

Table 4 Urinary findings of male rats treated orally with pentaerythritol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	pH				Pro			Glu	Ket	Occult blood
		7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	-	-	-
0	6	1 <sup>a)</sup>	1	1	3	3	1	2	6	6	6
100	6	0	0	0	6	2	4	0	6	6	6
300	6	0	0	0	6	0	6	0	6	6	6
1000	6	0	0	2	4	0	2	4	6	6	6

Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	Urinary sediments										
		Epithelial cell								Specific gravity		
		RBC	WBC	Squamous			Small round		Others	1.021- 1.030	1.031- 1.040	1.041- 1.050
				-	-	-	±	-				
0	6	6	6	6	0	6	6	6	0	4	2	
100	6	6	6	6	0	6	6	6	4	0	2	
300	6	6	6	5	1	6	6	6	1	3	2	
1000	6	6	6	5	1	6	6	6	1	1	4	

Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	U-Vol ml/21hr	U-Na mEq/21hr	U-K mEq/21hr	U-Cl mEq/21hr
0	6	19.17 <sup>b)</sup> ±5.46	0.8875 ±0.2926	3.2642 ±0.6782	1.5257 ±0.4575
100	6	19.17 ±3.76	0.7953 ±0.5028	2.6207 ±0.5896	1.0713 ±0.5461
300	6	20.67 ±5.65	1.2562 ±0.4137	3.5892 ±0.7058	1.7497 ±0.5971
1000	6	14.58 ±4.51	0.9180 ±0.4261	2.8787 ±0.4286	1.2005 ±0.4385

a: Values are no. of animals with findings.

b: Values are means ± S.D.

Table 5 Hematological findings of male rats treated orally with pentaerythritol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	RBC 10 <sup>6</sup> /μl	Ht. %	Hb. g/dl	MCV fl	MCH pg	MCHC %	WBC 10 <sup>3</sup> /μl	Plat 10 <sup>3</sup> /μl
0	11	8.421 <sup>a)</sup> ±0.331	47.49 ±1.79	15.79 ±0.68	56.41 ±1.52	18.70 ±0.39	33.19 ±0.57	12.96 ±3.50	1150.3 ±94.7
100	12	8.647 ±0.264	48.07 ±1.56	15.78 ±0.55	55.61 ±1.76	18.21 ±0.66	32.78 ±0.50	14.69 ±2.32	1148.6 ±96.4
300	12	8.613 ±0.335	48.00 ±1.51	15.58 ±0.39	55.75 ±1.16	18.08 * ±0.52	32.43 ** ±0.42	13.66 ±2.00	1079.3 ±94.7
1000	12	8.578 ±0.254	48.18 ±1.54	15.67 ±0.62	56.18 ±1.76	18.22 ±0.48	32.47 ** ±0.65	13.18 ±3.24	1097.3 ±151.6

Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	Ret. %	CT sec.	PT sec.	APTT sec.	Hemogram of WBC						
						Neutro.		Eos. %	Bas. %	Mono. %	Lymp. %	Others %
						Stab. %	Seg. %					
0	11	22.3 ±2.3	223.7 ±49.0	12.58 ±0.35	23.14 ±1.69	0.4 ±0.5	14.4 ±4.5	0.7 ±1.1	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	84.5 ±5.4	0.0 ±0.0
100	12	21.8 ±1.4	198.4 ±51.6	12.88 ±0.46	24.29 ±3.06	0.3 ±0.5	17.3 ±4.3	0.8 ±0.7	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	81.5 ±4.6	0.0 ±0.0
300	12	22.1 ±1.1	195.3 ±32.6	12.88 ±0.31	24.37 ±2.26	0.2 ±0.4	16.9 ±6.0	1.3 ±0.9	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	81.6 ±6.3	0.0 ±0.0
1000	12	21.8 ±1.4	191.8 ±69.9	12.81 ±0.39	25.35 ±1.84	0.2 ±0.4	15.8 ±6.5	1.1 ±0.5	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	83.0 ±6.6	0.0 ±0.0

a: Values are means ± S.D.

\*: Differs from control, p<0.05.

\*\*: Differs from control, p<0.01.

Table 6 Biochemical findings of male rats treated orally with pentaerythritol in the combined repeat-dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	TP g/dl	Alb g/dl	A/G	Protein fractions (%)				GOT IU/l	GPT IU/l	CHE IU/l	γ-GTP IU/l	
					Alb	Globulin							
						α <sub>1</sub>	α <sub>2</sub>	β					γ
0	11	6.38 <sup>a)</sup> ±0.24	2.48 ±0.09	0.634 ±0.027	46.85 ±1.42	23.54 ±1.95	7.05 ±0.50	17.47 ±1.32	5.08 ±0.98	97.7 ±14.2	29.2 ±4.5	57.6 ±26.9	1.19 ±0.34
100	12	6.42 ±0.22	2.48 ±0.09	0.623 ±0.031	46.58 ±1.48	23.72 ±1.36	7.08 ±0.55	17.42 ±0.80	5.22 ±0.62	102.8 ±18.5	29.5 ±4.7	64.0 ±29.2	1.18 ±0.40
300	12	6.23 ±0.22	2.42 ±0.12	0.630 ±0.034	46.69 ±1.54	23.50 ±1.82	7.13 ±0.89	17.41 ±0.81	5.28 ±0.73	105.7 ±19.0	30.4 ±6.8	51.4 ±17.6	1.34 ±0.39
1000	12	6.44 ±0.24	2.47 ±0.12	0.615 ±0.033	46.30 ±1.51	24.20 ±2.09	7.00 ±0.71	16.98 ±0.81	5.53 ±1.19	100.8 ±9.0	31.0 ±6.2	65.4 ±33.1	1.48 ±0.40

  

Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	T-Bil mg/dl	Glu mg/dl	T-Cho mg/dl	TG mg/dl	PL mg/dl	BUN mg/dl	Crea mg/dl	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l	Ca mg/dl	P mg/dl
100	12	0.10 ±0.00	147.4 ±10.1	67.8 ±15.1	77.8 ±23.7	118.3* ±15.3	16.47 ±1.86	0.55 ±0.08	144.13 ±0.96	5.001 ±0.230	105.3 ±1.3	9.75* ±0.24	7.32 ±0.74
300	12	0.10 ±0.00	148.2 ±13.1	60.3* ±14.2	90.8 ±22.3	115.0* ±18.5	16.40 ±1.07	0.54 ±0.07	143.75 ±1.41	4.919 ±0.269	104.7 ±1.2	9.71** ±0.25	7.24 ±0.58
1000	12	0.10 ±0.00	145.8 ±17.3	66.3 ±19.0	68.1 ±46.7	116.8 ±32.5	16.73 ±1.55	0.55 ±0.05	143.96 ±1.10	4.857 ±0.278	104.3 ±1.1	9.80 ±0.24	7.43 ±0.59

a: Values are means ± S.D.

\*: Differs from control, p<0.05.

\*\* : Differs from control, p<0.01.

Table 7 Histopathological findings of rats treated orally with pentaerythritol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	(Grade) <sup>e)</sup>	Male				Female			
		Pentaerythritol (mg/kg)				Pentaerythritol (mg/kg)			
		0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals examined		12 <sup>a)</sup>	12 <sup>a)</sup>	12 <sup>b)</sup>	12 <sup>a)</sup>	12 <sup>a)</sup>	12 <sup>b)</sup>	12 <sup>a,c)</sup>	
Organ : Findings <sup>d)</sup>	(Grade) <sup>e)</sup>								
Liver : Perilobular fatty change	(+)	0 <sup>f)</sup>	0	1	1	0	0	0	0
Focal necrosis of hepatocytes	(+)	0	0	0	0	0	2	0	1
Kidney (right/left) : Hyaline droplet deposition in tubular epithelium,									
mainly proximal tubules	(+)	5	6	2	4	0	0	0	0
Eosinophilic body deposition in tubular epithelium,									
mainly proximal tubules	(+)	4	3	2	2	0	0	0	0
Urinary cast	(+)	0	0	1	0	0	1	0	0
Focal regeneration of tubular epithelium	(+)	0	1	0	0	0	0	0	0
Regeneration of tubular epithelium	(+)	0	0	0	0	0	0	1	0
Dilation of renal pelvis	(+)	0	0	0	0	0	0	1	0
Dilation of tubules	(+)	0	0	0	0	0	0	1	0
Spleen : Fibrous adhesion to liver and intra-abdominal adipose tissue	(+)	0	0	0	0	1	0	0	0
Granuloma	<+>	0	0	0	0	1	0	0	0
Heart : Focal infiltration of cells, mainly histiocytes	(+)	1	0	0	0	0	0	0	0
Lung : Calcium deposition in blood vessel wall	(+)	2	3	2	3	1	0	0	1
Pituitary gland : Ciliated epithelial cyst	<+>	2	0	1	2	1	1	0	0
Retention of homogeneous plasma-like substance									
in Rathke's pouch	(+)	0	0	0	1	3	1	3	4
Thymus : Atrophy	(+)	0	0	0	0	1	0	0	1
Increase in RES cells in medulla	(++)	0	0	0	0	1	0	0	0
Ileum : Diverticulum	<+>	0	0	0	0	0	0	1	0
Prostate : Interstitial infiltration of cells, mainly lymphocytes	(+)	1	1	1	0	-	-	-	-
Ovaries : Lutein cyst	<+>	-	-	-	-	0	0	1	0

a: Includes two animals who or whose mate had no evidence of pregnancy.

b: Includes one animal who did not succeed in copulation.

c: Includes one animal whose pups all died.

d: There were no abnormal findings in the cerebrum, cerebellum, thyroid, adrenal, forestomach, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, testis or epididymis of all animals, and in the mammary gland, uterus or uterine cervix of one animal whose pups all died.

e: + = slight change, ++ = moderate change and <+> = detected.

f: Values are no. of animals with findings.

Table 8 Influence of pentaerythritol on reproductive and developmental performances of rats in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	Pentaerythritol(mg/kg)			
	0	100	300	1000
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of pairs with successful copulation	12	12	11	12
Copulation index <sup>a)</sup> (%)	100.0	100.0	91.7	100.0
No. of pregnant animals	10	10	11	10
Fertility index <sup>b)</sup> (%)	83.3	83.3	100.0	83.3
No. of corpora lutea	18.0 ± 2.1	18.2 ± 1.9	17.3 ± 2.8	18.5 ± 2.1
No. of implantation sites	16.6 ± 2.0	17.0 ± 1.2	14.9 ± 4.9	17.0 ± 1.2
Implantation index <sup>c)</sup> (%)	92.7 ± 8.9	93.9 ± 6.4	84.5 ± 22.9	92.5 ± 6.4
No. of pups born (%)	14.8 ± 2.6	16.1 ± 0.9	14.1 ± 4.5	15.4 ± 2.8
Delivery index <sup>d)</sup> (%)	89.0 ± 9.8	94.9 ± 4.9	95.1 ± 6.6	90.6 ± 14.9
Live pups born				
No.	14.3 ± 2.7	15.7 ± 0.9	13.9 ± 4.5	13.9 ± 4.0
Live birth index <sup>e)</sup> (%)	96.6 ± 6.0	97.6 ± 4.2	98.8 ± 2.8	91.7 ± 22.7
Sex ratio <sup>f)</sup>	1.0 ± 0.6	1.3 ± 0.9	1.1 ± 1.1	1.5 ± 1.5
Dead pups born				
No.	0.5 ± 0.8	0.4 ± 0.7	0.2 ± 0.4	1.5 ± 4.1
Gestation length (day)	22.2 ± 0.4	22.1 ± 0.3	22.0 ± 0.4	22.1 ± 0.3
Gestation index <sup>g)</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Nursing index <sup>h)</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	90.0 <sup>i)</sup>
Live pups on day 4				
No.	14.1 ± 2.8	15.6 ± 0.8	13.6 ± 4.3	14.8 ± 2.6 (9) <sup>j)</sup>
Viability index <sup>k)</sup> (%)	98.4 ± 3.5	99.4 ± 1.9	98.5 ± 3.5	99.3 ± 2.1 (9)
Body weight of pups (g)				
Male On day 0	6.74 ± 0.58	6.73 ± 0.41	6.66 ± 0.51 (10)	6.74 ± 0.60
Male On day 4	10.64 ± 1.52	10.29 ± 0.81	10.27 ± 1.12 (10)	10.23 ± 1.27 (9)
Female On day 0	6.40 ± 0.64	6.33 ± 0.43	6.49 ± 0.87	6.40 ± 0.59
Female On day 4	10.08 ± 1.74	9.73 ± 0.64	10.15 ± 1.99	9.66 ± 1.12 (9)

- a: (No. of pairs with successful copulation / no. of pairs mated) × 100.  
 b: (No. of pregnant animals / no. of pairs with successful copulation) × 100.  
 c: (No. of implantation sites / no. of corpora lutea) × 100.  
 d: (No. of pups born / no. of implantation sites) × 100.  
 e: (No. of live pups born / no. of pups born) × 100.  
 f: (No. of male pups / no. of female pups).  
 g: (No. of females with live pups delivered / no. of pregnant females) × 100.  
 h: (No. of females nursing live pups / no. of females with normal delivery) × 100.  
 i: All the pups at one litter died till day 1 of lactation.  
 j: Values in parentheses are no. of animals examined.  
 k: (No. of live pups on day 4 / no. of live pups born) × 100.

認められることから、母動物側に起因した全哺育児の死亡と判断された。しかしながら、本例のような例は背景データで認められることや、本試験において他に哺育異常例は認められないことおよび新生児の生存性に影響は認められないことから、本例はペンタエリスリトール投与との関連はないと考えられた。新生児の観察では、ペンタエリスリトール投与による影響は認められなかった。

以上より、ペンタエリスリトールの生殖発生に対する影響は認められないことから、本スクリーニング試験におけるペンタエリスリトールの雌雄動物の生殖および次世代の発生に対する無影響量は1000 mg/kg/dayであることが示された。

#### 連絡先

試験責任者：八幡昭子  
試験担当者：山田高士，長谷淳一，  
小林裕幸  
運営管理者：井本精一  
(株)化合物安全性研究所  
〒004 北海道札幌市豊平区真栄363番24号  
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

#### Correspondence

Authors : Akiko Yahata (Study director)  
Takashi Yamada, Jun-ichi Nagaya,  
Hiroyuki, Kobayashi,  
Seiichi Imoto (Management)  
Safety Research Institute for Chemical Compounds  
Co., Ltd.  
363-24 Shin-ei, Toyohira-ku, Sapporo, Hokkaido, 004,  
Japan  
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

# ペンタエリスリトールの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Pentaerythritol on Bacteria

### 要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、ペンタエリスリトールについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537<sup>1)</sup> および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験は、50~5000 µg/プレートの用量で、本試験は312.5~5000 µg/プレートの用量で試験を行った。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、ペンタエリスリトールは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

### 材料および試験方法

#### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium*の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は、-80°C以下で凍結保存した。各検定菌は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 (*pKM101*) の有無についての特性確認を行った。試験に際して、ニュートリエントプロスNo.2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37°C、約10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

#### 〔被験物質〕

ペンタエリスリトール (CAS No. 115-77-5) は、白色粉末である。純度92.7%のもの (ロット番号: 50825, 不純物としてジペンタエリスリトール (2.2%), ビスペンタエ

リスリトール (4.9%) および不明 (0.2%) を含む、三菱瓦斯化学(株)製造を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

ペンタエリスリトールは、純水に50 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし約3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、ペンタエリスリトールの純水溶液中での安定性試験を低濃度 (3.125 mg/ml) および高濃度 (50 mg/ml) の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後4時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値 (0時間) の平均に対して、103 および101%であった。

また、本試験IIに用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、3.125 mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し、97.1~99.8%、50 mg/ml溶液は、95.2~98.7%であった。

以上の結果から、ペンタエリスリトールは純水溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

#### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : フリルフラマイド (上野製薬(株))  
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))  
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem.Co.)  
2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2, 2AAはDMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを-20°Cで凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

#### 〔培地およびS9混液の組成〕

##### 1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B) * L-ヒスチジン	0.5 mM
ビオチン	0.5 mM

\* : WP2 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1リットルあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸一アンモニウム	1.92g
水酸化ナトリウム	0.66g
グルコース	20g
バクト・アガー (Difco)	15g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mlを流して固めてある。

3) S9混液 (1 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 mmol
塩化カリウム	33 mmol
グルコース・6リン酸	5 mmol
NADH	4 mmol
NADPH	4 mmol
0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 mmol

\*\* : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン(株))を用いた。

〔試験方法〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトップアガー2 ml, 被験物質調製液0.1 ml, リン酸緩衝液0.5 ml(代謝活性化試験においてはS9混液0.5 ml), 検定菌液0.1 mlを混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに純水, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量はTable1, 2に示した。培養は37°Cで48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

50~5000 µg/プレートの範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、いずれの検定菌においても、すべての

用量で抗菌性は認められなかったことから、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、直接法、代謝活性化法ともに5000 µg/プレートとすることとした。

〔本試験〕

結果をTable1, 2に示した。ペンタエリスリトールについて、312.5~5000 µg/プレートの範囲で、公比を2とし、試験を実施した。2回の試験において、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニーの増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、ペンタエリスリトールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, and B.N. Ames, *Mutation Research.*, 113, 173 (1983).
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹

試験担当者：坂本京子, 加藤基恵, 堀谷尚古,  
川上久美子, 松木容彦,  
北嶋美以子, 中込まどか

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257神奈川県秦野市落合 729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)

Kyoko Sakamoto, Motoe Katoh, Naoko  
Horiya, Kumiko Kawakami,  
Yasuhiko Matsuki, Miiko Kitashima,  
and Madoka Nakagomi

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257, Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with pentaerythritol\*\* on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	Solvent control	127	105	118	8	16	19	17	13	18	21	24	21	6	7	5
		( 117 $\pm$ 11.1 )			( 14 $\pm$ 5.7 )			( 16 $\pm$ 2.6 )			( 22 $\pm$ 1.7 )			( 6 $\pm$ 1.0 )		
	312.5	111	96	94	8	9	10	25	18	23	17	20	23	6	8	9
		( 100 $\pm$ 9.3 )			( 9 $\pm$ 1.0 )			( 22 $\pm$ 3.6 )			( 20 $\pm$ 3.0 )			( 8 $\pm$ 1.5 )		
	625	114	129	116	12	18	11	24	27	34	19	20	21	8	4	10
		( 120 $\pm$ 8.1 )			( 14 $\pm$ 3.8 )			( 28 $\pm$ 5.1 )			( 20 $\pm$ 1.0 )			( 7 $\pm$ 3.1 )		
	1250	94	92	124	11	14	10	23	21	29	20	21	27	5	8	6
	( 103 $\pm$ 17.9 )			( 12 $\pm$ 2.1 )			( 24 $\pm$ 4.2 )			( 23 $\pm$ 3.8 )			( 6 $\pm$ 1.5 )			
2500	126	104	112	14	12	12	18	25	27	20	26	30	4	1	8	
	( 114 $\pm$ 11.1 )			( 13 $\pm$ 1.2 )			( 23 $\pm$ 4.7 )			( 25 $\pm$ 5.0 )			( 4 $\pm$ 3.5 )			
5000	136	88	109	12	5	6	14	19	32	18	27	13	7	3	7	
	( 111 $\pm$ 24.1 )			( 8 $\pm$ 3.8 )			( 22 $\pm$ 9.3 )			( 19 $\pm$ 7.1 )			( 6 $\pm$ 2.3 )			
S9 Mix (+)	Solvent control	145	145	140	14	12	12	15	23	21	27	38	28	6	12	6
		( 143 $\pm$ 2.9 )			( 13 $\pm$ 1.2 )			( 20 $\pm$ 4.2 )			( 31 $\pm$ 6.1 )			( 8 $\pm$ 3.5 )		
	312.5	131	138	112	15	9	10	38	20	33	28	26	30	11	16	10
		( 127 $\pm$ 13.5 )			( 11 $\pm$ 3.2 )			( 30 $\pm$ 9.3 )			( 28 $\pm$ 2.0 )			( 12 $\pm$ 3.2 )		
	625	136	122	136	16	11	15	24	28	25	33	26	26	10	10	10
		( 131 $\pm$ 8.1 )			( 14 $\pm$ 2.6 )			( 26 $\pm$ 2.1 )			( 28 $\pm$ 4.0 )			( 10 $\pm$ 0.0 )		
1250	113	131	126	11	15	14	33	18	30	31	25	29	12	10	8	
	( 123 $\pm$ 9.3 )			( 13 $\pm$ 2.1 )			( 27 $\pm$ 7.9 )			( 28 $\pm$ 3.1 )			( 10 $\pm$ 2.0 )			
2500	124	105	117	15	11	7	30	26	27	32	25	29	18	6	15	
	( 115 $\pm$ 9.6 )			( 11 $\pm$ 4.0 )			( 28 $\pm$ 2.1 )			( 29 $\pm$ 3.5 )			( 13 $\pm$ 6.2 )			
5000	138	118	127	7	12	12	29	23	18	27	24	27	15	17	7	
	( 128 $\pm$ 10.0 )			( 10 $\pm$ 2.9 )			( 23 $\pm$ 5.5 )			( 26 $\pm$ 1.7 )			( 13 $\pm$ 5.3 )			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	357	322	366	212	225	228	115	140	149	593	624	696	1103	1060	993
		( 348 $\pm$ 23.2 )			( 222 $\pm$ 8.5 )			( 135 $\pm$ 17.6 )			( 638 $\pm$ 52.8 )			( 1052 $\pm$ 55.4 )		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	898	784	873	343	337	291	1136	1229	1281	371	384	400	226	254	253
		( 852 $\pm$ 59.9 )			( 324 $\pm$ 28.4 )			( 1215 $\pm$ 73.5 )			( 385 $\pm$ 14.5 )			( 244 $\pm$ 15.9 )		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*\* : Purity was 92.7 % and dipentaerythritol (2.2 %) and bispentaerythritol (4.9 %) were contained as impurity.

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay ( II ) with pentaerythritol \*\*on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	Solvent control	109	138	115	9	9	11	27	35	20	20	21	16	7	6	6
		( 121 $\pm$ 15.3 )			( 10 $\pm$ 1.2 )			( 27 $\pm$ 7.5 )			( 19 $\pm$ 2.6 )			( 6 $\pm$ 0.6 )		
	312.5	123	132	135	11	15	12	31	22	35	19	19	19	7	5	7
		( 130 $\pm$ 6.2 )			( 13 $\pm$ 2.1 )			( 29 $\pm$ 6.7 )			( 19 $\pm$ 0.0 )			( 6 $\pm$ 1.2 )		
	625	136	111	123	12	17	10	23	26	26	22	18	20	7	7	4
		( 123 $\pm$ 12.5 )			( 13 $\pm$ 3.6 )			( 25 $\pm$ 1.7 )			( 20 $\pm$ 2.0 )			( 6 $\pm$ 1.7 )		
	1250	133	135	114	22	8	12	20	27	18	16	22	21	7	10	12
	( 127 $\pm$ 11.6 )			( 14 $\pm$ 7.2 )			( 22 $\pm$ 4.7 )			( 20 $\pm$ 3.2 )			( 10 $\pm$ 2.5 )			
2500	135	137	121	8	11	7	27	31	19	14	22	25	9	9	8	
	( 131 $\pm$ 8.7 )			( 9 $\pm$ 2.1 )			( 26 $\pm$ 6.1 )			( 20 $\pm$ 5.7 )			( 9 $\pm$ 0.6 )			
5000	118	123	134	11	13	10	28	23	27	12	20	24	11	10	8	
	( 125 $\pm$ 8.2 )			( 11 $\pm$ 1.5 )			( 26 $\pm$ 2.6 )			( 19 $\pm$ 6.1 )			( 10 $\pm$ 1.5 )			
S9 Mix (+)	Solvent control	118	126	133	6	8	15	31	23	25	31	33	38	10	8	13
		( 126 $\pm$ 7.5 )			( 10 $\pm$ 4.7 )			( 26 $\pm$ 4.2 )			( 34 $\pm$ 3.6 )			( 10 $\pm$ 2.5 )		
	312.5	160	158	144	18	13	13	27	32	33	32	35	27	15	9	12
		( 154 $\pm$ 8.7 )			( 15 $\pm$ 2.9 )			( 31 $\pm$ 3.2 )			( 31 $\pm$ 4.0 )			( 12 $\pm$ 3.0 )		
	625	145	153	131	13	19	10	26	32	39	34	27	27	13	10	20
		( 143 $\pm$ 11.1 )			( 14 $\pm$ 4.6 )			( 32 $\pm$ 6.5 )			( 29 $\pm$ 4.0 )			( 14 $\pm$ 5.1 )		
	1250	140	155	149	17	17	15	22	20	23	27	37	32	15	17	12
	( 148 $\pm$ 7.5 )			( 16 $\pm$ 1.2 )			( 22 $\pm$ 1.5 )			( 32 $\pm$ 5.0 )			( 15 $\pm$ 2.5 )			
2500	132	122	138	11	19	18	30	28	34	43	36	30	5	12	18	
	( 131 $\pm$ 8.1 )			( 16 $\pm$ 4.4 )			( 31 $\pm$ 3.1 )			( 36 $\pm$ 6.5 )			( 12 $\pm$ 6.5 )			
5000	128	127	134	7	9	15	27	29	22	30	32	29	10	10	7	
	( 130 $\pm$ 3.8 )			( 10 $\pm$ 4.2 )			( 26 $\pm$ 3.6 )			( 30 $\pm$ 1.5 )			( 9 $\pm$ 1.7 )			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	532	483	500	334	338	344	175	210	242	948	957	930	1342	1484	1621
		( 505 $\pm$ 24.9 )			( 339 $\pm$ 5.0 )			( 209 $\pm$ 33.5 )			( 945 $\pm$ 13.7 )			( 1482 $\pm$ 139.5 )		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	738	913	943	324	312	299	1493	1584	1615	435	400	431	288	329	308
		( 865 $\pm$ 110.7 )			( 312 $\pm$ 12.5 )			( 1564 $\pm$ 63.4 )			( 422 $\pm$ 19.2 )			( 308 $\pm$ 20.5 )		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene  
 \*\*: Purity was 92.7 % and dipentaerythritol (2.2 %) and bispentaerythritol (4.9 %) were contained as impurity.

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

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test of  
Pentaerythritol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、ペンタエリスリトールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(24および48時間)、短時間処理(6時間)ともに、1.4 mg/ml (10 mM) の濃度においても明確な増殖抑制作用が認められなかった。従って、すべての試験において、1.4 mg/ml (10 mM) の濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理として、S9 mix非存在下における24時間および48時間処理、短時間処理としてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)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。

CHL/IU細胞を24および時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。また、短時間処理では、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や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、ペンタエリスリトールは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク (JCRB) から入手(1988年2月, 入手時: 継代4代, 現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS: JRH BIOSCIENCES) を10%添加したイーグルMEM (日本製薬(株)) 培養液を用いた。

3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ (径6 cm, Corning) に播き、37°CのCO<sub>2</sub> インキューベ-

ター (5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

ペンタエリスリトール (略号: PE, CAS No.: 115-77-5, ロット番号: 50825, 三菱ガス化学(株)製造, (社)日本化学工業協会提供) は、白色粉末で、水に対する溶解度は7.23 g/100 g, ジメチルスルホキシドに対する溶解度は4.5 g/100 gでアセトンに難溶, 融点261~262°C, 沸点276°C/30 mmHg, 分子式C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>, 分子量136.17, 純度92.7% (不純物として、ビスペンタエリスリトール (4.9%), ジペンタエリスリトール (2.2%) を含む) の物質である。被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(注射用蒸留水)での安定性試験では、3.125~50.00 mg/mlの濃度範囲で4時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒として注射用水(株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液(増殖抑制試験, 染色体異常試験ともに14 mg/ml)を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお、濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計 (Monocellater™, オリンパス光学工業(株)) を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の陰性対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を越える増殖抑制は認められなかった (Fig. 1)。