

最 終 報 告 書

ペンタエリスリトールテトライソオクチレ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：7826 (115-191)

平成17年5月25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.....	5
12. 被験物質.....	8
13. 試験材料および方法.....	10
14. 試験結果.....	17
15. 考察および結論.....	19
16. 参考文献.....	20

Figures

Figure 1	Growth inhibition of CHL cells treated with hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester [Short-term treatment].....	23
Figure 2	Growth inhibition of CHL cells treated with hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester [Continuous treatment].....	24
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester [Short-term treatment: -S9]	25

Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester [Short-term treatment: +S9]	26
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester [Continuous treatment: 24h].....	27
Tables		
Table 1	Results of growth inhibition test of hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester [Short-term treatment]	28
Table 2	Results of growth inhibition test of hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester [Continuous treatment]	29
Table 3	Chromosome aberration test in CHL cells treated with hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester [Short-term treatment: -S9]	30
Table 4	Chromosome aberration test in CHL cells treated with hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester [Short-term treatment: +S9]	31
Table 5	Chromosome aberration test in CHL cells treated with hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester [Continuous treatment: 24h].....	32

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、ペンタエリスリトールテトライソオクチレートは染色体異常を誘起しないものと判断した。

ペンタエリスリトールテトライソオクチレート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の結果を基に、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 1250, 2500 および 5000 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、ペンタエリスリトールテトライソオクチレート処理群の場合、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。さらに、連続処理法 24 時間処理で 1250, 2500 および 5000 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。同試験法においても、ペンタエリスリトールテトライソオクチレート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

ペンタエリスリトールテトライソオクチレート（英名：Hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester）

12.2. ロット番号

12.3. 純度

98.4% (GC%)

残り 1.6%不明 (各成分 1%未満)

12.4. 製造元

12.5. 保存条件

室温, 气密, 遮光.

12.6. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-3 : 22.2～29.8℃ ; 平成 16 年 7 月 20 日～平成 16 年 10 月 26 日)

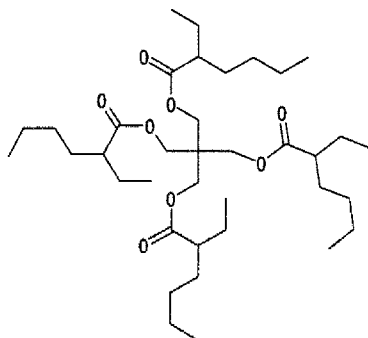
12.7. CAS No.

7299-99-2

12.8. 化学名

2,2-bis[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]propane-, 3-diyl -bis(2-ethylhexanoate)

12.9. 化学構造



- 12.10. 分子式
 $C_{37}H_{68}O_8$
- 12.11. 分子量
640.94
- 12.12. 物質の状態
形状：液体
色：無色透明
臭い：ほとんど臭いはないが、わずかに特異臭が有る。
- 12.13. 沸点
170°C (0.133 kPa)
- 12.14. 密度
 $d_{30} = 0.96$
- 12.15. 溶解性
水に対する溶解性：不溶
- 12.16. 安定性／反応性
安定性：安定
反応性：酸，アルカリで加水分解をうける
- 12.17. 取り扱い上の注意
火気厳禁
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 (0.5 g) 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。
- 12.19. 安定性
被験物質提供元 () にて保管されていた同一ロットの被験物質について実施した品質分析の結果 (平成 17 年 5 月 17 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 18 の細胞を、染色体異常試験で継代数 25 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 (設定温度 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エタノール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エタノール (Lot No. 606F1350 ; 関東化学) に溶解し、調製原液とした。

用量設定試験では、使用直前に調製原液 (500.0 mg/mL 液) を準備した。この 500.0

mg/mL 原液を使用溶媒で順次希釈し、250.0, 125.0, 62.5, 31.3, 15.6, 7.81, 3.91, 1.95 および 0.977 mg/mL 液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に調製原液 (500.0 mg/mL 液) を準備した。この 500.0 mg/mL 原液を使用溶媒で順次希釈し、250.0, 125.0 および 62.5 mg/mL 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 (エタノール) 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。

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。

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. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/mL を最高用量とし、以下 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5 および 9.77 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、各プレートの培養液を除き、あらかじめ 13.7.6. に記載した割合で溶媒もしくは被験物質液を添加した培養液を加えた。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 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、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、各プレートの培養液を除き、あらかじめ 13.7.6. に記載した割合で溶媒もしくは被験物質液を添加した培養液を加えた。

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、各プレートの培養液を除き、あらかじめ 13.7.6. に記載した割合で溶媒もしくは被験物質液を添加した培養液を加えた。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. K31134240 ; Merck) 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) を用いて波長 580 nm 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。

13.8. 染色体異常試験 (本試験)

13.8.1. 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 5000 µg/mL で細胞の増殖を 50%以上抑制することはなかったが、+S9 処理および 24 時間処理の高用量でわずかな細胞増殖抑制がみられた。したがって、染色体異常試験ではガイドライン上の限界用量である 5000 µg/mL を最高用量とし、2500、1250 および 625 µg/mL の計 4 用量を設定した。

試験系		用量 (µg/mL)			
短時間処理法-S9 処理	625	<u>1250</u>	<u>2500</u>	<u>5000</u>	
短時間処理法+S9 処理	625	<u>1250</u>	<u>2500</u>	<u>5000</u>	
連続処理法 24 時間処理	625	<u>1250</u>	<u>2500</u>	<u>5000</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。

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 を播種し、3 日間培養した。培養終了後、各プレートの培養液を除き、あらかじめ 13.8.6. に記載した割合で溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質液を添加した培養液を加えた。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. 103K2403 ; Sigma 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、各プレートの培養液を除き、あらかじめ 13.8.6. に記載した割合で溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質液を添加した培養液を加えた。

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、各プレートの培養液を除き、あらかじめ 13.8.6. に記載した割合で溶媒、被

験物質液あるいは陽性対照物質液を添加した培養液を加えた。さらに、24 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

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 µg/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乾燥させ、1/100 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. OB318388 ; 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 : キッコーマン) 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 µL 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 µL 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 µL

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 (=細胞生存率) を各用量群について求め、細胞増殖抑制制度とした。

13.8.10. 評価対象

観察用量としては、細胞増殖抑制試験および 13.8.9. の相対細胞増殖率がいずれの処理群においても 50% 以上であったので、試験した最も高い用量を最高用量とした。いずれにおいても連続する 3 用量を評価対象とした。

13.8.11. 染色体の観察

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。

短時間処理法と連続処理法のそれぞれ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、染色体の形態的变化としてギャップ (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. 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, 同+S9 処理および連続処理法 24 時間処理では, いずれの被験物質処理においても, 細胞生存率が陰性対照群の 50%以上であったので, 50%細胞増殖抑制濃度を算出できなかった. なお, 短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理の高用量でわずかな細胞増殖抑制がみられた.

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 625 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で油滴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 Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した.

ペンタエリスリトールテトライソオクチレート処理群での染色体構造異常出現頻度は, 1250 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 2500 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 5000 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%を示し, 陰性対照群 (0.5%) と比較し同等であった. 倍数性細胞の出現頻度は全ての用量で 0.0%を示し, 陰性対照群 (0.0%) と同等であった. また, 全ての用量で細胞生存率が陰性対照群の 50%以上であった.

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 48.5% ($p \leq 0.025$) であった.

14.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した.

ペンタエリスリトールテトライソオクチレート処理群での染色体構造異常出現頻度は, 1250 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 2500 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 5000 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%を示し, 陰性対照群 (0.0%) と同等であった. 倍数性細胞の出現頻度は, 1250 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 2500 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 5000 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%を示し, 陰性対照群 (0.0%) と同等であった. また, 全ての用量で細胞生存率が陰性対照群の 50%以上であった.

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 34.0% ($p \leq 0.025$) であった.

14.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 3 に示した.

ペンタエリスリトールテトライソオクチレート処理群での染色体構造異常出現頻度は, 1250 µg/mL で 0.5%, 2500 µg/mL で 0.0%, 5000 µg/mL で 0.5%を示し, 陰性対照群 (0.5%) と同等であった. 倍数性細胞の出現頻度は, 1250 µg/mL で 0.5%, 2500 µg/mL で 0.0%, 5000 µg/mL で 0.5%を示し, 陰性対照群 (0.5%) と同等であった. また, 全ての用量で細胞生存率が陰性対照群の 50%以上であった.

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 38.0% ($p \leq 0.025$) 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, 全ての用量において油滴状の析出物が認められた.

15. 考察および結論

ペンタエリスリトールテトライソオクチレートの変異原性, 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 5000 µg/mL まで検討した.

染色体異常試験の結果, ペンタエリスリトールテトライソオクチレート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.

本被験物質ペンタエリスリトールテトライソオクチレート (Hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[[2-ethyl-1-oxohexyl]oxy]methyl]-1, 3-propanediyl ester) の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はない.

類縁体である Pentaerythritol tetranitrate¹⁾ については, 2 年間のラット発がん性試験で, Zymbal 腺に新生物が低頻度で認められた¹⁾. また, ペンタエリスリトールは, 細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性²⁾, CHL/IU 細胞を用いた染色体異常試験で陰性³⁾と報告されている.

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, 本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ペンタエリスリトールテトライソオクチレート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) Bucher JR, Huff J, Haseman JK, Eustis SL, Lilja HS and Murthy AS.: No evidence of toxicity or carcinogenicity of Pentaerythritol tetranitrate given in the diet to F344 rats and B6C3F1 mice for up to two years. J Appl Toxicol. 1990, 10(5):353-357.
- 2) 澁谷徹, 坂本京子, 加藤基恵, 堀谷尚古, 川上久美子, 松本容彦, 川嶋美以子, 中込まどか, 化学物質毒性試験報告書 Vol. 3, 277-280, 1996.
- 3) 田中憲穂, 山影康次, 若栗忍, 中川ゆづき, 日下部博一, 橋本恵子, 化学物質毒性試験報告書 Vol. 3, 281-283, 1996.

Exp. No. 7826 (115-191)

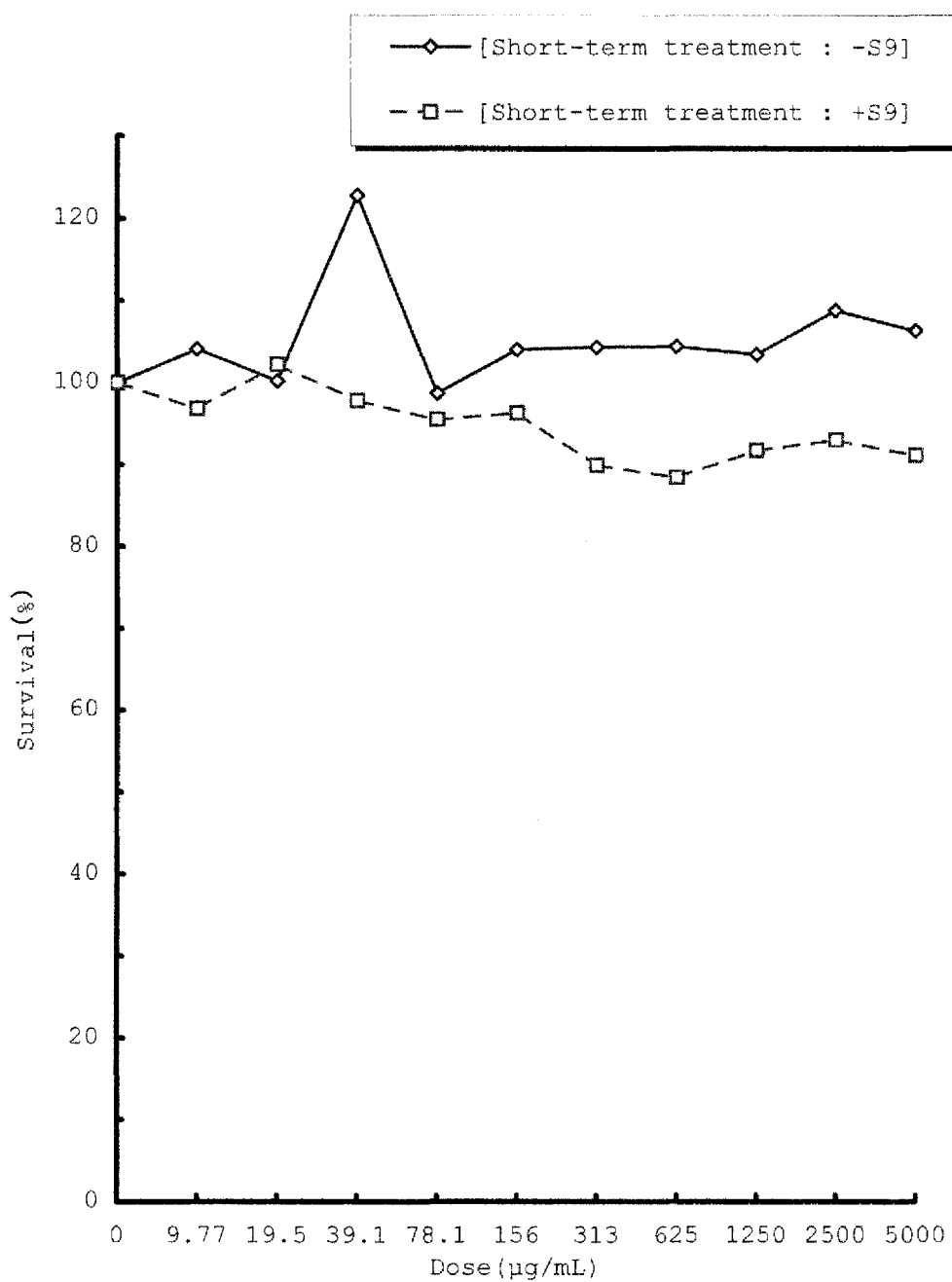


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester [Short-term treatment]

Exp. No. 7826 (115-191)

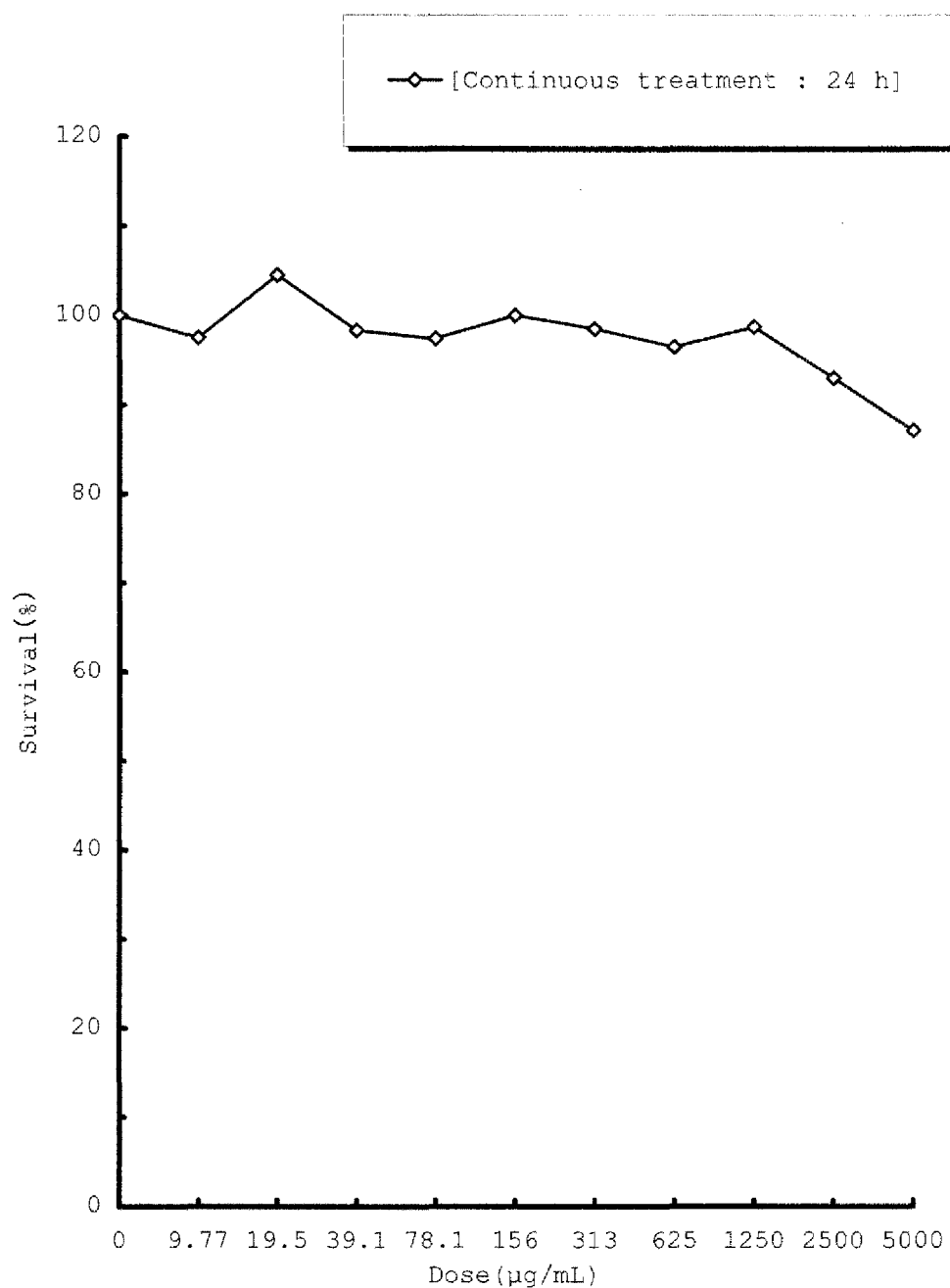


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester [Continuous treatment]

Exp. No. 7826 (115-191)

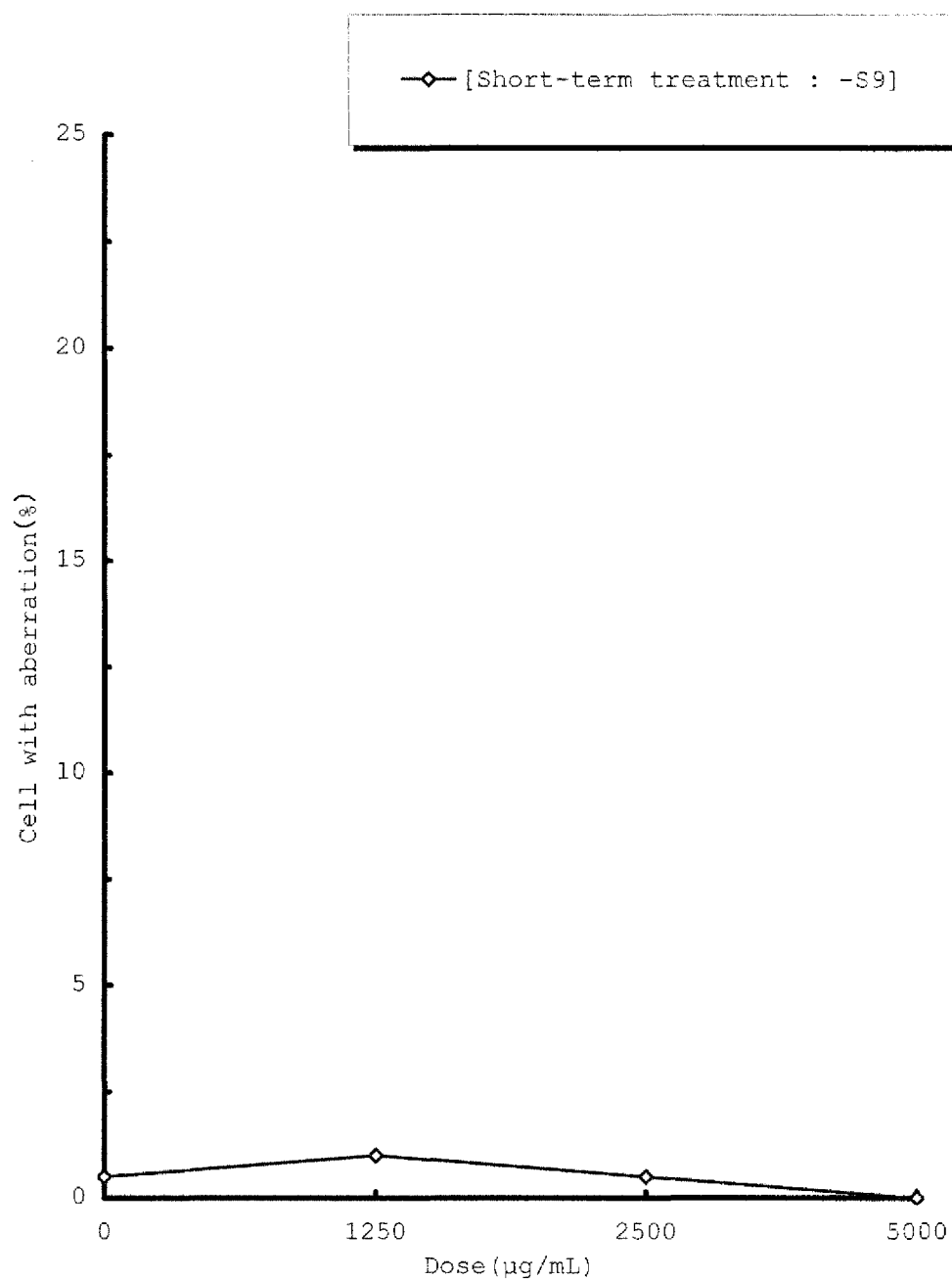


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by hexanoic acid,2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester [Short-term treatment:-S9]

Exp. No. 7826 (115-191)

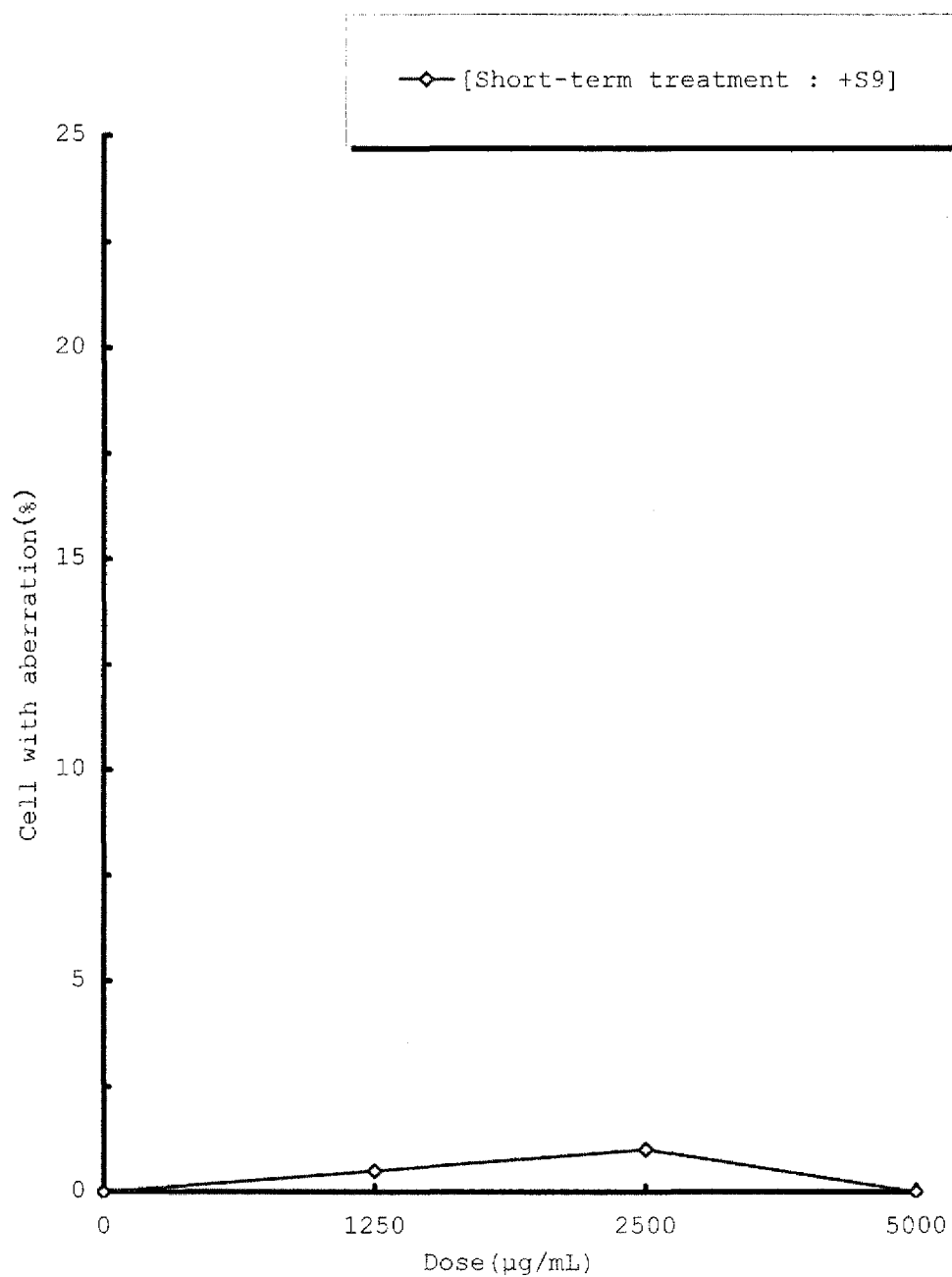


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester [Short-term treatment: +S9]

Exp. No. 7826 (115-191)

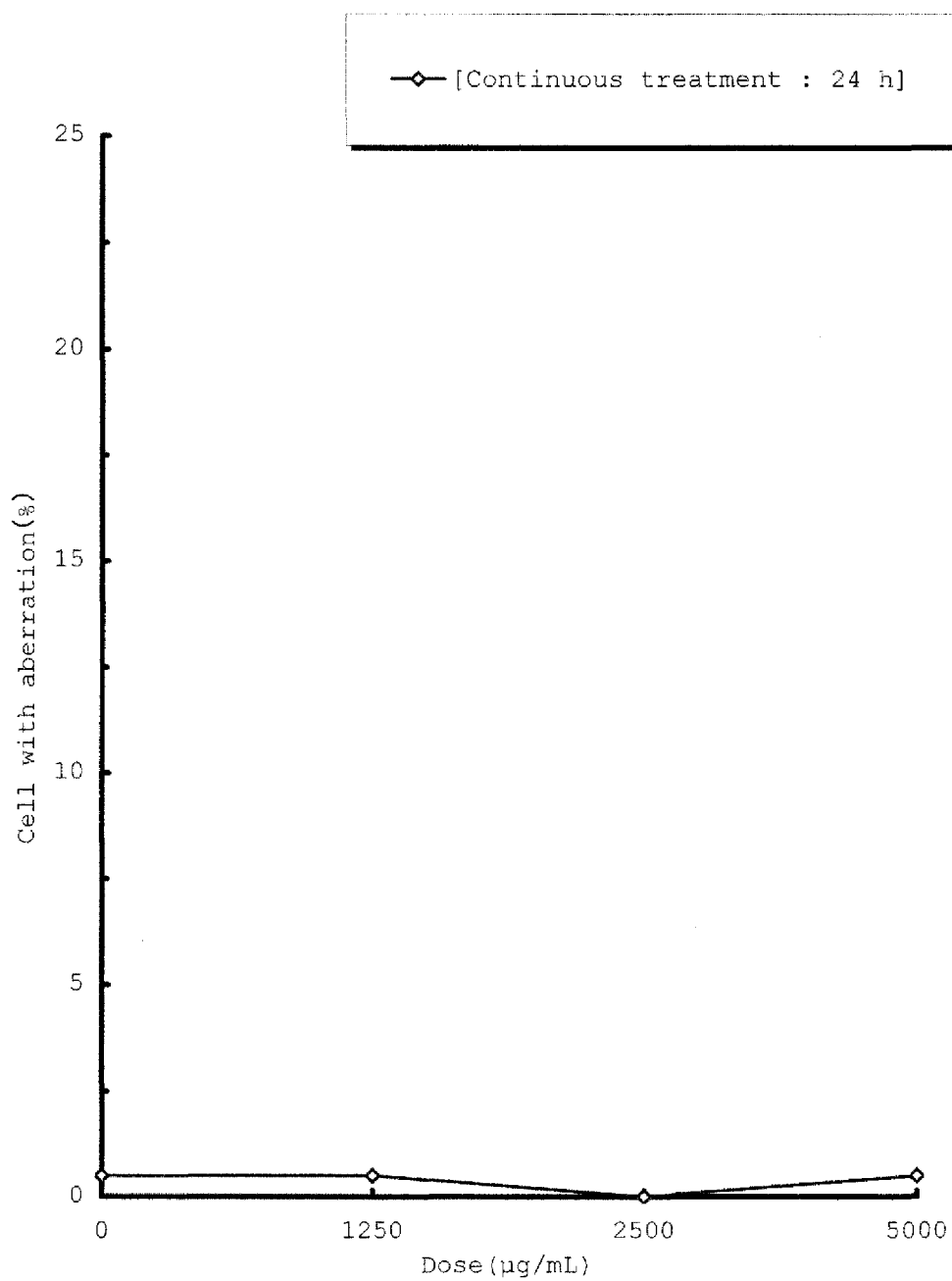


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester [Continuous treatment: 24 h]

Table 1. Results of growth inhibition test of hexanoic acid,
2-ethyl-,2,2-bis[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy] methyl]-1,3-propanediyl ester
[Short-term treatment]

Exp. No. 7826 (115-191)

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]
Ethanol a)	0	100.0 100.0	[100.0]	Ethanol a)	0	100.0 100.0	[100.0]
hexanoic acid, 2-ethyl-,2,2- bis[(2-ethyl-1- oxohexyl)oxy] methyl]-1,3- propanediyl ester	9.77	104.7 103.5	[104.1]	hexanoic acid, 2-ethyl-,2,2- bis[(2-ethyl-1- oxohexyl)oxy] methyl]-1,3- propanediyl ester	9.77	96.7 96.8	[96.8]
	19.5	98.1 102.3	[100.2]		19.5	101.9 102.5	[102.2]
	39.1	97.6 147.9	[122.8]		39.1	97.3 98.3	[97.8]
	78.1	99.0 98.3	[98.7]		78.1	95.5 95.5	[95.5]
	156	104.1 103.9	[104.0]		156	96.2 96.4	[96.3]
	313	103.7 104.8	[104.3]		313	85.6 94.3	[90.0]
	625 d)	102.2 106.6	[104.4]		625 d)	88.3 88.6	[88.5]
	1250 d)	107.3 99.5	[103.4]		1250 d)	90.9 92.4	[91.7]
	2500 d)	110.6 106.9	[108.8]		2500 d)	92.4 93.5	[93.0]
	5000 d)	110.1 102.5	[106.3]		5000 d)	89.2 92.9	[91.1]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] — Not inhibited

[short-term treatment : +S9] — Not inhibited

a): Negative control

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

Table 2. Results of growth inhibition test of hexanoic acid,
2-ethyl-,2,2-bis[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy] methyl]-1,3-propanediyl ester
[Continuous treatment]

Exp. No. 7826 (115-191)

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose(µg/mL)	Survival (%)	[Mean]
Ethanol a)	0	100.0 100.0	[100.0]
hexanoic acid, 2-ethyl-,2,2- bis[(2-ethyl-1- oxohexyl)oxy] methyl]-1,3- propanediyl ester	9.77	98.7 96.3	[97.5]
	19.5	104.4 104.5	[104.5]
	39.1	97.1 99.5	[98.3]
	78.1	96.5 98.3	[97.4]
	156	101.7 98.2	[100.0]
	313	98.1 98.9	[98.5]
	625 d)	100.1 92.9	[96.5]
	1250 d)	97.8 99.5	[98.7]
	2500 d)	93.9 92.0	[93.0]
	5000 d)	88.1 86.1	[87.1]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[continuous treatment : 24 h] ——— Not inhibited

a): Negative control

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

Table 3.

Chromosome aberration test in CHL cells treated with hexanoic acid,
2-ethyl-,2,2-bis[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester
[Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 7826 (115-191)

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 (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Ethanol a)	0	6	100.0	200	4	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
hexanoic acid,2-ethyl-,2,2-bis[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester	1250 d)	6	71.9	200	1	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	2500 d)	6	70.2	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	5000 d)	6	64.8	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
MMC b)	0.1	6	90.7	200	13	30	85	0	0	0	97 (48.5) *	200	0 (0.0)

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

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

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 hexanoic acid,
2-ethyl-,2,2-bis[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy] methyl] -1,3-propanediyl ester
[Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 7826 (115-191)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative Number of 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 (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Ethanol a)	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
hexanoic acid,2-ethyl-,2,2-bis[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy] methyl] -1,3-propanediyl ester	1250 d)	6	73.7	200	1	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	2500 d)	6	68.1	200	1	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	1 (0.5)
	5000 d)	6	69.1	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
CP c)	12.5	6	83.1	200	5	10	64	0	0	0	68 (34.0) *	200	0 (0.0)

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

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

a): Negative control

c): Positive control (Cyclophosphamide)

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

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with hexanoic acid,
2-ethyl-,2,2-bis[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester
[Continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 7826 (115-191)

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 (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Ethanol a)	0	24	100.0	200	4	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
hexanoic acid,2-ethyl-,2,2-bis[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester	1250 d)	24	78.9	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	2500 d)	24	64.9	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	5000 d)	24	64.9	200	2	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
MMC b)	0.05	24	91.2	200	15	21	63	0	0	0	76 (38.0) *	200	0 (0.0)

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

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

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

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