試験番号 G-09-022

最終報告書

ソルビタンモノオクタデカノアートの
マウスを用いる小核試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室　委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523　神奈川県秦野市落合729-5

TEL　0463-82-4751

目次

要約 5

材料と方法 6
1. 被験物質 6
2. 陰性対照物質 6
3. 陽性対照物質 6
4. 使用動物と飼育条件 7
5. 投与検体の調製 7
6. 投与方法 9
7. 試験操作、観察と解析 9
1) 毒性予備試験 9
2) 小核本試験 10

試験成績と考察 12
1. 毒性予備試験 12
2. 小核本試験 12
参考文献 13
Tables 14

要約

ソルビタンモノオクタデカノアートが生体内において染色体異常誘発性を有するか否かを評価するため、ICR 系マウスを用いた強制経口投与による小核試験を実施した。まず、小核本試験で用いる投与量を設定するため毒性予備試験を行い、その結果に基づき小核本試験を実施した。

毒性予備試験は、雌雄マウスを用いて、被験物質を 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の用量で、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間連続強制経口投与した。その結果、雌雄いずれの投与群においても、一般状態の変化および死亡は観察されなかった。

毒性予備試験の結果に基づき、小核本試験は陰性対照群（媒体）、被験物質投与群（500、1000 および 2000 mg/kg/day）および陽性対照群（cyclophosphamide monohydrate）の計 5 群を設定し、雄マウスを用いた。陰性対照群および被験物質投与群は、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間連続強制経口投与し、陽性対照群は 50 mg/kg の用量で、単回強制経口投与した。いずれの投与群も、最終投与の約 24 時間後に骨髄塗抹標本を作製して小核の観察を行った。その結果、被験物質投与による小核出現頻度の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群の小核出現頻度は 1%水準で有意な増加が認められ、本試験系の妥当性が確認された。なお、赤血球中に占める幼若赤血球の比率には、陰性対照群とその他の群との間に有意な差は認められなかった。

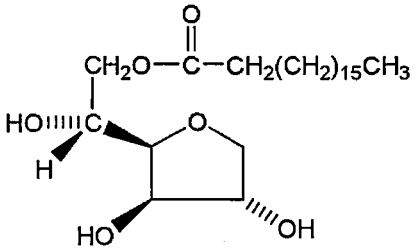
以上の結果から、本試験条件下では、ソルビタンモノオクタデカノアートはマウス骨髄細胞において染色体異常誘発作用を示さないもの（陰性）と結論する。

材料と方法

1. 被験物質

ソルビタンモノオクタデカノアート(別名:ソルビタンモノステアレート、英名:Sorbitan monooctadecanoate、略称: SMO、CAS No. 1338-41-6、分子式:$C_{24}H_{46}O_6$、分子量:430.62、

純度:99.5%以上、Appendix 1)は、うすい黄褐色結晶～粉末で、 より購入し(購入年月日 2009年9月29日)、使用時まで室温(実測値:16.5～24.4℃)、遮光下で保管した。ソルビタンモノオクタデカノアートの構造式を以下に示す。



被験物質の安定性については、投与開始前(2009年11月18日)および投与期間終了後(2009年12月21日)に、臭化カリウム錠剤を作製後、フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR-8300、島津製作所)を用いて 4000 cm^{-1}～400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、スペクトルに変化がないことを確認した(Appendix 2)。

2. 陰性対照物質

陰性対照物質および被験物質の媒体として、日局注射用水(製造番号: A89AA1、光製薬)を用いた。日局注射用水 (購入年月日:2008年10月30日、使用期限:2011年9月) は、使用時まで室温保管した。

3. 陽性対照物質

陽性対照物質として、cyclophosphamide monohydrate(略称:CP、CAS No. 6055-19-2、純度:98.0%、ロット番号:068K1131、製造者:Sigma Chemical)を用いた。CP(購入年月日:2009年9月29日、使用期

限:購入後 5 年)は、使用時まで冷蔵保管した。

4. 使用動物と飼育条件

日本チャールス・リバー厚木飼育センターから 8 週齢で購入した ICR 系マウス[Crlj:CD1(ICR)、SPF]を、入荷日を含む 7 日間、検疫と馴化を兼ねて飼育した。その間、毎日 1 回一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。試験には、検疫期間中の体重が順調に増加し、一般状態に異常の認められなかった動物を 9 週齢で使用した。検疫期間中は油性フェルトペンにより尾に馴化番号を記し、試験番号、性別、馴化番号および入荷日を記載した動物カードを飼育ケージに付けて識別した。各試験に用いた動物の入荷日、匹数および入荷時体重範囲を次表に示す。余剰動物および毒性予備試験に使用した動物は、各試験の動物飼育終了時に炭酸ガス吸入により安楽死させた。

試験	入荷日	入荷動物数(使用数/余剰数)	入荷時体重範囲
毒性予備試験	2009 年 11 月 18 日	雄 15 匹(12/3)	29.4～34.5 g
		雌 15 匹(12/3)	23.1～27.4 g
小核本試験	2009 年 12 月 9 日	雄 30 匹(25/5)	28.7～33.3 g

動物は、全飼育期間を通じて、許容温度:21.0～25.0℃、許容湿度:40.0～75.0%、換気設定:約 15 回／時間、明暗サイクル:12 時間(7 時～19 時)点灯、12 時間(19 時～7 時)消灯に設定された飼育室内で、床敷としてペパークリーン(日本エスエルシー)を入れた TPX 樹脂製ケージ(143W×293D×148H mm、日本チャールス・リバー)に個別に収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。全飼育期間中における飼育室の温度および湿度の実測値はそれぞれ 22.5～24.0℃および 49.0～68.0%であり、いずれも許容範囲内であった。また、供給した飼料、飲料水および床敷の分析結果は、いずれも標準操作手順書に記載の許容範囲内であることを確認した。

動物の群分けは、検疫終了時の測定体重(平均±20%以内の動物を用いた)をもとに、体重別層化無作為抽出法により行った。なお、検疫期間中に体重が減少した小核本試験の 1 例(馴化番号:18)は、事前に群分けの対象から除外した。群分け後の動物には、油性フェルトペンにより尾に動物番号を記し、群ごとに色の異なる動物カードに、試験番号、性別、群(投与量)および動物番号を記入して飼育ケージに付けて識別した。余剰動物は、検疫期間中の識別法を継続した。

5. 投与検体の調製

被験物質は、水に不溶であるが、均一な懸濁状態が得られることから、媒体として注射用水を用いた。毒性予備試験では、秤量した被験物質を、乳鉢および乳棒で磨砕後、媒体を加えて最高濃度の投与検体を調製し、以下同媒体で段階希釈して各濃度の投与検体を調製した。小核本試験では、粘性を考慮し、調製濃度ごとに秤量した被験物質を、それぞれ乳鉢および乳棒で磨砕後、媒体を加えて各濃度の被験物質投与検体を個別に調製した。被験物質投与検体の調製濃度を以下に示した。

毒性予備試験: 25、50、100 および 200 mg/mL

小核本試験: 50、100 および 200 mg/mL

媒体中における被験物質の安定性については、秦野研究所にて確立した定量法では、被験物質を化学的に加水分解処理するため、被験物質の全構造についての安定性を確認することはできないことから、媒体中での安定性試験は実施せず、調製は用時に行った。

小核本試験の投与開始日に調製した全ての被験物質投与検体について、秦野研究所でガスクロマトグラフ(GC)法を用いて含量測定および均一性試験を実施した。その結果、各投与検体中における被験物質の平均含量は 103～109%であり、各測定値のばらつきは 97.4～103%であった(Appendix 3)。これらの値は、試験計画書に記載した判定基準の範囲内(平均含量:調製濃度の 85.0～115%、各測定値のばらつき:平均値の 90.0%～110%)であった。分析法を以下に示す。

試料溶液、標準溶液およびそれぞれの空試験液について、以下に示した GC 条件下で測定した。標準溶液から得られた被験物質の内標準(IS)に対するピーク面積比と調製濃度を基に、最小二乗法により作成する検量線回帰式を用いて、投与検体中の被験物質濃度を求めた。各試料溶液および空試験液は n=1 で測定し、標準溶液については n=3 で測定した。

1)標準溶液の調製

被験物質 50.00 mg を精密に量り、四塩化炭素に溶解して 50 mL とし、標準原液(1.000 mg/mL)を調製した。この標準原液 1、2、3 および 4 mL を採り、それぞれ四塩化炭素で 10 mL とし、標準原液(100.0、200.0、300.0 および 400.0 μg/mL)を調製した。これらの標準原液と四塩化炭素(ともに n=1)をそれぞれ 1 mL 採り、窒素気流下 60℃で蒸発乾固後、0.5 mol/L 水酸化カリウムメタノール溶液[i] 0.4 mL を加えて撹拌した後、60℃で 20 分間加温した。さらに三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液 0.4 mL を加え、撹拌後、60℃で 5 分間加温し、放冷した。これらの溶液に内標準溶液 1 mL および飽和塩化ナトリウム水溶液[ii] 0.8 mL を加え撹拌後、遠心分離(3000 rpm、5 分間)し、得られたヘキサン層(100.0、200.0、300.0 および 400.0 μg/mL の標準溶液と標準溶液用空試験液)を GC に注入した。

i)水酸化カリウム 1.4 g をメタノールに溶解して 50 mL とした。

ii)塩化ナトリウム 12.5 g と蒸留水 25 mL を混合した。

2)内標準(IS)溶液の調製

アジピン酸ジ-n-ブチル 50.41 mg を採り、ヘキサンに溶解して 25 mL(2.016 mg/mL)とし、さらにこの溶液 2 mL をとり、ヘキサンで 50 mL(80.64 μg/mL)とした。

3)試料溶液の調製

投与検体の 0.5 mL を採取し、エタノールで希釈して試料原液を調製した(200 μg/mL 付近)。試料原液は n=3 で調製した。これらの試料原液とエタノール(n=1)をそれぞれ 1 mL 採り、窒素気流下 60℃で蒸発乾固し、以下、標準溶液と同様の操作を行い、試料溶液および試料溶液用空試験液を調製し、GC に注入した。

GC 条件

分析カラム: TC-FFAP (内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm、ジーエルサイエンス)

キャリアーガス: ヘリウム
注入口温度: 250 ℃
検出器温度: 250 ℃
カラム温度: 180 ℃
試料注入量: 2 μL
試料導入法: スプリット注入法 (スプリット比 10:1)
検出器: 水素炎イオン化検出器(FID)

4)システムの適合性

測定開始前に標準溶液(200.0 μg/mL)を 3 回測定し、被験物質の保持時間及び IS のピーク面積に対する被験物質のピーク面積比の変動係数(%)をそれぞれ確認した。判定基準は保持時間が±3%以内、IS に対する被験物質のピーク面積比が±5%以内とした。

陽性対照物質の CP については、秤量後、日局生理食塩液(製造番号:K9A95、大塚製薬工場)に溶解して、5 mg/mL 溶液を調製して使用した。調製は用時に行った。

6. 投与方法

陰性対照物質と被験物質の投与経路および投与回数は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づき強制経口投与とし、注射筒およびマウス用胃管を用いて 1 日 1 回、2 日間(24 時間間隔)連続して行った。陽性対照物質は、注射筒およびマウス用胃管を用いて単回強制経口投与した。投与は、いずれも 10 時～11 時の間に行った。投与容量は 10 mL/kg とし、初回投与の直前に測定した体重に基づいて個別に投与液量を算出した。初回投与時の体重範囲は、毒性予備試験では雄:34.9～39.3 g、雌:25.8～29.9 g、小核本試験では雄:31.0～37.1 g であった。

7. 試験操作、観察と解析

1)毒性予備試験

①試験群の設定

毒性予備試験においては、雌雄のマウスを用いて 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の被験物質投与群を設け、各群とも雌雄各 3 匹の動物に投与した。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号	
			雄	雌
250 mg/kg/day 投与群	10	2	T1～T3	T13～T15
500 mg/kg/day 投与群	10	2	T4～T6	T16～T18
1000 mg/kg/day 投与群	10	2	T7～T9	T19～T21
2000 mg/kg/day 投与群	10	2	T10～T12	T22～T24

②一般状態の観察

動物の生死および一般状態の観察は、各投与の直後、約 6 時間後および 22～24 時間後に行った。

2) 小核本試験

①試験群の設定

毒性予備試験の結果に基づき、雄マウスを用いて 500、1000 および 2000 mg/kg/day の被験物質投与群、陰性対照群(媒体:10 mL/kg/day)および陽性対照群(CP:50 mg/kg)を加えた 5 群構成とし、各群 5 匹の動物に投与した。なお、陽性対照物質の CP は、ICR 系雄マウスに 50 mg/kg の用量を単回強制経口投与した場合、投与の 24 時間後に小核を有する幼若赤血球の出現頻度が有意に増加することが、秦野研究所で確認されている。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号
陰性対照群(日局注射用水)	10	2	1～5
500 mg/kg/day 投与群	10	2	6～10
1000 mg/kg/day 投与群	10	2	11～15
2000 mg/kg/day 投与群	10	2	16～20
陽性対照群(CP:50 mg/kg)	10	1	21～25

②一般状態の観察

動物の生死および一般状態の観察は、各投与の直後、約 6 時間後および 22～24 時間後に行った。

③骨髄塗抹標本の作製

骨髄塗抹標本の作製は、Hayashi らの報告[1)]に従って最終投与の約 24 時間後に行った。頸椎脱臼法によりマウスを安楽死させ、両側の大腿骨を摘出した後、その両端を切断して 0.6 mL のウシ胎児血清(ロット番号:378712、Invitrogen)で骨髄細胞を遠心管に洗い出し、200×*g*で 5 分間遠心分離した。上清を除いた後、遠心管に残った少量の血清で沈渣を再懸濁させ、骨髄細胞浮遊液を作製した。塗抹標本は各個体につき 3 枚作製し、自然乾燥後、メタノールで 5 分間固定した。各塗抹標本は、フロスト部分に試験番号、動物番号およびスライド番号を記入して識別し、メタノール固定後の塗抹標本には、コード番号表に従って、試験番号、コード番号およびスライド番号を記したラベルを貼付してコード化し、標本観察時まで室温で保管した。

④骨髄塗抹標本のアクリジンオレンジ(AO)蛍光染色および標本観察

ゼーレンゼンの 1/15 mol/L リン酸緩衝液に溶解した 40 μg/mL の AO 溶液を標本観察の直前に骨髄

塗抹標本に数滴滴下してカバーグラスをかけ、510 nm の吸収フィルターが装着されたブルー励起の蛍光顕微鏡下で、100倍の対物レンズと10倍の接眼レンズを用いて観察した。骨髄塗抹標本は、各個体について2名の観察者により1匹あたり2000個(1名あたり1000個)の幼若赤血球を観察し、そのうち小核を有する幼若赤血球の数を記録した。また、骨髄細胞(赤血球)の増殖抑制の指標として、1 匹あたり1000個(1名あたり500個)の赤血球を観察して、幼若赤血球の数を記録した。

⑤統計解析

A. 小核出現頻度

陰性対照群と陽性対照群の小核出現頻度(平均値)が、背景データのばらつきの範囲(平均値±3×標準偏差)内にあるか否かを調べた。なお、背景データは、秦野研究所で2006年度から2008年度に実施した小核試験の陰性対照値および陽性対照値とした。

小核出現頻度については、陰性対照群と各被験物質投与群および陽性対照群の間で、Fisher の正確確率検定法(片側検定)を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して Bonferroni の補正[2)]を行い、有意水準は 5%および 1%とした。また、小核出現頻度の用量(対数値)依存性については、Cochran-Armitage の傾向検定[3)](片側検定)を行い、有意水準は 5%および 1%とした。

B. 赤血球中に占める幼若赤血球の比率

赤血球中に占める幼若赤血球の比率については、まずBartlett検定[4)]により陽性対照群を除く各群の分散の一様性について検定を行った。その結果、等分散であったことから、Dunnett 検定[5)](両側検定)を用いて陰性対照群と各被験物質投与群との平均値の差の検定を行った。陰性対照群と陽性対照群との比較については、F 検定[4)]により 2 群の分散の一様性について検定を行い、等分散であったことから Student の t 検定[4)](両側検定)を行った。Bartlett 検定および F 検定の有意水準は 5%とし、Dunnett 検定および Student の t 検定の有意水準はいずれも 5%および 1%とした。

被験物質が骨髄細胞の増殖へ影響を及ぼすか否かは、幼若赤血球の比率に関する統計解析の結果を基に、用量反応性および陰性対照群の背景データ等を参考にして判断した。

⑥判定

被験物質が生体内において染色体異常誘発作用を示すか否かの判定は、統計解析の結果を基に、用量反応性および陰性対照群の背景データ、骨髄細胞増殖への影響等を参考にして総合的に行った。

試験成績と考察

1. 毒性予備試験

毒性予備試験における一般状態および死亡率を Table 1 に示す。雌雄いずれの投与群においても、一般状態の変化および死亡例は観察されなかった。

以上の結果から、雌雄とも最大耐量は 2000 mg/kg/day 以上と判断され、一般状態に変化は認められなかったことから、小核本試験では雄を用い、2000 mg/kg/day を高用量に設定し、実施することとした。

2. 小核本試験

小核本試験における一般状態および死亡率を Table 2 に示す。いずれの投与群にいても、一般状態の変化および死亡例は観察されなかった。

小核出現頻度および赤血球中に占める幼若赤血球の比率を Table 3 に示す。陰性対照群および陽性対照群の小核出現頻度(平均値)は、いずれも秦野研究所の背景データ(Appendix 4)のばらつきの範囲(平均値±3×標準偏差)内であった。

被験物質投与群の小核出現頻度は、いずれの用量においても陰性対照群と比較して有意な増加は認められず、用量に依存して有意に増加する傾向もみられなかった。一方、CP を投与した陽性対照群では、1%水準で有意な小核出現頻度の増加が確認され、本試験系の妥当性が確認された。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、陰性対照群とその他の群との間に有意な差は認められず、被験物質の投与による骨髄細胞(赤血球)の増殖抑制作用はないと判断した。

本被験物質に関しては、秦野研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験(試験番号: M-04-073)では陰性、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験(試験番号: G-94-024)では陽性の結果が報告されているが、今回行った試験条件下では、被験物質投与による小核誘発性は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、ソルビタンモノオクタデカノアートはマウス骨髄細胞において染色体異常誘発作用を示さないもの(陰性)と結論する。

参考文献

1) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T.: In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutat. Res. 312: 293-304 (1994)

2) Margolin, B. H., Resnick, M. A., Rimpo, J. Y., Archer, P., Galloway, S. M., Bloom, A. D., Zeiger, E.: Statistical analyses for in vitro cytogenetic assays using Chinese hamster ovary cells. Environ. Mutagen. 8: 183-204 (1986)

3) Margolin, B. H., Risko, K. J.: In "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" Ashby, J. et al. eds., Cambridge Univ. Press (1988), vol.1. pp. 29-42

4) Snedecor, G. W., Cochran, W. G.: In "Statistical Methods" 7th ed., Iowa State University Press, Iowa (1980)

5) Dunnett, C. W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J. Am. Statist. Assoc. 50: 1096-1121 (1955)

Table 1 General condition and mortality in CD1(ICR) mice after double oral administrations of Sorbitan monooctadecanoate in the preliminary toxicity test

Sex	Dose (mg/kg/day)	Number of mice administered	General condition	Number of mice						Mortality
				Hours after the 1st administration			Hours after the 2nd administration			
				0	6	22-24	0	6	22-24	
Male	250	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	500	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	1000	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	2000	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
Female	250	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	500	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	1000	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	2000	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3

Table 2 General condition and mortality in male CD1(ICR) mice after double oral administrations of Sorbitan monooctadecanoate in the micronucleus test

Dose	Number of mice administered	General condition	Number of mice						Mortality
			Hours after the 1st administration			Hours after the 2nd administration			
			0	6	22-24	0	6	22-24	
Negative control Water for injection JP 10 mL/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	0 / 5
Sorbitan monooctadecanoate 500 mg/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	0 / 5
Sorbitan monooctadecanoate 1000 mg/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	0 / 5
Sorbitan monooctadecanoate 2000 mg/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	0 / 5
Positive control CP 50 mg/kg	5	No abnormality	5	5	5	-	-	-	0 / 5

CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)

Table 3 Results of micronucleus test in male CD1(ICR) mice after double oral administrations of Sorbitan monooctadecanoate

Group	Animal No.	% of MNPCEs[a]	% of PCEs in ERYs[b]
Negative control Water for injection JP 10 mL/kg/day	1	0.10	56.7
	2	0.05	47.8
	3	0.15	53.5
	4	0.10	62.6
	5	0.15	40.0
	Total	11 / 10000	2606 / 5000
	Mean ± S.D.	0.11 ± 0.04	52.1 ± 8.6
	Min. - Max.	0.05 - 0.15	40.0 - 62.6
Sorbitan monooctadecanoate 500 mg/kg/day	6	0.00	59.4
	7	0.10	62.2
	8	0.20	57.8
	9	0.10	52.3
	10	0.05	55.0
	Total	9 / 10000	2867 / 5000
	Mean ± S.D.	0.09 ± 0.07	57.3 ± 3.8
	Min. - Max.	0.00 - 0.20	52.3 - 62.2
Sorbitan monooctadecanoate 1000 mg/kg/day	11	0.20	57.4
	12	0.10	50.8
	13	0.15	50.4
	14	0.05	58.6
	15	0.10	43.9
	Total	12 / 10000	2611 / 5000
	Mean ± S.D.	0.12 ± 0.06	52.2 ± 6.0
	Min. - Max.	0.05 - 0.20	43.9 - 58.6
Sorbitan monooctadecanoate 2000 mg/kg/day	16	0.05	63.8
	17	0.15	56.4
	18	0.30	65.1
	19	0.05	52.9
	20	0.10	52.4
	Total	13 / 10000	2906 / 5000
	Mean ± S.D.	0.13 ± 0.10	58.1 ± 6.0
	Min. - Max.	0.05 - 0.30	52.4 - 65.1
Positive control CP 50 mg/kg	21	2.75	59.4
	22	2.45	57.7
	23	2.75	60.5
	24	2.65	59.1
	25	3.00	66.5
	Total	272 / 10000 **	3032 / 5000
	Mean ± S.D.	2.72 ± 0.20	60.6 ± 3.4
	Min. - Max.	2.45 - 3.00	57.7 - 66.5

a, % of micronucleated polychromatic erythrocytes in polychromatic erythrocytes observed
b, % of polychromatic erythrocytes in erythrocytes observed
CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)
**, Significantly higher than the negative control at 1% level (Fisher's exact probability test)