

最終報告書

表 題：イソトリデシル＝ステアラートのほ乳類培養細胞を用いる
染色体異常試験

試験番号：SR09206

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙	1
目次	4
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	19
考察	21
参考資料	21

Tables and Figure

Table 1	Effects of isotridecyl stearate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR09206)	23
Figure 1	Effects of isotridecyl stearate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR09206)	24
Table 2	Effects of isotridecyl stearate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR09206)	25
Table 3-1	Results of the chromosomal aberration test of isotridecyl stearate (6 hours treatment without metabolic activation) (SR09206)	26
Table 3-2	Results of the chromosomal aberration test of isotridecyl stearate (6 hours treatment with metabolic activation) (SR09206)	27
Table 3-3	Results of the chromosomal aberration test of isotridecyl stearate (24 hours treatment without metabolic activation) (SR09206)	28

要 約

イソトリデシル＝ステアラートの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて検討した。試験は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の24-0 h処理による場合の3試験系列で実施した。

予備試験[細胞増殖抑制試験：18.4～4700 µg/mL(10 mM 相当濃度)]の結果、短時間処理法の代謝活性化によらない場合の最高用量で極軽度の細胞増殖抑制が認められ、短時間処理法の代謝活性化による場合では細胞増殖への影響はみられなかった。また、連続処理法の24-0 h処理による場合では588 µg/mL以上の用量で極軽度あるいは軽度の細胞増殖抑制が認められ、その抑制は50%を超えるものではなかった。被験物質の析出が、各試験系列とも試験液処理開始時の294 µg/mL以上の用量および試験液処理終了時の36.7 µg/mL以上の用量で観察された。被験物質処理による培養液pHへの影響は、各試験系列のいずれの用量にも観察されなかった。

本試験(染色体異常試験)は、予備試験の結果に基づき、各試験系列の最高用量を4700 µg/mLとし、以下公比2で計3あるいは5用量を設定した。

本試験の結果、染色体の構造異常および数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量：1175～4700 µg/mL)、短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：1175～4700 µg/mL)および連続処理法の24-0 h処理による場合(評価用量：294～4700 µg/mL)のいずれの用量においても5%未満であった。被験物質の析出が各試験系列とも試験液処理開始時および処理終了時の全ての用量で観察された。被験物質処理による培養液pHへの影響は、各試験系列のいずれの用量にも観察されなかった。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、イソトリデシル＝ステアラートは、本試験条件において、ほ乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

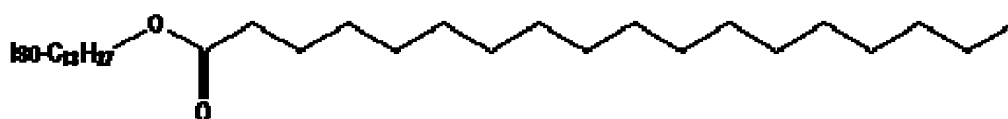
緒 言

イソトリデシル＝ステアラートの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討する目的で、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いる染色体異常試験を実施した。

材料および方法

1. 被験物質

名称	: イソトリデシル＝ステアラート
英語名	: Isotridecyl stearate
別名	: オクタデカン酸イソトリデシル ¹⁾ ステアリン酸イソトリデシルエステル ²⁾ Octadecanoic acid isotridecyl ester ¹⁾
CAS No.	: 31565-37-4
化審法官報公示整理番号	: 2-2489
分子式	: C ₃₁ H ₆₂ O ₂
構造式 ³⁾	:



分子量	: 466.835 ¹⁾
物理化学的性質 ²⁾	: 外観 ; 液体(30℃)、淡黄色透明 臭い ; 特有臭気 引火点 ; 240℃ 比重 ; 約 0.86 溶解度 ; 水溶解性のデータなし。低級アルコールに難溶、エーテル等の溶剤類に可溶。 試験施設において、蒸留水(日本薬局方注射用水)、ジメチルスルホキシドおよび 0.5%カルボキシメチル

セルロースナトリウム溶液を用いて調製確認を行った。確認内容を、2. 被験物質の調製(10頁)に記載した。

純度(GC/MS) : 71%(Appendix 1)
 (ステアリン酸とイソトリデカノールのエステル化物 71%、パルミチン酸とイソトリデカノールのエステル化物 29%)。
 現状を、純度 100%として試験に使用した。

使用原料の成分比率(Appendix 1)

- 1) 脂肪酸原料成分(パルミチン酸 30%、ステアリン酸 69%、その他脂肪酸 1%)
- 2) アルコール原料成分[イソトリデカノール(異性体混合物) 99%以上]

入手量 : 750 g×2 (関連試験と共に一括受入)
 保存場所 : 被験物質保存室および変異原性試験室
 保存条件 : 直射日光の当たらない場所で容器を密閉し保存した(実測範囲 21~28°C)。火気、熱源より遠ざけた。
 保存期間 : 2010年4月26日(受入)~2010年11月8日(最終使用日)
 安定性 : 通常の手扱いにおいて、光、熱、衝撃に対し化学的に安定²⁾。試験操作の終了後、使用した被験物質に関する分析成績を入手し、被験物質の試験期間中の安定性を確認する。
 取扱上の注意 : 保護手袋、保護眼鏡、保護面、保護衣を着用し、飛沫等が皮膚に付着したり、粉塵、ガスを吸入しないように取扱った。
 残余被験物質の処置 : 試験操作終了後、分析者に送付する。

2. 被験物質の調製

試験施設における溶解性確認において、被験物質は蒸留水(日本薬局方注射用水、100 mg/mL の濃度まで検討)および 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液(50 mg/mL の濃度まで検討)に均一に懸濁し反応性はみられなかった。ジメチルスルホキシド(500 mg/mL の濃度まで確認)とは混合せず調製困難であった。以上のことから、当該試験の溶媒として、懸濁調製のための水系溶媒である 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を選択した。

被験物質を精秤し、0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を用いて懸濁ならびに希釈し、所定の濃度に用時調製した。

予備試験では47 mg/mL 調製液を調製し、47 mg/mL 調製液から公比2の段階希釈により23.5、11.75、5.88、2.94、1.47、0.734、0.367 および0.184 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では47 mg/mL 調製液を調製し、47 mg/mL 調製液から公比2の段階希釈により23.5、11.75、5.88 および2.94 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、予備試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は、プレート内の液に対し10 vol%の割合で添加し、予備試験では調製後1.1時間以内に、本試験では調製後0.8時間以内に使用した。

調製はクリーンベンチ内で行い、調製に際しては保護眼鏡、マスク、手袋および白衣等を着用し、吸引または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体である0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を使用した。

0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液は、日本薬局方注射用水(ロット番号9K88、株式会社大塚製薬工場)に日本薬局方カルメロースナトリウム(ロット番号8806、丸石製薬株式会社)を加え攪拌により溶解させた後、規定容量にメスアップした。調製は無菌的に行い、調製後は冷所で保存し調製後2日以内に使用した。

陰性対照物質は、プレート内の液に対し10 vol%の割合で添加した。

4. 陽性対照物質

代謝活性化によらない場合の陽性対照物質として、マイトマイシンC(ロット番号542A1A、使用期限2013年1月、協和醗酵キリン株式会社)を使用した。マイトマイシンCは、購入後室温で保存し、日本薬局方注射用水(ロット番号9K88、株式会社大塚製薬工場)を用いて5および10 µg/mLの濃度に調製した。購入したマイトマイシンCは、1瓶中に日局マイトマイシンCを2 mg(力価)含有しており、調製の際には1 mg(力価)を1 mgとして換算した。

代謝活性化による場合の陽性対照物質として、3,4-ベンゾピレン[ロット番号8JB8G、使用期限2014年7月(購入より5年)、東京化成工業株式会社]を使用した。3,4-ベンゾピレンは、購入後冷所(2~8°C)で保存し、ジメチルスルホキシド(ロット番号WF032、株

式会社同仁化学研究所)を用いて 1 mg/mL の濃度に調製した。なお、購入した 3,4-ベンゾピレンの含量は 98.2%であった。

陽性対照物質の各調製液は-20℃以下で分注凍結保存し、調製後 3 ヶ月以内に試験に使用した(使用期限は調製後 1 年)。保存調製液は解凍後 0.5 時間以内に使用した。

陽性対照物質は、それぞれプレート内の液に対し 1 vol%の割合で添加した。

5. 試験系

試験系として、2005 年 5 月 17 日に大日本製薬株式会社より継代数 14 で入手した CHL/IU を使用した。CHL/IU は、雌性の新生チャイニーズハムスターの肺に由来し、染色体数(モード)は 25 本(2n=22)、倍加時間の測定値は 15.0 時間である。本細胞は、増殖速度、継代における染色体の安定性、染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮して選択した。また、供試細胞と同時に凍結保存した細胞を用いて蛍光染色法によりマイコプラズマチェックを行い、陰性であることを確認した。

細胞の保存に際しては、10 vol%ジメチルスルホキシドを含む培地を用いて 1×10^6 cells/mL 細胞浮遊液を調製し、1 mL ずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結させた後、液体窒素内に保存した。解凍後は、75 cm² 培養フラスコを用いて 5.0%CO₂、37.0℃に設定した CO₂ インキュベーター(MCO-175、三洋電機株式会社)内で培養し、3 または 4 日毎に継代を行った。試験では、継代数 18(予備試験)あるいは 20(本試験)の細胞を使用した。

6. 培地

イーグル MEM 培地を以下の割合で混合し調製した。

イーグル MEM 培地(Code 05900、ロット番号 634004 および 646004、カナマイシンおよびフェノールレッド含有、日水製薬株式会社)9.4 g を日本薬局方注射用水(ロット番号 9K88、株式会社大塚製薬工場)に溶解し、全量を 1 L とした。オートクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの炭酸水素ナトリウム(試薬特級、ロット番号 905X1946、関東化学株式会社)溶液で pH7.2~7.4 に調整し、ろ過除菌した L-グルタミン溶液(試薬特級、L-グルタミン：ロット番号 CDK3266、和光純薬工業株式会社)を 0.292 g/L となるように添加した。さらに牛胎児血清(ロット番号 672248、GIBCO)を最終調製量の 10%になるように加えた。なお、牛胎児血清は 56℃で 30 分間非働化した後に使用した。

7. S9 mix

S9 mix はキッコーマン株式会社より購入し(ロット番号 CAM-618、2010 年 7 月 30 日製造)、-80℃以下で凍結保存したものを製造日より 4 ヶ月以内(使用期限：製造後 6 ヶ月)に使用した。

S9 mix は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット(雄、7 週齢)の肝ホモジネートより調製した S9 1.05 mL に、コファクターミックス 2.45 mL を加え、次表の組成に調製されたものである。

S9 mix 1 mL 中の組成		
S9	(キッコーマン株式会社製 RAA-618、S9 中蛋白 含量 27.22 mg/mL)	0.3 mL
MgCl ₂	(和光純薬工業株式会社 SDN0075)	5 μmol
KCl	(和光純薬工業株式会社 CDL2642)	33 μmol
G-6-P	(オリエンタル酵母工業株式会社 118001)	5 μmol
NADP	(オリエンタル酵母工業株式会社 045913)	4 μmol
HEPES 緩衝液	(株式会社同仁化学研究所 PE026)	4 μmol
蒸留水		0.1 mL

8. 試験方法

(1) 予備試験(細胞増殖抑制試験)

1) 試験群

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 試験系列について実施した。

被験物質の最高用量を試験法ガイドラインに従い 10 mM 相当濃度(被験物質の分子量:466.835)の 4700 μg/mL とし、以下公比 2 で低下させた計 9 用量(4700、2350、1175、588、294、147、73.4、36.7 および 18.4 μg/mL)の試験群を設定した。更に、試験系列毎に陰性対照群を設定した。

各群につき 2 枚のプレートを使用し、各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

直径 60 mm の培養プレートに、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 0.4×10^4 cells/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合では 0.6×10^4 cells/mL の細胞浮遊液をそれぞれ 5 mL ずつ播種し、5.0% CO₂、37.0°C に設定した CO₂ インキュベーター内で培養した。

3) 試験液の処理

a 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、培養液 2.7 mL に対して試験液を 300 μ L の割合で試験チューブ内で混合し、その混合液 3 mL をプレートに添加し 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

b 短時間処理法の代謝活性化による場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、S9 mix 0.5 mL および培養液 2.2 mL の混和液に対し試験液を 300 μ L の割合で試験チューブ内で混合し (S9 の最終濃度約 5 vol%)、その混合液 3 mL をプレートに添加し 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

c 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、培養液 4.5 mL に対して試験液を 500 μ L の割合で試験チューブ内で混合し、その混合液 5 mL をプレートに添加した。更に、24 時間培養した。

4) 被験物質の析出の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質の析出の有無を目視確認した。

5) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、培養液色の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化が認められない場合には、被験物質による培養液 pH への影響は無いものと判断した。なお、当該試験では、被験物質の析出により培養液に著しい白濁が観察されたプレートについて、pH 試験紙 (東洋濾紙株式会社) で培養液の pH を確認した。

6) 細胞増殖率の測定および 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) の算出

培養終了後、プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、10%ホルマリンで約 10~15 分間固定した後、0.1 w/v% クリスタルバイオレットで約 10~15 分間の染色を行った。染色後、水道水を入れた水槽内でプレートを洗浄して風乾させた。対照群のプレートを 100% として、各プレートの細胞増殖率を単層培養細胞密度測定装置 (MONOCELLATER II、東洋測器株式会社) で測定した。当該試験において、細胞増殖率が 50% 以下までの低下はみられなかったことから 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) は算出しなかった。

(2) 本試験(染色体異常試験)

1) 試験群

a 被験物質

予備試験の結果、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の24-0 h 処理による場合において極軽度あるいは軽度の細胞増殖抑制が認められ、短時間処理法の代謝活性化による場合では細胞増殖への影響はみられなかった。従って、各試験系列とも被験物質の最高用量を予備試験と同様 4700 µg/mL とし、以下公比 2 で低下させた計 3 あるいは 5 用量を設定した。

b 対照物質

各試験系列について、陰性対照群ならびに次表の陽性対照群を設定した。

試験系列	陽性対照物質	用量 (µg/mL)
短時間処理法の代謝活性化によらない場合	マイトマイシン C	0.1
短時間処理法の代謝活性化による場合	3,4-ベンゾピレン	10
連続処理法の 24-0 h 処理による場合	マイトマイシン C	0.05

c サテライト群

被験物質の細胞増殖への影響を確認するためのサテライト群を、陽性対照群を除く各用量に設定した。

d プレート数

陽性対照群を除く各群に 4 枚のプレート(2 枚はサテライト群)を、陽性対照群には 2 枚のプレートを使用した。各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、2)細胞の播種と同様の方法で実施した。

3) 試験液の処理

a 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、3)試験液の処理、a 短時間処理法の代謝活性化によらない場合と同様の方法で実施した。

b 短時間処理法の代謝活性化による場合

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、3)試験液の処理、b 短時間処理法の代謝活性化による場合と同様の方法で実施した。

c 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、3)試験液の処理、c 連続処理法の 24-0 h 処理による場合と同様の方法で実施した。

4) 被験物質の析出の有無の確認

8. 試験方法、(1) 予備試験(細胞増殖抑制試験)、4) 被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。

5) 被験物質による培養液pHへの影響の有無の確認

8. 試験方法、(1) 予備試験(細胞増殖抑制試験)、5) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認と同様の方法で実施した。

6) 細胞増殖率の測定

8. 試験方法、(1) 予備試験(細胞増殖抑制試験)、6) 細胞増殖率の測定および 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) の算出と同様の方法で実施した。

7) 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前に、各プレートに最終濃度 0.2 µg/mL のコルセミド(ロット番号 771425、GIBCO)を加えた。培養終了時間に、プレート内の液をそれぞれ遠沈管に回収し、各プレートを 0.02% EDTA-0.25%トリプシン(0.5M EDTA:ロット番号 1390894、GIBCO、2.5%トリプシン:ロット番号 765413、GIBCO)で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を同上の遠沈管に回収して 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、0.075 mol/L 塩化カリウム(ロット番号 810X1990、関東化学株式会社)を加え、穏やかにピペッティングを繰り返しながら常温で 30 分間放置し細胞を膨満化させた。氷冷したカルノア固定液(メタノール:酢酸=3:1、メタノール:ロット番号 110N1127、関東化学株式会社、酢酸:ロット番号 EPL1744、和光純薬工業株式会社)を加えて細胞を固定した後、1000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。細胞の固定操作を 3 回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、一夜以上自然乾燥させた。各プレートより、2 枚の染色体標本作製した。

各スライドは、2%ギムザ液(ギムザ液:ロット番号 KH933、和光純薬工業株式会社、インスタントリン酸緩衝液(pH7.2):ロット番号 R942、三菱化学メディエンス株式会社)で 20 分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤(マリノール、ロット番号 0701201、武藤化学薬品株式会社)で封入した。

8) 染色体標本の観察

標本観察の前に各用量の各プレートにつき 1 枚の標本を選択してコード化した。

総合倍率 600 倍の顕微鏡(BX51TF、オリンパス株式会社)で、1 枚あたり 100 個の分裂中期像を観察し、次頁の分類に従って染色体異常の判定を行った。構造異常については 25±2 本の染色体をもつものを観察対象とした。

①構造異常(structural aberration)

- ・染色分体切断(ctb: chromatid break)

染色分体のはっきりした不連続部分(切断部分)で、不連続部分が染色分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色分体の長軸線上から外れている場合に染色分体切断として判定した。

- ・染色分体交換(cte: chromatid exchange)

染色分体の2ヵ所以上の切断部位が相互に交換(結合反応)しているものを染色分体交換として判定した。

- ・染色体切断(csb: chromosome break)

両方の染色分体の同じ位置に切断が生じている場合に、染色体切断として判定した。切断の判定基準は、染色分体切断に準じた。

- ・染色体交換(cse: chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合に、染色体交換として判定した。

- ・その他(others)

その他の構造異常として、断片化(fragmentation)がある。一つの分裂中期像のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化として判定した。

②ギャップ(gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分(染色性が全くみられない部分)で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合にギャップとして判定した。

③数的異常(numerical aberration)

- ・倍数体(poly: polyploid)

染色体数(25 ± 2)が倍加し、三倍体、四倍体等になったものを倍数体として判定した。

- ・その他(others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加(end: endoreduplication)と判定し、倍数体とは区別し計数した。

9) 観察結果の集計方法

プレート毎に以下の細胞出現数を求め、試験群毎にその合計値を算出した。更に、構造異常(1個の細胞に複数の構造異常がある場合にも、構造異常を有する細胞数は1として計数)および数的異常を有する細胞の total について、それぞれ出現率(%)を

求めた。出現率(%)は、観察した細胞数(分裂中期像の数)に対する出現数の百分率で算出した。

①構造異常について

- ・ctb: 染色分体切断をもつ細胞数
- ・cte: 染色分体交換をもつ細胞数
- ・csb: 染色体切断をもつ細胞数
- ・cse: 染色体交換をもつ細胞数
- ・others: その他の構造異常をもつ細胞数
- ・total: 何らかの構造異常をもつ細胞数

②ギャップについて

- ・gap: ギャップをもつ細胞数

③数的異常について

- ・poly: 倍数体の細胞数
- ・others: その他の数的異常をもつ細胞数
- ・total: 何らかの数的異常をもつ細胞数

9. 試験結果の評価

構造異常または数的異常の total の出現率(%)が10%以上増加し、その出現様式に用量依存性がみられる場合、あるいは5%以上増加する結果について確認試験により再現性がみられる場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。

なお、いずれの試験系列にも異常細胞の5%以上の出現はみられなかったことから、D₂₀値(細胞の20%に異常が認められる濃度)は算出しなかった。

成 績

1. 予備試験

細胞増殖率の結果を Table 1 および Figure 1 に、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 1 に示す。

細胞増殖への影響では、短時間処理法の代謝活性化によらない場合の最高用量で極軽度の細胞増殖抑制が認められ、短時間処理法の代謝活性化による場合では細胞増殖への影響はみられなかった。また、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 588 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で極軽度あるいは軽度の細胞増殖抑制が認められ、4700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の増殖率は 54.0% でありその抑制は 50% を超えるものではなかった。

被験物質の析出が、各試験系列とも試験液処理開始時の 294 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量および試験液処理終了時の 36.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で観察された。

被験物質処理による培養液 pH への影響は、各試験系列のいずれの用量にも観察されなかった。

2. 本試験

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 2 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 3-1~3-3 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群において、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合では細胞増殖への影響はみられなかった。連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、1175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で極軽度の細胞増殖抑制が認められた。

被験物質の析出が、各試験系列とも試験液処理開始時および処理終了時の全ての用量で観察された。

被験物質処理による培養液 pH への影響は、各試験系列のいずれの用量にも観察されなかった。

染色体の構造異常および数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量 : 1175~4700 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量 :

1175～4700 $\mu\text{g}/\text{mL}$)および連続処理法の 24-0 h 処理による場合(評価用量：294～4700 $\mu\text{g}/\text{mL}$)のいずれの用量においても 5%未満であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 42.5%、短時間処理法の代謝活性化による場合が 43.5%および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 58.0%であった。

考 察

イソトリデシル＝ステアラートの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて検討した。

予備試験(細胞増殖抑制試験)の結果に基づき、本試験(染色体異常試験)用量として、各試験系列の最高用量を 10 mM 相当濃度の 4700 µg/mL とし、以下公比 2 で計 3 あるいは 5 用量を設定した。

本試験の結果、染色体の構造異常ならびに数的異常の出現率は各試験系列のいずれの用量も 5%未満であり、結果は陰性であった。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、イソトリデシル＝ステアラートは、本試験条件において、ほ乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

参考資料

- 1) 日本化学物質辞書 Web. 化学物質情報詳細. 独立行政法人 科学技術振興機構.
- 2) 製品安全データシート(2010年6月15日版)
- 3) 化学物質総合情報提供システム Chemical Risk Information Platform (CHRIP). 独立行政法人 製品評価技術基盤機構.

Table 1 Effects of isotridecyl stearate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR09206)

Growth rate (% to the control)				
Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control ^a	-	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
Isotridecyl stearate	18.4	102 , 113 (107.5)	103 , 101 (102.0)	106 , 90 (98.0)
	36.7	92 ⁺ , 104 ⁺ (98.0)	98 ⁺ , 104 ⁺ (101.0)	101 ⁺ , 85 ⁺ (93.0)
	73.4	93 ⁺ , 107 ⁺ (100.0)	102 ⁺ , 92 ⁺ (97.0)	107 ⁺ , 89 ⁺ (98.0)
	147	95 ⁺ , 96 ⁺ (95.5)	96 ⁺ , 92 ⁺ (94.0)	106 ⁺ , 82 ⁺ (94.0)
	294	83 [*] , 90 [*] (86.5)	91 [*] , 86 [*] (88.5)	94 [*] , 82 [*] (88.0)
	588	80 [*] , 79 [*] (79.5)	86 [*] , 85 [*] (85.5)	79 [*] , 76 [*] (77.5)
	1175	93 [*] , 102 [*] (97.5)	81 [*] , 84 [*] (82.5)	85 [*] , 71 [*] (78.0)
	2350	87 [*] , 81 [*] (84.0)	87 [*] , 93 [*] (90.0)	77 [*] , 75 [*] (76.0)
4700	73 [*] , 79 [*] (76.0)	86 [*] , 81 [*] (83.5)	63 [*] , 45 [*] (54.0)	
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		-	-	-

a : 0.5%Carboxymethylcellulose sodium solution

* : Precipitation at the beginning and end of treatment

⁺ : Precipitation at the end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

-: Blank

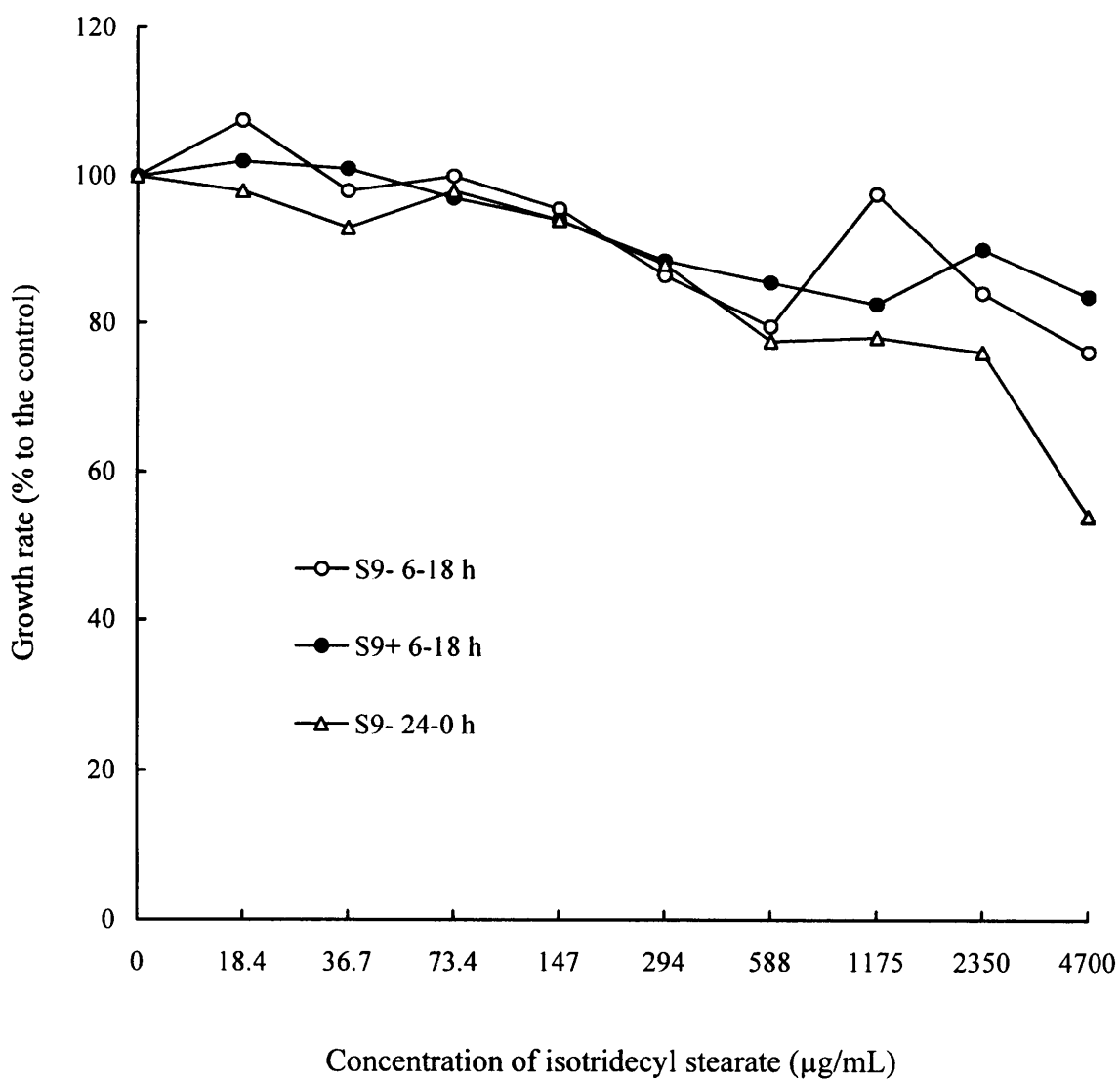


Figure 1 Effects of isotridecyl stearate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR09206)

Each point represents mean value (n=2).

Table 2 Effects of isotridecyl stearate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR09206)

Growth rate (% to the control)				
Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control ^a	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
Isotridecyl stearate	294	-	-	84 *, 88 * (86.0)
	588	-	-	73 *, 88 * (80.5)
	1175	90 *, 92 * (91.0)	94 *, 91 * (92.5)	69 *, 82 * (75.5)
	2350	89 *, 100 * (94.5)	96 *, 95 * (95.5)	67 *, 83 * (75.0)
	4700	76 *, 87 * (81.5)	102 *, 91 * (96.5)	66 *, 79 * (72.5)

a : 0.5%Carboxymethylcellulose sodium solution

* : Precipitation at the beginning and end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

-: Blank

Table 3-1 Results of the chromosomal aberration test of isotridecyl stearate (6 hours treatment without metabolic activation) (SR09206)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c		
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)			
6-18	-	Control ^b	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	-	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.5)			
		Isotridecyl stearate	1175	91.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
			200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)					
			2350	94.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
					100	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0			
			200	0	2	0	0	0	2 (1.0)	0	1	0	1 (0.5)					
		4700	81.5	100	1	0	0	0	0	1	0	4	0	4				
				100	1	1	0	0	0	2	0	2	0	2				
		200	2	1	0	0	0	3 (1.5)	0	6	0	6 (3.0)						
Mitomycin C	0.1	/	100	17	31	0	0	0	41	0	0	0	0	+				
			100	9	39	0	0	0	44	0	0	0						
			200	26	70	0	0	0	85 (42.5)	0	0	0 (0.0)						

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : 0.5%Carboxymethylcellulose sodium solution

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

Table 3-2 Results of the chromosomal aberration test of isotridecyl stearate (6 hours treatment with metabolic activation) (SR09206)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
6-18	+	Control ^b	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)		
		Isotridecyl stearate	1175	92.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
			200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.5)				
			2350	95.5	100	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0		
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
			200	0	1	1	0	0	2 (1.0)	0	1	0	1 (0.5)				
		4700	96.5	100	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0			
				100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1			
				200	1	1	0	0	0	2 (1.0)	0	1	0	1 (0.5)			
3,4-Benzopyrene	10	/	100	7	42	0	0	0	46	0	0	0	0	+			
			100	11	33	0	0	0	41	0	0	0					
			200	18	75	0	0	0	87 (43.5)	0	0	0	0 (0.0)				

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : 0.5%Carboxymethylcellulose sodium solution

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations : -, negative +, positive

Table 3-3 Results of the chromosomal aberration test of isotridecyl stearate (24 hours treatment without metabolic activation) (SR09206)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c		
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)			
24-0	-	Control ^b	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)			
		Isotridecyl stearate	294	86.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	-
					100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0			
					200	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0	1	0	1 (0.5)			
			588	80.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1			
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)			
			1175	75.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)			
		2350	75.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
				200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)				
		4700	72.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
				100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0				
				200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)				
Mitomycin C	0.05	/	100	8	49	1	0	0	56	0	0	0	0	0	+			
			100	14	53	0	0	0	60	0	0	0	0					
			200	22	102	1	0	0	116 (58.0)	0	0	0	0 (0.0)					

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : 0.5%Carboxymethylcellulose sodium solution

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive