

Table 5. -Continued

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]																
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537				
2-ethylhexyl vinyl ether	156							20	24	24								
								[ 23	$\pm$	2 ]								
	313							22	20	21								
								[ 21	$\pm$	1 ]								
	625								20	25	25							
									[ 23	$\pm$	3 ]							
	1250																	
								[ 22	$\pm$	1 ]								
	2500																	
								21	22	22								
								[ 22	$\pm$	1 ]								
	5000																	
								12*	14*	14*								
								[ 13	$\pm$	1 ]								
Positive control		827	768	790 b)	596	609	602 c)	121	106	118 b)	713	728	695 d)	254	231	244 e)		
		[ 795	$\pm$	30 ]	[ 602	$\pm$	7 ]	[ 115	$\pm$	8 ]	[ 712	$\pm$	17 ]	[ 243	$\pm$	12 ]		

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c): NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\* : Growth inhibition was observed.

Table 6. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether  
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	112	104	114	12	14	10	25	26	22	35	38	36	23	21	20
		[ 110	$\pm$	5 ]	[ 12	$\pm$	2 ]	[ 24	$\pm$	2 ]	[ 36	$\pm$	2 ]	[ 21	$\pm$	2 ]
	4.88	109	113	119	14	11	12							16	19	20
		[ 114	$\pm$	5 ]	[ 12	$\pm$	2 ]							[ 18	$\pm$	2 ]
	9.77	115	122	114	11	10	11				34	31	34	22	20	18
		[ 117	$\pm$	4 ]	[ 11	$\pm$	1 ]				[ 33	$\pm$	2 ]	[ 20	$\pm$	2 ]
	19.5	118	124	116	9	14	12				29	32	35	21	18	20
		[ 119	$\pm$	4 ]	[ 12	$\pm$	3 ]				[ 32	$\pm$	3 ]	[ 20	$\pm$	2 ]
	39.1	126	117	117	13	12	10				37	31	37	18	21	18
		[ 120	$\pm$	5 ]	[ 12	$\pm$	2 ]				[ 35	$\pm$	3 ]	[ 19	$\pm$	2 ]
78.1	92*	85*	81*	10*	7*	9*	23	28	24	38	36	31	16*	20*	19*	
	[ 86	$\pm$	6 ]	[ 9	$\pm$	2 ]	[ 25	$\pm$	3 ]	[ 35	$\pm$	4 ]	[ 18	$\pm$	2 ]	
156	74*	85*	80*	8*	10*	6*	22	23	21	28*	28*	26*	12*	16*	13*	
	[ 80	$\pm$	6 ]	[ 8	$\pm$	2 ]	[ 22	$\pm$	1 ]	[ 27	$\pm$	1 ]	[ 14	$\pm$	2 ]	
313							26	23	24	23*	26*	28*				
							[ 24	$\pm$	2 ]	[ 26	$\pm$	3 ]				
625							29	26	26							
							[ 27	$\pm$	2 ]							
1250							23	23	22							
							[ 23	$\pm$	1 ]							
2500							19*	20*	17*							
							[ 19	$\pm$	2 ]							
Positive control		1195	1163	1111 b)	434	460	414 c)	527	516	495 d)	403	424	441 e)	143	190	142 c)
		[ 1156	$\pm$	42 ]	[ 436	$\pm$	23 ]	[ 513	$\pm$	16 ]	[ 423	$\pm$	19 ]	[ 158	$\pm$	27 ]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e): 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\* : Growth inhibition was observed.

## 1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2-ethylhexyl vinyl ether は染色体異常を誘起しないものと判断した。

2-ethylhexyl vinyl ether の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に染色体異常試験の用量を設定した。染色体異常試験では短時間処理法-S9 処理ならびに同+S9 処理で 393, 785 および 1570  $\mu\text{g/mL}$  の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、2-ethylhexyl vinyl ether 処理群の場合、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても、明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。以上の結果より、さらに、連続処理法 24 時間処理群においても 393, 785 および 1570  $\mu\text{g/mL}$  の 3 用量について顕微鏡観察を実施したが、同試験法においても、2-ethylhexyl vinyl ether 処理による染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) 処理群では、染色体構造異常の出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ( $p \leq 0.025$ ) な増加を示した。

2. 表題

2-ethylhexyl vinyl ether のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討する。

4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP

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 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環保企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 473 (21st July 1997: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

5. 試験番号

9047 ( 115-198 )

6. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

7. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

## 12. 試験日程

試験開始日 :	平成 17 年 8 月 16 日
実験開始日 :	平成 17 年 8 月 22 日
【細胞増殖抑制試験】	
被験物質液調製日 :	平成 17 年 8 月 22 日
被験物質処理日 :	平成 17 年 8 月 22 日
細胞生存率計測日 :	平成 17 年 8 月 23 日
【染色体異常試験】	
被験物質液調製日 :	平成 17 年 9 月 8 日
被験物質処理日 :	平成 17 年 9 月 8 日
染色体標本作製日 :	平成 17 年 9 月 9 日
染色体観察終了日 :	平成 17 年 10 月 13 日
実験終了日 :	平成 17 年 10 月 13 日
試験終了日 :	平成 18 年 9 月 11 日

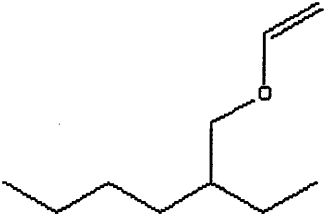
## 13. 被験物質

### 13.1. 被験物質名

2-ethylhexyl vinyl ether (2-エチルヘキシル=ビニル=エーテル)

### 13.2. ロット番号

05A001

- 13.3. 純度  
99.9%
- 13.4. 提供元  
日本カーバイド工業株式会社
- 13.5. 出荷年月日  
2005年3月11日
- 13.6. 保存条件  
遮光, 冷暗所 (1~9°C)
- 13.7. 保存場所  
安評センター被験物質保管庫 (H-2 : 実測値 3.2~7.7°C, 2005年3月14日~2005年8月19日 ; 6号館2階被験物質調製室内バイオマルチクーラーch. 41 : 実測値 3.1~7.7°C, 2005年8月19日~2005年11月1日)
- 13.8. 化学名  
2-ethylhexyl vinyl ether
- 13.9. CAS No.  
103-44-6
- 13.10. 化学構造
- 
- The image shows the skeletal structure of 2-ethylhexyl vinyl ether. It consists of a six-carbon main chain (hexyl group) with an ethyl group attached to the second carbon. The first carbon of the main chain is part of a vinyl ether group, represented by a double bond to a CH2 group and a single bond to an oxygen atom.
- 13.11. 分子式  
 $C_{10}H_{20}O$
- 13.12. 分子量  
156.27
- 13.13. 物質の状態  
無色透明液体
- 13.14. 溶解性  
溶解度 : 0.05 g/100 g 水, 約 157 mg/mL DMSO (当施設の試験による)

**13.15. 安定性/反応性**

酸化剤, 重金属には不安定 (重合, 分解を起こす).  
高温化では不安定.

**13.16. 蒸気圧**

3.3 kPa (25 mmHg) (73°C)

**13.17. 取り扱い上の注意**

危険性: 可燃性液体で, 蒸気は爆発性ガスを作りやすい.

有害性: 蒸気は咽喉, 目, 鼻などの粘膜を刺激する.

軽度の麻酔作用がある.

液体が目に入ると粘膜を侵し, 炎症を起こす.

適切な保護具 (マスク・手袋等) を着用し, 吸い込んだり, 目, 皮膚および衣類に触れないようにした.

**13.18. 毒性**

急性経口毒性 (ラット): LD<sub>50</sub>, 1350 mg/kg

**13.19. 残余被験物質の処理**

実験終了後, 1 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し, 残りは安定性分析のため, 被験物質等管理責任者を介して提供元に返却した. 分析の結果 (2005年11月22日付報告), 被験物質が試験期間中安定であったことが確認された.

**14. 試験材料および方法**

**14.1. 試験細胞株**

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において, 遺伝毒性ガイドラインで指定されていることから, 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) を使用した. CHL/IU 細胞は 1984 年 11 月 15 日に国立衛生試験所 (現 国立医薬品食品衛生研究所) から分与を受け, ジメチルスルホキシド (DMSO, GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K26414578, Merck) を容量比で 10% 添加した後, 液体窒素中に保存した. 試験に際しては, 凍結した細胞を融解した後, 3~5 日ごとに継代したものを使用した.

なお, 細胞増殖抑制試験では継代数 15 の細胞を, 染色体異常試験では継代数 20 の細胞を用いた.

凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査 (陰性), 倍加時間の測定 (17.9 時間), 染色体数 (モード数 25 本の細胞が 82%) の測定ならびに陰性対照および陽性対照における構造異常出現頻度の確認を実施し, 異常のない細胞を試験に使用した.

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI, Lot No. 519045, 旭テクノグラス) に非働化 (56°C, 30 分) 済みの仔牛血清 (Lot No. 54238545D, Invitrogen) を最終濃度で 10%になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所 (15°C 以下) に保存した。

14.3. 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーター (三洋電機バイオメディカ) を用い, CO<sub>2</sub>濃度 5%, 37°Cの条件で細胞を培養した。

14.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. CAM-526, キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を以下に示す。

ロット番号	RAA-526
製造年月日	2005 年 7 月 29 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	215~259 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB)および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2~4 日目) BF: 80 mg/kg 1 回 (3 日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	25.58 mg/mL



#### 14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の各内容物の量を以下に示す。

S9	0.3	mL
MgCl <sub>2</sub>	5	μmol/0.1mL
KCl	33	μmol/0.1mL
G-6-P	5	μmol/0.1mL
NADP	4	μmol/0.1mL
HEPES 緩衝液	4	μmol/0.2mL
蒸留水	0.1	mL

#### 14.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に難溶で DMSO に溶解することから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (Lot No. K31758278, Merck) に溶解し、調製原液とした。

細胞増殖抑制試験では、使用直前に被験物質 314 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 1 mL の DMSO (使用溶媒) を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 2 mL に定容し、調製原液 (157 mg/mL 溶液) を準備した。DMSO 1 mL に対し、この 157 mg/mL 調製原液 1 mL を加えることにより 78.5 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、39.3, 19.6, 9.81, 4.91, 2.45, 1.23 および 0.613 mg/mL 溶液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に被験物質 314 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 1 mL の DMSO (使用溶媒) を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 2 mL に定容し、調製原液 (157 mg/mL 溶液) を準備した。DMSO 1 mL に対し、この 157 mg/mL 調製原液 1 mL を加えることにより 78.5 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、39.3 および 19.6 mg/mL 溶液を調製した。

調製後、速やかに処理を行った。

#### 14.6. 対照群

##### 14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

##### 14.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. K3G77, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC, Lot No. 415ACF, 協和醗酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, Lot No. 4C87N, 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、

凍結保存したものを試験に用いた。

用量は、短時間処理法で0.1 µg/mL、連続処理法で0.05 µg/mLとした。

14.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K3G77) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP, Lot No. 4028, 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. 4C87N) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

用量は 12.5 µg/mL とした。

14.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

14.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 1570 µg/mL (10 mM 相当) を最高用量とし、以下、785, 393, 196, 98.1, 49.1, 24.5, 12.3 および 6.13 µg/mL の計 9 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした。

14.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

14.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート (細胞培養用マルチプレート 12F:住友ベークライト) の各ウェルに培養液を用いて  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 094K2331, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 µL を加え、さらに 18 時間培養を続けた。

14.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行った。

その後の操作は 14.7.3. に記載した方法に準じた。

14.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた。

## 14.7.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質		
	培養液	S9 mix	溶媒/ 被験物質液
-S9 処理	600 $\mu$ L	-	3 $\mu$ L
+S9 処理	500 $\mu$ L	100 $\mu$ L	3 $\mu$ L
24 時間処理	600 $\mu$ L	-	3 $\mu$ L

## 14.7.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

## 14.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウエルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：Lot No. EWK9790, 和光純薬工業）を加えて10分間細胞を固定した。次いで、0.1%クリスタル・バイオレット（Lot No. K31134240, Merck）水溶液で10分間細胞を染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。各ウエルに色素溶出液（30%エタノール、1%酢酸水溶液）を3 mL 加え、5分間放置した。各ウエルの溶出液を96ウエルのプレート（アッセイプレート, IWAKI）に各々300  $\mu$ L 分注し、マイクロプレートリーダー（モデル450, BIO・RAD）を用いて570 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各用量群について求めた。

## 14.8. 染色体異常試験

## 14.8.1. 用量

細胞増殖抑制試験の結果、いずれの処理においても最高用量の1570  $\mu$ g/mL（10 mM 相当）で細胞の増殖を50%以上抑制することはなかった。従って、染色体異常試験では1570  $\mu$ g/mL を最高用量とし、785, 393 および196  $\mu$ g/mL の計4用量を設定した。

処理法	用量 ( $\mu$ g/mL)			
短時間処理法-S9 処理	196	<u>393</u>	<u>785</u>	<u>1570</u>
短時間処理法+S9 処理	196	<u>393</u>	<u>785</u>	<u>1570</u>
連続処理法 24 時間処理	196	<u>393</u>	<u>785</u>	<u>1570</u>

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

## 14.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。