

最終報告書

モノオレイン酸グリセリルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：7820 (115-185)

平成17年5月11日

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約.....	4
2. 表題.....	5
3. 試験目的.....	5
12. 被験物質.....	8
13. 試験材料および方法.....	10
14. 試験結果.....	18
15. 考察および結論.....	20
16. 参考文献.....	21

Figures

Figure 1	Growth inhibition of CHL cells treated with glycerol monooleate [Short-term treatment].....	23
Figure 2	Growth inhibition of CHL cells treated with glycerol monooleate [Continuous treatment].....	24

Tables

Table 1	Results of growth inhibition test of glycerol monooleate [Short-term treatment].....	25
Table 2	Results of growth inhibition test of glycerol monooleate [Continuous treatment].....	26
Table 3	Chromosome aberration test in CHL cells treated with glycerol monooleate [Short-term treatment : -S9].....	27
Table 4	Chromosome aberration test in CHL cells treated with glycerol monooleate [Short-term treatment : +S9].....	28
Table 5	Chromosome aberration test in CHL cells treated with glycerol monooleate (additional study) [Continuous treatment : 24h].....	29

1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、モノオレイン酸グリセリルは染色体異常を誘起しないものと判断した。

モノオレイン酸グリセリル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、試験用量を設定した。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 891, 1783 および 3565 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、モノオレイン酸グリセリル処理群の場合、短時間処理法の-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の誘発は認められなかった。したがって、連続処理法 24 時間処理の 55.7, 111 および 223 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。同処理法においても、モノオレイン酸グリセリル処理による染色体異常の誘発は認められなかった。

また、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。

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

モノオレイン酸グリセリル (英名 : Glycerol monooleate)

12.2. ロット番号

12.3. 純度

99.93%

12.4. 成分情報

抽出トコフェロール : 0.05%

リン酸 : 0.02%

12.5. 製造元

12.6. 保存条件

密栓した容器に保存する.

直射日光を避け, 室温に保存する.

12.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-3)

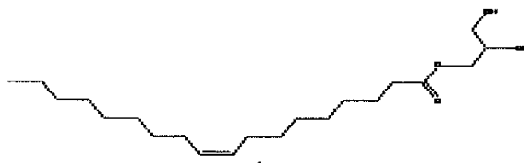
12.8. CAS No.

111-03-5 (主成分)

12.9. 化学名

9-Octadecenoic acid, (9Z)-, 2,3-dihydroxypropyl ester

12.10. 化学構造



12.11. 分子式

C₂₁H₄₀O₄

12.12. 分子量

356.54

12.13. 物質の状態

形状：ロウ状

色：淡黄色

臭い：僅かな特異臭

12.14. 融点（流動点）

42°C

12.15. 溶解性

水溶解性：不溶

溶媒溶解性：クロロホルムに可溶，DMSO に可溶（500 mg/mL 以上）

12.16. 安定性／反応性

通常の使用では安定

12.17. 取り扱い上の注意

火気注意

作業場の換気を十分に行う。

保護眼鏡，保護手袋等の適切な保護具を使用する。

取り扱い後は，手，顔等を良く洗い，うがいをする。

12.18. 残余被験物質の処理

被験物質の一部を保存した後，残りは品質試験等の実施のため被験物質提供元へ返却した。品質分析の結果（平成 16 年 11 月 26 日付報告），安定性に関して問題はなかった。

13. 試験材料および方法

13.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を選択した。

CHL/IU 細胞は昭和 59 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、一部については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継代数 9 の細胞を、染色体異常試験で継代数 17 の細胞を、同一追加試験で継代数 24 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。

13.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI : Lot No. 515014 ; 旭テクノグラス) に非働化 (56°C, 30 分) 済み仔牛血清 (Lot No. 427252 ; 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 (4°C) に保存した。

13.3. 培養条件

CO₂ インキュベーター (三洋電機バイオメディカ) を用い、CO₂ 濃度 5%, 37°C の条件で細胞を培養した。

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. CAM-499 ; 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 (設定温度 -80°C) で保存した。

13.4.1. S9 の調製方法

調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法等を以下に示した.

ロット番号	RAA-499
調製日	平成 16 年 3 月 19 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	214~245 g
臓器	肝臓
誘導物質投与量 および投与回数	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF) 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	25.22 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に不溶であるが DMSO に易溶であることから, 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. K30049278 ; 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調製原液 (356.5 mg/mL 溶液) を準備した. この 356.5

mg/mL 原液を使用溶媒で順次希釈し、178.3, 89.1, 44.6, 22.3, 11.1, 5.57, 2.79, 1.39 および 0.696 mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに処理を行った。

染色体異常試験では使用直前に調製原液 (356.5 mg/mL 溶液) を準備した。この 356.5 mg/mL 原液を使用溶媒で順次希釈し、320.9, 288.8, 259.9, 233.9, 210.5, 189.5, 170.5, 153.5 および 138.1 mg/mL 溶液を調製した (連続処理法 24 時間処理)。また、356.5 mg/mL 原液から一部採取し、同様に使用溶媒で順次希釈し、178.3, 89.1, 44.6 および 22.3 mg/mL 溶液を調製した (短時間処理法)。調製後、速やかに処理を行った。

染色体異常試験 (連続処理法 24 時間処理-追加試験) では使用直前に調製原液 (356.5 mg/mL 溶液) を準備した。この 356.5 mg/mL 原液を使用溶媒で順次希釈し、178.3, 89.1, 44.6, 22.3, 11.1 および 5.57 mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに処理を行った。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒 (DMSO) で試験した。

13.6.2. 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. K2K80; 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC: Lot No. 382BBC; 協和醗酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液: Lot No. K2H96; 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。

試験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。

13.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K2K80) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP: Lot No. 3045; 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. K2H96) 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。

試験用量は 12.5 µg/mL とした。

13.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

13.7.1. 試験用量

ガイドライン上定められた最高用量である 3565 µg/mL (10 mM 相当) を最高用量とし、以下 1783, 891, 446, 223, 111, 55.7, 27.9, 13.9 および 6.96 µg/mL の 10 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした。

13.7.2. 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。

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。

13.7.3. 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 8×10^3 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、13.7.6.記載の割合で被験物質等の処理を行った。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. 73K2448；Sigma-Aldrich Chemical）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 μ L を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に細胞生存率（陰性対照に対する比）を求めた。

13.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 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、13.7.6.に記載した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 13.7.3.に記載の方法に準じた。

13.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 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、13.7.6.に記載した割合で溶媒および被験物質の処理を行った。さらに 24 時間培養を続けた。

13.7.6. 処理量一覧

	溶媒および被験物質		
	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	600 μ L	-	6 μ L
+S9 処理	500 μ L	100 μ L	6 μ L
24 時間処理	600 μ L	-	6 μ L

13.7.7. 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。

13.7.8. 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ェルから培養液を除いた。10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：Lot No. KLP8824；和光純薬工業）を加えて約 10 分間細胞を固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット（Lot No. 107D2074；関東化学）水溶液で 10 分間染色した。各ウェルを水洗した後、乾燥させた。各ウェルに色素溶出液（30%エタノール、1%酢酸水溶液）を 3.0 mL 加え、5 分間放置した後、分光光度計（105-50 型：日立製作所）を用いて 580 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。連続処理法 24 時間処理では細胞増殖抑制が認められたため、プロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。算出には 446 ~ 3565 $\mu\text{g/mL}$ の 4 点を用いた。

13.8. 染色体異常試験 (本試験)

13.8.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法では最高用量の 3565 $\mu\text{g/mL}$ においても細胞の増殖を 50%以上抑制することはなかったことから 3565 $\mu\text{g/mL}$ を、連続処理法 24 時間処理では細胞増殖を 50%以上抑制すると予想される 3565 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下に示した 4~10 用量を染色体異常試験の用量に設定した。

試験系	用量 ($\mu\text{g/mL}$)									
短時間処理法 -S9 処理						223	446	<u>891</u>	<u>1783</u>	<u>3565</u>
短時間処理法 +S9 処理							446	<u>891</u>	<u>1783</u>	<u>3565</u>
連続処理法 24 時間処理	1381	1535	1705	1895	2105	2339	2599	2888	3209	3565

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。

13.8.2. 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。

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。

13.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート (細胞培養用シャーレ: 住友ベークライト) に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.8.6. 記載の割合で被験物質等の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 73K2448 ; Sigma-Aldrich Chemical) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

13.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.8.6. に記載した割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は 13.8.3. に記載の方法に準じた。

13.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後 13.8.6. に記載した割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行った。さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

13.8.6. 処理量一覧

	溶媒および被験物質			陽性対照物質		
	培養液	S9 mix	処理液	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

13.8.7. 析出等の観察

13.7.7. に記載の方法に準じた。

13.8.8. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に最終濃度で $0.2 \mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド溶液 (Lot No. 1187876 ; Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25% トリプシン溶液 (Lot No. 1194331 ; Invitrogen) を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、 37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え、 37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 2 回交換した後、新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に 2 滴ずつ滴下した。スライド標本を十分に乾燥させ、 $1/100 \text{ mol/L}$ ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8 ; Lot No. TP601374 ; Merck) を用いて希釈した 1.2% ギムザ染色液 (Lot No. OB279210 ; Merck) で 12 分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

1 プレート当たり 3 枚の染色体標本を作製した。

13.8.9. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照、各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスター C-100LU ; キョーマン) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理した細胞液を $50 \mu\text{L}$ 添加し攪拌してから約 20 分間静置した。測定用チューブにこの混合液を $100 \mu\text{L}$

分注し、ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250:キッコーマン) の発光試薬を 100 μ L 添加した後、相対発光量 (Relative Light Unit ; RLU) を測定した。陰性対照群における RLU に対する比 (相対細胞増殖率) を各用量群について求め、細胞増殖抑制率とした。

13.8.10. 評価対象

短時間処理法の場合、13.8.9.の相対細胞増殖率が各群とも 50%以上を示したことから、試験した最も高い用量、すなわち 3565 μ g/mL を高用量とし、いずれとも連続する 3 用量を観察用量とした。

13.8.11. 染色体の観察

全ての標本をコード化して観察した。

各プレート当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下 ($\times 600$) で観察し、染色体の形態的変化としてギャップ (gap)、染色分体切断 (ctb)、染色分体切断 (csb)、染色分体交換 (cte)、染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

13.9. 染色体異常試験 (追加試験-24 時間処理)

短時間処理法において、陰性結果が得られたので、連続処理法の標本についても観察を実施したが、評価対象群が 3 用量得られなかったことから、追加試験を実施した。

13.9.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験の結果、連続処理法 24 時間処理では細胞増殖を 50%以上抑制すると予想される 3565 μ g/mL を最高用量とし、以下に示した 7 用量を染色体異常試験-追加試験の用量に設定した。ただし、先に作製した標本の細胞毒性作用を考慮し、公比を 2 に増加して実施した。

試験系	用量 (μ g/mL)						
連続処理法 24 時間処理	<u>55.7</u>	<u>111</u>	<u>223</u>	446	891	1783	3565

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。

13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.8.2.に記載の方法に準じた。

13.9.3. 連続処理法 24 時間処理

13.8.5.に記載の方法に準じた。

ただし、溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理は13.9.4.に記載した割合で行った。

13.9.4. 処理量一覧

	溶媒および被験物質			陽性対照物質		
	培養液	S9 mix	処理液	培養液	S9 mix	処理液
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

13.9.5. 析出等の観察

13.7.7.に記載の方法に準じた。

13.9.6. 標本の作製

13.8.8.に記載の方法に準じた。ただし、被験物質の析出物を除くために、トリプシン溶液を添加する前に、ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 103K2403) を用いて細胞を洗浄した。また、ギムザ染色液 (Merck) は Lot No. OB318388 のものを使用した。

13.9.7. 細胞増殖抑制度の測定

13.8.9.に記載の方法に準じた。

13.9.8. 評価対象

連続処理法 24 時間処理の場合、相対細胞増殖率がおよそ 90%を示している 446 µg/mL においても分裂中期像は大きく減少していることから、223 µg/mL を高用量とした連続する 3 用量を観察用量とした。

13.9.9. 染色体の観察

13.8.11.に記載の方法に準じた。

13.10. 結果の解析

最終評価は、ギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った。

異常細胞の出現頻度を、Fisher の直接確率計算法 (有意水準片側 2.5%) を用いて検定した。また用量依存性については、Cochran Armitage の傾向検定 (有意水準片側 2.5%) を用いて検定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、試験用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

14. 試験結果

14.1. 細胞増殖抑制試験

14.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した。

短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理では明確な細胞増殖抑制作用がみられず、50%細胞増殖抑制濃度を算出できなかった。連続処理法 24 時間処理では最高用量の 3565 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で相対細胞増殖率が 50%を下回り、モノオレイン酸グリセリル処理による 50%細胞増殖抑制濃度は 2738 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。

14.1.2. 析出等の観察

処理開始および処理終了時、いずれの処理においても 223 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で白色粉末状の析出物が、1783 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上ではさらに白色塊状の析出物が認められた。

14.2. 染色体異常試験

14.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Table 3 および Appendix 1 に示した。

モノオレイン酸グリセリル処理群での染色体構造異常出現頻度は、891 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1.0%、1783 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.0%、3565 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%を示し、陰性対照群 (1.0%) と比較して明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、各用量とも陰性対照 (0.0%) と同等であった。また、いずれの処理群においても顕著な細胞増殖抑制作用は観察されなかった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 36.0% ($p \leq 0.025$) であった。

14.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Table 4 および Appendix 2 に示した。

モノオレイン酸グリセリル処理群での染色体構造異常出現頻度は、891 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 2.0%、1783 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%、3565 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%を示し、陰性対照群 (0.0%) と比較して明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、各用量とも陰性対照 (0.0%) と同等であった。また、いずれの処理群においても顕著な細胞増殖抑制作用は観察されなかった。

一方、陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 19.5% ($p \leq 0.025$) であった。

14.2.3. 連続処理法 24 時間処理—追加試験

試験結果を Table 5 および Appendix 3 に示した。

モノオレイン酸グリセリル処理群での染色体構造異常出現頻度は、55.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.0%、111 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1.0%、223 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.0%を示し、陰性対照群 (1.0%) と比較して明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は各用量とも陰性対照 (1.0%) と同等であった。また、いずれの処理群においても顕著な細胞増殖抑制作用は観察されなかった。最高用量の 446 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても相対細胞増殖率は 90%以上を示していたが、観察可能な分裂中期像はほとんど見られなかった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 25.0% ($p \leq 0.025$) であった。

14.2.4. 被験物質の析出等

処理開始および処理終了時、-S9 処理ならびに 24 時間処理で 223 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で白色粉末状の析出物が、1783 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上ではさらに白色塊状の析出物が認められた。+S9 処理では 446 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で白色粉末状の析出物が、1783 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上ではさらに白色塊状の析出物が認められた。

15. 考察および結論

モノオレイン酸グリセリルの変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、培養細胞（CHL/IU）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果を基に、短時間処理法-S9 処理、同+S9 処理ならびに連続処理法24時間処理ではガイドライン上定められた最高用量である 10 mM相当の 3565 µg/mL あるいは染色体異常の観察可能な上限の用量まで検討した。

染色体異常試験の結果、モノオレイン酸グリセリル処理では、短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても染色体異常の誘発頻度は陰性対照群と同等の値を示し、明確な染色体構造異常の誘発は認められなかった。短時間処理法において陰性と判定されたことから、連続処理法 24 時間処理の染色体の観察を実施した。その結果、連続処理法においても染色体異常誘発性は陰性と判定された。

本被験物質モノオレイン酸グリセリル（Glycerol monooleate）の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった。

類縁体であるグリセロール（Glycerol）については細菌を用いる復帰突然変異試験、CHO 細胞を用いた染色体異常試験、CHO 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験、CHO 細胞を用いた遺伝子突然変異試験、ラット肝細胞を用いた UDS 試験で陰性¹⁾と報告されている。Glyceryl trinitrate (nitroglycerin) は、復帰突然変異試験（TA1535 のみ）で陽性²⁾との報告があった。また、Glycerol formal は、マウス骨髄小核試験で陰性³⁾との報告があった。

なお、陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度は、いずれも当施設での背景データ（Appendix 4）の範囲内であり、当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、モノオレイン酸グリセリルのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

16. 参考文献

- 1) Doolittle D.J., Lee D.A. and Lee C.K.: The genotoxic activity of glycerol in an in vitro test battery. *Food Chem. Toxicol.* 1988, 26(7):631-635.
- 2) Maragos C.M., Andrews A.W., Keefer L.K. and Elespuru R.K.: Mutagenicity of glyceryl trinitrate (nitroglycerin) in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 1993, 298(3):187-195.
- 3) Ashby J. and Ratpan F.: Inactivity of glycerol formal in a mouse micronucleus assay: relationship to its teratogenicity. *Environ. Mutagen.* 1986, 8(6):873-877.

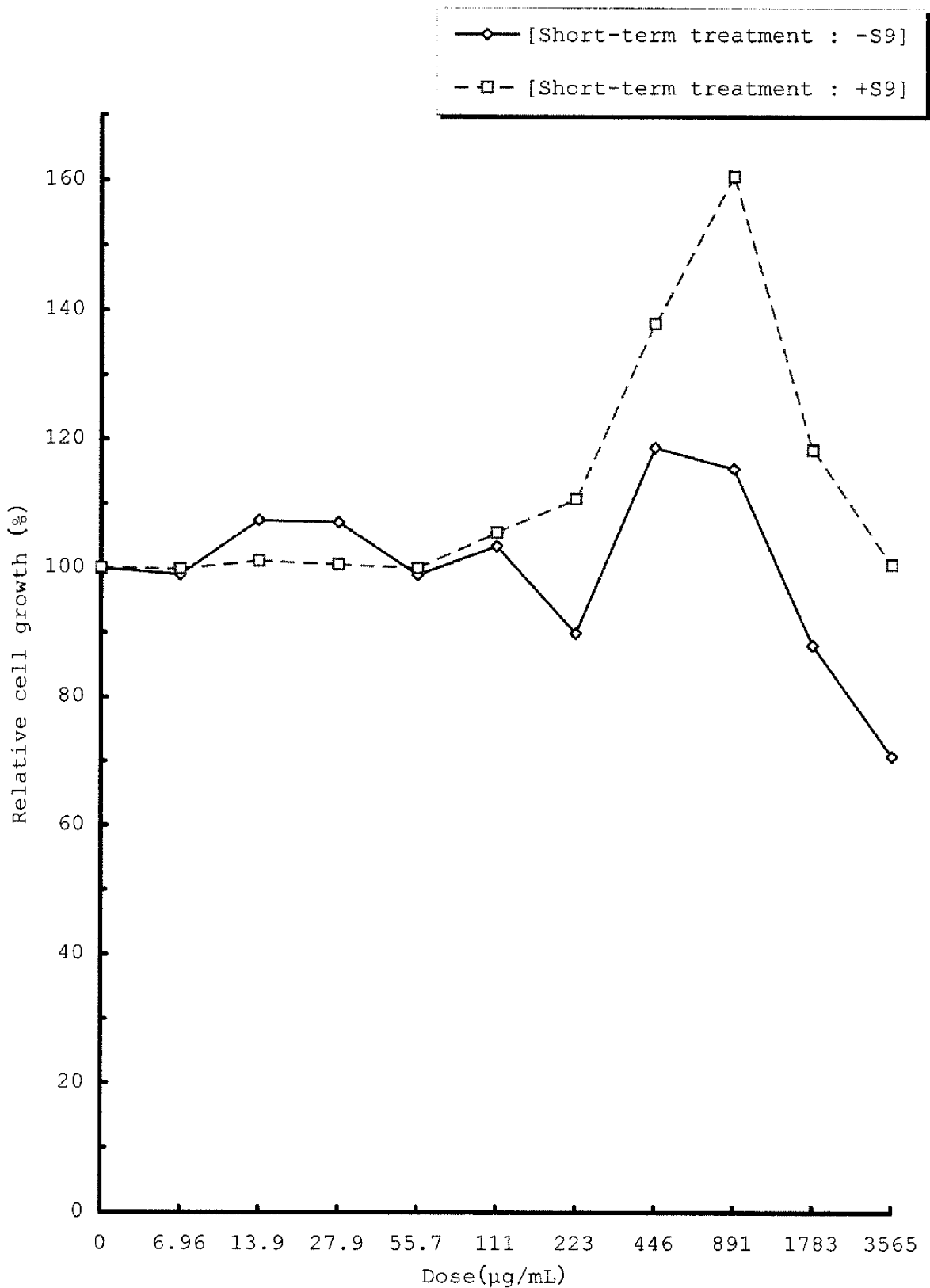


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with glycerol monooleate [Short-term treatment]

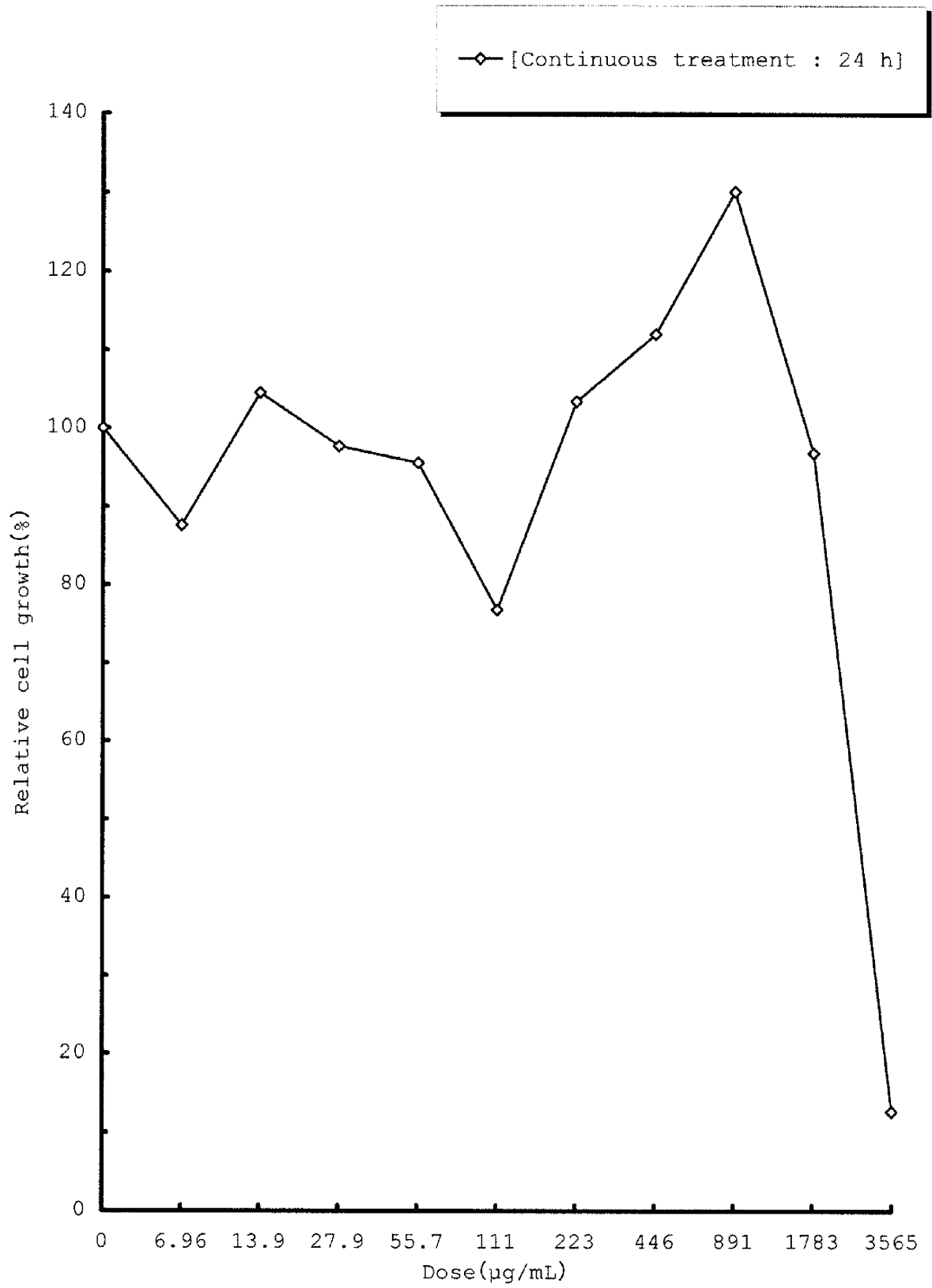


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with glycerol monooleate [Continuous treatment]

Table 1. Results of growth inhibition test of glycerol monooleate [Short-term treatment] Exp. No. 7820 (115-185)

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Glycerol monooleate	6.96	97.6 100.4	[99.0]	Glycerol monooleate	6.96	97.5 102.3	[99.9]
	13.9	106.0 108.7	[107.4]		13.9	100.3 101.8	[101.1]
	27.9	105.4 108.8	[107.1]		27.9	102.2 99.0	[100.6]
	55.7	96.8 101.2	[99.0]		55.7	99.5 100.5	[100.0]
	111	108.1 98.7	[103.4]		111	109.2 101.8	[105.5]
	223 d)	89.0 90.8	[89.9]		223 d)	110.1 111.3	[110.7]
	446 d)	117.2 120.2	[118.7]		446 d)	140.9 134.8	[137.9]
	891 d)	121.1 109.7	[115.4]		891 d)	165.2 156.0	[160.6]
	1783 d)	80.3 95.9	[88.1]		1783 d)	127.0 109.6	[118.3]
	3565 d)	87.0 54.7	[70.9]		3565 d)	95.5 105.7	[100.6]

a): Negative control

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2.

Results of growth inhibition test of glycerol monooleate [Continuous treatment]

Exp. No. 7820 (115-185)

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Glycerol monooleate	6.96	84.8 90.3	[87.6]
	13.9	103.3 105.6	[104.5]
	27.9	96.9 98.4	[97.7]
	55.7	95.3 95.8	[95.6]
	111	56.1 97.6	[76.9]
	223 d)	101.0 105.7	[103.4]
	446 d)	112.8 111.2	[112.0]
	891 d)	133.5 126.6	[130.1]
	1783 d)	96.2 97.4	[96.8]
	3565 d)	6.5 18.9	[12.7]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Continuous treatment : 24 h] 2738 (µg/mL)

a): Negative control

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with glycerol monooleate
[Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 7820 (115-185)

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	6	100.0	200	2	0	2	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)	
Glycerol -monooleate	891 d)	6	121.8	200	0	2	1	0	0	0	2 (1.0)	200	3 (1.5)	
	1783 d)	6	114.8	200	2	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)	Negative
	3565 d)	6	101.1	200	3	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	4 (2.0)	
MMC b)	0.1	6	77.5	200	9	22	63	0	1	0	72 (36.0) *	200	2 (1.0)	

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

*:Significant difference from control (Fisher's exact test) $p < 0.025$

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with glycerol monooleate
[Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 7820 (115-185)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse					oth
DMSO a)	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)	
Glycerol -monooleate	891 d)	6	135.9	200	4	3	3	0	0	0	4 (2.0)	200	1 (0.5)	
	1783 d)	6	123.9	200	2	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)	Negative
	3565 d)	6	111.4	200	2	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)	
CP b)	12.5	6	83.4	200	7	10	31	0	0	0	39 (19.5) *	200	0 (0.0)	

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

*:Significant difference from control (Fisher's exact test) $p < 0.025$

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with glycerol monooleate
(additional study)
[Continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 7820 (115-185)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	24	100.0	200	2	0	2	0	0	0	2 (1.0)	200	2 (1.0)	
Glycerol -monooleate	55.7	24	99.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)	
	111	24	105.9	200	2	0	2	0	0	0	2 (1.0)	200	2 (1.0)	Negative
	223 d)	24	87.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	3 (1.5)	
	446 d)	24	91.6	Toxic										
MMC b)	0.05	24	104.4	200	13	9	44	0	1	0	50 (25.0) *	200	0 (0.0)	

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

*:Significant difference from control (Fisher's exact test) p<0.025

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.