

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)の細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of Pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) in Bacteria

要約

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)について、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

試験菌株として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537)および*Escherichia coli* (WP2 *uvrA*)の5菌株を用いた。用量設定試験においてはS9 mix無添加群および添加群の各試験菌株において8.19~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の8用量を実施した。その結果、いずれの処理においても試験菌株に対する生育阻害作用および変異原性が認められず、2000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で析出が認められた。したがって、本試験ではS9 mix無添加群およびS9 mix添加群の各試験菌株において、析出が認められる最も低い用量を含めた78.1~2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で試験を実施した。また、用量設定試験のS9 mix無添加群のTA1535のみで雑菌汚染が認められたため、本試験との再現性を確認するために、S9 mix無添加群のTA1535において78.1~2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で再試験を実施した。その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。これらの試験結果は、用量設定試験、本試験および再試験において再現性が確認された。

以上の結果より、本試験条件下ではペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)は、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537¹⁾ならびにトリプトファン要求性の*Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のAmes BN教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成15年9月16日~9月19日に菌株の特性検査を実施し、当該試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO, Merck)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フ

リーザーに-80°Cで保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム[いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業)と1.2%の寒天(伊那寒天BA-30A)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5 w/v%を含む0.6 w/v% Bacto-agar (BD Diagnostic Systems)水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学)-0.5 mmol/L D-ビオチン(関東化学)水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン(関東化学)水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mLのバツフル付三角フラスコに2.5 w/v% ニュートリエントブロス(Nutrient Broth No.2, Oxoid)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μL 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10, タイテック)を用い、37°Cの条件で8時間振盪(往復振盪:100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol

NADH	4 μ mol
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol

5. 被験物質

被験物質のペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)(ロット番号:TOL-887)は純度98.4%(GC%, 残り1.6%不明, 各成分1%未満)の無色透明の液体である。本剤は水に不溶であるが, アセトンに易溶である。日本精化(兵庫)から提供された被験物質を使用した。被験物質は, 使用時まで室温, 気密, 遮光で保管した。試験終了後, 被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果, 安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

試験の都度, 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アセトン(関東化学)を用いて溶解し, 調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後, 速やかに処理を行った。

7. 試験用量の設定

8.19~5000 μ g/plateの8用量(公比2.5)を用いて用量設定試験を実施した。その結果, S9 mix無添加群のTA1535以外の試験菌株は, いずれの用量においても, 復帰変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった。なお, S9 mix無添加群のTA1535の一部プレートにおいて雑菌汚染が認められたため, コロニー数を計測しなかった。また, 各試験菌株のいずれの処理群においても, 試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。被験物質処理時, S9 mix無添加群および添加群の2000 μ g/plate以上の用量で油滴状の析出物が認められた。なお, プレインキューベーション終了後, S9 mix無添加群の2000 μ g/plate以上の用量では, 認められた油滴状の析出物が消失していた。コロニー数計測時, S9 mix無添加群および添加群の2000 μ g/plate以上の用量では, 油滴状および油膜状の析出物が認められた。

従って, 本試験ではS9 mix無添加群および添加群とも, すべての試験菌株において2500 μ g/plateを最高用量とし, それぞれ6用量(公比2)を設定した。

また, S9 mix無添加群のTA1535において, 本試験との再現性を確認するため再試験を実施し, 本試験と同じ2500 μ g/plateを最高用量とした6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した調製済み陽性対照物質溶液(オリエンタル酵母工業)を使用した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)

アクリルアミド(AF-2)

アジ化ナトリウム(NaN_3)

9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA)

2-アミノアントラセン(2-AA)

9. 試験方法

Amesらの原法¹⁾の改良法であるプレインキューベーション法に準じて, S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に, 使用溶媒, 被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μ L, 次いでS9 mix無添加群の場合, 0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μ L, S9 mix添加群の場合, S9 mixを500 μ L添加し, さらに試験菌液100 μ Lを加え, 37°Cで20分間振盪培養(プレインキューベーション)した。培養終了後, あらかじめ45°Cに保温したトッパアガーを2 mL添加し, 混合液をプレート上に重層した。37°Cの条件で48時間各プレートを培養した後, 被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため, 実体顕微鏡($\times 40$)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで, 復帰変異により生じたコロニーを計測した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11, システムサイエンス)を用いた。各濃度につき3枚のプレートを使用した。

10. 結果の解析

復帰変異コロニー数が溶媒対照の2倍以上に増加し, かつ, 再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に, 陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

用量設定試験の結果をTable 1~2に, 本試験の結果をTable 3~4に示した。また, 用量設定試験のS9 mix無添加群のTA1535で雑菌汚染が認められ, 本試験との再現性を確認するために再試験を実施し, その結果をTable 5に示した。S9 mix無添加群および添加群とも, いずれの試験菌株においてもペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)処理による復帰変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった。また, 各試験菌株のいずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。一方, 陽性対照物質は溶媒対照群の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。なお, 被験物質処理時, 1250 μ g/plate以上の用量で油滴状の析出物が認められた。なお, プレインキューベーション終了後, 1250 μ g/plate以上の用量では, 認められた油滴状の析出物が消失していた。コロニー数計測時, 1250 μ g/plate以上の用量では, 油滴状および油膜状の析出物が認められた。

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(2-エチルヘキサノアート)の微生物に対する遺伝子突然変異に関し, 陰性と判定した。

なお, 本被験物質[ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)]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 tetranitrate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²⁾。また, ペンタエリスリトールは, 細菌を用いる復帰変異試験で陰

性⁴⁾, CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陰性⁵⁾と報告されている。

文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, 113: 173-215(1983).
- 2) Green MH, Muriel WJ: Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res*, 38: 3-32(1978).
- 3) 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*, 10(5):353-357(1990).
- 4) 澁谷徹ら: ペンタエリスリトールの細菌を用いる復帰変異試験. 化学物質毒性試験報告, 3:277-280(1996).
- 5) 田中憲穂ら: ペンタエリスリトールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報告, 3: 281-283(1996).

連絡先

試験責任者: 益森勝志

試験担当者: 古屋有佳子, 田中 仁, 菊池正憲,
木下裕加, 永井美穂, 鈴木ゆみ子,
上田摩弥, 嶋田佐和子,
赤星まゆみ, 仲村渠奈美子

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Shoji Masumori (Study Director)
Yukako Furuya, Jin Tanaka,
Masanori Kikuchi, Yuka Kishita,
Miho Nagai, Yumiko Suzuki,
Maya Ueda, Sawako Shimada,
Mayumi Akahoshi,
Namiko Nakandakari

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden, Iwata-shi, Shizuoka,
437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Summary data on dose-finding study of pentaerythritol tetra (2-ethylhexanoate)
[Non-activation method: -S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0 ^{a)}	111	118	130	—	—	—	28	25	23	22	21	23	6	4	10
		[120 \pm 10]						[25 \pm 3]			[22 \pm 1]			[7 \pm 3]		
	8.19	124	112	117	—	—	—	23	21	27	23	24	20	5	4	6
		[118 \pm 6]						[24 \pm 3]			[22 \pm 2]			[5 \pm 1]		
	20.5	127	119	132	—	—	—	27	21	24	21	28	21	8	4	9
		[126 \pm 7]						[24 \pm 3]			[23 \pm 4]			[7 \pm 3]		
	51.2	115	108	108	—	—	—	22	25	30	31	30	28	7	6	6
		[110 \pm 4]						[26 \pm 4]			[30 \pm 2]			[6 \pm 1]		
	128	118	124	109	—	—	—	32	31	28	24	29	24	9	6	7
		[117 \pm 8]						[30 \pm 2]			[26 \pm 3]			[7 \pm 2]		
320	125	119	108	—	—	—	25	22	22	25	24	20	5	7	4	
	[117 \pm 9]						[23 \pm 2]			[23 \pm 3]			[5 \pm 2]			
800	120	108	125	—	—	—	25	20	21	28	25	22	10	5	7	
	[118 \pm 9]						[22 \pm 3]			[25 \pm 3]			[7 \pm 3]			
2000+	109	116	113	—	—	—	28	26	31	24	30	31	11	8	5	
	[113 \pm 4]						[28 \pm 3]			[28 \pm 4]			[8 \pm 3]			
5000+	120	120	114	—	—	—	20	25	26	22	25	28	7	8	10	
	[118 \pm 3]						[24 \pm 3]			[25 \pm 3]			[8 \pm 2]			
Positive control		569	618	584 ^{b)}	—	—	—	151	143	160 ^{b)}	677	724	717 ^{c)}	223	174	193 ^{d)}
		[590 \pm 25]						[151 \pm 9]			[706 \pm 25]			[197 \pm 25]		

a) Negative control (acetone)
 b) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 c) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 +: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.
 -: Revertant colonies were not counted because some plates were contaminated with bacteria.

Table 2 Summary data on dose-finding study of pentaerythritol tetra (2-ethylhexanoate)
[Activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0 ^{a)}	121	129	114	13	13	9	25	21	25	23	28	32	15	13	13
		[121 \pm 8]			[12 \pm 2]			[24 \pm 2]			[28 \pm 5]			[14 \pm 1]		
	8.19	128	130	139	10	12	9	24	20	22	35	36	31	14	13	10
		[132 \pm 6]			[10 \pm 2]			[22 \pm 2]			[34 \pm 3]			[12 \pm 2]		
	20.5	124	131	117	9	8	12	32	26	26	30	36	33	15	17	11
		[124 \pm 7]			[10 \pm 2]			[28 \pm 3]			[33 \pm 3]			[14 \pm 3]		
	51.2	125	128	127	14	11	11	34	26	29	36	36	34	16	10	11
		[127 \pm 2]			[12 \pm 2]			[30 \pm 4]			[35 \pm 1]			[12 \pm 3]		
	128	124	116	123	10	11	14	28	22	25	28	30	33	10	12	10
		[121 \pm 4]			[12 \pm 2]			[25 \pm 3]			[30 \pm 3]			[11 \pm 1]		
320	126	115	136	8	13	14	29	22	25	25	30	28	11	14	11	
	[126 \pm 11]			[12 \pm 3]			[25 \pm 4]			[28 \pm 3]			[12 \pm 2]			
800	140	127	149	11	10	11	24	28	24	25	26	33	14	11	10	
	[139 \pm 11]			[11 \pm 1]			[25 \pm 2]			[28 \pm 4]			[12 \pm 2]			
2000+	137	131	129	10	12	11	25	25	33	30	34	29	13	15	12	
	[132 \pm 4]			[11 \pm 1]			[28 \pm 5]			[31 \pm 3]			[13 \pm 2]			
5000+	134	141	128	13	7	8	33	29	30	31	33	27	12	14	15	
	[134 \pm 7]			[9 \pm 3]			[31 \pm 2]			[30 \pm 3]			[14 \pm 2]			
Positive control		1117	1102	912 ^{b)}	282	299	330 ^{b)}	692	662	692 ^{b)}	372	357	347 ^{c)}	131	149	126 ^{d)}
		[1044 \pm 114]			[304 \pm 24]			[682 \pm 17]			[359 \pm 13]			[135 \pm 12]		

a) Negative control (acetone)
 b) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 +: Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3 Summary data on bacterial reverse mutation test of pentaerythritol tetra (2-ethylhexanoate)
[Non-activation method: -S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0 ^a	125	117	116	11	9	9	22	23	27	21	19	21	7	6	8
		[119 \pm 5]			[10 \pm 1]			[24 \pm 3]			[20 \pm 1]			[7 \pm 1]		
	78.1	138	125	114	5	11	11	28	29	24	16	22	19	13	5	9
		[126 \pm 12]			[9 \pm 3]			[27 \pm 3]			[19 \pm 3]			[9 \pm 4]		
	156	117	111	132	14	14	13	27	23	23	25	21	21	8	7	8
		[120 \pm 11]			[14 \pm 1]			[24 \pm 2]			[22 \pm 2]			[8 \pm 1]		
313	118	131	119	12	14	12	20	26	23	15	16	20	5	6	6	
	[123 \pm 7]			[13 \pm 1]			[23 \pm 3]			[17 \pm 3]			[6 \pm 1]			
625	107	138	122	15	9	9	24	24	21	14	18	18	8	6	7	
	[122 \pm 16]			[11 \pm 3]			[23 \pm 2]			[17 \pm 2]			[7 \pm 1]			
1250+	110	111	116	14	10	15	30	24	24	25	18	29	7	8	7	
	[112 \pm 3]			[13 \pm 3]			[26 \pm 3]			[24 \pm 6]			[7 \pm 1]			
2500+	128	136	119	13	10	10	30	23	27	20	21	25	6	10	11	
	[128 \pm 9]			[11 \pm 2]			[27 \pm 4]			[22 \pm 3]			[9 \pm 3]			
Positive control		721	696	805 ^b	416	464	427 ^c	166	146	145 ^b	714	726	628 ^d	211	199	206 ^e
		[741 \pm 57]			[436 \pm 25]			[152 \pm 12]			[689 \pm 53]			[205 \pm 6]		

a) Negative control (acetone)

b) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

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

Table 4 Summary data on bacterial reverse mutation test of pentaerythritol tetra (2-ethylhexanoate)
[Activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0 ^a	135	125	132	8	12	12	29	37	21	28	35	26	12	14	11
		[131 \pm 5]			[11 \pm 2]			[29 \pm 8]			[30 \pm 5]			[12 \pm 2]		
	78.1	147	125	124	11	13	13	21	23	38	34	27	29	14	9	17
		[132 \pm 13]			[12 \pm 1]			[27 \pm 9]			[30 \pm 4]			[13 \pm 4]		
	156	147	139	149	12	11	13	26	20	27	39	33	30	8	13	9
		[145 \pm 5]			[12 \pm 1]			[24 \pm 4]			[34 \pm 5]			[10 \pm 3]		
313	128	132	133	12	11	15	30	28	19	31	27	28	12	14	21	
	[131 \pm 3]			[13 \pm 2]			[26 \pm 6]			[29 \pm 2]			[16 \pm 5]			
625	153	150	142	11	14	10	23	22	27	25	27	25	12	10	16	
	[148 \pm 6]			[12 \pm 2]			[24 \pm 3]			[26 \pm 1]			[13 \pm 3]			
1250+	123	131	152	9	9	11	27	31	23	25	28	30	8	11	14	
	[135 \pm 15]			[10 \pm 1]			[27 \pm 4]			[28 \pm 3]			[11 \pm 3]			
2500+	149	155	152	12	11	8	30	36	28	30	25	29	18	13	11	
	[152 \pm 3]			[10 \pm 2]			[31 \pm 4]			[28 \pm 3]			[14 \pm 4]			
Positive control		1105	1033	1002 ^b	369	358	360 ^c	698	687	776 ^d	325	310	394 ^e	125	143	118 ^e
		[1047 \pm 53]			[362 \pm 6]			[720 \pm 49]			[343 \pm 45]			[129 \pm 13]		

a) Negative control (acetone)

b) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

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

Table 5 Summary data on bacterial reverse mutation test of pentaerythritol tetra (2-ethylhexanoate) (restudy)
[Non-activation method:-S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]		
		TA1535		
Test substance	0 ^{a)}	7	11	8
		[9 \pm 2]		
	78.1	9	7	7
		[8 \pm 1]		
	156	12	11	15
		[13 \pm 2]		
	313	13	14	12
		[13 \pm 1]		
1250+	625	12	8	14
		[11 \pm 3]		
	1250+	9	11	11
		[10 \pm 1]		
2500+	2500+	12	12	7
		[10 \pm 3]		
Positive control		538	530	500 ^{b)}
		[523 \pm 20]		

a) Negative control (acetone)

b) NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

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

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)の
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

In Vitro Chromosomal Aberration Test
of Pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、短時間処理法S9 mix非存在下およびS9 mix存在下ならびに連続処理法とも5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高処理濃度とした625~5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で4用量を設定した。短時間処理法においてはS9 mix非存在下および存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、連続処理法においてはS9 mix非存在下で24時間連続処理後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。短時間処理法S9 mix非存在下およびS9 mix存在下ならびに連続処理法のいずれにおいても1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常あるいは倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)は、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

哺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)を選択した。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、ジメチルスルホキシド(DMSO, Merck)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を融解し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は継代数18, 染色体異常試験では継代数25の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(旭テクノグラス)に; 非働化(56°C, 30分)済み仔牛血清(Invitrogen)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液は冷暗所(4°C)に保存した。

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。

4. S9 mix

製造後6カ月以内のキッコマン製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製した。また、S9 mixの組成は松岡らの方法¹⁾に従った。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 $\mu\text{mol}/0.1 \text{ mL}$
KCl	33 $\mu\text{mol}/0.1 \text{ mL}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}/0.1 \text{ mL}$
NADP	4 $\mu\text{mol}/0.1 \text{ mL}$
HEPES緩衝液(pH 7.2)	4 $\mu\text{mol}/0.2 \text{ mL}$
蒸留水	0.1 mL

5. 被験物質

被験物質のペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)(ロット番号:TOL-887)は純度98.4%(GC%, 残り1.6%不明, 各成分1%未満)の無色透明の液体である。本剤は水に不溶であるが、エタノールに易溶である。日本精化(兵庫)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温、気密、遮光で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

試験の都度、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(関東化学)で被験物質を溶解し、調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。

7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

12ウエルの細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。短時間処理法ではS9 mix非存在下(-S9処理)あるいは存在下(+S9処理)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。連続処理法の場合、24時間連続して処理を実施した。

細胞を10 vol%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業)

で固定した後、0.1 w/v%クリスタル・バイオレット(関東化学)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30 vol%エタノール, 1 vol%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、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。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比, すなわち相対細胞増殖率を算出した。

その結果, 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群においても, 相対細胞増殖率が溶媒対照群の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(Fig. 1~2)。

被験物質処理開始および終了時, いずれの処理においても625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で油滴状の析出物が認められた。

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに, 染色体異常試験では短時間処理法-S9処理および+S9処理ならびに連続処理法24時間処理とも5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高処理濃度とし, 以下それぞれ公比2で減じた4用量ならびに溶媒対照群を設定した。

なお, 陽性対照として, 短時間処理の場合, -S9処理でマイトマイシンC(MMC, 協和醗酵工業)を0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, +S9処理でシクロホスファミド(CP, 塩野義製薬)を

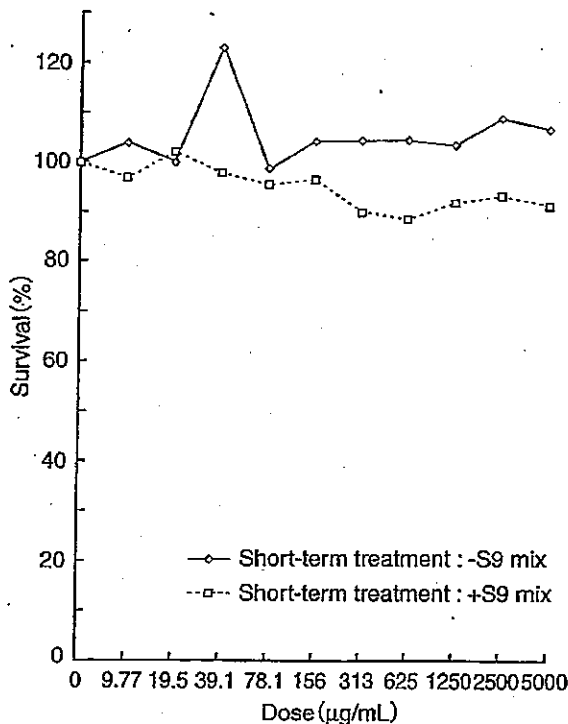


Fig. 1 Growth inhibition of CHL cells treated with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) [Short-term treatment: 6 hr]

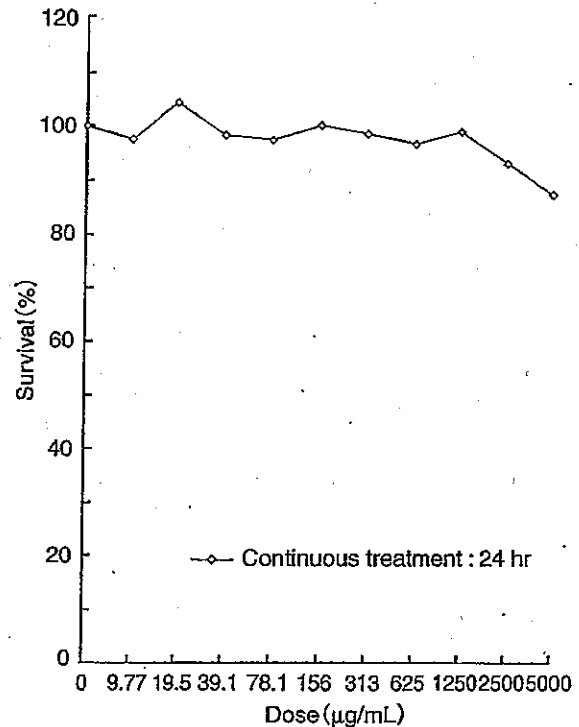


Fig. 2 Growth inhibition of CHL cells treated with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) [Continuous treatment: 24 hr]

12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で, 連続処理の場合MMCを0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い, 細胞増殖抑制試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に, 最終濃度で0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようコルセミド(Invitrogen)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ, 遠心分離により細胞を回収した。75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後, 固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本作製した後, 1.2 vol%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 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。

各プレートあたり100個, すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し, 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。同時に, 倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会による分類法²⁾に従って実施した。

すべての標本をコード化した後, 染色体分析を実施した。

11. 結果の解析

ギャップを含めない場合(-gap)について染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、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。溶媒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、再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。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。

12. 細胞増殖抑制の測定

染色体標本作製時に各プレートの低張処理した細胞液を一定量採取し、ATP測定用試薬キット(ルシフェール250, キッコマン)およびATPフォトメーター(ルミテスター C-100LU, キッコマン)を用いて相対発光量(Relative Light Unit:RLU)を求めATP含量を測定した。溶媒対照群におけるRLUに対する比(=相対細胞増殖率)を各用量群について求め、細胞増殖抑制制度とした。

結果および考察

短時間処理法での試験結果をTable 1~2に示した。ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)処理群の場合、染色体構造異常出現頻度は、-S9処理では1250 µg/mLで1.0%, 2500 µg/mLで0.5%, 5000 µg/mLで0.0%, +S9処理では1250 µg/mLで0.5%, 2500 µg/mLで1.0%, 5000 µg/mLで0.0%を示し、溶媒対照群と同等であった。倍数性細胞の出現頻度についても、-S9処理および+S9処理とも溶媒対照群と同等であった。また、全ての用量で相対細胞増殖率が溶媒対照群の50%以上であった。一方、S9 mix非存在下における陽性対照物質MMCで処理した細胞、およびS9 mix存在下における陽性対照物質CPで処理した細胞では染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)における-S9処理および+S9処理での結果は、いずれも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、結果をTable 3に示した。ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)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、溶媒対照群と同等であった。倍数性細胞の誘発傾向はいずれの用量においても観察されなかった。また、全ての用量で相対細胞増殖率が溶媒対照群の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の顕著な誘発が認められた。

短時間処理法-S9 mix処理および+S9 mix処理ならびに連続処理法において、被験物質処理開始および終了時、全ての用量で油滴状の析出物が認められた。

以上の試験結果から、本試験条件下においてペンタエ

リスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)のチャイニーズ・ハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

なお、本被験物質(ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート))について、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 tetranitrate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³⁾。また、ペンタエリスリトールは、細菌を用いる復帰変異試験で陰性⁴⁾、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陰性⁵⁾と報告されている。

文献

- 1) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*: Mutation Res, 66:277-290 (1979).
- 2) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(編): 「化学物質による染色体異常アトラス」朝倉書店, 東京(1988) pp.31-35.
- 3) Bucher JR, Huff J, Haseman JK, Eustis SL, Lijja 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, 10(5):353-357(1990).
- 4) 澁谷徹ら: ペンタエリスリトールの細菌を用いる復帰変異試験. 化学物質毒性試験報告, 3:277-280 (1996).
- 5) 田中憲穂ら: ペンタエリスリトールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報告, 3:281-283(1996).

連絡先

試験責任者: 益森勝志
試験担当者: 古屋有佳子, 田中 仁, 菊池正憲,
夏目匡克, 永井美穂, 鈴木ゆみ子,
上田摩弥, 嶋田佐和子, 赤星まゆみ,
仲村渠奈美子, 鈴木雅也

(財)食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田582-2
Tel 0538-58-1266 · Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Shoji Masumori (Study director)
Yukako Furuya, Jin Tanaka,
Masanori Kikuchi,
Masakatsu Natsume, Miho Nagai,
Yumiko Suzuki, Maya Ueda,
Sawako Shimada, Mayumi Akahoshi,
Namiko Nakandakari, Masaya Suzuki

Biosafety Research Center, Foods, Drug and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shiohinden, Iwata-shi, Shizuoka,
437-1213, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Chromosome aberration test in CHL cells treated with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) [Short-term treatment:-S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (hr)	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
Test substance	0 ^{a)}	6	100.0	200	4	0	1	0	0	0	1(0.5)	200	0(0.0)
	1250+	6	71.9	200	1	1	1	0	0	0	2(1.0)	200	0(0.0)
	2500+	6	70.2	200	1	1	0	0	0	0	1(0.5)	200	0(0.0)
	5000+	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:others
-gap:total number of cells with aberrations except gap

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

a) Negative control (ethanol)

b) Positive control (mitomycin C)

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

Table 2 Chromosome aberration test in CHL cells treated with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) [Short-term treatment:+S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (hr)	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
Test substance	0 ^{a)}	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0(0.0)	200	0(0.0)
	1250+	6	73.7	200	1	0	1	0	0	0	1(0.5)	200	0(0.0)
	2500+	6	68.1	200	1	1	1	0	0	0	2(1.0)	200	1(0.5)
	5000+	6	69.1	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	200	0(0.0)
CP ^{b)}	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:others

-gap:total number of cells with aberrations except gap

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

a) Negative control (ethanol)

b) Positive control (cyclophosphamide)

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

Table 3 Chromosome aberration test in CHL cells treated with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) [Continuous treatment:24 hr]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (hr)	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
Test substance	0 ^{a)}	24	100.0	200	4	0	1	0	0	0	1(0.5)	200	1(0.5)
	1250+	24	78.9	200	0	0	1	0	0	0	1(0.5)	200	1(0.5)
	2500+	24	64.9	200	1	0	0	0	0	0	0(0.0)	200	0(0.0)
	5000+	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:others

-gap:total number of cells with aberrations except gap

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

a) Negative control (ethanol)

b) Positive control (mitomycin C)

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