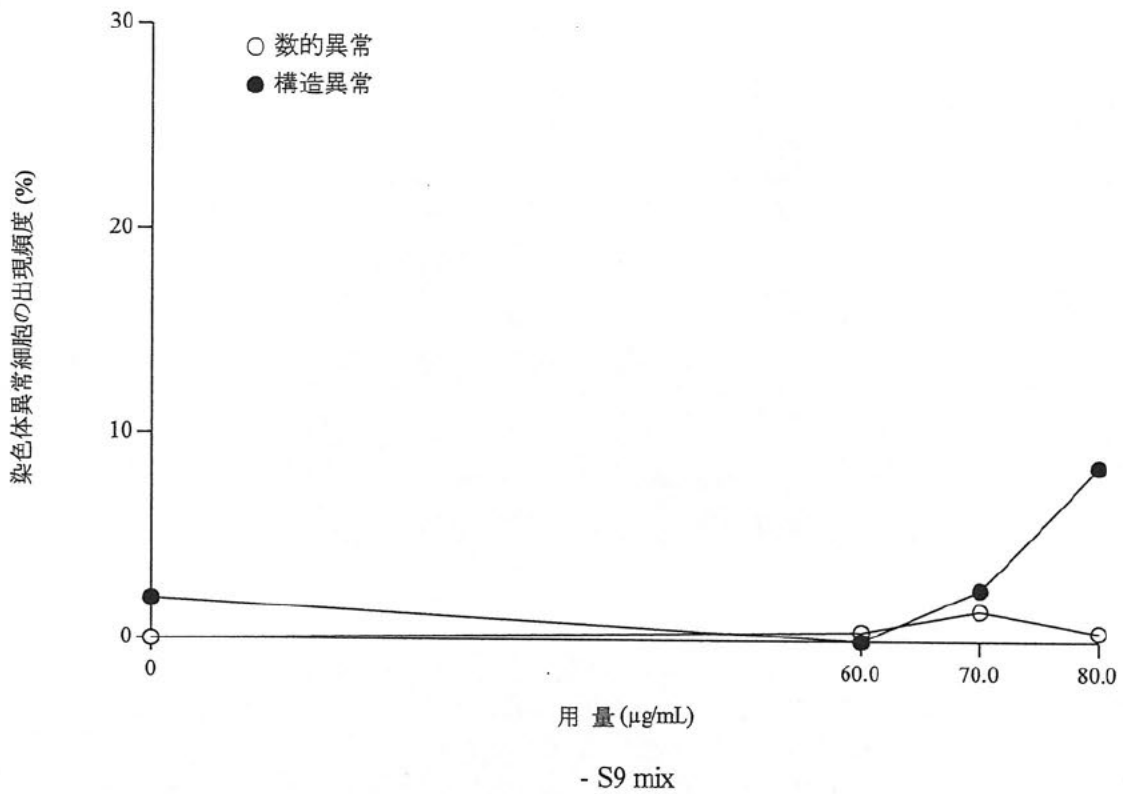


図3 5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの短時間処理法による染色体異常試験結果

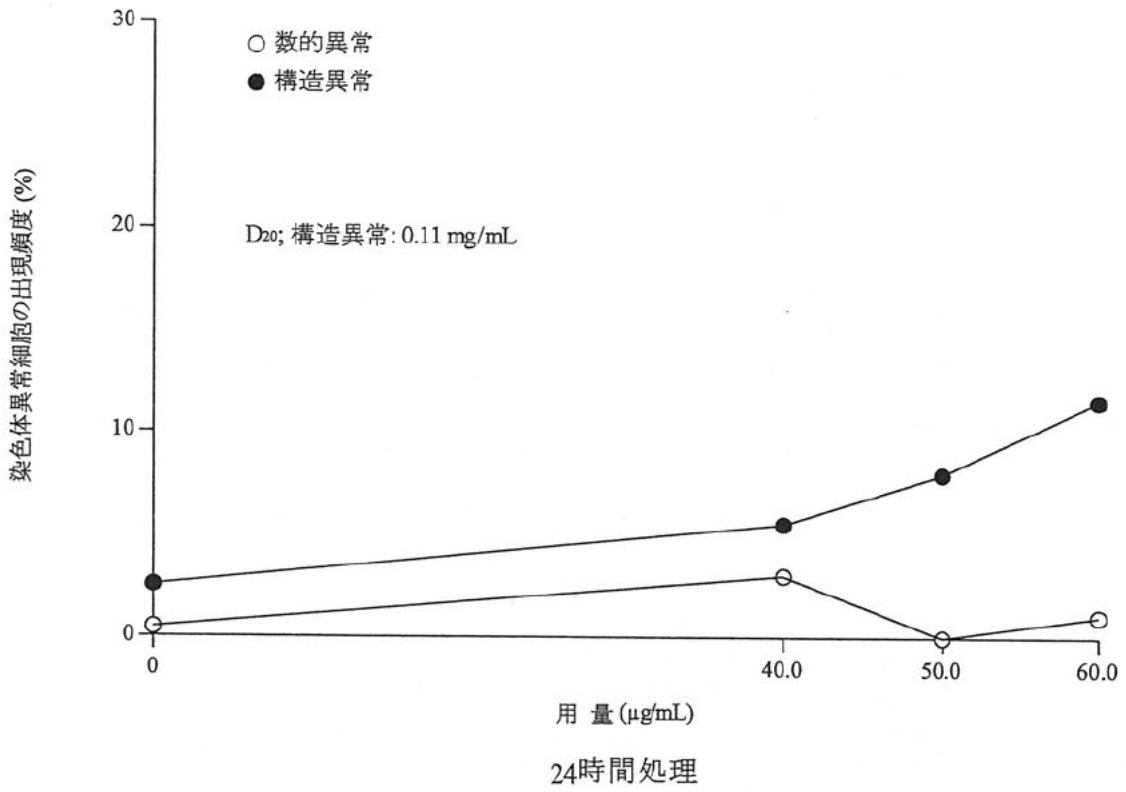


図4 5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの連続処理法による染色体異常試験結果



写真1 正常細胞
24 時間連続処理法 陰性対照

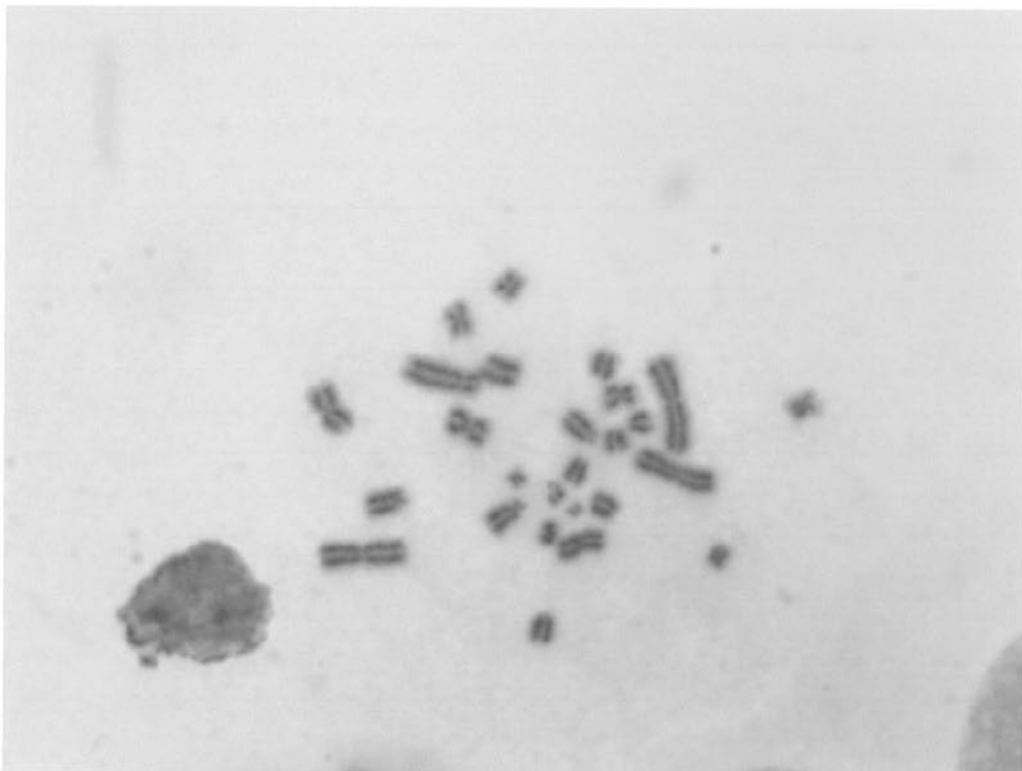


写真2 5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールにより誘発された構造異常
24 時間連続処理法 60.0 $\mu\text{g/mL}$

添付資料 1 試験施設における背景データ

陰性対照

処理法		異常細胞の出現頻度(%、平均±標準偏差)	
		構造異常	数的異常
短時間処理	-S9 mix	1.6 ±0.93	0.5 ±0.39
	+S9 mix	1.0 ±0.67	0.3 ±0.41
24時間連続処理		2.2 ±1.17	0.5 ±0.43

処理法		異常細胞の出現頻度の範囲 (%,平均±3標準偏差)	
		構造異常	数的異常
短時間処理	-S9 mix	0.0 ~ 4.4	0.0 ~ 1.7
	+S9 mix	0.0 ~ 3.0	0.0 ~ 1.5
24時間連続処理		0.0 ~ 5.7	0.0 ~ 1.8

なお、範囲の下限が0未満の場合は、0.0とした。

陽性対照

処理法		物質名	用量 (µg/mL)	異常細胞の出現頻度(%、平均±標準偏差)	
				構造異常	数的異常
短時間処理	-S9 mix	MMC	0.1	68.1 ±7.73	0.2 ±0.24
	+S9 mix	CPA	6	34.1 ±10.31	0.2 ±0.34
24時間連続処理		MMC	0.05	69.2 ±6.75	0.4 ±0.40

処理法		異常細胞の出現頻度の範囲 (%,平均±2標準偏差)	
		構造異常	数的異常
短時間処理	-S9 mix	52.6 ~ 83.6	0.0 ~ 0.7
	+S9 mix	13.5 ~ 54.7	0.0 ~ 0.9
24時間連続処理		55.7 ~ 82.7	0.0 ~ 1.2

なお、範囲の下限が0未満の場合は、0.0とした。

各処理法とも、2014年11月までに終了した最新20実験のデータ