

3,5,5-トリメチルヘキサン酸のラットを用いた強制経口投与による肝中期発がん性試験 日本バイオアッセイ研究センター

1 被験物質

1.1 名称等

名称	: 3,5,5-トリメチルヘキサン酸 (3,5,5-Trimethylhexanoic acid) (別名 イソノナン酸)
製造元	: 富士フイルム和光純薬(株)
CAS No.	: 3302-10-1
ロット番号	: KCQ5746
純度	: 98.4%
分子量	: 158.24

1.2 物理化学的性状等

外観及び性状	: 無色～わずかにうすい黄色、液体
融点	: -60℃
溶解性	: 難溶

1.3 製造・輸入量及び用途

製造・輸入量	: 2,000 t (平成 24 年度)
用途	: 合成潤滑油原料、防錆添加剤、金属石けん原料 等

1.4 有害性情報 (文献 1)

急性毒性	: LD50 : 1160～3135 mg / kg body (ラット経口)
刺激性	: 皮膚・眼 : 刺激性なし～中程度 (ウサギ)
遺伝毒性	: エームス試験 : 陰性
細胞形質転換	: Bhas42 形質転換試験 : 陽性 (2019 年度)
特定標的臓器毒性	: 肝臓の小葉明瞭化、腎臓の淡色化 ラット強制経口 14 日間試験 LOAEL 100 mg / kg body weight day

2 目的

F344/DuCrIcrlj ラットを用いた肝中期発がん性試験 (伊東法) を用いて、3,5,5-トリメチルヘキサン酸の肝臓に対するプロモーション作用の有無を検索し、その発がん性を予測した。

3 方法

試験は、被験物質投与群 3 群、媒体対照群及び陽性対照群の計 5 群の構成で、各群 22 匹の F344 ラット (雄 6 週齢) を用いて行った。起始物質として *N*-ニトロソジエチルアミン (DEN) 200 mg/kg を単回腹腔内へ投与した後、第 3 週目より 6 週間、オリブ油に溶解させた被験物質を 0 (媒体対照群)、150、300 及び 600 mg/kg の用量で毎日 1 回強制経口投与した。陽性対照群にはフェノバ

ルビタールナトリウムを 25 mg/kg の用量で、毎日 1 回強制経口投与した。DEN 処置後、第 3 週目の終わりに肝臓の 2/3 を切除する手術を行った。なお、600 mg/kg 群については、投与開始後に顕著な体重減少がみられ、これによる死亡（2 匹）も認められたことから、手術後の 3～4 日間は投与量を 300 mg/kg に減少させ、動物の回復状況を確認してから 600 mg/kg に復帰させた。600 mg/kg 群はこの条件での評価になる。

動物は投与終了日の翌日に安楽死させ、肝臓の前腫瘍性病変である胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巢（直径 0.2 mm 以上）の数及び面積を計測し、肝臓単位面積当たりの陽性細胞巢の数及び面積を計測した。

4 投与量設定の理由

被験物質の投与量は、以下に示す用量設定試験の結果を基に決定した。用量設定試験は、3 週間反復投与試験及び部分肝切除した動物を用いる 2 週間反復投与試験を実施した。

3 週間反復投与試験では、被験物質投与量を 0（媒体対照、オリーブ油）、30、100、300 及び 600 mg/kg に設定して、6 週齢で DEN を 200 mg/kg 腹腔内投与した雄の F344 ラットに 8 週齢から毎日、3 週間、強制経口投与し、投与終了翌日に剖検した。その結果、100 mg/kg 以上で投与量に対応した肝臓重量（実重量、体重比）の増加、300 mg/kg 以上では体重増加の抑制がみられ、特に 600 mg/kg では投与初期の体重は開始時に比較して減少したが、その後増加に転じて、投与期間中に死亡した動物はなかった。

この結果を基に、部分肝切除した動物を用いる 2 週間反復投与試験を実施した。被験物質投与量は 0（媒体対照、オリーブ油）、100、300 及び 600 mg/kg とし、9 週齢で部分肝切除した雄の F344 ラットに、部分肝切除翌日から毎日、2 週間、強制経口投与した。その結果、600 mg/kg では投与開始初期の投与後に自発運動の減少がみられ、投与初期の体重は開始時に比較して減少したが、その後は回復が認められた。

以上の結果から、動物は 600 mg/kg の投与量でも部分肝切除及び 6 週間の投与に耐え得ると判断し、本試験では、高用量を 600 mg/kg として、公比 2 で除して中用量を 300 mg/kg、低用量を 150 mg/kg とした。

5 結果

要精査動物除外前	要精査動物除外後 (600 mg/kg 群の 3 匹を除外)
<p>600 mg/kg 群では被験物質投与 1 週目に、体重の急激な減少により 2 匹が死亡した。体重の推移については、600 mg/kg 群は被験物質投与期間を通して、また、300 mg/kg 群は手術後 1 週間程度、増加抑制が認められた (図 1)。摂餌量の推移については、600 mg/kg 群には、被験物質投与開始 1 週目に著しい摂餌量の減少がみられたが、その後は増加に転じた。肝臓及び腎臓の重量は、150 mg/kg 以上の群で実重量、重量体重比ともに増加、特に肝臓重量の増加は顕著であった (表 1)。この肝臓重量増加は、病理組織学検査において、びまん性の肝細胞肥大として観察された。腎臓には 150 mg/kg 以上の群で近位尿細管の好酸滴が観察され、150 mg/kg 群と 300 mg/kg 群には近位尿細管上皮の再生も認められた。肝臓の GST-P 陽性細胞巢は、単位面積当たりの数は 150 mg/kg 以上の群に、単位面積当たりの面積は 150 mg/kg 群と 600 mg/kg 群で増加が認められた (表 2)。</p>	<p><u>本試験結果は、「日本バイオアッセイ研究センターにおける試験手順書からの逸脱行為事案に関する検討会」の調査結果を踏まえ、「日本バイオアッセイ研究センターにおける試験手順書からの逸脱行為事案による規制等への影響評価に関する検討会」の報告書の整理に従い、「要精査動物」とされた最高用量 600 mg/kg 群の 3 匹を除外した結果である。</u></p> <p><u>従って、GST-P 陽性細胞巢の評価対象とした有効動物数は、媒体対照群 18 匹、150 mg/kg 群 18 匹、300 mg/kg 群 20 匹、600 mg/kg 群 15 匹、陽性対照群 19 匹とした。</u></p> <p>600 mg/kg 群では被験物質投与 1 週目に、体重の急激な減少により 2 匹が死亡した。体重の推移については、600 mg/kg 群は被験物質投与期間を通して、また、300 mg/kg 群は手術後 1 週間程度、増加抑制が認められた (図 2)。摂餌量の推移については、600 mg/kg 群には、被験物質投与開始 1 週目に著しい摂餌量の減少がみられたが、その後は増加に転じた。肝臓及び腎臓の重量は、150 mg/kg 以上の群で実重量、重量体重比ともに増加、特に肝臓重量の増加は顕著であった (表 1: 600mg/kg 群下段 ()内)。この肝臓重量増加は、病理組織学検査において、びまん性の肝細胞肥大として観察された。腎臓には 150 mg/kg 以上の群で近位尿細管の好酸滴が観察され、150 mg/kg 群と 300 mg/kg 群には近位尿細管上皮の再生も認められた。肝臓の GST-P 陽性細胞巢は、単位面積当たりの数は 150 mg/kg 以上の群に、単位面積当たりの面積は 150 mg/kg 群と 600 mg/kg 群で増加が認められた (表 2: 600mg/kg 群下段 ()内)。</p> <p><u>なお、600 mg/kg 群の 3 匹を除外した結果を「要精査動物除外前」と比較した結果、①体重推移、②肝臓重量 (絶対重量・相対重量)、③GST-P 陽性細胞巢 (数及び面積)のいずれも、データ平均</u></p>

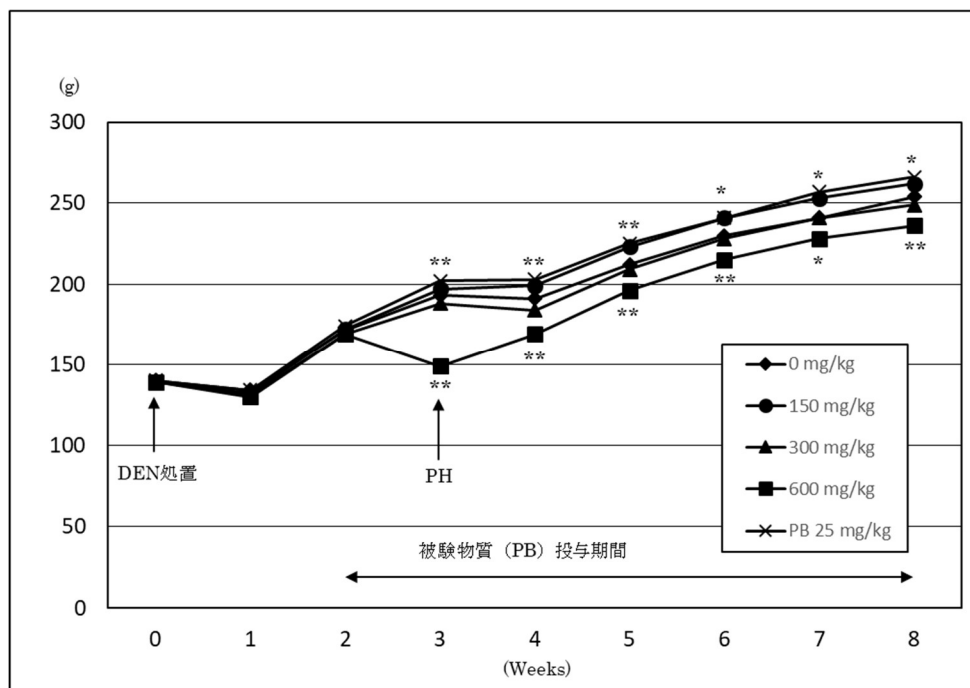
<p>陽性対照群では、体重及び摂餌量が高値で推移し、肝臓、腎臓重量についても実重量、重量体重比ともに高値を示した。また、肝臓の GST-P 陽性細胞巢については単位面積当たりの数、面積が媒体対照群に比較して高値であったことから肝臓に対する発がんプロモーション作用は陽性であることを確認した。</p>	<p><u>値の差は僅かであり、統計検定結果においても差はなかった。</u></p> <p>陽性対照群では、体重及び摂餌量が高値で推移し、肝臓、腎臓重量についても実重量、重量体重比ともに高値を示した。また、肝臓の GST-P 陽性細胞巢については単位面積当たりの数、面積が媒体対照群に比較して高値であったことから肝臓に対する発がんプロモーション作用は陽性であることを確認した。</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6 結論

要精査動物除外前	要精査動物除外後 (600 mg/kg 群の 3 匹を除外)
<p>以上の結果から、3,5,5-トリメチルヘキサン酸は、本試験条件下で肝臓に対する発がんプロモーション作用を示すと結論した。</p>	<p>以上の結果から、3,5,5-トリメチルヘキサン酸は、本試験条件下で肝臓に対する発がんプロモーション作用を示すと結論した。</p>

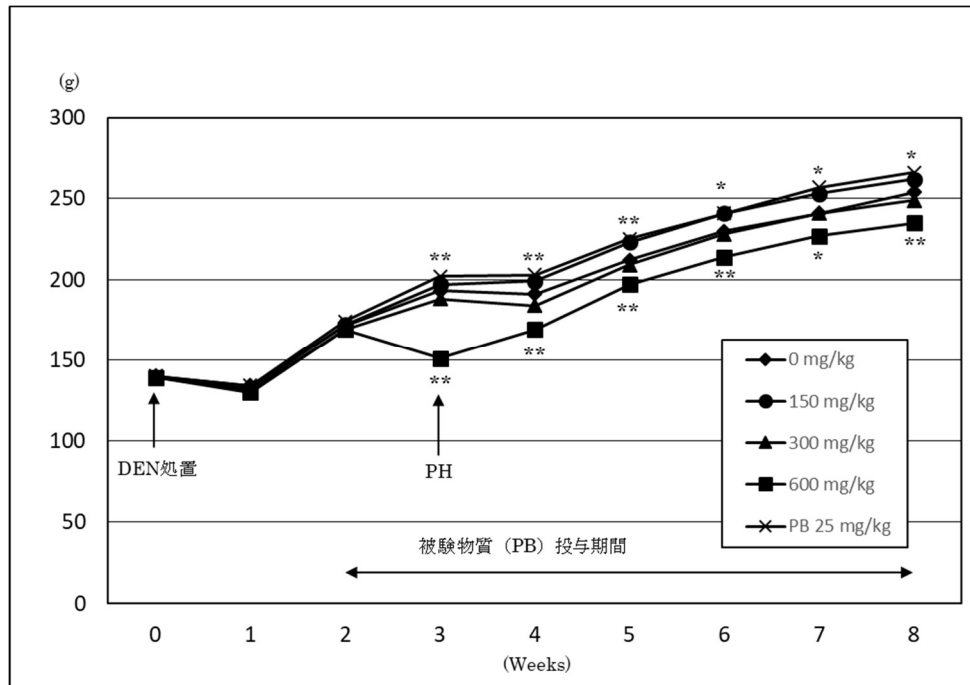
7 文献

- 1) Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) 2009. Isononansäure (technisches Isomerenmisch) [MAK Value Documentation in German language, 2009]



*, ** : Significantly different from control group at $p < 0.05$, $p < 0.01$.

図1 3,5,5-トリメチルヘキサノ酸の肝中期発がん性試験における体重推移 (要精査動物除外前)



*, ** : Significantly different from control group at $p < 0.05$, $p < 0.01$.

図2 3,5,5-トリメチルヘキサノ酸の肝中期発がん性試験における体重推移 (要精査動物 600 mg/kg 群の 3 匹を除外)

表1 3,5,5-トリメチルヘキサン酸の肝中期発がん性試験における肝臓重量結果

投与量 (mg/kg/day)	有効 動物数	剖検時体重 ^a (g)	肝臓絶対重量 (g)	肝臓相対重量 (%)
0	18	237 ± 14	5.616 ± 0.552	2.364 ± 0.169
150	18	243 ± 14	7.615 ± 0.558**	3.136 ± 0.119**
300	21	230 ± 15	8.559 ± 0.859**	3.736 ± 0.397**
600	19 (16)	212 ± 17** (211 ± 17**)	9.959 ± 0.796** (9.872 ± 0.794**)	4.694 ± 0.204** (4.677 ± 0.218**)
PB 25	19	246 ± 15	7.711 ± 0.476**	3.138 ± 0.131**

^a: The value presented were obtained after the animals were fasted overnight.

** : Significantly different from control group at p<0.01.

(): 600 mg/kg 群の要精査動物 3 匹を除外

表2 3,5,5-トリメチルヘキサン酸の肝中期発がん性試験における免疫組織化学的検査結果

投与量 (mg/kg/day)	有効 動物数	GST-P 陽性細胞巢	
		陽性細胞巢数 (No./cm ²)	陽性細胞巢面積 (mm ² /cm ²)
0	18	5.115 ± 2.400	0.561 ± 0.305
150	18	8.064 ± 2.231**	0.928 ± 0.355**
300	20 ^{a)}	7.279 ± 2.437*	0.725 ± 0.280
600	18 ^{a)} (15)	7.568 ± 2.029** (7.600 ± 1.757**)	0.924 ± 0.183** (0.934 ± 0.198**)
PB 25	19	9.333 ± 2.066**	1.075 ± 0.443**

*, ** : Significantly different from control group at p<0.05, p<0.01.

a): 肝臓の細胆管の増殖が広く顕著に認められ、解析に必要な肝実質細胞領域（面積）が少ないことから、GST-P 陽性細胞巢の本解析から各 1 匹除外

(): 600 mg/kg 群の要精査動物 3 匹を除外