厚生省生活衛生局　殿

最 終 報 告 書

2-エチル酪酸のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

（試験番号：9L772）

2001 年 4 月 24 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

目　次

要約 ---------- 7

材料および方法 ---------- 8

1. 試験物質 ---------- 8

2. 細胞 ---------- 9

3. 培地 ---------- 9

4. S9 mix ---------- 10

5. 試験方法 ---------- 10

結果 ---------- 16

考察および結論 ---------- 17

参考文献 ---------- 17

表 ---------- 18

図 ---------- 21

要　約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い，2-エチル酪酸の *in vitro* における染色体異常試験を実施した．

予備試験の結果に基づいて，短時間処理法の細胞増殖抑制試験は，S9 mix 非共存下（－ S9 mix）および S9 mix 共存下（＋ S9 mix）で 250，500，1000，2000，3000，4000 μg/ml を設定した．その結果，被験物質の 50 %細胞増殖抑制用量（IC_{50}）は － S9 mix では 1002 μg/ml，＋ S9 mix では 1002 μg/ml であった．

この結果に基づき，短時間処理法の染色体異常試験は，－ S9 mix および＋ S9 mix で 200，400，800，1600 μg/ml を設定した．標本観察の結果，－ S9 mix および＋ S9 mix のいずれの用量においても，染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5 %未満であった．そこで，短時間処理法における染色体異常誘発性は陰性と判定し，引き続き連続処理法 24 時間処理を実施した．

予備試験の結果に基づいて，連続処理法の細胞増殖抑制試験は 1000，1200，1400，1600，1800，2000 μg/ml を設定した．その結果，IC_{50} は 1272 μg/ml であった．

この結果に基づき，連続処理法の染色体異常試験は，400，800，1200，1600 μg/ml を設定した．標本観察の結果，1200，1600 μg/ml において，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度はそれぞれ 17.0，74.0 %となった．

従って，2-エチル酪酸は，本試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有すると結論した．

材料および方法

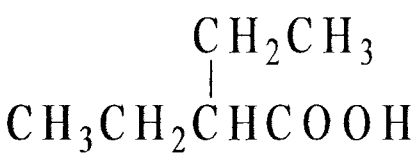
1. 試験物質

1.1 被験物質

1) 被験物質

から提供された 2-エチル酪酸(CAS 番号 88-09-5，ロット番号 ，純度 99.2 %)は，使用時まで冷蔵・暗所で保存した．被験物質は下記の構造式，分子量および不純物を有する無色液体である．

構造式：



分子量：116.16

不純物：水分 0.03 %

2) 被験物質溶液の調製

溶媒検討および予備試験において，本被験物質の溶媒を検討した．その結果，本被験物質は生理食塩液（以下生食）には 50 mg/ml で不溶であった．1 %カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液には 50 mg/ml で均一に懸濁しなかった．一方，ジメチルスルホキシド(以下 DMSO）には 900 mg/ml（添加時最終用量：4500 μg/ml），アセトンには 500 mg/ml（添加時最終用量：5000 μg/ml）でそれぞれ溶解した．予備試験の結果，4500 μg/ml（溶媒：DMSO）における細胞生存率が 0 %であった．これらの結果から，本被験物質の溶媒には DMSO を用いた．

被験物質を DMSO で所定用量に用時溶解した．これを同じ溶媒で希釈し，所定用量の被験物質溶液を調製した．

1.2 陰性対照物質

DMSO（関東化学㈱，ロット番号：

010G1456[短時間処理法]，純度：99.7 %

104G1307[連続処理法　細胞増殖抑制試験]，純度：99.7 %

108G2036[連続処理法　染色体異常試験]，純度：99.7 %)

1.3 陽性対照物質

1) 陽性対照物質

マイトマイシンC

（以下MMC，協和発酵工業㈱，ロット番号：283AIG，含量 104 %；短時間処理法，286AIH，含量 109 %；連続処理法）

ベンゾ〔a〕ピレン

（以下BP，東京化成工業㈱，ロット番号：GG01，含量 95.6 %）

2) 陽性対照物質の調製

MMCは，生食（㈱大塚製薬工場，ロット番号：K9H99；短時間処理法，K9L78；連続処理法）に用時溶解した（短時間処理法：1 μg/ml，連続処理法：0.3 μg/ml）．BPは，DMSO（関東化学㈱，ロット番号：104G1307）に4 mg/mlで溶解し，使用時まで凍結保存した．

2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株CHL/IUを使用した．細胞は大日本製薬㈱より1999年8月3日に購入し，細胞懸濁液に対し最終10 %の割合でDMSOを添加したものを1 mlに小分けして，液体窒素中で凍結保存した．試験には，これを融解して培養し，その後の継代数が5代以内のものを使用した．細胞の培養には，プラスチックプレート（直径6 cmまたは10 cm； Becton Dickinson and Company）を用い，炭酸ガス細胞培養装置内（炭酸ガス5 %，温度37 ℃，加湿，NAPCO社，7300型）で培養した．

3. 培地

3.1 MEM

イーグルMEM培地「ニッスイ」①（日水製薬㈱）約8.3 gを精製水880 mlに溶解し，オートクレーブ滅菌（121 ℃，15分間）後，別に滅菌処理した2.92 % L-グルタミン水溶液と10 %炭酸水素ナトリウム水溶液をそれぞれ8.8 ml，11.2 ml添加した．この溶液を以下MEMとする．

3.2 培養液

MEM 900 mlに，非働化（56 ℃, 30分間加熱処理）した仔牛血清(GIBCO BRL, ロ

ット番号：1019033）を 100 ml 添加した．

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール（1 日目 30 mg/kg，2 日目以降 60 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与）と 5, 6- ベンゾフラボン（3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与）で酵素誘導した SD 系雄ラット肝由来 S9（キッコーマン㈱，ロット番号：RAA-412，1999 年 9 月 3 日製造）を購入した．購入した S9 は使用時まで -80 ℃ 以下に設定した超低温冷凍庫内で保存した．

4.2 S9 mix

S9 mix 1 ml あたり以下の組成で用時調製し，使用時まで氷中に保存した．

S9	0.3 ml
D- グルコース -6- リン酸	5 μ mol
β -NADP $^{+}$	4 μ mol
HEPES（pH 7.2）	4 μ mol
塩化マグネシウム六水和物	5 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
精製水	残量

5. 試験方法

5.1 短時間処理法

1) 細胞増殖抑制試験

(1) 試験物質用量

細胞増殖抑制試験に先立ち，S9 mix 非共存下（以下－ S9 mix）および共存下（以下＋ S9 mix）で，45，450，4500 μg/ml の 3 用量（溶媒：DMSO）ならびに 50，500，5000 μg/ml の 3 用量（溶媒：アセトン）で予備試験を実施した．この試験では，1 用量あたり 1 枚のプレートを用い，細胞の状態を位相差倒立顕微鏡を用いて観察した．

その結果，陰性対照と比較した細胞生存率は下記の通りであった．

溶媒：DMSO

処理群 ＼ 用量（μg/ml）	45	450	4500
－ S9 mix	100 %	100 %	0 %
＋ S9 mix	100 %	100 %	0 %

溶媒：アセトン

処理群 ＼ 用量（μg/ml）	50	500	5000
－ S9 mix	100 %	100 %	0 %
＋ S9 mix	100 %	100 %	0 %

以上の結果から，細胞増殖抑制試験は，溶媒を DMSO として下記の用量を設定した．

－ S9 mix：250，500，1000，2000，3000，4000 μg/ml

＋ S9 mix：250，500，1000，2000，3000，4000 μg/ml

なお，いずれの溶媒を使用した場合も，高用量群において被験物質添加時に培養液色の黄変が認められた．この結果から，細胞増殖抑制試験および染色体異常試験において，被験物質処理開始時および終了時（短時間処理法では 6 時間処理終了時）の細胞処理液の pH を測定した．

(2) 細胞処理

4×10^3 個/ml に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 ml ずつ播き，3 日間培養した．

培養液を除去した後，下記の組成の細胞処理液を 1 用量あたり 2 枚のプレートに加え 6 時間細胞を処理した．6 時間後，MEM で細胞表面を 1 回洗浄し，新しい培養液 5 ml でさらに 18 時間処理した．

	被験物質溶液 または陰性対照物質	S9 mix	培養液
－ S9 mix	0.015 ml	―――	3.0 ml
＋ S9 mix	0.015 ml	0.5 ml	2.5 ml

処理開始時および 6 時間処理終了時に陰性対照と全処理用量について，細胞処理液を微量採取し，pH を pH メーター（twin pH B-212，㈱堀場製作所）で測定した．

(3) 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca^{2+}，Mg^{2+} フリーのリン酸緩衝液（以下 PBS(-)，ダルベッコ PBS「ニッスイ」，日水製薬㈱）で洗浄後，0.25 %トリプシン処理し，培養液を加えて細胞を剥離した後，血球計算盤で細胞を計数した．

(4) 50 %細胞増殖抑制用量の算出

各処理条件について，陰性対照値を 100 %として生存曲線を作成し，被験物質の 50 %細胞増殖抑制用量(IC_{50})を算出した．なおIC_{50}は，細胞増殖率が 50 %を示す用量を挟む 2 点を結ぶ直線式より算出した．

2) 染色体異常試験

(1) 試験物質用量

短時間処理法の細胞増殖抑制試験の結果は図１，２に示すごとく，IC_{50}は－ S9 mix および＋ S9 mix で共に 1002 μg/ml であった．

この結果に基づき，短時間処理法の染色体異常試験は，下記の用量を設定した．

－ S9 mix : 200, 400, 800, 1600 μg/ml

＋ S9 mix : 200, 400, 800, 1600 μg/ml

陽性対照である MMC, BP の用量はそれぞれ，染色体異常誘発性が知られている 0.1, 20 μg/ml とした．

(2) 細胞処理

細胞増殖抑制試験と同様に細胞を処理した．

陽性対照については，下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した．

	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	培養液
－ S9 mix	0.3 ml	―――	―――	2.7 ml
＋ S9 mix	―――	0.015 ml	0.5 ml	2.5 ml

陽性対照については，pH 測定を実施しなかった．

(3) 標本作製

標本作製用プレートに処理終了の 2 時間前に最終用量が 0.1 μg/ml となるようにコルセミドを加え，分裂中期細胞を蓄積した．処理終了後，細胞表面を PBS(-) で洗浄し，0.25 %トリプシン処理にて細胞を剥離した後，遠心管に回収し，遠心分離（1000 rpm, 5 分間；以下同様）により細胞を集めた．上清を除去し，各遠心管に 0.075 M 塩化カリウム溶液 4 ml を加えて低張処理（37 ℃, 15 分）を行った．次に，冷却したメタノール・酢酸（3:1) 混合液 0.5 ml を加え細胞を半固定した後，遠心分離し，上清を除去した．さらに，同固定液 4 ml を加え，同様の操作を 2 回繰り返した．その後，少量の固定液で細胞を懸濁させ，濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに 2 箇所滴

下して乾燥した．これを3％ギムザ溶液で20分間染色し，水洗，乾燥後，封入して観察標本とした．なお，標本は，各プレートにつき2枚作製した．

(4)細胞増殖率の測定

標本作製と同時期における細胞増殖率の測定を実施した．標本作製時にトリプシン処理にて剥離した細胞の一部を採取し，血球計算盤で細胞を計数した．

(5)観　察

①予備鏡検

標本作製後，試験の適否確認のため予備鏡検を行い，プレート1枚あたり50個以上の分裂中期細胞が得られる標本を観察の対象とした．また，陰性対照および陽性対照については，構造異常細胞の有無が適切であることを確認した．

②構造異常および数的異常

標本はすべてをコード化し，プレート1枚につき100個，1用量200個の分裂中期細胞を盲検法で観察した．分裂中期細胞は，染色体がよく拡がった細胞を観察した．

構造異常は，以下の分類[1]に従って観察した．ただし，構造異常がなく，染色体数が25±2本でない細胞は除外した．

- 染色分体型切断　(ctbと略す)
- 染色分体型交換　(cteと略す)
- 染色体型切断　(csbと略す)
- 染色体型交換　(二動原体, 環状染色体など；cseと略す)
- 断片化　(frgと略す)

ギャップは，染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした．他の異常と区別して記録し，構造異常には含めなかった．

数的異常は，核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた．

(6)試験結果の判定基準

構造異常を1個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし，ギャップのみをもつ細胞を除いて集計した．なお，観察可能な分裂中期細胞数がプレートあたり50個未満の標本のデータは集計から除外した．

被験物質の染色体異常誘発性の判定は，各処理条件において，構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に5％未満を陰性（－），いずれか一方または両方が5％以上10％未満を疑陽性（±），いずれか一方または両方が10％以上を陽性（＋）とした．

5.2 結果のまとめ

染色体構造異常および数的異常をもつ細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度（%）を表示した．染色体構造異常は種類別に細胞数を表示した．なお，観察可能な分裂中期細胞数がプレートあたり 50 個未満の標本の欄は“TOX”と記載した．

また，細胞増殖抑制試験および染色体異常試験における用量依存性について図示した．

陽性となった試験条件毎に，D_{20} 値（分裂中期細胞の 20 %に異常を誘発させるために必要な用量，mg/ml）を算出した．

5.3 連続処理法

短時間処理法の結果，染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの処理条件においても 5 %未満であった．このため，連続処理法による試験を実施した．

原則として，短時間処理法に準じて行った．連続処理法に適用された操作については以下に記載する．

(1) 試験物質用量

連続処理法の細胞増殖抑制試験に先立ち，24 時間処理で予備試験を実施した．

その結果，陰性対照と比較した細胞生存率は下記の通りであった．

処理群 ＼ 用量（μg/ml）	500	1000	2000
24 時間処理	100 %	100 %	0 %

この結果に基づき，連続処理法の細胞増殖抑制試験は，下記の用量を設定した．

24 時間処理：1000，1200，1400，1600，1800，2000 μg/ml

連続処理法の細胞増殖抑制試験の結果は図 3 に示すごとく，IC_{50} は 1272 μg/ml であった．

この結果に基づき，連続処理法の染色体異常試験は，下記の用量を設定した．

24 時間処理：400，800，1200，1600 μg/ml

陽性対照である MMC の用量は，染色体異常誘発性が知られている 0.3 μg/ml とした．

(2) 細胞処理

4×10^3 個/ml に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 ml ずつ播き，3 日間培養した．

培養液を除去した後，下記の組成の細胞処理液を 1 用量あたり 2 枚のプレートに加

え，細胞を 24 時間連続処理した．

細胞処理液の pH 測定は，処理開始時および 24 時間処理終了時に実施した．

	被験物質溶液 または陰性対照物質	培養液
24 時間処理	0.025 ml	5.0 ml

染色体異常試験の陽性対照については，下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した．

	MMC 溶液	培養液
24 時間処理	0.5 ml	4.5 ml

結　果

細胞増殖抑制試験の結果を表３，図１～３に，染色体異常試験の結果を表１～３および図１～７に示す．

短時間処理法の細胞増殖抑制試験の結果，被験物質の 50 %細胞増殖抑制用量(IC_{50})は，－ S9 mix および＋ S9 mix で共に 1002 μg/ml であった．この結果に基づき，染色体異常試験は，－ S9 mix および＋ S9 mix で共に 200，400，800，1600 μg/ml を設定した．

短時間処理法の予備鏡検の結果，＋ S9 mix の 1600 μg/ml において分裂中期細胞数が 50 個未満であったため，観察の対象から除外した．

短時間処理法の標本観察の結果，染色体構造異常および数的異常をもつ細胞の出現頻度は－ S9 mix および＋ S9 mix のいずれの用量においても 5 %未満であった．そこで，短時間処理法における染色体異常誘発性は陰性と判定し，引き続き連続処理法 24 時間処理を実施した．

連続処理法の細胞増殖抑制試験の結果，被験物質の IC_{50} は 1272 μg/ml であった．この結果に基づき，連続処理法の染色体異常試験は，400，800，1200，1600 μg/ml を設定した．

連続処理法の予備鏡検の結果，1600 μg/ml のプレートのうち１枚において，１枚あたりの分裂中期細胞数が 50 個未満であったため，観察の対象から除外した．

連続処理法の標本観察の結果，1200，1600 μg/ml において，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度はそれぞれ 17.0，74.0 %であった．D_{20} 値は 1.06 mg/ml であった．

連続処理法の 1200，1600 μg/ml において，処理開始時および処理終了時の細胞処理液の pH は 6.6 ～ 7.1 であった．

一方，数的異常細胞の出現頻度はいずれの用量も 5 %未満であった．

短時間処理法および連続処理法の陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 10 %以上であった．

異常を持たない染色体像を写真１に，代表的な染色体構造異常像を写真２に示した．

考 察 お よ び 結 論

2-エチル酪酸の染色体異常誘発性を検討するため，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した.

連続処理法の 1200，1600 μg/ml において，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度はそれぞれ 17.0，74.0 %となった.

これらの用量において，処理開始時および処理終了時の細胞処理液の pH は 6.6 ～ 7.1 であった．よって，染色体構造異常誘発は，細胞処理液の pH 低下に起因するものではなく，被験物質の染色体異常誘発性に起因するものであると考えられた.

一方，陰性対照および陽性対照では染色体構造異常を有する細胞の出現頻度は期待通りの値を示し，本試験が技術的に成立していることが示された.

従って，2-エチル酪酸は，本試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有すると結論した.

なお，類似化合物の染色体異常誘発性に関する情報は添付資料にまとめた.

参 考 文 献

1. 日本環境変異学会・哺乳動物試験分科会：“化学物質による染色体異常アトラス”
朝倉書店，東京，1988

表 1　染色体異常試験の結果(短時間処理法)

被験物質の名称　2-エチル酪酸

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量(μg/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)	ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 − 18	−	陰性対照(DMSO)	100	2	0	0	0	0	2	0	95	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	105	100	0	0	0
			200	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	200	100	0	0	1	0	0	1	0	117	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	132	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	125	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	400	100	0	0	1	0	0	1	0	95	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	138	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	117	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	800	100	1	0	0	0	0	1	0	102	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	80	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	91	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	1600 A	100	1	1	0	0	0	1	0	46	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	62	100	1	0	1
			200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	54	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	−	陽性対照(MMC 0.1)	100	27	16	0	0	0	31	0	69	100	1	0	1
			100	24	17	0	0	0	35	0	56	100	0	0	0
			200	51 (25.5)	33 (16.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	66 (33.0)	0	62	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	+	陰性対照(DMSO)	100	0	0	1	0	0	1	0	102	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	98	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	200	100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	84	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	84	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	400	100	0	0	0	0	0	0	0	84	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	101	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	93	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	800	100	0	0	0	0	0	0	0	87	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	85	100	2	0	2
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	86	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6 − 18	+	1600 A	TOX								0	TOX			
											0				
											0				
6 − 18	+	陽性対照(BP 20)	100	10	44	0	0	0	50	0	72	100	0	0	0
			100	15	61	1	0	0	66	0	65	100	0	0	0
			200	25 (12.5)	105 (52.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	116 (58.0)	0	68	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　BP:ベンゾ[a]ピレン　DMSO:ジメチルスルホキシド
A:被験物質処理(6時間)終了時に培養液色の黄変が認められた.
TOX:細胞毒性のため50個以上の分裂中期細胞が得られなかった.

表 2　染色体異常試験の結果(連続処理法)

被験物質の名称　2-エチル酪酸

処理-回復時間(h)	被験物質の用量(μg/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数的異常の細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24 − 0	陰性対照(DMSO)	100	1	0	1	0	0	2	0	100	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	400	100	9	0	0	0	0	9	1	92	100	0	0	0
		100	2	0	0	0	0	2	1	95	100	0	0	0
		200	11 (5.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (5.5)	2	94	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	800	100	4	0	0	0	0	4	1	80	100	0	0	0
		100	6	0	1	0	0	6	1	86	100	2	0	2
		200	10 (5.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (5.0)	2	83	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
24 − 0	1200	100	13	0	2	0	0	14	1	72	100	1	0	1
		100	20	0	0	0	0	20	0	51	100	0	0	0
		200	33 (16.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	34 (17.0)	1	62	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24 − 0	1600 A	100	72	2	0	0	0	74	4	1	100	0	0	0
		TOX								4	TOX			
		100	72 (72.0)	2 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	74 (74.0)	4	2	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	陽性対照(MMC 0.03)	100	21	8	3	0	0	31	1	78	100	0	0	0
		100	16	11	2	0	0	28	1	80	100	0	0	0
		200	37 (18.5)	19 (9.5)	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	59 (29.5)	2	79	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　DMSO:ジメチルスルホキシド
A:被験物質処理終了時に培養液色の黄変が認められた.
TOX:細胞毒性のため50個以上の分裂中期細胞が得られなかった.

表 3　細胞処理液の pH 測定結果

(1) 短時間処理法－ S9 mix　細胞増殖抑制試験

濃度 (μg/ml)		DMSO	250	500	1000	2000	3000	4000
pH	処理開始時	8.1	7.8	7.5	7.1	5.7	5.1	4.9
	処理終了時	7.3	7.4	7.2	7.0	5.8	4.8	4.6

(2) 短時間処理法＋ S9 mix　細胞増殖抑制試験

濃度 (μg/ml)		DMSO	250	500	1000	2000	3000	4000
pH	処理開始時	7.9	7.4	7.1	6.5	5.5	5.1	4.9
	処理終了時	7.2	7.1	6.8	6.5	5.1	4.6	4.6

(3) 短時間処理法－ S9 mix　染色体異常試験

濃度 (μg/ml)		DMSO	200	400	800	1600
pH	処理開始時	7.2	7.5	7.3	7.0	6.5
	処理終了時	7.1	7.5	7.5	7.2	6.4

(4) 短時間処理法＋ S9 mix　染色体異常試験

濃度 (μg/ml)		DMSO	200	400	800	1600
pH	処理開始時	7.8	7.6	7.4	7.0	5.8
	処理終了時	7.3	7.2	7.1	6.8	5.6

(5) 連続処理法　細胞増殖抑制試験

濃度 (μg/ml)		DMSO	1000	1200	1400	1600	1800	2000
pH	処理開始時	7.7	6.8	6.6	6.3	6.3	5.7	5.4
	処理終了時	7.5	7.2	7.0	6.8	6.4	6.0	5.5

(6) 連続処理法　染色体異常試験

濃度 (μg/ml)		DMSO	400	800	1200	1600
pH	処理開始時	7.7	7.5	7.4	7.1	6.6
	処理終了時	7.5	7.4	7.2	7.0	6.7

図１　2-エチル酪酸の細胞毒性
(短時間処理法・－S9 mix)

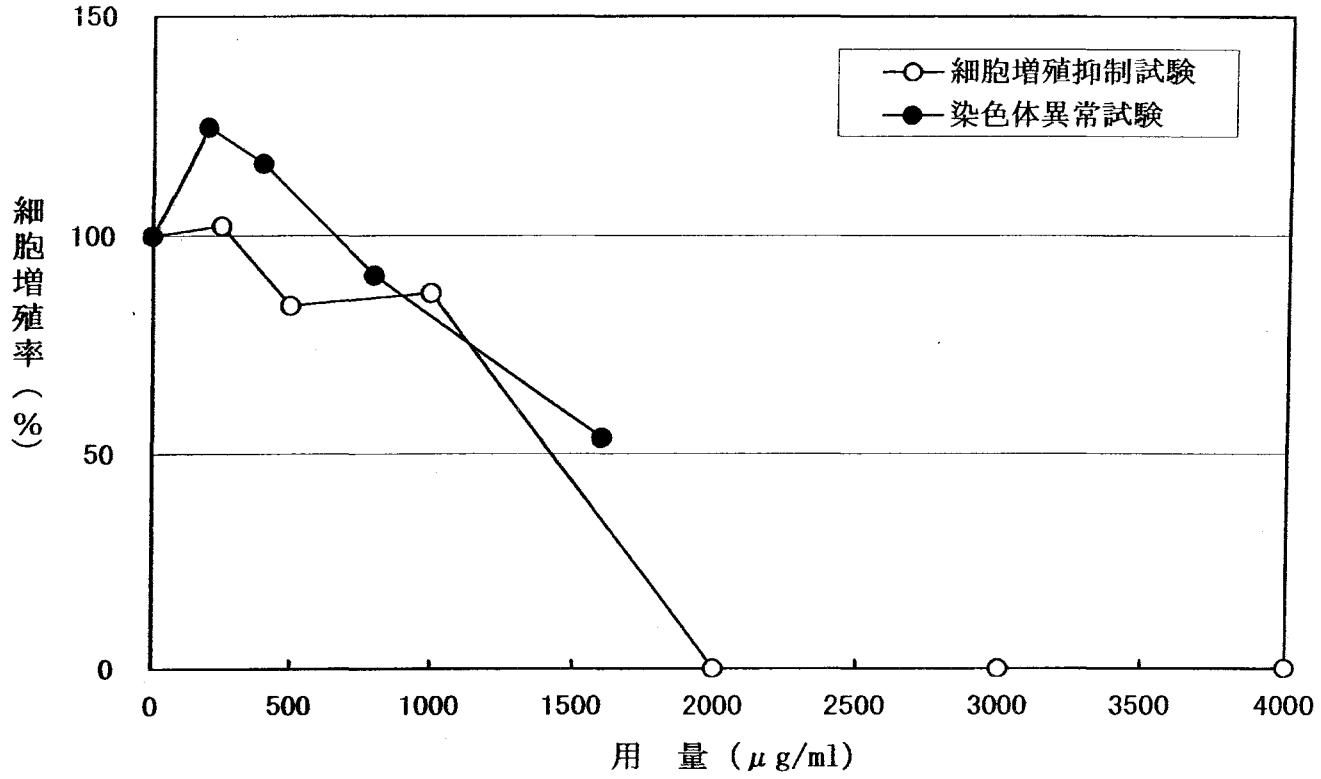


図２　2-エチル酪酸の細胞毒性
(短時間処理法・＋S9 mix)

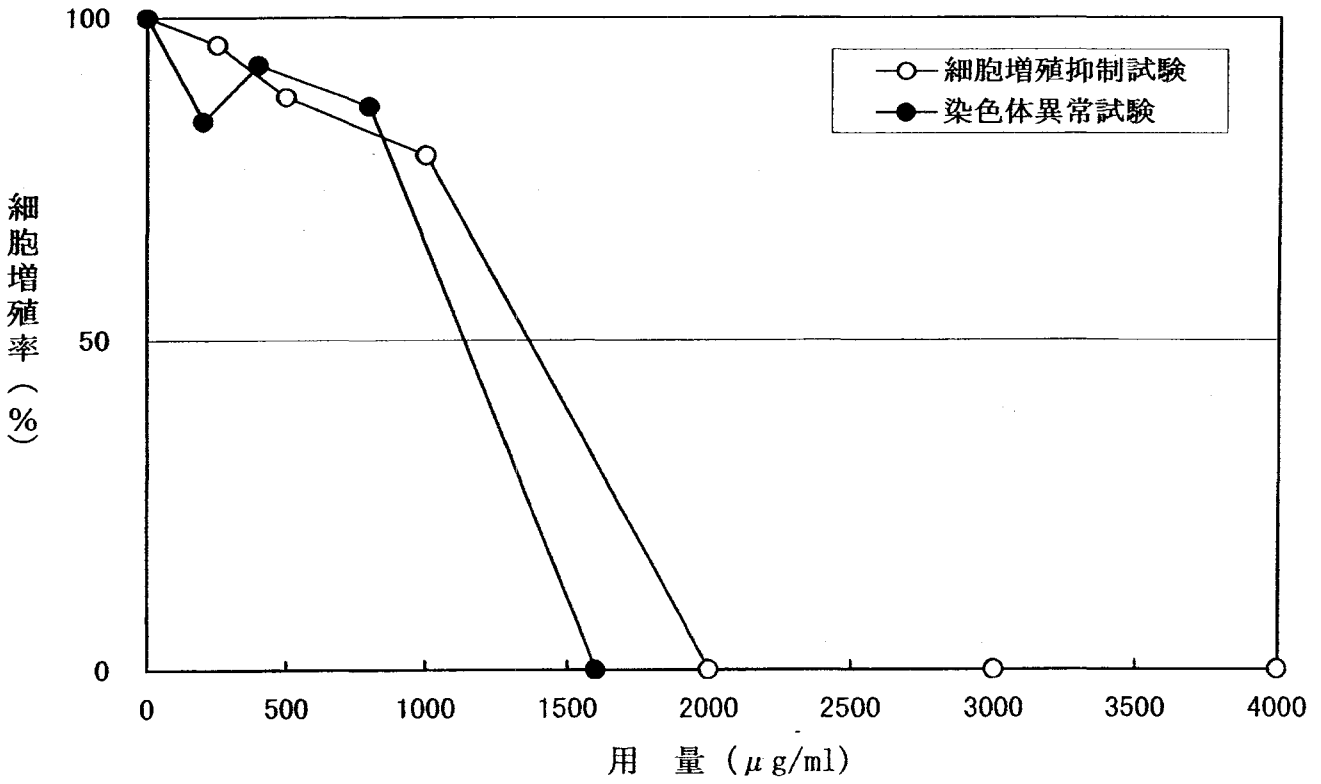


図３　2-ｴﾁﾙ酪酸の細胞毒性
(連続処理法)

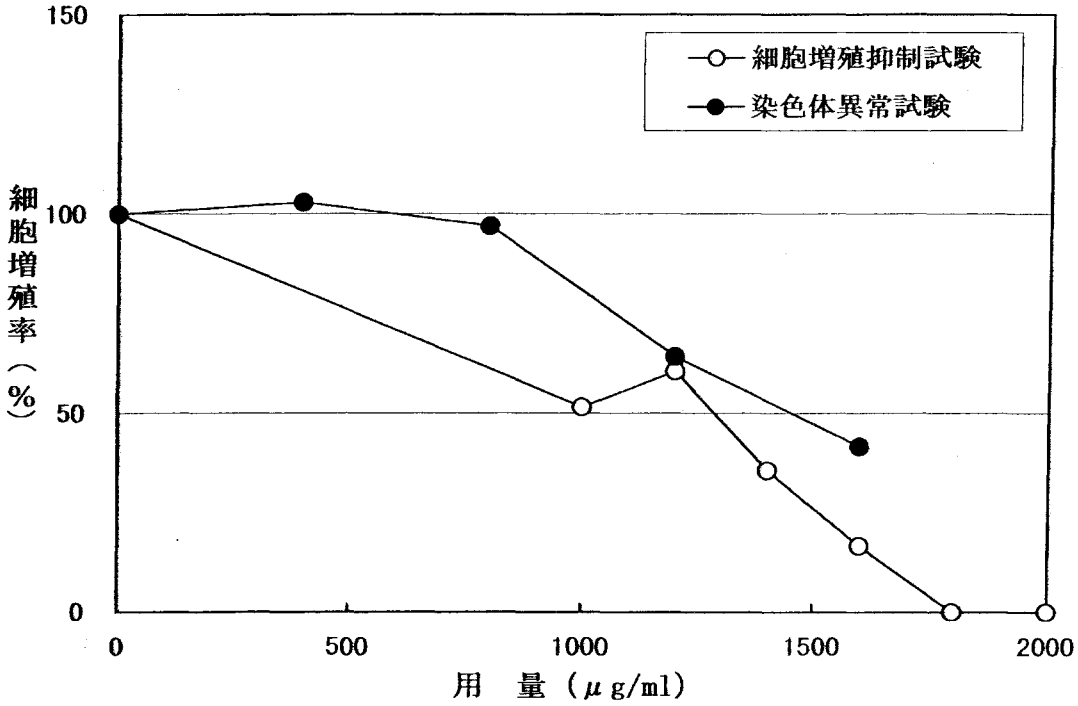


図４　2-エチル酪酸の構造異常細胞出現頻度
（短時間処理法）

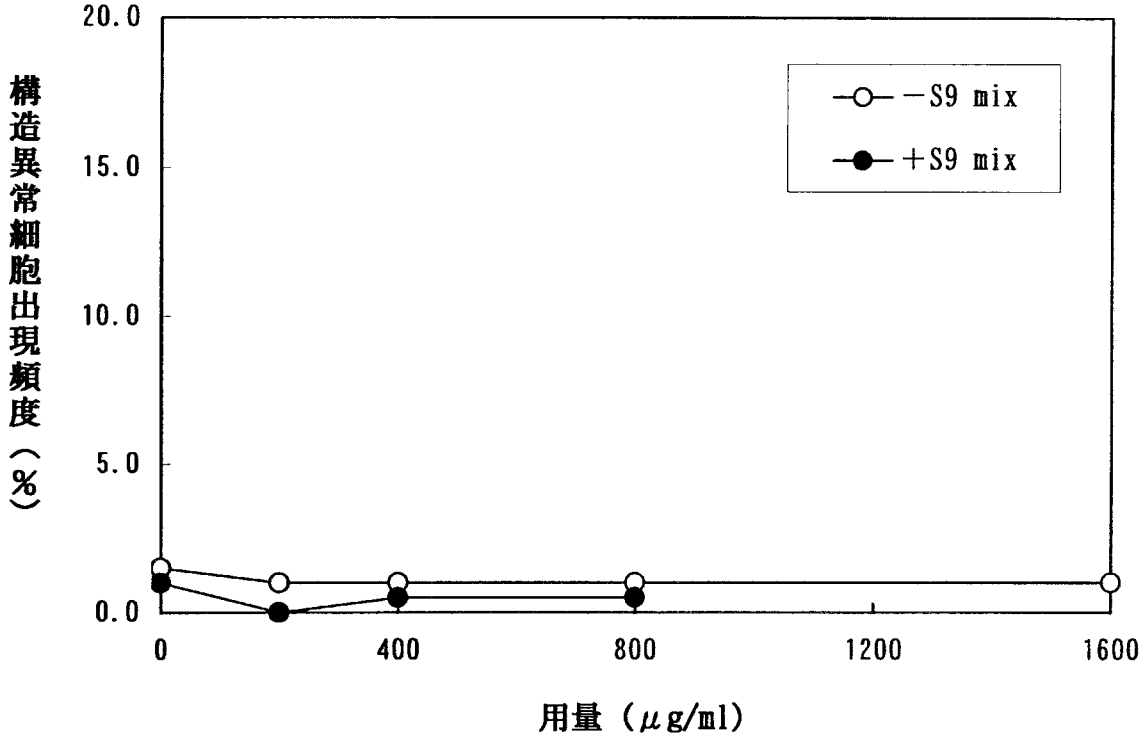


図５　2-エチル酪酸の数的異常細胞出現頻度
（短時間処理法）

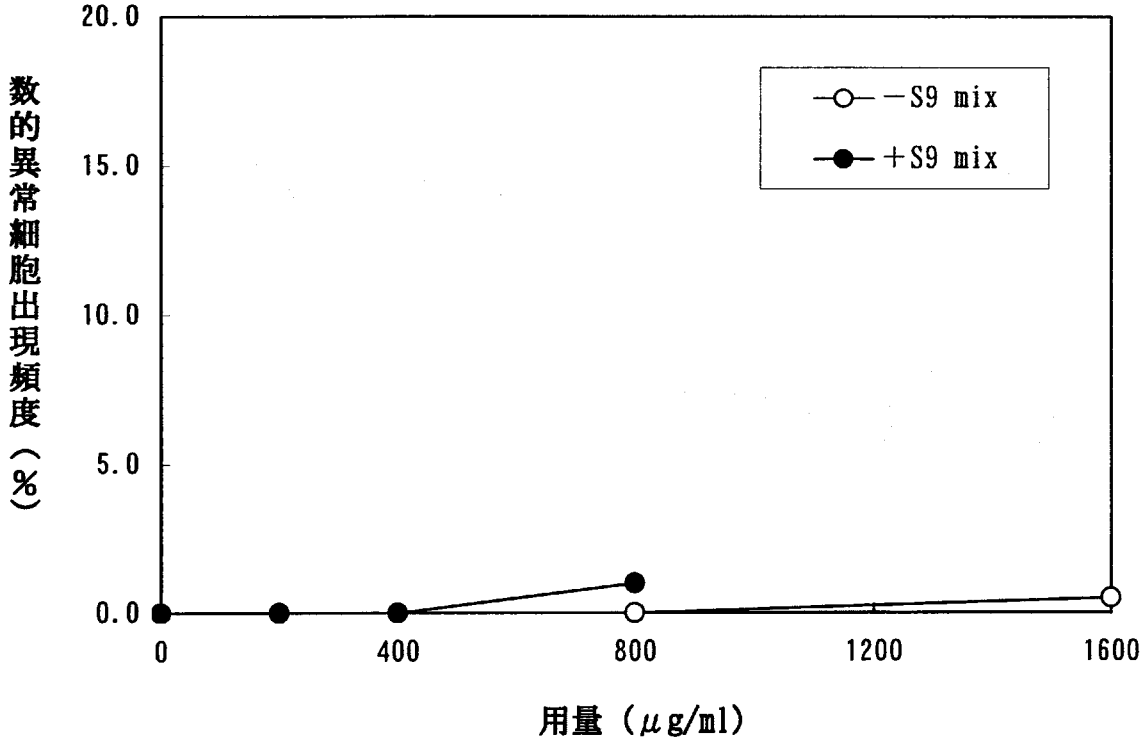


図６　2-エチル酪酸の構造異常細胞出現頻度
（連続処理法）

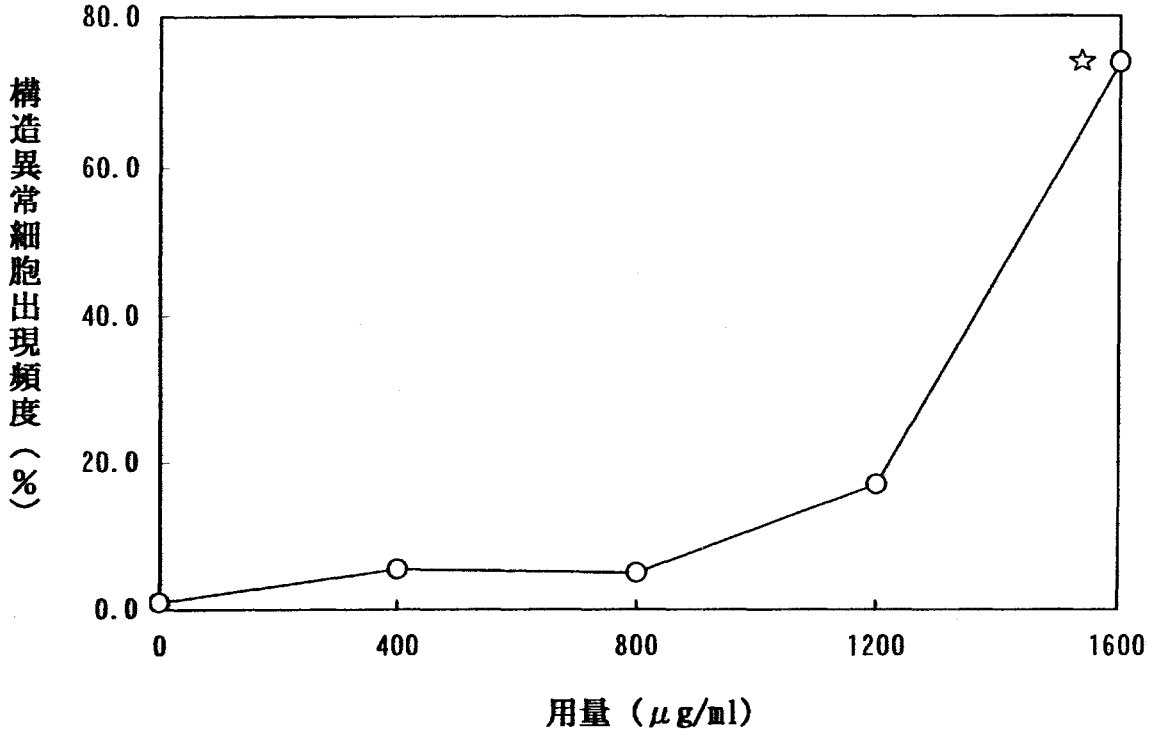
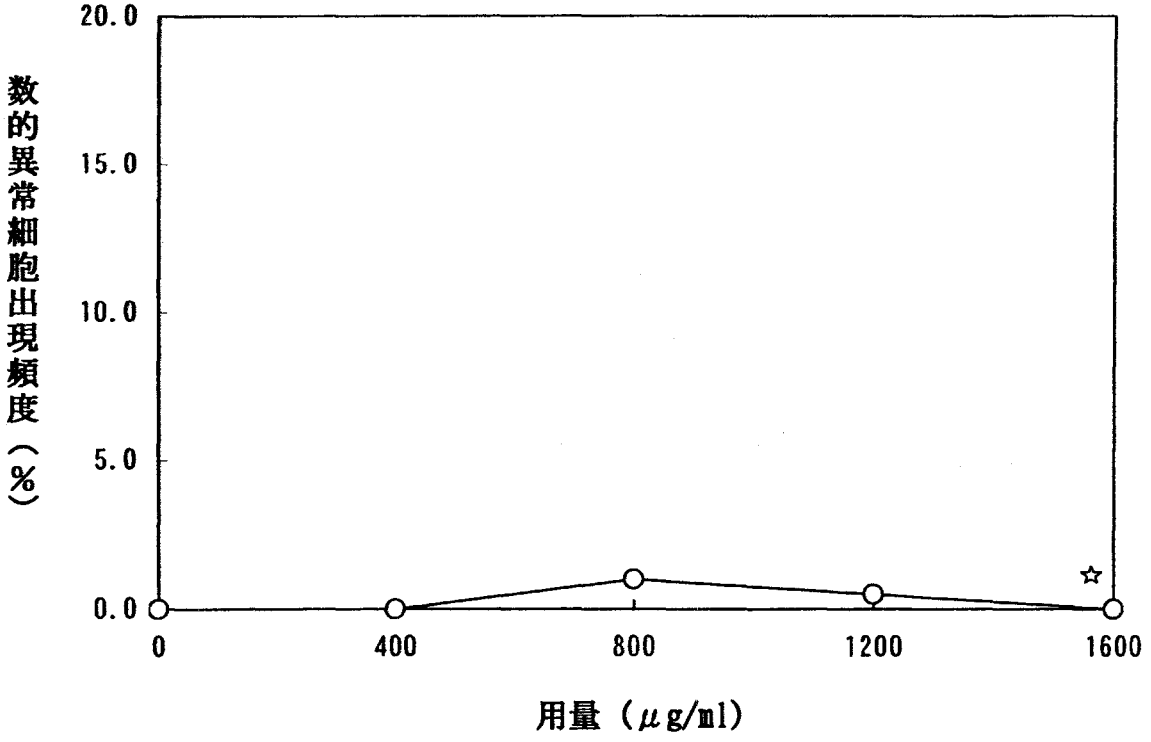


図７　2-エチル酪酸の数的異常細胞出現頻度
（連続処理法）



☆：1600μg/mLについては，1枚のプレートの標本が細胞毒性により観察不可能であったため，もう1枚のプレートの標本における出現頻度のみを示してある．