8EHQ-1202-15241B

MA#64774

RECEIVED
OPPT NCIC
2003 JAN -3 AM 9:46

COMPANY SANITIZED

December 10, 2002

Document Processing Center
U.S. Environmental Protection Agency
1201 Constitution Ave. NW
Room 3166
Washington, DC 20460-0001

Re: 1,3-bis(2,3-epoxypropyl)-2-(2,3-epoxypropoxy)benzene (CAS# 13561-08-5)

To Whom It May Concern:

This letter will serve as a TSCA 8(e) Notification for a potential increased risk to human health regarding 1,3-bis(2,3-epoxypropyl)-2-(2,3-epoxypropoxy)benzene (CAS# 13561-08-5). National Chemical Inventory sheet and documentation for claiming Confidential Business Information are provided in the attached document.

A chromosomal aberration test in mammalian cultured cells was conducted on the aforementioned material. The results showed genotoxic potential for this chemistry. The study was conducted in Japan and the final report is in Japanese. Both the original Japanese version and the English translation of the report are attached.

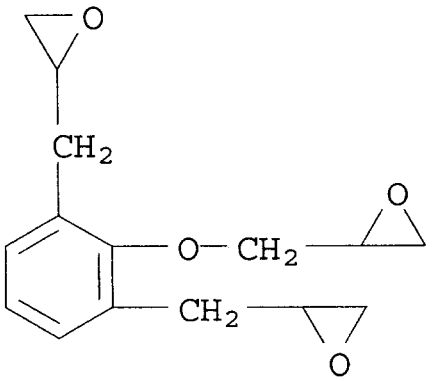
This chemical is an industrial material. Physicochemical properties and engineering controls for the purpose of minimizing human exposure are under review. Appropriate warnings are in place to comply with OHSA Hazard Communication Standards 29 CFR 1910.1200.

If you have any questions please contact me.

8EHQ-02-15241
86030000036

Copyright - 2001 American Chemical Society.
All rights reserved.

CAS REGISTRY NUMBER:
13561-08-5
EINECS No. 236-951-5
ECL Serial No. KE-27552
INVENTORY NAME(S):
Oxirane, 2,2'-[[2-(oxiranylmethoxy)-1,3-phenylene]bis(methylene)]bis- (TSCA, NDSL)
2,2'-[[2-(Oxiranylmethoxy)-1,3-phenylene]bis(methylene)]bisoxirane (French) (NDSL)
2,2'-[[2-(oxiranylmethoxy)-1,3-phenylene]bis(methylene)]bisoxirane (EINECS)
2,2'-[[2-(oxirannylmethoxy)-1,3-phenylene]bis(methylene)]bisoxiranne (French) (EINECS)
2,2'-[[2-(Oxiranylmethoxy)-1,3-phenylen]bis(methylen)]bisoxiran (German) (EINECS)
2,2'-[[2-(oxiranilmetoxi)-1,3-fenilen]bis(metilen)]bisoxirano (Spanish) (EINECS)
2,2'-[[2-(Oxiranylmethoxy)-1,3-phenylene]bis(methylene)]bisoxirane (ECL)
OTHER NAME(S):
2,6-Diglycidylphenyl glycidyl ether
Benzene, 2-(2,3-epoxypropoxy)-1,3-bis(2,3-epoxypropyl)-
Ether, 2,6-bis(2,3-epoxypropyl)phenyl 2,3-epoxypropyl
See also Glycidol derivatives
EPA FLAGS:
T Subject to Section 4 test rule
FORMULA:
$C_{15}H_{18}O_4$



Substantiation of confidentiality for §8(e) substance 1,3-bis(2,3-epoxypropyl)-2-(2,3-epoxypropoxy)benzene:

Substantiation of confidentiality for §8(e) substance 1,3-bis(2,3-epoxypropyl)-2-(2,3-epoxypropoxy)benzene:

陳述書

社団法人　日本油料検定協会
綜合分析センター

RECEIVED
OPPT NCIC
2003 JAN -3 AM 9:54

表　　題：　　のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試 験 番 号：　8L898

本試験は下記のＧＬＰに従って実施したものである。

「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第４条に規定する試験施設に関する基準（環保業第39号，薬発第 229号，59基局第85号 1984，　一部改正 1988)」

「有害性の調査を行う試験施設等が具備すべき基準（労働省工事告示第76号，1988）」

1999 年 3 月 15 日

運営管理者

信頼性保証証明書

社団法人　日本油料検定協会
綜合分析センター

表　　題：　　のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：8L898

本試験は，試験計画書および標準操作手順書に従って実施され，本報告書には試験に使用した方法，手順が正確に記載されており，試験結果は生データを正確に反映していることを，下記のとおり確認した。

確認内容	実施日	運営管理者および試験責任者への報告日
試験計画書	1999年 1月19日	1999年 1月19日
試験実施状況	1999年 2月16日	1999年 2月16日
試験報告書草案	1999年 3月10日	1999年 3月10日
試験報告書	1999年 3月15日	1999年 3月15日

1999 年 3 月 15 日

信頼性保証責任者 藤原悦郎

試験実施概要

1. 表　　題：　のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
（試験番号： 8L898）

2. 試験目的：　被験物質のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を調べる。

3. 適用ｶﾞｲﾄﾞﾗｲﾝ：　化審法ガイドライン（1997）および安衛法ガイドライン（1997）

4. 適用ＧＬＰ：　化審法ＧＬＰ（1984, 1988）および安衛法ＧＬＰ（1988）

5. 試験委託者：　日本エイブルスティック株式会社
神奈川県横浜市緑区白山 1-18-2 ＧＩＣ３０２
（委託責任者） 辻野　俊一

6. 試験受託者：　株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目１番30号

7. 試験施設：　社団法人　日本油料検定協会　綜合分析センター
兵庫県神戸市東灘区御影塚町１丁目10番４号

8. 試験関係者：
試験責任者　中村　真人
試験担当者　祝原　修
大谷　純代

9. 試　験　期　間：試験開始日　1999 年　1 月 19 日

実験開始日　1999 年　1 月 22 日

実験終了日　1999 年　3 月　5 日

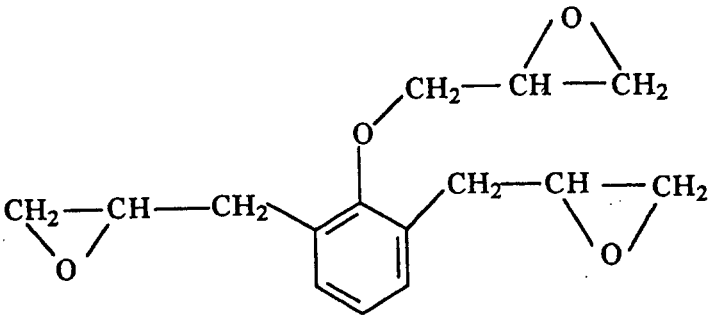
試験終了日　1999 年　3 月 15 日

10. 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：　なし

11. 保　　管：試験計画書，生データ，被験物質，記録文書および最終報告書は，綜合分析センターの保管施設に保管する。ただし，生データ等の保管期間は最終報告書作成後 10 年間とし，以後の保管は試験委託者と協議の上，決定する。

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1．一般的事項

新規化学物質の名称（IUPAC命名法による）	1，3－ビス（2，3－エポキシプロピル）－2－（2，3－エポキシプロポキシ）ベンゼン		
別　　名			
構造式又は示性式（いずれも不明の場合は、その製法の概要）			
試験に供した新規化学物質の純度	９９％以上	試験に供した新規化学物質のLot.No.	ＦＨＳ１９５６
不純物の名称及び濃度	トルエン（３）－２　０．５％未満，　水　０．５％未満		
ＣＡＳ番号	１３５６１－０８－５	蒸　気　圧	――――
分　子　量	２６２．３１	分配係数	――――
融　　点	――――	常温における性状	淡琥珀色液体
沸　　点	＞２５０℃		
安　定　性	安定		

溶媒に対する溶解度等	溶　媒	溶　解　度	溶媒中の安定性
	水	不　溶	――――
	DMSO	――――	――――
	ｱｾﾄﾝ	500mg/ml で溶解[1]	安　定[2]
	その他（　　）	――――	――――

DMSO　：ｼﾞﾒﾁﾙｽﾙﾎｷｼﾄﾞ

1）：　当綜合分析センターでの溶媒検討の結果による。

2）：　被験物質溶液調製時に発熱，変色および発泡は認められなかった。

2．細胞の種類―培養条件

細胞名	CHL／IU	入手先	大日本製薬株式会社
種	チャイニーズハムスター	入手年月日	1998年5月26日
培養液	イーグルのMEM	製造元	日水製薬株式会社
血清の種類と添加量	仔牛血清，10％	製造元(Lot No)	Gibco BRL (1009120)
細胞周期	約 15.2h	凍結条件	液体窒素中
継代数	16～19 *	培養条件 容器	プラスチックシャーレ
染色体数（モード）	25 本	培養条件 温度	37℃
		培養条件 CO_2 濃度	5％
備考	＊ 継代数 15 で凍結した細胞を使用した。		

3．S9mix

（1）S9の入手方法等（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

自製・購入の別	1. 自製 (2.) 購入（製造元：ｷｯｺｰﾏﾝ株式会社）
製造年月日	1998年 9月11日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA－393
保存温度	－80℃以下

（2）S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	ﾌｪﾉﾊﾞﾙﾋﾞﾀｰﾙ (PB) 5,6-ﾍﾞﾝｿﾞﾌﾗﾎﾞﾝ (BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週令	7 週	投与期間及び投与量（g／kg体重）	PB 4日間 0.03~0.06 BF 1日間 0.08
体重	212～248g		

（3）Ｓ９ｍｉｘの組成

成　分	Ｓ９mix 1ml 中の量	成　分	Ｓ９mix 1ml 中の量
Ｓ９	0.3 ml	ＮＡＤＰ$^{+}$	4 μmol
$MgCl_2$	5 μmol	Na－ﾘﾝ酸緩衝液	―― μmol
ＫＣｌ	33 μmol	その他（HEPES 緩衝液）	4 μmol
ｸﾞﾙｺｰｽ-6-ﾘﾝ酸	5 μmol	その他（DW）	残　量

DW ： 滅菌蒸留水

（4）Ｓ９ｍｉｘの処理条件（該当する番号を○で囲み，必要事項を記入すること。）

1. プレート法　　2．浮遊細胞法　　3．その他（　　）	
Ｓ９量（最終濃度）	５％
Ｓ９蛋白量（最終濃度）	1.26mg/ml
処　理　時　間	６ｈ
回　復　時　間	１８ｈ
備　　考	――――――――――――――

4．被験物質溶液の調製（被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。）

使　用　溶　媒	名称	製　造　元	Lot No.	グレード	純度（%）
	ｱｾﾄﾝ	和光純薬工業株式会社	ACH2505	――	min.99.5
溶媒選択の理由	水に不溶の溶解度の情報があり，溶媒検討を実施した。被験物質原液に相当する濃度として，生食および 1%ｶﾙﾎﾞｷｼﾒﾁﾙｾﾙﾛｰｽﾅﾄﾘｳﾑ 水溶液(1%CMC-Na 水溶液）は 50mg/ml，DMSO は 1000mg/ml，ｱｾﾄﾝは 500mg/ml を調製した。結果，生食および1%CMC-Na水溶液では溶解せず，DMSOおよび ｱｾﾄﾝ では溶解した。 DMSO および ｱｾﾄﾝ で調製した被験物質溶液を培養液に添加した時，被験物質の分散が ｱｾﾄﾝ の方がより均一であったので， ｱｾﾄﾝ を溶媒に用いた。				
被験物質溶液の性状	溶　解　　懸　濁　　その他（　　）				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	――――――――――――――				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	(短時間処理法の代謝活性化法にらない場合の細胞増殖抑制試験) 約15分　室温 (短時間処理法の代謝活性化法による場合の細胞増殖抑制試験) 約40分　室温 (短時間処理法の染色体異常試験)　約40分　室温				
純度換算の有無	有　　無				

生食 ： 生理食塩液

5．短時間処理法における試験

（1）細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		1999年 2月 1日から 1999年 2月 5日	1999年 1月22日から 1999年 1月26日
培養器	形状	円形ﾌﾟﾗｽﾁｯｸｼｬｰﾚ	円形ﾌﾟﾗｽﾁｯｸｼｬｰﾚ
	大きさ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培養液量	3 ml／培養器	3 ml／培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／ml	4×10^3 個／ml
	前培養日数	3 日目	3 日目
処理条件	被験物質溶液添加量	0.03ml／培養器	0.03ml／培養器
	S9mix 添加量		0.5 ml／培養器
	S9の最終濃度		5 %
	S9蛋白の最終濃度		1.26mg/ml
	処理時間	6 h	6 h
	回復時間	18h	18h
細胞増殖抑制測定法	メタノールで15分間固定し，0.1％クリスタルバイオレット溶液で10分間染色したのち，水洗いし，乾燥させた。 測定には単層培養細胞密度計を使用した。		
備考：			

（２）細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合（６－１８ｈ）		代謝活性化法による場合（６－１８ｈ）	
用量（μｇ／ｍｌ）	細胞増殖率（％）	用量（μｇ／ｍｌ）	細胞増殖率（％）
０（溶媒）	１００	０（溶媒）	１００
０．４	８４	３９	９３
０．８	７６	７８	８０
１．６	７７	１５６	２２
３．１	９３	３１３	０
６．３	９１	６２５	０
１２．５	７４	１２５０	０
２５	３４	２５００	０
５０	０	５０００	０

備考：　代謝活性化法によらない場合において最高濃度を 5000μg/ml とした細胞増殖抑制試験では処理濃度 39μg/mlまで０％であった。

（3）染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		1999年 2月12日から 1999年 2月16日	1999年 2月12日から 1999年 2月16日
培養器	形状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大きさ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培養液量	3 ml／培養器	3 ml／培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／ml	4×10^3 個／ml
	前培養日数	3 日目	3 日目
処理条件	被験物質溶液添加量	0.03ml／培養器	0.03ml／培養器
	S9mix 添加量		0.5 ml／培養器
	S9の最終濃度		5 %
	S9蛋白の最終濃度		1.26mg/ml
	処理時間	6 h	6 h
	回復時間	18h	18h
備考：			

（4）染色体異常試験結果（別表1による。）

7．結果の判定および参考事項

（1）結果の判定

判　　定 （いずれかを○で囲むこと。）	陽　性　　陰　性

判定の理由

・短時間処理法において，構造異常をもつ細胞の出現頻度が代謝活性化法によらない場合(-S9 mix)では　100.0 %，代謝活性化法による場合（+S9 mix)では，93.5%であった。

・短時間処理法において，数的異常をもつ細胞の出現頻度が代謝活性化法によらない場合および代謝活性化法による場合ともに５%未満であった。

・以上の結果より，　　の染色体異常誘発性は陽性と判定した。

D_{20}値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	6－18h処理	0.00039 mg/ml
			+S9 mix	6－18h処理	0.024 mg/ml
		連続処理法		24－0h処理	——— mg/ml
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	6－18h処理	——— mg/ml
			+S9 mix	6－18h処理	——— mg/ml
		連続処理法		24－0h処理	——— mg/ml

〔備考〕D_{20}値は分裂中期像 20 %に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり，陽性と判断した試験系列について，異常のタイプ別に記入すること。

（2）参考事項

・短時間処理法による細胞増殖抑制試験の結果，細胞増殖を50%抑制する濃度は下記の通りであった。
　S9mix非共存下：　19μg/ml
　S9mix共存下　：106μg/ml
この結果から，染色体異常試験は，下記の濃度で実施した。
　S9mix非共存下：50，25，12.5，6.3，3.1μg/ml
　S9mix共存下　：300，150，75，37.5，18.8μg/ml

・短時間処理法による染色体異常試験において細胞毒性が認められ，S9mix非共存下では50，25μg/ml，S9mix共存下では 300，150μg/mlで分裂中期細胞が50個以上得られなかった。

・陰性対照群にみられた正常細胞および代謝活性化法による場合にみられた構造異常細胞の顕微鏡写真を添付した（写真１および２）。

・陽性対照に用いた物質
　マイトマイシンC（MMC と略す）；純度（108 %）ロット番号(080AEK)，製造元(協和発酵工業株式会社)
　ベンゾ〔a〕ピレン（BPと略す）；純度（95.6%）ロット番号(GG01)，製造元(東京化成工業株式会社)

・染色体構造異常および数的異常の分類は以下の通りとした。

構造異常の分類

- 染色分体切断（ctb と略す）
- 染色分体交換（cte と略す）
- 染色体切断　（csb と略す）
- 染色体交換　（二動原体，環状染色体など ; cse と略す）
- その他　（断片化，ただし細粉化は除く ; frg と略す）
- ギャップ　（染色分体および染色体型 ; gap と略す）

数的異常の分類

- 倍数体　（3倍体以上のもの，ただし異数性については検索しない。）
- その他　（核内倍加）

ギャップについては，染色分体幅よりも狭い非染色部位と定義し，他の異常として区別して記録し，構造異常に含めない。

・構造異常を持つ細胞は，異常を1個持つ細胞とし，ギャップのみの異常を持つ細胞を除いた場合（ -gap ）と含めた場合（ +gap ）で集計した。
被験物質の染色体異常誘発性の最終判定は，各処理条件における -gap の構造異常および数的異常細胞の出現頻度が共に5％未満を陰性，いずれかまたは両方が5％以上10％未満を疑陽性，いずれかまたは両方が10％以上を陽性とした。また染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度が陰性（溶媒）対照と比較して明らかに上昇し，かつ，その作用に用量依存性または再現性が認められる場合には陽性と判断した。

・データの解析のために統計学的手法は用いなかった。

8．その他

試験実施施設	名　称	社団法人　日本油料検定協会　綜合分析センター
	所在地	兵庫県神戸市東灘区御影塚町１丁目10番４号 電話　（０７８）８４１－４９３１ FAX　（０７８）８２２－０５３０
試験責任者	職氏名	主　任　中村 真人
	経験年数	８　年
試験番号	８Ｌ８９８	
試験期間	１９９９年　1月１９日　より　１９９９年　3月１５日	

別表１　染色体異常試験（短時間処理法）

被験物質名：

処理時間 (h)	S9mix	被験物質の用量 (μg/ml)	染色体構造異常の細胞数（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 (%)	ギャップの出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度%） 観察細胞数	倍数体	その他 **	総異常細胞数 (%)
6-18	−	溶媒対照（アセトン）	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		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)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	−	3.1	100	17	55	0	1	0	65	0	96	100	0	0	0
			100	24	55	0	0	0	67	0		100	0	0	0
			200	41(20.5)	110(55.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	132(66.0)	0(0.0)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	−	6.3	100	49	96	0	0	0	99	0	109	100	0	0	0
			100	45	80	0	0	0	96	0		100	0	0	0
			200	94(47.0)	176(88.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	195(97.5)	0(0.0)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	−	12.5	100	91	88	0	0	0	100	0	86	100	0	0	0
			100	82	92	0	0	0	100	0		100	0	0	0
			200	173(86.5)	180(90.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	200(100.0)	0(0.0)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	−	25	TOX								21	TOX			
6-18	−	50	TOX								0	TOX			
6-18	−	陽性対照 (MMC) 0.15	100	30	50	0	0	0	64	0	／	100	0	0	0
			100	18	44	0	0	0	50	0		100	0	0	0
			200	48(24.0)	94(47.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	114(57.0)	0(0.0)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	溶媒対照（アセトン）	100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		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)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	18.8	100	0	0	0	0	0	0	0	109	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0		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)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	37.5	100	1	3	0	0	0	4	0	91	100	0	0	0
			100	1	4	0	0	0	5	0		100	0	0	0
			200	2(1.0)	7(3.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	9(4.5)	0(0.0)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	75	100	35	87	0	0	0	92	0	91	100	0	0	0
			100	35	91	0	0	0	95	0		100	0	0	0
			200	70(35.0)	178(89.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	187(93.5)	0(0.0)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	150	TOX								23	TOX			
6-18	+	300	TOX								0	TOX			
6-18	+	陽性対照 (BP) 20	100	21	70	0	0	0	78	0	／	100	0	0	0
			100	15	71	0	0	0	76	0		100	0	0	0
			200	36(18.0)	141(70.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	154(77.0)	0(0.0)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

被験物質処理時間（6時間）－被験物質処理後の回復時間（18時間）

*:構造異常のその他：断片化(細粉化は除く)，**：数的異常のその他：核内倍加

MMC：ﾏｲﾄﾏｲｼﾝ C，BP：ﾍﾞﾝｿﾞ〔a〕ﾋﾟﾚﾝ

TOX：細胞毒性により分裂細胞が５０個以上得られなかった

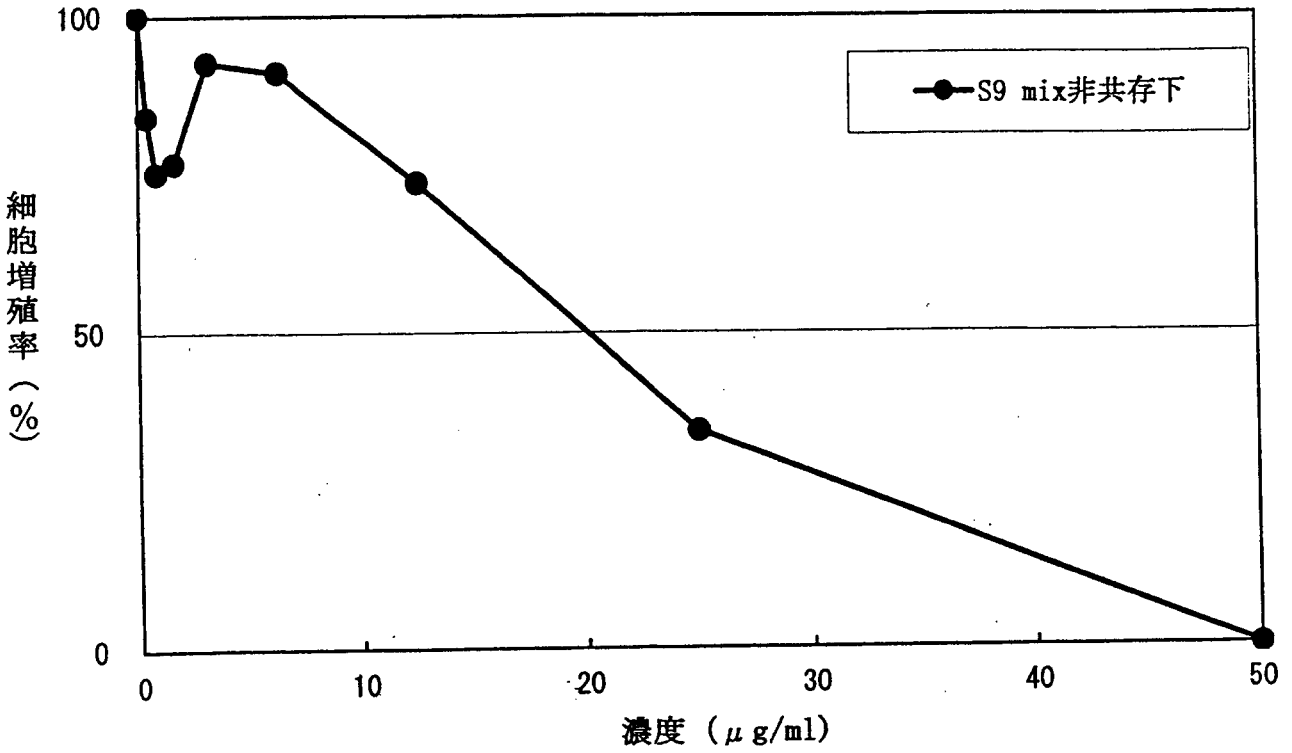


図 1　　の細胞毒性〔細胞増殖抑制試験〕

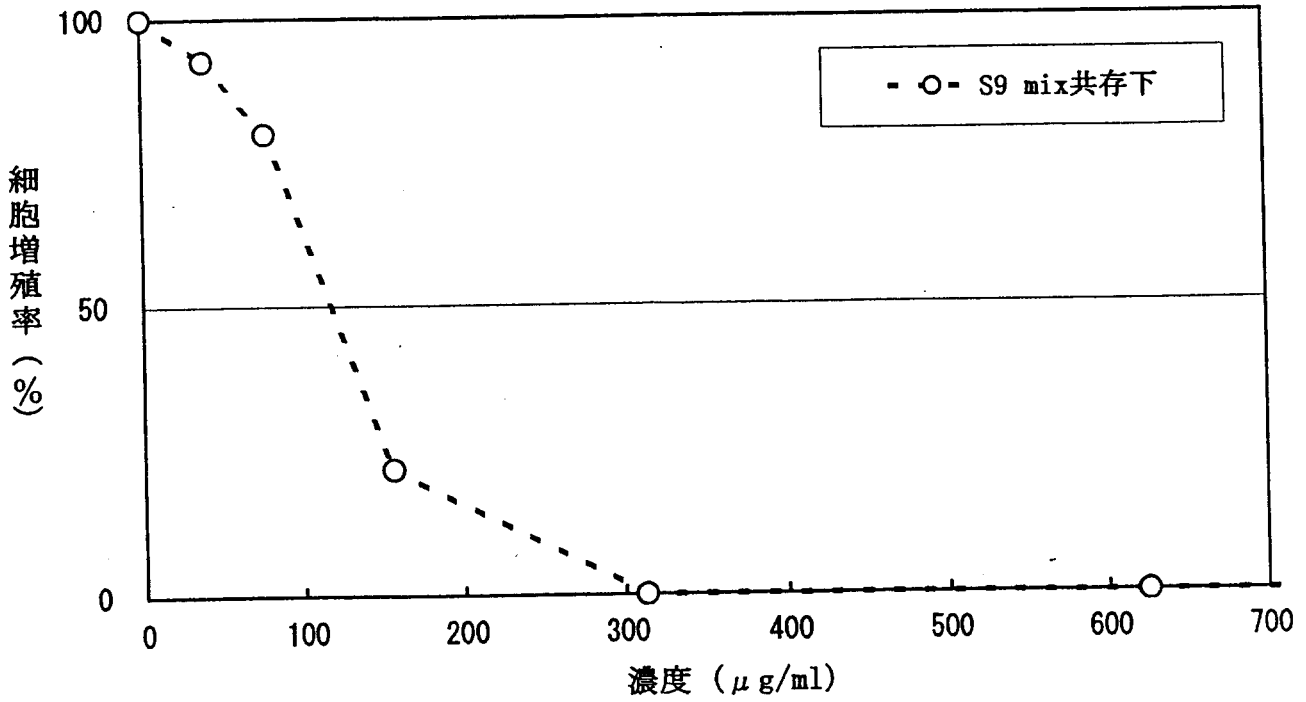


図 2　　の細胞毒性〔細胞増殖抑制試験〕

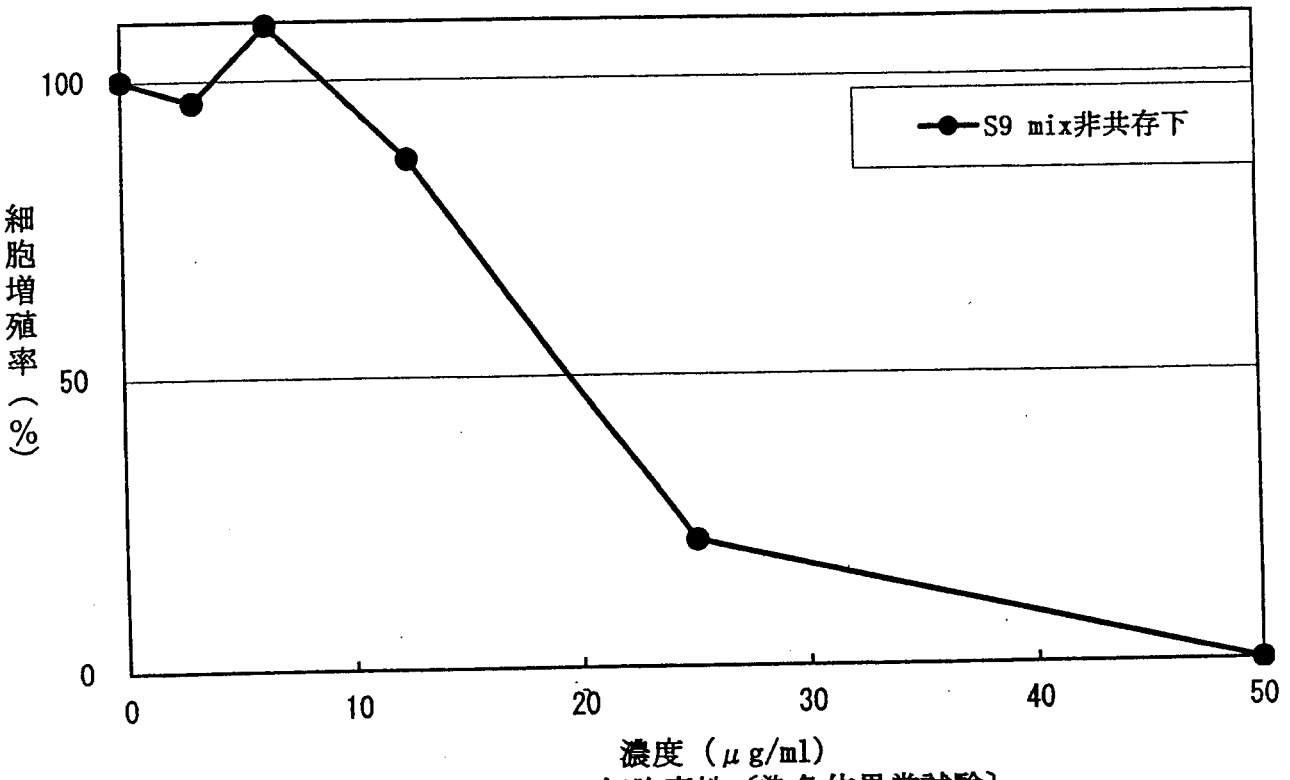


図 3　　の細胞毒性〔染色体異常試験〕

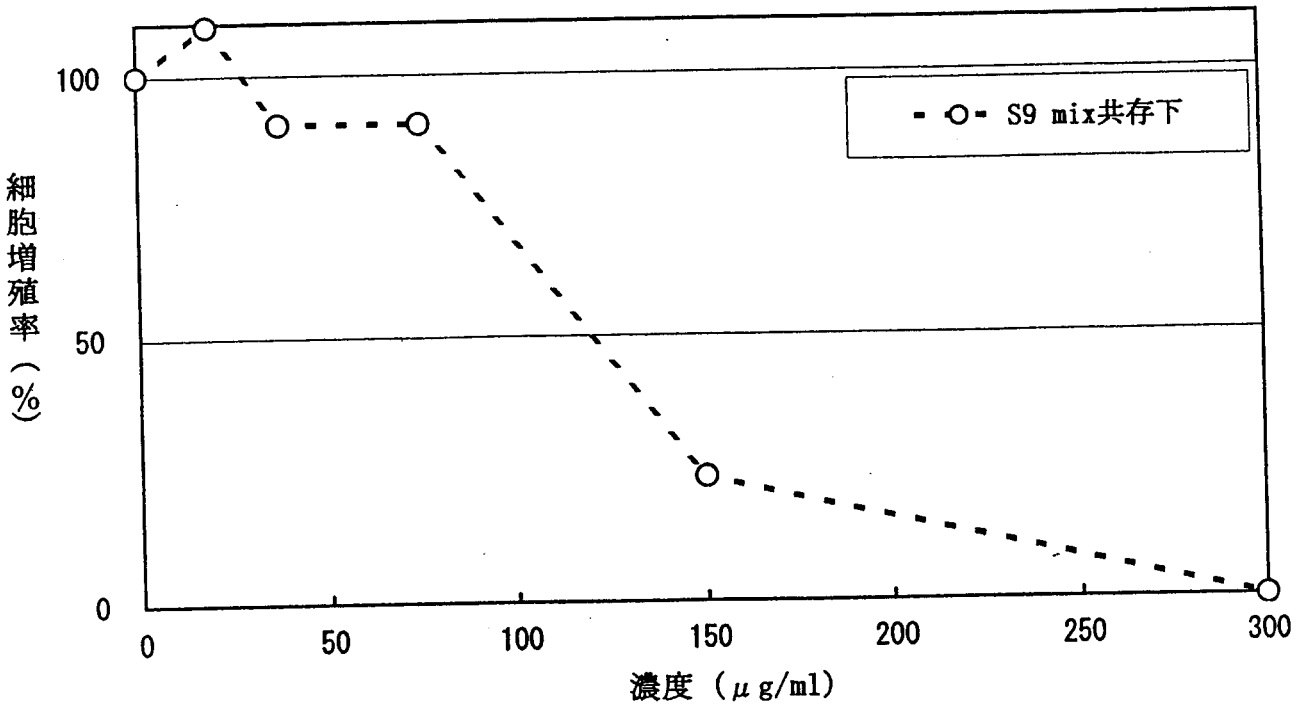


図 4　　の細胞毒性〔染色体異常試験〕

短 時 間 処 理 法

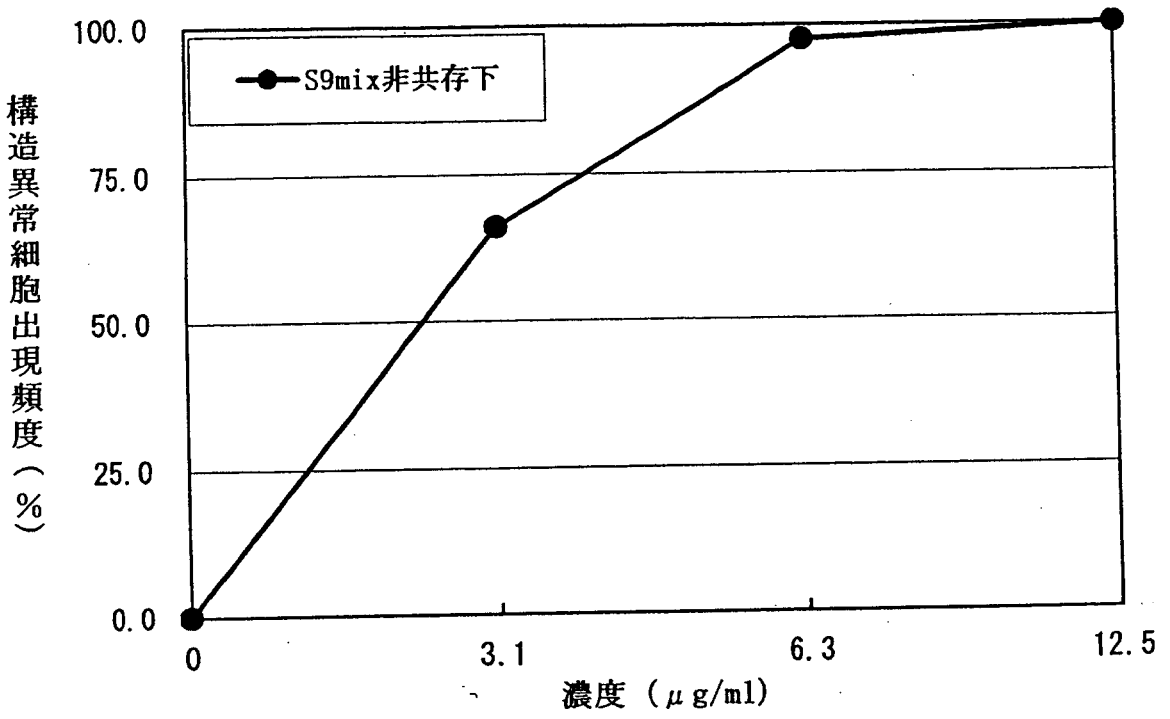


図 5　　の構造異常細胞出現頻度

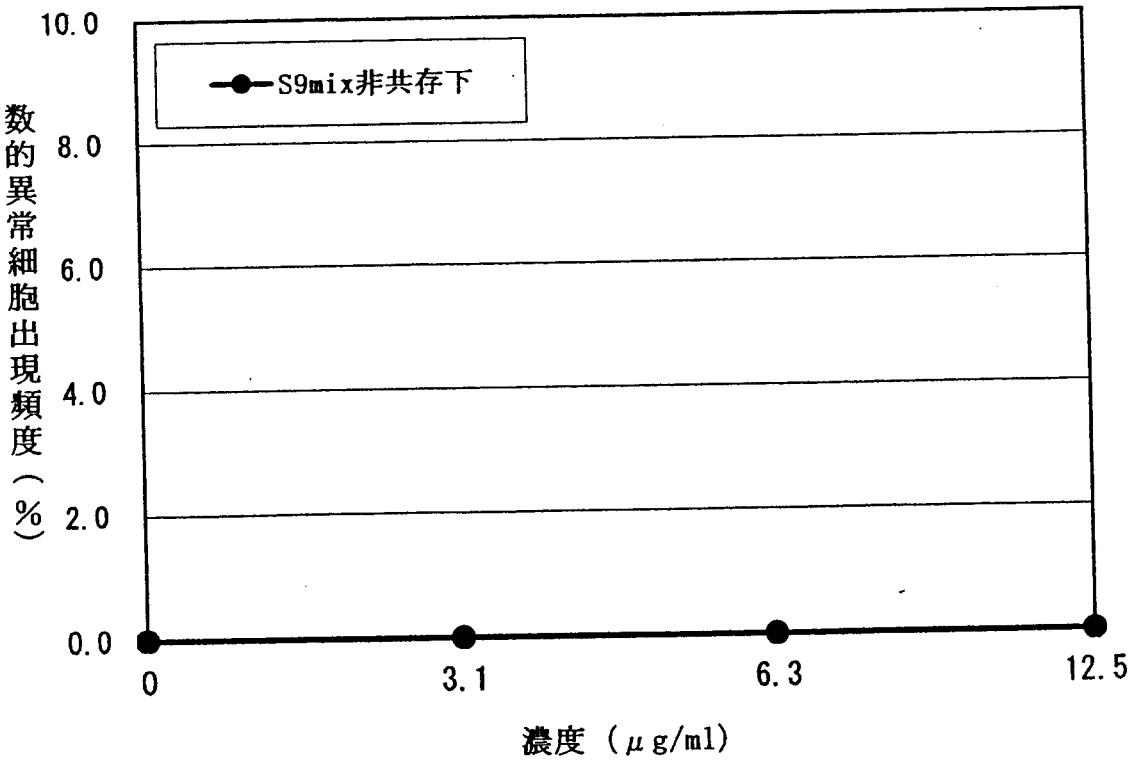


図 6　　の数的異常細胞出現頻度

短 時 間 処 理 法

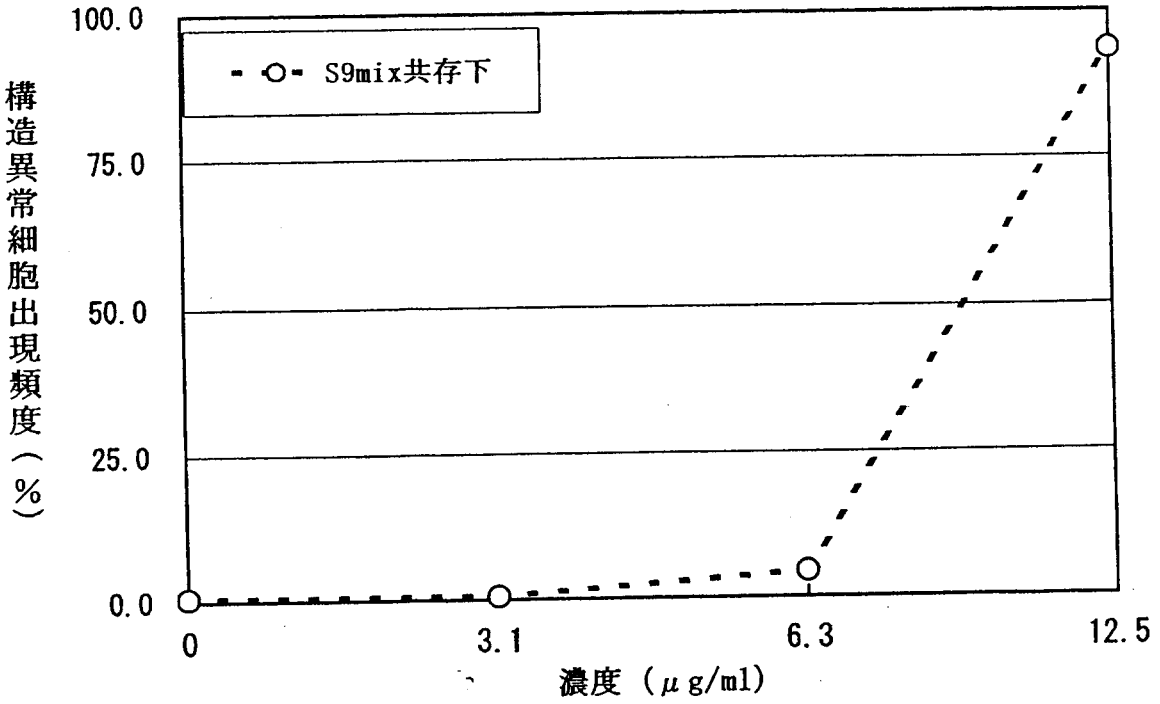


図 7　　の構造異常細胞出現頻度

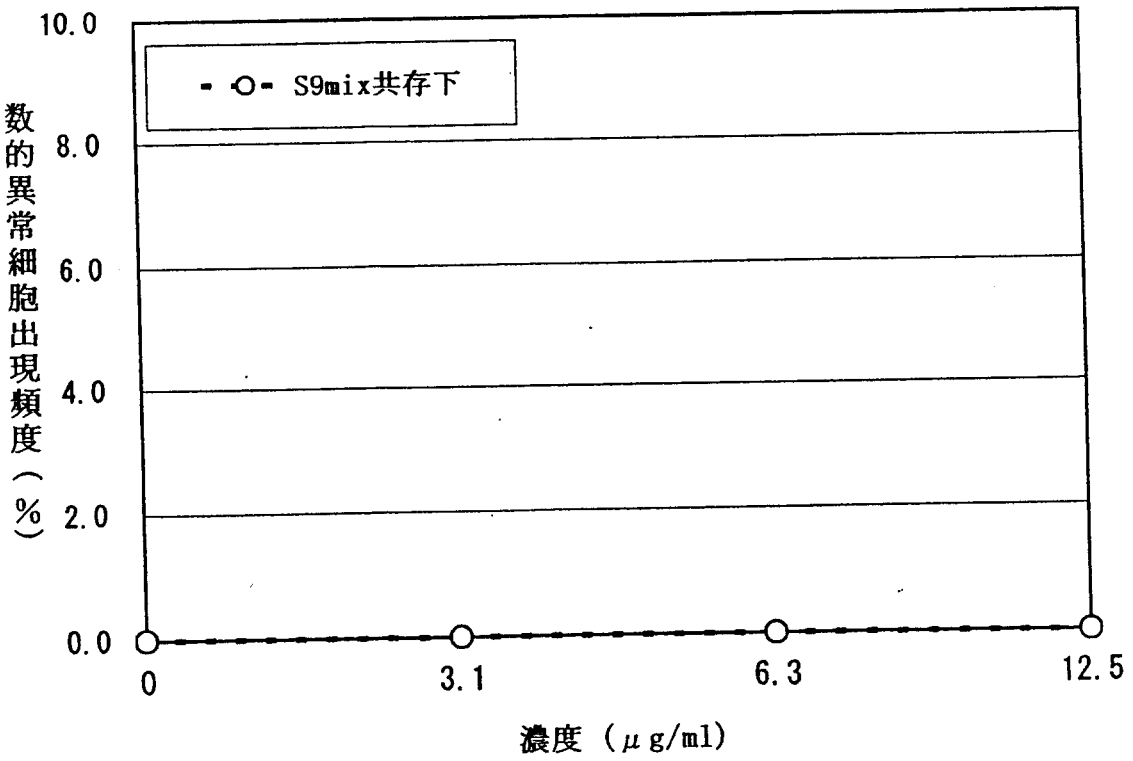


図 8　　の数的異常細胞出現頻度

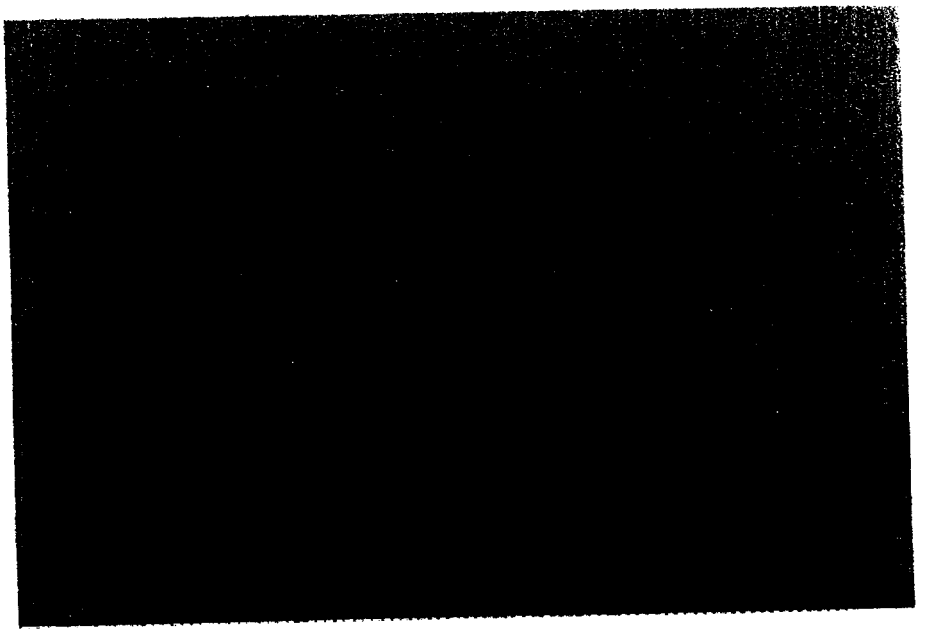


写真１　陰性対照群にみられた正常細胞

（短時間処理法 S9mix非共存下）

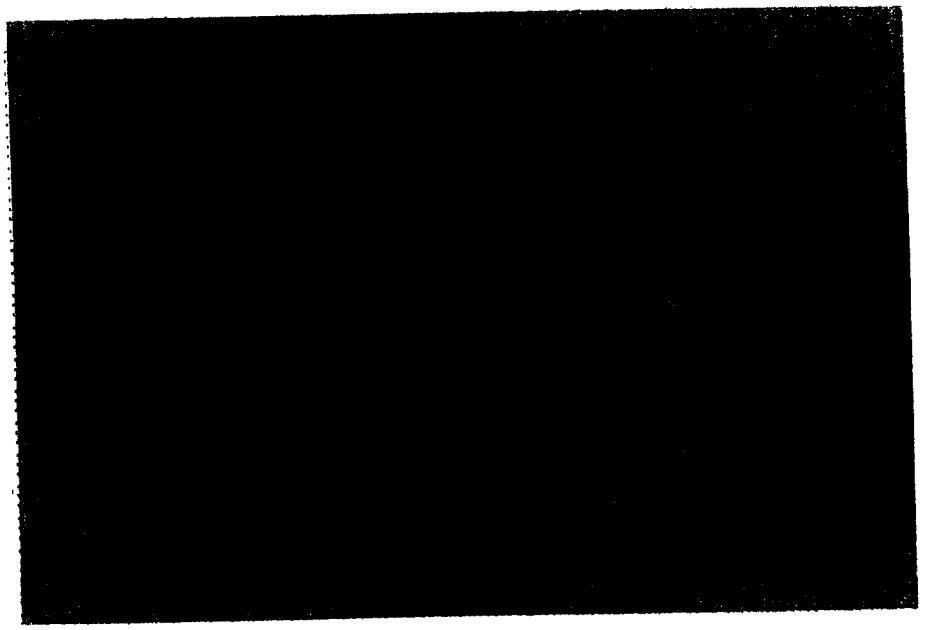


写真２　被験物質処理群にみられた構造異常細胞

（短時間処理法 S9mix非共存下の12.5μg/mℓ）

添付資料　1

有糸分裂指数

（1）短時間処理法

代謝活性化法によらない場合（6－18h）			代謝活性化法による場合（6－18h）		
処理濃度（μg/ml）	観察細胞数	有糸分裂指数（%）	処理濃度（μg/ml）	観察細胞数	有糸分裂指数（%）
溶媒対照（ｱｾﾄﾝ）	2000	8.8	溶媒対照（ｱｾﾄﾝ）	2000	11.5
3.1	2000	7.3	18.8	2000	14.0
6.3	2000	2.0	37.5	2000	12.1
12.5	2000	0.5	75	2000	2.9
25	「TOX」		150	「TOX」	
50	「TOX」		300	「TOX」	
陽性対照（MMC）	2000	6.7	陽性対照（BP）	2000	2.3

備考，MMC：ﾏｲﾄﾏｲｼﾝ C，BP：ﾍﾞﾝｿﾞ〔a〕ﾋﾟﾚﾝ
「TOX」：細胞毒性により分裂細胞が50個以上得られなかった。

Translated from Japanese by
SCIENTIFIC TRANSLATION SERVICES
411 Wyntre Lea Dr.
Bryn Mawr, PA 19010

8L898

DECLARATION

Comprehensive Analysis Center
Japan Oil Testing Association, Ltd.

Test contractor:

Subject: Chromosomal aberration test using mammalian cultured cells of[1]

Test number: 8L898

This test has been carried out in accordance with the following GLP.

"The standards related to test facilities provided in article 4 of the ordinance prescribing items and the like for tests relating to new chemical substances and investigations of the harmfulness of designated chemical substances (Environ. Prot. Indus. No. 39, Drug Iss. No. 229, 59 Base Bureau No. 85, 1984, partially revised 1988)"

"Standards to be maintained by test facilities that conduct investigations of harmfulness (Ministry of Labor, Work Bulletin No. 76, 1988)"

March 15, 1999

Operations Manager [signature] [name stamp]

[1] Translator's note: Proper name transliterated from the Japanese, spelling uncertain.

8L898

Reliability Assurance Certificate

Comprehensive Analysis Center
Japan Oil Testing Association, Ltd.

Test contractor:

Subject: Chromosomal aberration test using mammalia cultured cells of

Test number: 8L898

It is certified as follows that this test was conducted in accordance with the Test Plan and the Standard Operating Procedures Manual, that the methods and procedures used in the test have been accurately recorded in this report, and that the test results accurately reflect the raw data.

Certified Contents	Date of execution	Date of report to Operations Manager and Test Manager
Test Plan	January 19, 1999	January 19, 1999
Test Execution Circumstances	February 16, 1999	February 16, 1999
Test Report Draft	March 10, 1999	March 10, 1999
Test Report	March 15, 1999	March 15, 1999

March 15, 1999

Reliability Assurance Manager: Etsuro Fujihara [name stamp]

[2] Translator's note: Proper name transliterated from the Japanese, spelling uncertain.

8L898

Test Execution Outline

1. Subject: Chromosomal aberration test using mammalian cultured cells of [illegible] (Test No.: 8L898)

2. Test objective: Investigate the inducibility of chromosomal aberration relative to subject material of mammalian cultured cells

3. Applicable guidelines: Chem. Assay Method Guidelines (1997) and Safe Hygiene Method Guidelines (1997)

4. Applicable GLP: Chem. Assay Method GLP (1984, 1988) and Safe Hygiene Method GLP (1988)

5. Test Contractor: [illegible]

6. Test Contractor: Mitsubishi Chemical Safe Science Research Institute, Ltd.
1-ban 30-go 2-chome Shiba, Minato-ku, Tokyo

7. Test Facility: Comprehensive Analysis Center, Japan Oil Testing Association, Ltd.
1-chome 10-ban 4-go Mikagezuka-cho, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo Prefecture

8. Test participants:
Test manager: Makoto Nakamura
Test assignees: Osamu Tokihara*
Yoshinori* Otani

* Translator's note: The Chinese "kanji" characters composing this proper name have a multiplicity of possible readings; the most common rendering is used here, but confirmation is required.

9. Test period: Test start date: January 19, 1999
Experiment start date: January 22, 1999
Experiment termination date: March 5, 1999
Test termination date: March 15, 1999

10. Environmental factors that would seem to have affected the reliability of the test results: none

11. Retention: The test plan, raw data, subject material, written records and final report shall be kept in the storage facilities of the Comprehensive Analysis Center. However, the retention period for the raw data and the like shall be 10 years from the preparation of the final report, and subsequent retention shall be decided upon after consultation with the test contractor.

Report of Results of Chromosomal Aberration Test Using Mammalian Cultured Cells

1. General Information

Name of new chemical substance (according to IUPAC Nomenclature):	1,3-bis(2,3-epoxypropyl)-2-(2,3-epoxypropoxy)benzene		
Other name:			
Structural formula or rational formula: (if both are unclear, summarize the method of manufacture)			
Purity of new chemical substance provided for testing:	99% or higher	Lot No. of new chemical substance provided for testing:	FHS1956
Name and concentration of impurities:	0.5% or less toluene(3)-2; 0.5% or less water		
CAS No.:	13561-08-5	Vapor pressure:	----
Molecular weight:	262.31	Partition coefficient:	----
Melting point:	----	Properties at ordinary temperature:	light amber solution
Boiling point:	> 250°C		
Stability:	Stable		
Solubility, etc. relative to solvents	Solvent	Solubility	Stability in solvent
	water	insoluble	----
	DMSO	----	----
	acetone	dissolves at 500 mg/m*L* [1)]	stable[2)]
	other ( )	----	----

DMSO: dimethylsulfoxide

1): According to results of solvent testing at this Comprehensive Research Center.
2): There was no finding of heat build-up, discoloration or foaming at the time of preparation of the subject material solution.

2. Cell Type - Culture Conditions

Cell name:	CHL/IU	Obtained from:		Dainippon Seiyaku Co., Ltd.
Type:	Chinese hamster	Date obtained:		May 26, 1998
Culture solution:	MEM of eagle	Source of manufacture:		Nissui Seiyaku Co., Ltd.
Serum type and dosage:	Calf serum, 10%	Source of manufacture (Lot No.):		Gibco BRL (1009120)
Cell cycle:	ca. 15.2 h	Freezing conditions:		In liquid nitrogen
No. of successive generations:	16-19*	Culture conditions:	Container:	Plastic Petri dish
Chromosome quantity (mode):	25		Temperature:	37°C
			CO_2 concentration:	5%
Remarks:	* Cells that had been frozen at the 15th successive generation were used.			

3. S9 Mix

(1) Method of obtaining S9, etc. (circle the pertinent number, and fill in the required items)

Self-manufacture, purchase:	1. self-manufacture (2.) purchase (source of manufacture: Kikkoman Co., Ltd.)
Date of manufacture:	Manufactured September 11, 1998
Lot No. in case of purchase:	RAA-393
Storage temperature	-80°C or less

(2) S9 Manufacturing Method

Animals used		Inducer	
Species / strain:	Rats / SD type	Name:	Phenobarbitol (PB) 5,6-benzoflavone (BF)
Sex:	Male	Method of administration:	intra-abdominal administration
Age in weeks:	7 weeks	Period of administration and dosage (g/kg body weight):	PB 4 days 0.03-0.06 BF 1 day 0.08
Body weight:	212-248 g		

(3) Composition of S9 Mix

Component	Amount in 1 m*L* of S9 mix	Component	Amount in 1 m*L* of S9 mix
S9	0.3 m*L*	$NADP^+$	4 μmol
$MgCl_2$	5 μmol	Na-phosphate buffer solution	-- μmol
KCl	33 μmol	Other (HEPES buffer solution)	4 μmol
Glucose-6-phosphate	5 μmol	Other (DW)	Remainder

DW: sterilized distilled water

(4) Treatment Conditions for S9 Mix (circle the pertinent number, and fill in the required items)

(1.) plate method 2. floating cell method 3. other ( )	
S9 amount (final concentration):	5%
S9 protein amount (final concentration):	1.26 mg/m*L*
Treatment time:	6 h
Recovery time:	18 h
Remarks:	----------

4. Preparation of the Subject Material Solution (circle the pertinent items for the property of the subject material solution, and the presence or absence of purity conversion)

Employed solvent	Name	Manufacturing source	Lot No.	Grade	Purity (%)
	acetone	Wako Junyaku Industries Co., Ltd.	ACH2505	-----	min. 99.5
Reason for solvent selection	As there was information concerning its solubility to the effect that it is insoluble in water, we conducted a solvent test. As a concentration equivalent to the subject material stock solution, we prepared 50 mg/m*L* of sal. sol. and 1% carboxymethyl cellulose sodium aqueous solution (1% CMC-Na aqueous solution), 1,000 mg/m*L* of DMSO, and 500 mg/m*L* of acetone. Results: no dissolution in the sal. sol. and 1% CMC-Na aqueous solution, but dissolution in DMSO and acetone. When the prepared subject material solution was added to the culture solution in DMSO and acetone, the dispersion of subject material was more uniform in acetone, and consequently acetone was used as the solvent.				
Property of subject material solution	(dissolved) suspended other ( )				
Method of suspension, etc. for the case where subject material solution is only slightly soluble	----------				
Retention time and temperature from preparation of solution until use	(Cytostatic test for cases not involving a metabolic activation method that is a short-time treatment method) ca. 15 minutes at room temperature (Cytostatic test for cases involving a metabolic activation method that is a short-time treatment method) ca. 40 minutes at room temperature				

	(Chromosomal aberration test using a short-time treatment method) ca. 40 minutes at room temperature
Presence or absence of purity conversion	Yes (No)

sal. sol.: saline solution

3/15

5. Testing by Short-time Treatment Method

(1) Cytostatic Test Conditions

		Case not involving metabolic activation method	Case involving metabolic activation method
Test execution period:		From Feb. 1, 1999 to Feb. 5, 1999	From Jan. 22, 1999 to Jan. 26, 1999
Incubator:	Form	plastic circular Petri dish	plastic circular Petri dish
	Size	diameter 6 cm	diameter 6 cm
	Amount of culture solution	3 m*L*/incubator	3 m*L*/incubator
	No. of incubators per dosage	2	2
Cells:	No. of planted cells	4×10^3 units/m*L*	4×10^3 units/m*L*
	No. of days to incubation	3rd day	3rd day
Treatment conditions:	Amount of subject material solution added	0.03 m*L*/incubator	0.03 m*L*/incubator
	Amount of S9 mix added	---	0.5 m*L*/incubator
	Final concentration of S9	---	5%
	Final conentration of S9 protein	---	1.26 mg/m*L*
	Treatment time	6 h	6 h
	Recovery time	18 h	18 h
Cytostatic measuring method:	After being fixed for 15 minutes in methanol, and dyed for 10 minutes in 0.1% crystal violet solution, it is washed and dried. A monolayer culture cell density meter was used for measurement.		
Remarks:			

(2) Cytostatic Test Results

Cases not involving a metabolic activation method (6-18 h)		Cases involving a metabolic activation method (6-18 h)	
Dosage (μg/m*L*)	Cell proliferation rate (%)	Dosage (μg/m*L*)	Cell proliferation rate (%)
0 (solvent)	100	0 (solvent)	100
0.4	84	39	93
0.8	76	78	80
1.6	77	156	22
3.1	93	313	0
6.3	91	625	0
12.5	74	1,250	0
25	34	2,500	0
50	0	5,000	0

Remarks: In cytostatic tests with a maximum concentration of 5,000 μg/m*L* for cases not involving a metabolic activation method, it was 0% up to a treatment concentration of 39 μg/m*L*.

(3) Chromosomal Aberration Test Conditions

		Case not involving metabolic activation method	Case involving metabolic activation method
Test execution period:		From Feb. 12, 1999 to Feb. 16, 1999	From Feb. 12, 1999 to Feb. 16, 1999
Incubator:	Form	plastic circular Petri dish	plastic circular Petri dish
	Size	diameter 6 cm	diameter 6 cm
	Amount of culture solution	3 m*L*/incubator	3 m*L*/incubator
	No. of incubators per dosage	2	2
Cells:	No. of planted cells	4×10^3 units/m*L*	4×10^3 units/m*L*
	No. of days to incubation	3rd day	3rd day
Treatment conditions:	Amount of subject material solution added	0.03 m*L*/incubator	0.03 m*L*/incubator
	Amount of S9 mix added	---	0.5 m*L*/incubator
	Final concentration of S9	---	5%
	Final conentration of S9 protein	---	1.26 mg/m*L*
	Treatment time	6 h	6 h
	Recovery time	18 h	18 h
Remarks:			

(4) Chromosomal Aberration Test Results (per Table Attachment 1)

7. Interpretation of Results and Reference Items

(1) Interpretation of Results

Interpretation (Circle one)	(Positive) Negative

Grounds of the interpretation:

- In the short-time treatment method, the frequency of occurrence of cells with structural abnormalities was 100% in the case (-S9mix) not involving a metabolic activation method, and 93.5% in the case (+S9 mix) involving a metabolic activation method.
- In the short-time treatment method, the frequency of occurrence of cells with quantitative abnormalities was less than 5% in both the case involving a metabolic activation method and the case not involving a metabolic activation method.
- From the above results, it is deemed that the chromosomal aberration inducibility of is positive.

D_{20} value	Structural abnormality	Short-time treatment method	-S9mix	6-18 h treatment	0.00039 mg/m*L*
			+S9mix	6-18 h treatment	0.024 mg/m*L*
		Continuous treatment method	--	24-0 h treatment	--- mg/m*L*
	Quantitative abnormality	Short-time treatment method	-S9mix	6-18 h treatment	--- mg/m*L*
			+S9mix	6-18 h treatment	--- mg/m*L*
		Continuous treatment method	--	24-0 h treatment	--- mg/m*L*

(Remarks) The D_{20} value is the estimated dosage of subject material required in order to induce abnormalities in 20% of the interkinetic image and is to be recorded by type of abnormality for test strains that are deemed to be positive.

(2) Reference Items

- As a result of cytostatic testing by short-time treatment method, the concentrations where cell proliferation was inhibited by 50% are as follows.
  without coexistence of S9 mix: 19 μg/m*L*
  with coexistence of S9 mix: 106 μg/m*L*
- Based on these results, chromosome abnormality tests were conducted with the following concentrations:
  without coexistence of S9 mix: 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 μg/m*L*
  with coexistence of S9 mix: 300, 150, 75, 37.5, 18.8 μg/m*L*
- Cytotoxicity was noted in the chromosomal aberration tests by short-term treatment method, and it was not possible to obtain more than 50 interkinetic cells at 50 and 25 μg/m*L* without coexistence of S9 mix or at 300 and 150 μg/m*L* with coexistence of S9 mix.
- Microphotographs of normal cells observed in the negative control group and of structurally abnormal cells observed in the case involving a metabolic activation method are attached

(Photographs 1 and 2).

- Substances used for positive control:

mitomycin C (abbreviated MMC):	purity (108%), lot No. (080AEK), source of manufacture (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)
benzo[α]pyrene (abbreviated BP):	purity (95.6%), lot No. (GG01), source of manufacture (Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.)

- The classification of chromosome structure abnormalities and quantitative abnormalities is as follows.

  Classification of structural abnormalities:

  Chromatid breakage (abbreviated "ctb")
  Chromatid exchange (abbreviated "cte")
  Chromosome breakage (abbreviated "csb")
  Chromosome exchange (dicentric, annular chromosomes, etc.; abbreviated "cse")
  Other (fragmentation, excluding pulverization; abbreviated "frg")
  Gaps (chromatid type and chromosome type; abbreviated "gap")

  Classification of quantitative abnormalities:

  Polyploid (3-ploid or more, but there is no search for heteroploidy)
  Other (endopolyploidy)

  Gaps are defined as non-chromosomal regions narrower than chromatid width, are classified and recorded as other abnormalities and not included in structural abnormalities.

- Cells with structural abnormality are considered as cells with 1 incidence of abnormality, and are tabulated for cases excluding cells with only gap abnormalities (-gap) and for cases including them (+gap).
  With regard to the final interpretation of the chromosomal aberration inducibility of the subject material, under all treatment conditions, a frequency of occurrence of less than 5% for both structurally abnormal and quantitatively abnormal cells of -gap was considered as negative, above 5% but less than 10% for either one or both as pseudo-positive, and 10% or more for either one or both as positive. Moreover, a finding of positive was made in the case where the frequency of occurrence of cells with chromosomal structure abnormalities or quantitative abnormalities was clearly higher compared to the negative (solvent) control and where its working was found to exhibit dosage dependency or reproducibility.

- No statistical techniques were used for purposes of data analysis.

8. Other

Test execution facility	Name:	Comprehensive Analysis Center, Japan Oil Testing Association, Ltd.
	Location:	1-chome 10-ban 4-go Mikagezuka-cho, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo Prefecture
Test manager	Work name:	Manager Makoto Nakamura [name stamp]
	No. of years of experience:	8 years
Test number	8L898	
Test period	January 19, 1999 to March 15, 1999	

Table Attachment 1. Chromosomal Aberration Test (Short-Time Treatment Method)

Name of subject material: [Translator's note: for figures in table, see original]

Treat-ment time (h)	S9 mix	Dosage of subject material (μg/mL)	No. of cells with chromosomal structure abnormalities (frequency of occurrence %)							No. of gap occur-rences	Cell proliferation rate (%)	No. of cells with quantitative abnormality of chromosome (frequency of occurrence %)			
			No. of cells observed	Chromatid breakage	Chromatid exchange	Chromosome breakage	Chromosome exchange	Other*	Total No. of abnormal cells (%)			No. of cells observed	Polyploid	Other**	Total No. of abnormal cells (%)
6-18	–	solvent control (acetone)													
6-18	–	3.1													
6-18	–	6.3													
6-18	–	12.5													
6-18	–	25	TOX								21	TOX			
6-18	–	50	TOX								0	TOX			
6-18	-	positive control (MMC) 0.15													
6-18	+	solvent control (acetone)													
6-18	+	18.8													
6-18	+	37.5													
6-18	+	75													
6-18	+	150	TOX								23	TOX			
6-18	+	300	TOX								0	TOX			
6-18	+	negative control (BP) 20													

Subject material treatment time (6 hours) – recovery time after subject material treatment (18 hours)

*Other structural abnormalities: fragmentation (excluding pulverization); **Other quantitative abnormalities: endopolyploidy

MMC: mitomycin C; BP: benzo[α]pyrene

TOX: unable to obtain 50 or more mitotic cells due to cytotoxicity

Short-Time Treatment Method

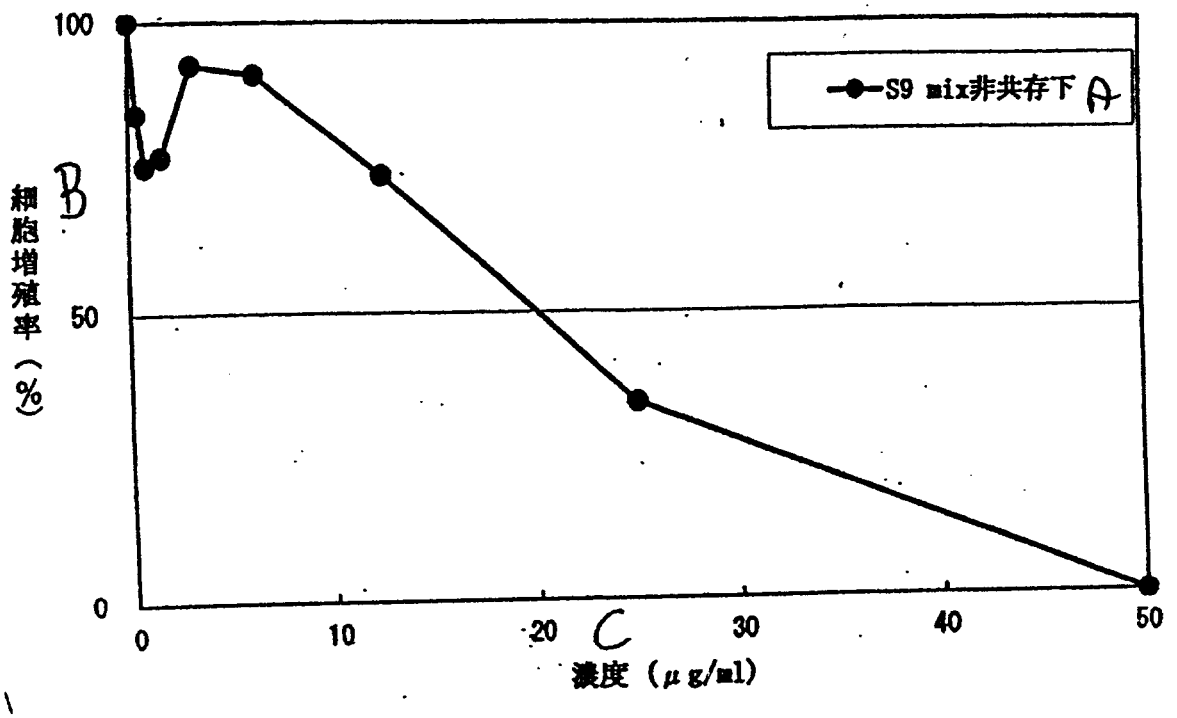


Fig. 1 Cytotoxicity of (Cytostatic Test)

A\ without coexistence of S9 mix B\ Cell Proliferation Rate (%) C\ Concentration (μg/m*L*)

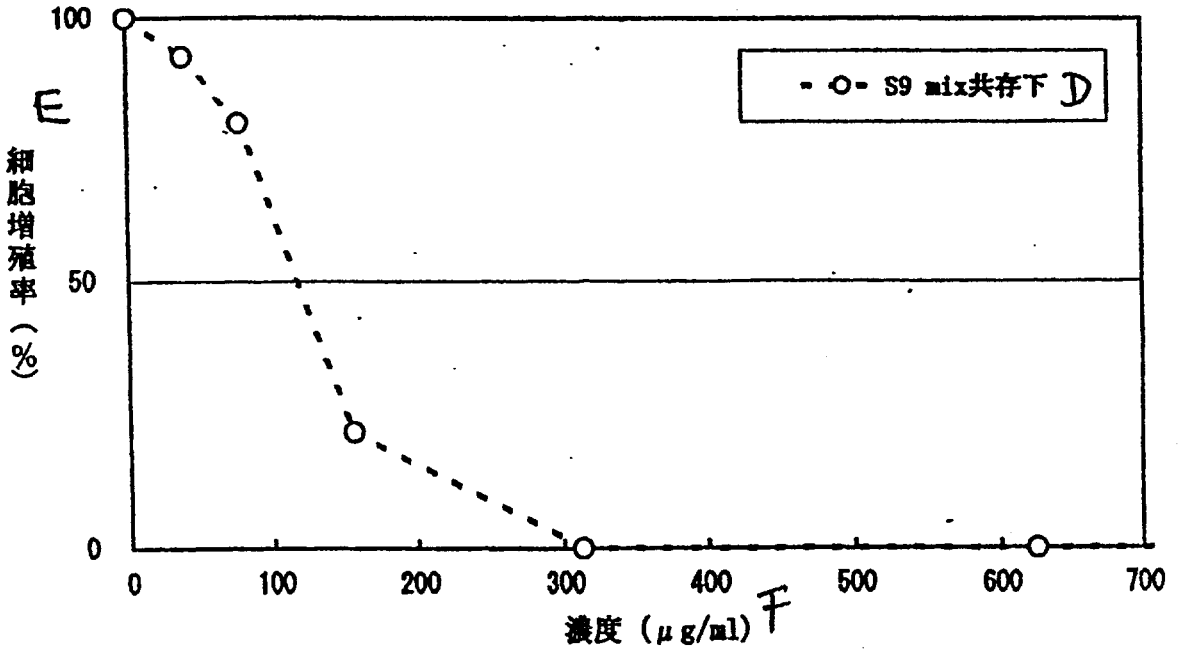


Fig. 2 Cytotoxicity of ' (Cytostatic Test)

D\ with coexistence of S9 mix E\ Cell Proliferation Rate (%) F\ Concentration (μg/m*L*)

Short-Time Treatment Method

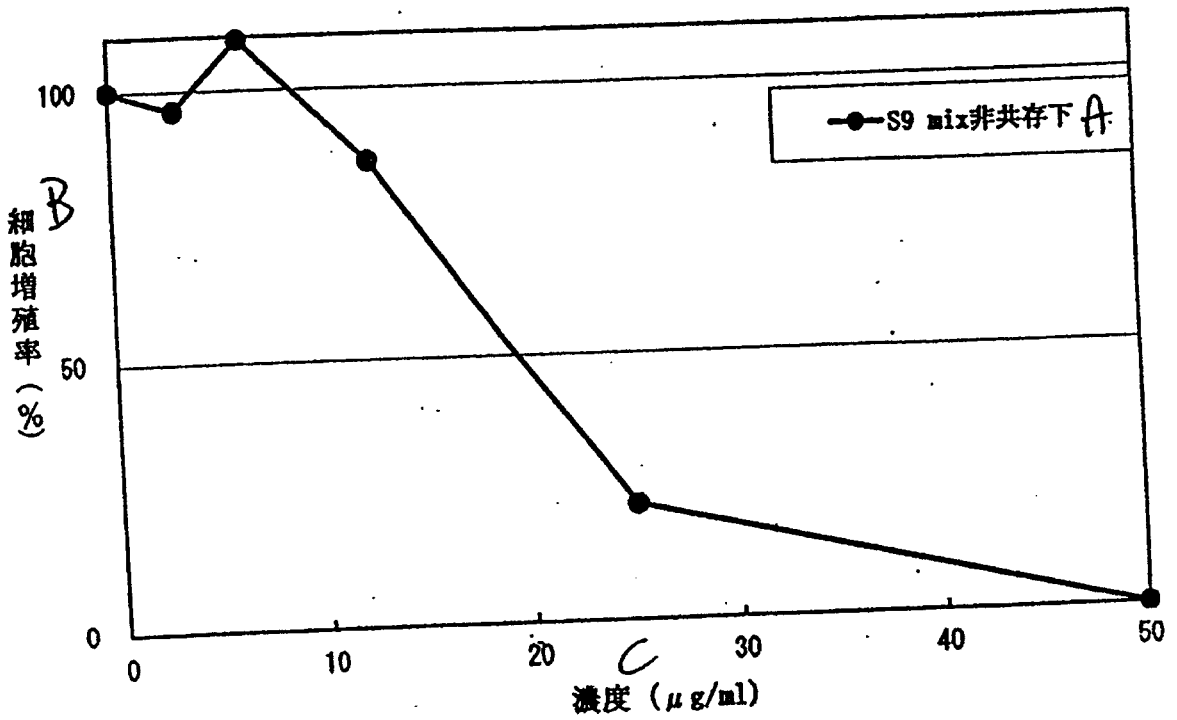


Fig. 3 Cytotoxicity of (Chromosomal Aberration Test)

A\ without coexistence of S9 mix B\ Cell Proliferation Rate (%) C\ Concentration (μg/m*L*)

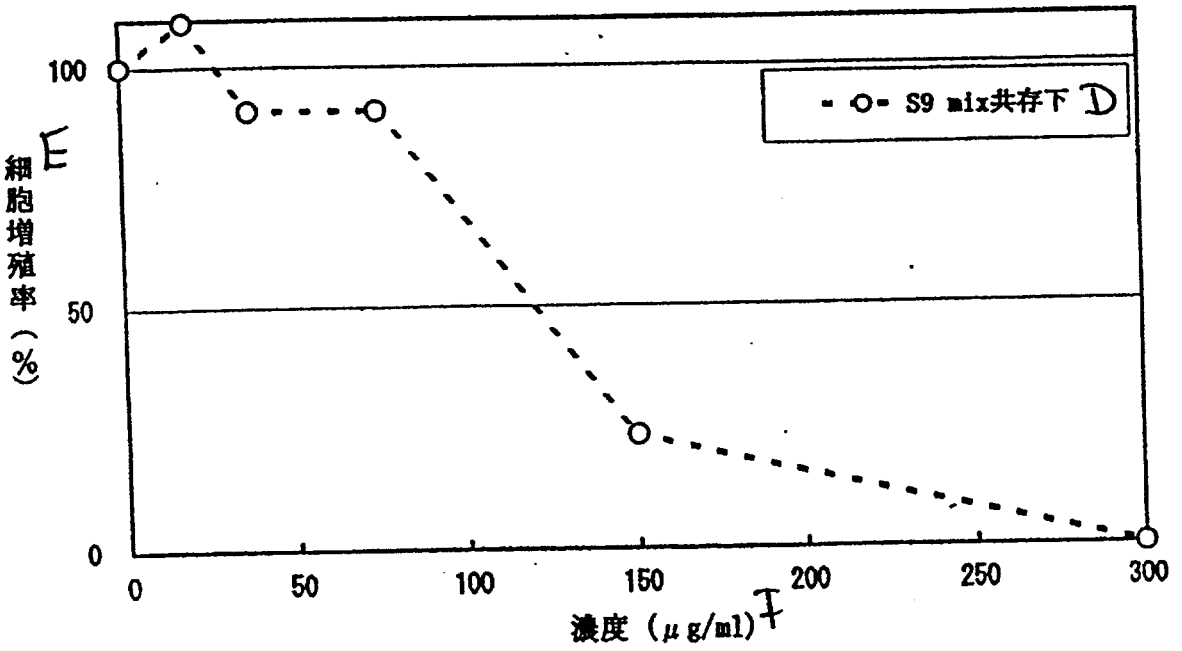


Fig. 4 Cytotoxicity of (Chromosomal Aberration Test)

D\ with coexistence of S9 mix E\ Cell Proliferation Rate (%) F\ Concentration (μg/m*L*)

Short-Time Treatment Method

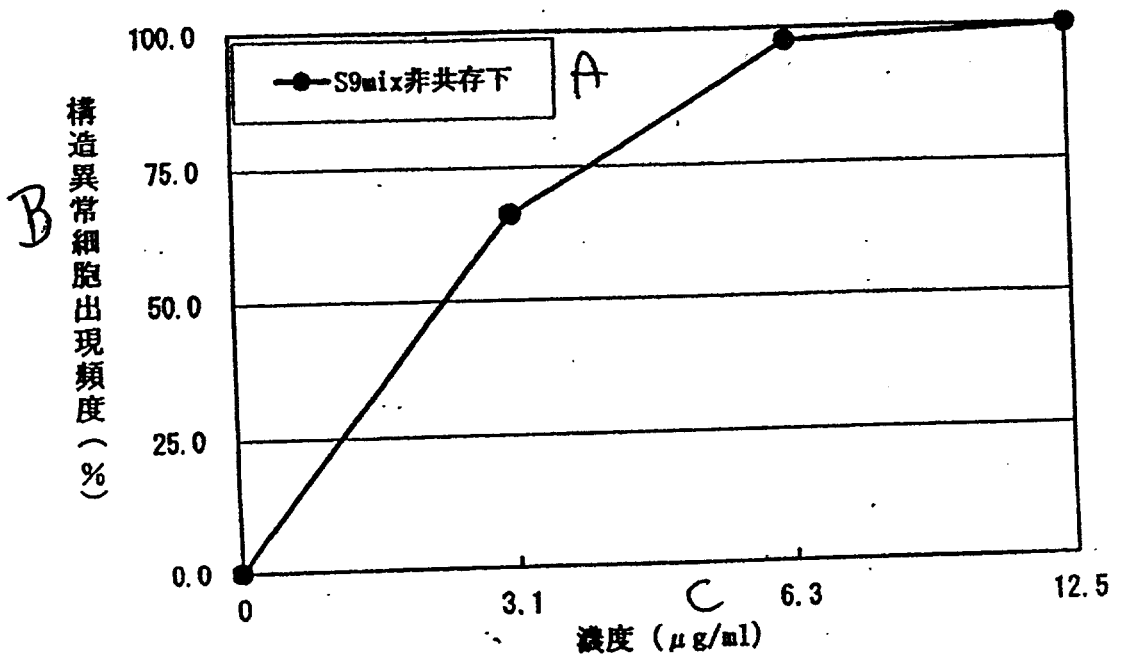


Fig. 5 Frequency of Occurrence of Structurally Abnormal Cells of

A\ without coexistence of S9 mix B\ Frequency of Occurrence of Structurally Abnormal Cells (%) C\ Concentration (μg/m*L*)

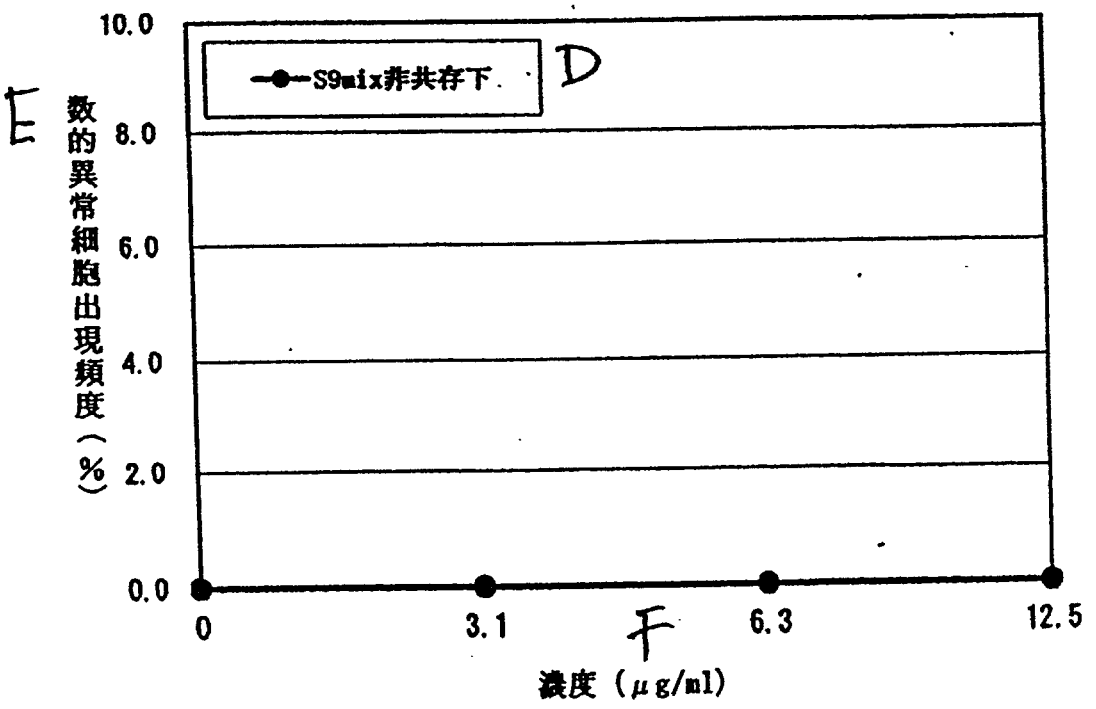


Fig. 6 Frequency of Occurrence of Quantitatively Abnormal Cells of

D\ without coexistence of S9 mix E\ Frequency of Occurrence of Quantitatively Abnormal Cells (%) F\ Concentration (μg/m*L*)

Short-Time Treatment Method

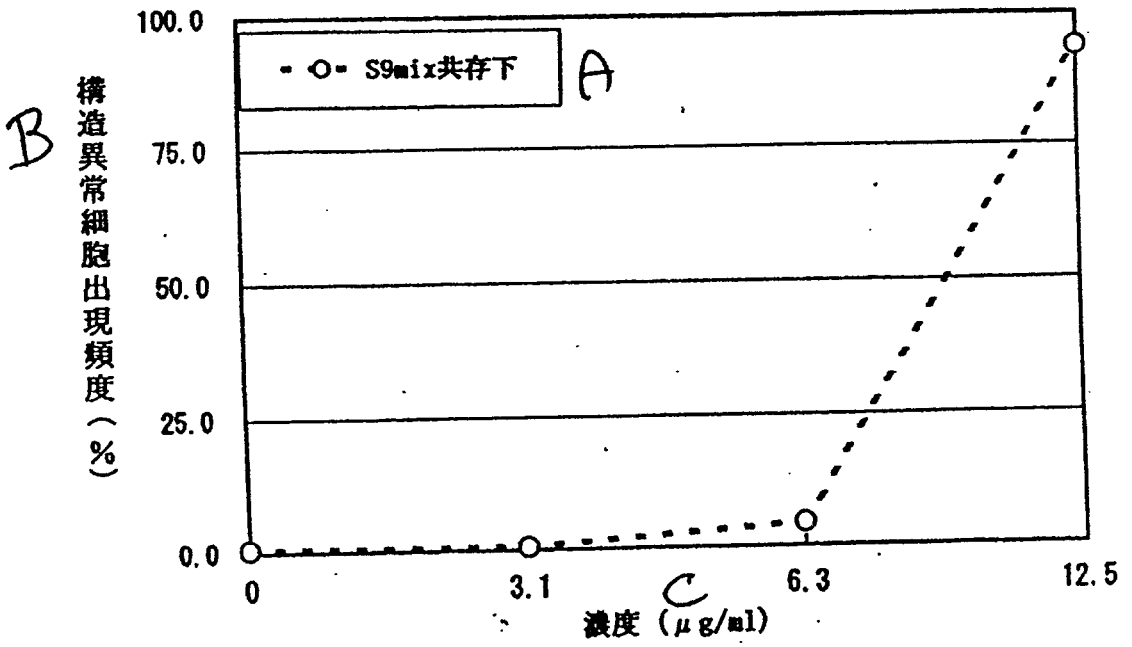


Fig. 7 Frequency of Occurrence of Structurally Abnormal Cells of

A\ with coexistence of S9 mix B\ Frequency of Occurrence of Structurally Abnormal Cells (%)
C\ Concentration (μg/m*L*)

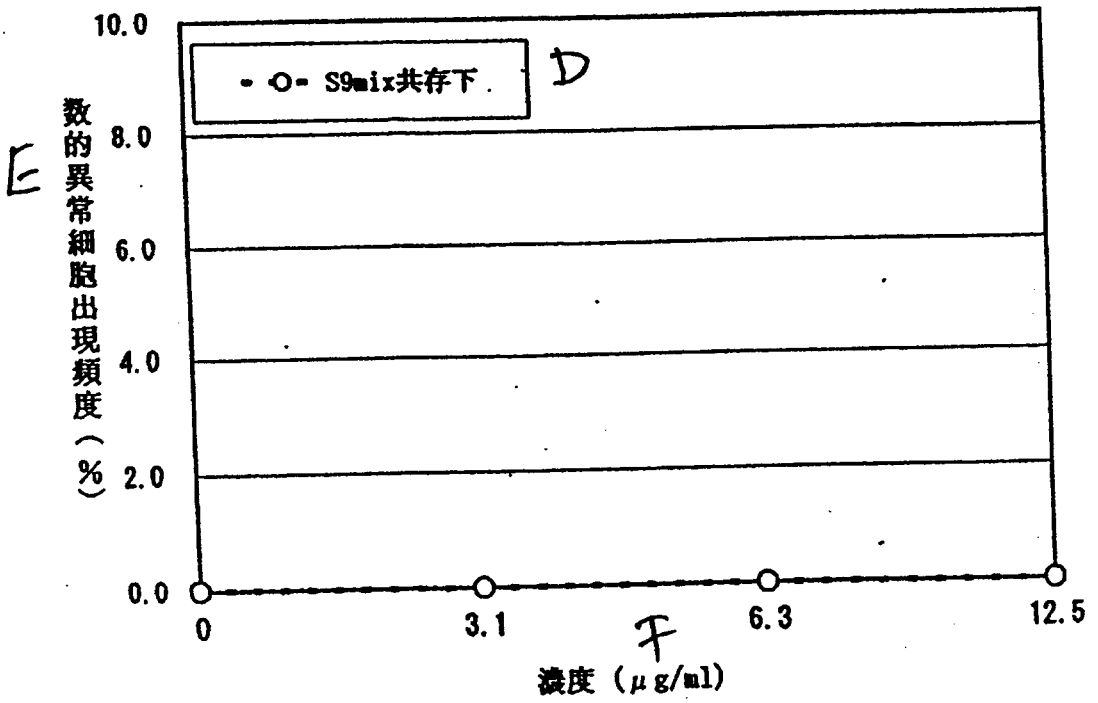


Fig. 8 Frequency of Occurrence of Quantitatively Abnormal Cells of

D\ with coexistence of S9 mix E\ Frequency of Occurrence of Quantitatively (%) F\ Concentration (μg/mL)

Fig. 2 Structurally abnormal cells observed in subject material treatment group (short-time treatment method: 12.5 μg/m*L* without coexistence of S9 mix)

Mitotic Index

(1) Short-time treatment method

Case not involving metabolic activation method (6-18 h)			Case involving metabolic activation method (6-18 h)		
Treatment concentration (μg/m*L*)	No. of cells observed	Mitotic index (%)	Treatment concentration (μg/m*L*)	No. of cells observed	Mitotic index (%)
Solvent control (acetone)	2,000	8.8	Solvent control (acetone)	2,000	11.5
3.1	2,000	7.3	18.8	2,000	14.0
6.3	2,000	2.0	37.5	2,000	12.1
12.5	2,000	0.5	75	2,000	2.9
25	"TOX"		150	"TOX"	
50	"TOX"		300	"TOX"	
Positive control (MMC)	2,000	6.7	Negative control (BP)	2,000	2.3

Remarks: MMC: mitomycin C, BP: benzo[α]pyrene
"TOX": unable to obtain 50 or more mitotic cells due to cytotoxicity