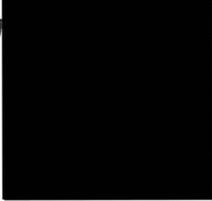


受付番号	832-11-T-6983
試験番号	K11-0272

最 終 報 告 書

2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールのマウス小核試験

2012 年 3 月

一般財団法人  評価研究機構

陳 述 書

一般財団法人化学物質評価研究機構
日田事業所

試験委託者 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室

試験の表題 2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールのマウス小核試験

試験番号 K11-0272

上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号）に定める「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

2012年 3月 14日

試験責任者



目 次

	頁
1. 表 題	5
2. 試験委託者	5
3. 試験施設	5
4. 試験目的	5
5. 試験法	5
6. GLP 基準	5
7. 試験日程	5
8. 試験関係者	6
9. 試資料の保管	6
10. 最終報告書作成者の承認	6
11. 要 約	7
12. 試験材料	8
12.1 被験物質（提供源試験成績書及び森村、2004 より引用）	8
12.2 陰性対照物質（媒体）	8
12.3 陽性対照物質	9
12.4 使用動物	9
12.5 飼育環境	10
13. 試験方法	11
13.1 被験物質液及び陽性対照物質溶液の調製	11
13.2 試験の手順	13
14. 試験の成立条件	15
15. 統計学的方法	16
16. 確認試験	16
17. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	16
18. 試験成績	16
18.1 予備試験	16
18.2 小核試験	16
19. 試験施設の背景データ	17
20. 考察	17
21. 結論	17
22. 参考文献	18
表 1 小核試験に用いた被験物質液の濃度確認結果	19
表 2 予備試験における雄の一般状態	20
表 3 予備試験における雌の一般状態	21
表 4 予備試験における雄の体重	22
表 5 予備試験における雌の体重	23

表 6	小核試験における一般状態	24
表 7	小核試験における体重	25
表 8	小核試験における標本観察結果	26
添付資料 1	マウスを用いた小核試験の背景データ	27

信頼性保証書

1. 表 題

2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールのマウス小核試験

2. 試験委託者

名 称 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室

住 所 〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所

住 所 〒877-0061 大分県日田市石井町 3 丁目 822 番地

4. 試験目的

マウスを用いて、被験物質の小核誘発能の有無を骨髄細胞で検討する。

5. 試験法

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号)に定める「変異原性試験」の「げっ歯類を用いる小核試験」

6. GLP 基準

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)に定める「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」

7. 試験日程

試験開始日	2011 年 11 月 24 日
予 備 試 験	
動物入荷日	2011 年 11 月 29 日
投与開始日	2011 年 12 月 6 日
小 核 試 験	
動物入荷日	2011 年 12 月 13 日
投与開始日	2011 年 12 月 20 日
解剖・標本作製日	2011 年 12 月 22 日
標本観察終了日 (実験終了日)	2012 年 2 月 6 日
試験終了日	2012 年 3 月 14 日

8. 試験関係者

試験責任者: 

所 属: 日田事業所 試験第三課

試験担当者: 

(検収、体重測定、検疫、検疫終了、被験物質液の調製、一般状態観察、解剖、標本作製及び標本観察)

(検疫、体重測定及び一般状態観察)

(検疫)

(検疫)

(検疫)

(投与)

(標本作製)

(陽性対照物質溶液の調製、標本作製及び標本観察)

(解剖及び標本観察)

9. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、契約書、その他の記録及び標本は当試験施設に保管する。

保管期間は試験終了後 10 年間とする。ただし保管中に品質が著しく変化する標本などの保管期間は、その品質が評価に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

10. 最終報告書作成者の承認

試験責任者:

2012年3月14日



11. 要 約

7 週齢の雄 Crlj: CD1(ICR)マウスを用いた 24 時間間隔の 2 回連続強制経口投与により、2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールの小核誘発能の有無を検討した。

62.5~2000 mg/kg/day を設定した予備試験において、動物の死亡を指標とした被験物質の最大耐量 (MTD) が雌雄のいずれにおいても 250 mg/kg/day と推定された。したがって、小核試験での被験物質用量は、250 mg/kg/day を最高用量とし、公比 2 とした 125、62.5 及び 31.3 mg/kg/day の 4 用量を設定した。なお、雌雄の MTD に差は無く、毒性に明らかな性差が見られなかったため、動物は雄のみを使用した。対照群には、陰性対照群及び陽性対照群を設定し、陰性対照群には媒体 (コーン油) を 10 mL/kg で 2 回連続の強制経口投与を行った。陽性対照群にはマイトマイシン C を 2 mg/kg/day で単回腹腔内投与を行った。

標本作製時期とした 2 回目投与 24 時間後においても最高用量の 250 mg/kg/day までのすべての被験物質群で死亡はみられなかったため、上位 3 用量 (250、125 及び 62.5 mg/kg/day) を被験物質の標本観察用量とし、骨髓細胞の小核を有する多染性赤血球の出現頻度 (MNPCE/PCE) 及び全赤血球中の多染性赤血球の割合 (PCE/TE) を調べた。

標本観察の結果、標本観察したすべての被験物質群で、MNPCE/PCE は、陰性対照群と比較して統計学的な有意差はみられず、被験物質投与により小核を有する多染性赤血球の出現は増加しないものと判断した。

陰性対照群及び陽性対照群での MNPCE/PCE の平均値は、いずれも試験施設の背景データ (最新 20 実験) の範囲内であったことから、試験は適正に実施されたと判断した。

また、PCE/TE は、すべての被験物質群及び陽性対照群で、陰性対照群と比較して統計学的な有意差がみられなかったため、被験物質による PCE/TE の減少を指標とした骨髓細胞の被験物質暴露を証明できなかった。しかし、予備試験において推定された MTD である 250 mg/kg/day までの用量を設定していることから、本試験の結果により小核誘発能を適切に評価できると判断した。

以上の結果から、2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールは、本試験条件下では小核を誘発しないものと判断した。

12. 試験材料

12.1 被験物質（提供源試験成績書及び森村、2004 より引用）

a) 名称等

名称	2-(ジ- <i>n</i> -ブチルアミノ)エタノール
CAS 番号	102-81-8

b) 提供源

c) ロット番号

GL01

d) 分子量

173.30

e) 分子式

 $C_{10}H_{23}NO$

f) 純度

99.4% (GC)

g) 物理化学的性状

常温における性状	弱いアミン臭を有するうすい黄色澄明の液体
融点	-75°C
沸点	228.7°C
密度	0.857 g/mL (20°C)
溶解度	水: 0.4 g/100g

h) 保管条件

遮光した気密容器に入れ、被験物質保管室の保冷库 001 及び 005 で冷所(実測温度: 1.8 ~5.9°C、許容範囲: 1~10°C) 保管した。

i) 保管条件下での安定性

試験施設で実施する試験 (2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールの安定性、被験物質液の濃度確認試験、試験番号: X02-0253) で確認した。

j) 取扱い上の注意

手袋、マスク、帽子、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入をさけた。

12.2 陰性対照物質（媒体）

a) 名称

コーン油

b) 製造元、ロット番号及びグレード

製造元	和光純薬工業
ロット番号	LAR5187
グレード	生化学用

c) 保管条件

準備室 2 の試薬棚で室温保管した。

12.3 陽性対照物質

a) 名称等

名 称	製造元	ロット番号	外 観	純 度	グレード
MMC ^{†1}	協和発酵キリン	557AJL	青紫色の粉末	98.1%	注射用

†1: マイトマイシン C

b) 保管条件

被験物質保管室のキャビネット 2 及び 5 で室温(実測温度: 18.2~20.7°C、許容範囲: 10~30°C) 保管した。

c) 取り扱い上の注意

手袋、マスク、帽子、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入をさけた。

12.4 使用動物

a) 種、系統、性別及び購入先

マウス、Crlj: CD1(ICR)、SPF、雌雄、日本チャールス・リバー (日野飼育センター)

b) 動物種選択の理由

小核の観察が容易なこと、背景データが豊富なことから、一般に小核試験に用いられている。

c) 入荷時週齢及び購入匹数

予備試験: 6 週齢 雄 24 匹、雌 24 匹

小核試験: 6 週齢 雄 40 匹

d) 投与時週齢・体重範囲

7 週齢、平均体重 \pm 20%以内

e) 検疫・馴化方法及び期間

入荷時に動物の外観を観察し、健常と判断された動物を 5 日間以上検疫及び馴化した。この間、一般状態を 1 日 1 回観察した。また、入荷時及び検疫終了時に、体重を測定した。

f) 群分け

検疫及び馴化期間中、順調に発育し、実験動物管理者によって健常と確認された動物のみを、体重層別無作為抽出法により投与開始前日に群分けした。予備試験では雌雄とも 1 群 3 匹で 7 群、小核試験では 1 群 6 匹で 6 群に群分けし、群分け 1 日後に投与に用いた。なお、試験に使用しなかった余り動物は、群分け後に本試験系から除外した。

g) 識別方法

1) 動物

入荷時に、入荷動物番号を任意に割り付けた。番号順に各ケージ 5 匹を収容し、予備試験の動物番号 21~24 については雌雄ともにケージに 4 匹で収容した。各ケージ

の入荷動物番号の小さい4匹について、尾部に油性インクでマーキング（5はマーキング無し）して識別した。

群分け後に新たな動物番号を割り付け、各ケージ3匹（予備試験：1ケージ/用量、小核試験：2ケージ/用量）を収容した。各用量の動物番号の小さい順に、予備試験では1～3、小核試験では1～6のマーキングを背部被毛に施して識別した。群分け後のマーキングには、水性インク（アニマルカラーインク NRC-706、日本ラビット）を用い、用量毎に色を変えた。

2) ケージ

群分け前は、試験番号、性別、入荷動物番号、ケージ番号、入荷日、入荷時週齢、動物種、系統及び試験責任者を明記したラベルを付け、群分け後は、試験番号、ケージ番号、群、用量、動物番号、動物種、系統、性別、飼育期間（群分け日～飼育終了日）及び試験責任者を明記したラベルを付けて、識別した。

h) 使用動物の投与開始時週齢、使用動物数及び初回投与時体重

予備試験:

7週齢 雄 21匹、初回投与時体重 30.4～35.9 g、平均: 33.1 g

7週齢 雌 21匹、初回投与時体重 22.8～27.9 g、平均: 25.9 g

小核試験:

7週齢 雄 36匹、初回投与時体重 29.9～34.8 g、平均: 32.1 g

12.5 飼育環境

飼料、床敷及び飼育用器材は、オートクレーブ滅菌（121℃で30分間）したものを使用し、ラック、ケージ、ケージ蓋、床敷及び給水びんは、検疫終了時に交換した。

検疫・馴化期間中及び試験期間中、以下の飼育環境要因において、試験の結果に影響を及ぼすと考えられる変動は認められなかった。

12.5.1 環境条件

a) 飼育室

検疫期間中: 検疫室2

検疫終了後: 飼育室7

b) 温度

21-25℃（実測値: 22.1～23.9℃）

c) 相対湿度

40-70%（実測値: 50.0～59.6%）

d) 換気回数

10-15回/時

e) 明暗サイクル

12時間明（7:00-19:00）/12時間暗（19:00-7:00）

f) ケージの種類と大きさ

ポリカーボネート製平床ケージ（210 W×320 D×130 H mm）

g) 飼育密度

5匹以下/ケージ

h) 飼育器材交換回数

ケージ及び床敷 1 回以上/週

12.5.2 飼料

a) 種類

MF (固型飼料)

b) 製造元及びロット番号

製造元 オリエンタル酵母工業

ロット番号 110906

c) 給餌法

自由摂取

d) 混入物に対する処置

Eurofins 社で実施した混入物の分析データを製造元から入手し、米国環境保護庁有害物質規制法の「飼料及び媒体の汚染物質限度」(1979)を参考にして試験施設で定めた基準値内であることを確認できた飼料を用いた。

12.5.3 飲料水

a) 種類

日田市上水道水 (塩素添加水)

b) 給餌法

給水びんによる自由摂取

c) 混入物に対する処置

厚生労働省の水質基準に関する省令 (厚生労働省令第 101 号、第 135 号、第 174 号) に記載されている水質基準を参考にして、年に 2 回試験施設で定めた項目を検査した。動物入荷前に入手した最新の検査結果が、基準値内であることを確認した。

12.5.4 床敷

a) 種類

サンフレーク (モミ材、電気かんな削りくず)

b) 製造元及びロット番号

製造元 日本チャールス・リバー

ロット番号 110719 及び 111004

c) 混入物に対する処置

Eurofins 社で実施した混入物の分析データを製造元から入手し、米国環境保護庁有害物質規制法の「飼料及び媒体の汚染物質限度」(1979)を参考にして試験施設で定めた基準値内であることを確認できた床敷を用いた。

13. 試験方法

13.1 被験物質液及び陽性対照物質溶液の調製

13.1.1 被験物質液の調製

a) 媒体の選択理由

被験物質の対水溶解度は 0.4 g/100 g と低く、2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールのラッ

トを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験（森村、2004）において、コーン油が媒体として使用されている。また、同試験において、コーン油で調製した 2.00 及び 200 mg/mL の被験物質液の安定性が確認されているため、コーン油を媒体に選択した。

b) 調製法

予備試験では、秤量した被験物質 4.00 g にコーン油を加え攪拌（チューブミキサー）して溶解させ、全量を 20 mL として 200 mg/mL の被験物質液を調製した。200 mg/mL の被験物質液をコーン油で段階希釈して 100、50.0、25.0、12.5 及び 6.25 mg/mL の被験物質液を調製した。

小核試験では、秤量した被験物質 0.750 g にコーン油を加え攪拌（チューブミキサー）して溶解させ、全量を 30 mL として 25.0 mg/mL の被験物質液を調製した。25.0 mg/mL の被験物質液をコーン油で段階希釈して 12.5、6.25 及び 3.13 mg/mL の被験物質液を調製した。

なお、調製は安全キャビネット内にて行った。

c) 調製時期及び保管

各濃度の被験物質液を等分し、気密容器に入れ、被験物質調製室の保冷库 7 で冷所（実測温度：2～7°C、許容範囲：1～10°C）保管した。安定性が確認されている期間内に使用し、投与前に室温に取り出した後、投与に用いた。

d) 安定性の確認

2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験（森村、2004）において、冷所・8 日間での 2.00 及び 200 mg/mL の被験物質液の安定性が確認されているため、被験物質液の安定性は確認しなかった。

e) 濃度確認

小核試験に用いる被験物質液の最高濃度について、試験施設で実施する試験（2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールの安定性、被験物質液の濃度確認試験、試験番号：X02-0253）で、調製直後の被験物質濃度を測定した。測定した被験物質濃度が設定値に対し 100±10%以内であることを確認した。結果を表 1 に示す。

13.1.2 陽性対照物質溶液の調製

a) 調製法

MMC 2 mg 入り瓶に、注射用水（ロット番号 K0F78、大塚製薬工場）を加えて溶解させ、注射用水で全量を 10 mL として 0.2 mg/mL の溶液を調製した。なお、陽性対照物質溶液は安全キャビネット内にて取り扱った。

b) 調製時期及び保管

用時に調製し 4 時間以内に使用した。使用まで室温で保管した。

c) 安定性及び濃度確認

陽性対照群における小核を有する多染性赤血球の出現頻度から、陽性対照物質溶液が適切に調製され、かつ、安定であったことが確認できるため、安定性及び濃度確認は実施しなかった。

13.2 試験の手順

13.2.1 予備試験

a) 群構成

1) 被験物質群

ガイドラインに上限とされている 2000 mg/kg/day を最高用量とし、公比 2 で希釈した 1000、500、250、125 及び 62.5 mg/kg/day の 6 用量を設定した。各用量につき雌雄 3 匹ずつ用いた。

2) 対照群

陰性対照群として、投与当日の体重を基に媒体を 10 mL/kg で投与する群を設置した。

3) 群構成及び動物番号

投与群	投与用量 (mg/kg/day)	動物数 (匹) 雄・雌	動物番号	
			雄	雌
陰性対照 (媒体) 被験物質	0	3・3	1-3	51-53
	62.5	3・3	4-6	54-56
	125	3・3	7-9	57-59
	250	3・3	10-12	60-62
	500	3・3	13-15	63-65
	1000	3・3	16-18	66-68
	2000	3・3	19-21	69-71

b) 投与

小核試験において一般的に実施されている強制経口投与とし、24 時間間隔で 2 日間連続投与した。

投与には、1 mL 容ディスポーザブルシリンジ (テルモ) とマウス用経口胃ゾンデ (フチガミ器械) を用い、被験物質液をマグネチックスターラーで攪拌しながら採取し、投与当日の体重を基に 10 mL/kg で投与した。

c) 一般状態観察

各投与 1 時間後まで頻繁に観察した。初回投与では、雌雄のいずれにおいても投与後 1 時間までに毒性症状がみられ、症状が安定せず新たな毒性症状もみられたため、1.5 時間後まで観察を継続した。2 回目投与では、雌雄のいずれにおいても投与後 1 時間までに毒性症状がみられなかったため、投与後の観察は 1 時間までとした。さらに、各投与の 1 日後に観察した。

d) 体重測定

初回投与前、2 回目投与前及び 2 回目投与 1 日後の計 3 回、電子天秤 (ザルトリウス) を用いて測定した。

e) 瀕死動物及び死亡動物の処置

瀕死動物はみられなかった。初回投与 1.5 時間後までに死亡が確認された動物については、体重は測定せず、本試験系から除外し、その旨を記録した。2 回目投与前に発見した死亡動物については、体重測定を行った後、本試験系から除外し、その旨を記録した。

f) 観察終了後の動物の処置

エーテル麻酔下にて、頸椎脱臼により安楽死させた。

13.2.2 小核試験

a) 群構成

1) 被験物質群

予備試験において、動物の死亡を指標とした被験物質の最大耐量 (MTD) が雌雄いずれも 250 mg/kg/day と推定された。雌雄の MTD に差はなく、毒性に明らかな性差がみられなかったため、動物は雄のみを使用した。小核試験での被験物質用量は、250 mg/kg/day を最高用量とし、公比 2 とした 125、62.5 及び 31.3 mg/kg/day の計 4 用量を設定した。

各用量につき雄 6 匹を用い、標本作製時に生存したすべての動物について標本作製したが、評価には、標本作製時に 5 匹以上の動物が確保された上位 3 用量 (250、125 及び 62.5 mg/kg/day) について、各用量の動物番号の小さい 5 匹を使用した。

2) 対照群

陰性対照群として投与当日の体重を基に媒体を 10 mL/kg で投与する群を設置した。陽性対照群として試験施設の背景データに基づき、MMC を 2 mg/kg/day で投与する群を設定した。各対照群とも雄 6 匹を用い、標本作製時に生存したすべての動物について標本作製したが、評価には動物番号の小さい 5 匹を使用した。

3) 群構成及び動物番号

投与群	投与用量 (mg/kg/day)	動物数		動物番号
		使用数	評価数	
被験物質	0	6	5	101 - 106
	31.3	6	0	107 - 112
	62.5	6	5	113 - 118
	125	6	5	119 - 124
	250	6	5	125 - 130
陽性対照 (MMC)	2	6	5	131 - 136

b) 投与

1) 被験物質群及び陰性対照群

予備試験に準じた。ただし、被験物質液採取時のマグネチックスターラーによる攪拌は行わなかった。

2) 陽性対照群

被験物質の投与 2 日目に、1 mL 容ディスポーザブルシリンジ (テルモ) とディスポーザブル注射針 (テルモ) を用い、投与当日の体重を基に 10 mL/kg で単回腹腔内投与した。

c) 一般状態観察、体重測定、瀕死動物及び死亡動物の処置

1) 一般状態観察

各投与後 1 時間までは頻繁に観察した。初回及び 2 回目投与後のいずれにおいても、投与 1 時間後までに毒性症状がみられなかったため、投与後の観察は 1 時間までとし

た。さらに、各投与の1日後に観察した。ただし、陽性対照群においては、被験物質投与1日目には一般状態観察を実施しなかった。

2) 体重測定

初回投与前、2回目投与前及び2回目投与1日後の計3回、電子天秤（ザルトリウス）を用いて測定した。ただし、陽性対照群においては、被験物質投与1日目には体重測定を実施しなかった。

3) 瀕死動物及び死亡動物の処置

瀕死動物及び死亡動物はみられなかった。

d) 標本作製

1) 作製時期

2回目投与24時間後（陽性対照群は、単回投与24時間後）

2) 方法

動物を頸椎脱臼により安楽死させた後、大腿骨を摘出し、非働化した牛胎仔血清約0.8 mLで骨髓細胞を遠沈管に洗い出した。1000 rpmで5分間遠心分離し、集めた細胞の沈渣をスライドガラス上に塗抹した。風乾させた後、メタノールで固定した。3 vol% ギムザ溶液（ゼーレンゼン緩衝液、pH6.8で調製）で染色した後、0.004 w/v% クエン酸溶液で分染した。

標本作製時に生存したすべての動物について、1個体につき2枚の標本作製した。

e) 標本観察

陰性対照群及び陽性対照群並びに被験物質群3用量の標本を観察した。被験物質群の観察用量は、標本作製時に5匹以上が生存した上位3用量である62.5、125及び250 mg/kg/dayとした。いずれの群においても、動物番号の小さい順に5匹の標本のみ観察した。

観察する標本には、ランダムに発生させたスライド番号を付し、生物顕微鏡（×1000）にてブラインド法により観察した。

1) 小核の出現頻度

1個体につき、2000個（1標本当たり1000個）の多染性赤血球（polychromatic erythrocyte: PCE）を観察し、小核を有する多染性赤血球（micronucleated polychromatic erythrocyte: MNPCE）の出現頻度（MNPCE/PCE）を求めた。

2) 骨髓細胞の増殖抑制

1個体につき200個（1標本当たり100個）の全赤血球（total erythrocyte: TE）を観察し、PCEの占める割合（PCE/TE）を求めた。

14. 試験の成立条件

陰性対照群及び陽性対照群でのMNPCE/PCEの平均値が、いずれも当試験施設での最新20実験の背景データの範囲内（陰性対照: mean ± 3 S.D.、陽性対照: mean ± 3 S.D）にあることを試験の成立条件とした。

15. 統計学的方法

a) MNPCE/PCE の判定

被験物質群の各用量及び陽性対照群の MNPCE/PCE について、陰性対照群との間で条件付二項検定 (Kastenbaum and Bowman) により、上側 5%及び 1%水準での有意差検定を行った。被験物質群で有意差がみられた場合には、Cochran-Armitage の傾向検定により用量依存性があるかを検定することになっていたが、有意差がみられなかったため、傾向検定は行わなかった。被験物質群での MNPCE/PCE が、陰性対照群と比べ有意に増加し、かつ、その増加に用量依存性がみられた場合を陽性とした。

b) PCE/TE の判定

被験物質群の各用量及び陽性対照群の PCE/TE を、陰性対照群と F 検定により 2 群の分散の一樣性を検定した結果、すべての被験物質群及び陽性対照群で等分散であったため Student の t 検定を実施した。F 検定は 20%、Student の t 検定は両側 5%及び 1%とした。

16. 確認試験

被験物質群の各用量での MNPCE/PCE が陰性対照群と比較し有意に増加しなかったため、確認試験は実施しなかった。

17. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験計画書からの逸脱を含む当該要因はなかった。

18. 試験成績

18.1 予備試験

a) 一般状態

試験結果を表 2 及び 3 に示す。

被験物質群の 62.5、125 及び 250 mg/kg/day では、2 回目投与 1 日後までに一般状態の変化はみられなかったが、500 mg/kg/day 以上の用量では毒性症状がみられた。500 mg/kg/day では雌雄共に 1 匹が死亡し、1000 mg/kg/day では雌雄共に 2 匹が死亡し、2000 mg/kg/day では全例が死亡した。

陰性対照群では 2 回目投与 1 日後までに一般状態の変化及び死亡はみられなかった。

b) 体重

試験結果を表 4 及び 5 に示す。

2 回目投与 1 日後まで生存した動物のうち、陰性対照群と比較して、著しい体重変動は雌雄いずれもみられなかった。

18.2 小核試験

a) 一般状態

試験結果を表 6 に示す。

陰性対照群、陽性対照群及びすべての被験物質群で 2 回目投与 1 日後までに一般状態の変化及び死亡はみられなかった。

b) 体重

試験結果を表 7 に示す。

陰性対照群と比較し、すべての被験物質群及び陽性対照群で、2 回目投与 1 日後までに明確な体重減少はみられなかった。

c) MNPCE/PCE 及び PCE/TE

試験結果を表 8 に示す。

陰性対照群及び陽性対照群での MNPCE/PCE の平均値は、それぞれ 0.11 及び 8.10% であった。被験物質群の 62.5、125 及び 250 mg/kg/day では、それぞれ 0.12、0.11 及び 0.05%を示し、陰性対照群と比較してすべての被験物質群で統計学的な有意差はみられなかった。陽性対照群では、1%水準で有意な増加がみられた。

一方、PCE/TE の平均値は、陰性対照群及び陽性対照群では、それぞれ 62.1 及び 40.5% であった。被験物質群の 62.5、125 及び 250 mg/kg/day では、それぞれ 59.7、55.3 及び 60.7%を示し、陰性対照群と比較してすべての被験物質群で統計学的な有意差はみられなかった。陽性対照群では、両側 1%水準で統計学的な有意差がみられた。

19. 試験施設の背景データ

試験施設における最新 20 実験の背景データでは、陰性対照群の MNPCE/PCE は $0.10 \pm 0.032\%$ (mean \pm S.D.)、陽性対照群では $6.04 \pm 1.406\%$ (mean \pm S.D.) であることから、以下の範囲を適正值とした (添付資料 1)。

陰性対照群: 0.00~0.20% (mean \pm 3 S.D.)、陽性対照群: 1.82~10.26% (mean \pm 3 S.D.)

20. 考察

陰性対照群及び陽性対照群での小核を有する多染性赤血球の出現頻度 (MNPCE/PCE) は、試験施設の背景データの範囲内であった。よって、試験に用いた動物の感受性に問題はなく、試験操作の誤りもなかったと判断されることから、試験は適正に実施されたと評価した。

標本観察した被験物質群の 62.5、125 及び 250 mg/kg/day のいずれにおいても、MNPCE/PCE は、陰性対照群と比較して統計学的な有意差はみられず、被験物質投与により小核を有する多染性赤血球の出現は増加しないものと判断した。

また、すべての被験物質群での全赤血球に対する多染性赤血球の占める割合 (PCE/TE) は、陰性対照群と比較して統計学的な有意差がみられなかったため、被験物質による PCE/TE の減少を指標とした骨髄細胞の被験物質暴露を証明できなかった。しかしながら、予備試験において推定された MTD である 250 mg/kg/day までの用量を設定していることから、本試験の結果により小核誘発能を適切に評価できると判断した。

21. 結論

2-(ジ-n-ブチルアミノ)エタノールは、本試験条件下では小核を誘発しないものと判断された。

22. 参考文献

1. ■■■■■ 2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験 (回復 14 日間)、財団法人食品薬品安全センター、(2004)
2. 林 真、小核試験 増補版、サイエンティスト社、(1999)
3. Heddle, J. A. et al., The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.* 123, 61-118 (1983)
4. Kastenbaum, M. A. and Bowman, K. O., Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527-549 (1970)
5. Schmid, W., The micronucleus test for cytogenetic analysis. In : Hollaender, A. Ed., *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol.4, Plenum, New York, 31-53 (1976)

表 1 小核試験に用いた被験物質液の濃度確認結果

設定濃度 (mg/mL)	測定濃度 (mg/mL)	R.N. (%)
25.0	24.9	99.6

R.N.: 設定濃度に対する相対比

表2 予備試験における雄の一般状態

使用動物: 7週齢・雄Crlj: CD1 (ICR) マウス

投与回数: 24時間間隔で2回連続投与

投与経路: 強制経口投与

投与容量: 10 mL/kg

投与群	投与用量 (mg/kg/day)	動物 番号	初回投与		2回目投与		
			1時間後まで	1時間後～ 1.5時間後まで	投与前	1時間後まで	1日後
陰性対照 [コーン油]	0	1	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		2	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		3	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
被験物質 [2-(ジ-n-ブチル アミノ)エタノール]	62.5	4	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		5	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		6	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	125	7	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		8	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		9	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	250	10	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		11	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		12	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	500	13	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		14	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		15	自発運動低下、 振戦、 間代性痙攣	腹臥位、死亡			
	1000	16	振戦、 間代性痙攣、 死亡				
		17	振戦、 間代性痙攣、 自発運動低下	呼吸数減少	死亡		
		18	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
2000	19	振戦、 間代性痙攣、 死亡					
	20	振戦、 間代性痙攣、 死亡					
	21	振戦、 間代性痙攣、 死亡					

表3 予備試験における雌の一般状態

使用動物: 7週齢・雌Crlj: CD1 (ICR) マウス

投与回数: 24時間間隔で2回連続投与

投与経路: 強制経口投与

投与容量: 10 mL/kg

投与群	投与用量 (mg/kg/day)	動物 番号	初回投与		2回目投与		
			1時間後まで	1時間後～ 1.5時間後まで	投与前	1時間後まで	1日後
陰性対照 [コーン油]	0	51	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		52	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		53	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
被験物質 [2-(ジ-n-ブチル アミノ)エタノール]	62.5	54	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		55	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		56	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	125	57	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		58	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		59	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	250	60	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		61	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		62	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	500	63	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		64	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		65	振戦、 間代性痙攣、 死亡				
	1000	66	振戦、 間代性痙攣、 死亡				
		67	振戦、 間代性痙攣、 死亡				
		68	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
2000	69	振戦、 間代性痙攣、 死亡					
	70	振戦、 間代性痙攣、 死亡					
	71	振戦、 間代性痙攣、 死亡					

表4 予備試験における雄の体重

使用動物: 7週齢・雄CrIj: CD1 (ICR) マウス

投与回数: 24時間間隔で2回連続投与

投与経路: 強制経口投与

投与容量: 10 mL/kg

投与群	投与用量 (mg/kg/day)	動物 番号	体 重 (g)		
			初回投与前	2回目投与前	2回目投与1日後
陰性対照 [コーン油]	0	1	30.8	30.5	31.1
		2	33.5	33.2	33.9
		3	35.4	36.2	37.4
	平均値 ± 標準偏差		33.2 ± 2.31	33.3 ± 2.85	34.1 ± 3.16
被験物質 [2-(ジ- <i>n</i> -ブチルアミノ) エタノール]	62.5	4	35.9	35.7	35.7
		5	30.4	30.5	30.2
		6	33.3	33.5	33.9
	平均値 ± 標準偏差		33.2 ± 2.75	33.2 ± 2.61	33.3 ± 2.80
	125	7	30.8	30.0	30.2
		8	33.0	32.9	33.1
		9	34.2	34.6	34.7
	平均値 ± 標準偏差		32.7 ± 1.72	32.5 ± 2.33	32.7 ± 2.28
	250	10	30.9	30.3	31.1
		11	34.6	35.0	35.2
		12	34.0	33.9	33.7
	平均値 ± 標準偏差		33.2 ± 1.99	33.1 ± 2.46	33.3 ± 2.07
	500	13	32.3	32.4	32.5
		14	30.6	30.4	30.8
		15	34.9	*	*
	平均値 ± 標準偏差		32.6 ± 2.17	31.4 ± _{b)}	31.7 ± _{b)}
1000	16	31.4	*	*	
	17	33.4	31.6 ^{a)}	*	
	18	34.9	34.6	35.0	
平均値 ± 標準偏差		33.2 ± 1.76	33.1 ± _{b)}	_{c)}	
2000	19	32.2	*	*	
	20	34.9	*	*	
	21	34.1	*	*	
平均値 ± 標準偏差		33.7 ± 1.39	-	-	

a) 死亡発見時の体重

b) 2匹のみの値であるため、標準偏差は算出しなかった。

c) 1匹のみの値であるため、平均値±標準偏差は算出しなかった。

*: 動物が死亡したため体重測定を実施しなかった。

表5 予備試験における雌の体重

使用動物: 7週齢・雌Crlj: CD1 (ICR) マウス

投与回数: 24時間間隔で2回連続投与

投与経路: 強制経口投与

投与容量: 10 mL/kg

投与群	投与用量 (mg/kg/day)	動物 番号	体 重 (g)		
			初回投与前	2回目投与前	2回目投与1日後
陰性対照 [コーン油]	0	51	26.2	26.3	26.9
		52	27.4	27.6	27.6
		53	25.1	25.0	26.2
	平均値 ± 標準偏差		26.2 ± 1.15	26.3 ± 1.30	26.9 ± 0.70
被験物質 [2-(ジ-n-ブチルアミノ) エタノール]	62.5	54	27.0	27.9	27.5
		55	26.0	25.5	25.0
		56	25.3	25.3	24.6
	平均値 ± 標準偏差		26.1 ± 0.85	26.2 ± 1.45	25.7 ± 1.57
	125	57	26.8	26.7	26.4
		58	24.8	24.8	25.1
		59	26.2	26.4	26.5
	平均値 ± 標準偏差		25.9 ± 1.03	26.0 ± 1.02	26.0 ± 0.78
	250	60	27.9	27.8	27.2
		61	22.8	22.8	23.0
		62	25.5	25.2	24.9
	平均値 ± 標準偏差		25.4 ± 2.55	25.3 ± 2.50	25.0 ± 2.10
	500	63	25.5	25.5	24.5
		64	26.5	26.3	26.6
		65	26.9	*	*
	平均値 ± 標準偏差		26.3 ± 0.72	25.9 ± ^{a)}	25.6 ± ^{a)}
1000	66	27.0	*	*	
	67	26.4	*	*	
	68	24.1	22.4	22.4	
平均値 ± 標準偏差		25.8 ± 1.53	^{b)}	^{b)}	
2000	69	26.0	*	*	
	70	24.4	*	*	
	71	26.1	*	*	
平均値 ± 標準偏差		25.5 ± 0.95	-	-	

a) 2匹のみの値であるため、標準偏差は算出しなかった。

b) 1匹のみの値であるため、平均値 ± 標準偏差は算出しなかった。

*: 動物が死亡したため体重測定を実施しなかった。

表6 小核試験における一般状態

使用動物: 7週齢・雄Crlj: CD1 (ICR) マウス
 投与回数: 24時間間隔で2回連続投与 (陽性対照は単回投与)
 投与経路: 強制経口投与 (陽性対照は腹腔内投与)
 投与容量: 10 mL/kg

投与群	投与用量 (mg/kg/day)	動物 番号	初回投与	2回目投与		
			1時間後まで	投与前	1時間後まで	1日後
陰性対照 [コーン油]	0	101	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		102	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		103	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		104	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		105	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		106	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
被験物質 [2-(ジ-n-ブチル アミノ)エタノール]	31.3	107	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		108	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		109	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		110	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		111	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		112	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	62.5	113	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		114	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		115	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		116	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		117	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		118	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	125	119	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		120	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		121	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		122	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		123	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		124	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
250	125	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	
	126	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	
	127	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	
	128	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	
	129	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	
	130	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	
陽性対照 [MMC]	2	131	/	異常なし	異常なし	異常なし
		132		異常なし	異常なし	異常なし
		133		異常なし	異常なし	異常なし
		134		異常なし	異常なし	異常なし
		135		異常なし	異常なし	異常なし
		136		異常なし	異常なし	異常なし

MMC: マイトマイシンC

表7 小核試験における体重

使用動物: 7週齢・雄Crj: CD1 (ICR) マウス
 投与回数: 24時間間隔で2回連続投与 (陽性対照は単回投与)
 投与経路: 強制経口投与 (陽性対照は腹腔内投与)
 投与容量: 10 mL/kg

投与群	投与用量 (mg/kg/day)	動物 番号	体 重 (g)		
			初回投与日	2回目投与日	2回目投与1日後
陰性対照 [コーン油]	0	101	31.7	32.1	32.7
		102	33.2	33.2	32.9
		103	32.1	32.4	32.3
		104	30.9	31.7	31.6
		105	33.3	33.3	34.0
		106	31.6	31.5	31.4
	平均値±標準偏差		32.1 ± 0.95	32.4 ± 0.75	32.5 ± 0.95
被験物質 [2-(ジ-n-ブチル アミノ)エタノール]	31.3	107	33.0	33.4	33.9
		108	34.1	34.1	34.4
		109	32.1	32.3	32.6
		110	31.0	31.5	30.7
		111	30.3	31.0	30.9
		112	32.3	32.5	32.2
	平均値±標準偏差		32.1 ± 1.36	32.5 ± 1.15	32.5 ± 1.51
	62.5	113	33.2	33.6	33.8
		114	33.4	33.1	33.1
		115	30.9	31.5	31.9
		116	32.3	32.2	32.7
		117	30.0	30.0	30.5
		118	32.7	32.8	33.1
	平均値±標準偏差		32.1 ± 1.35	32.2 ± 1.30	32.5 ± 1.17
	125	119	31.2	30.9	31.2
120		33.1	33.5	33.3	
121		31.4	32.0	32.2	
122		34.5	35.1	35.4	
123		30.8	31.2	32.0	
124		33.4	33.8	34.1	
平均値±標準偏差		32.4 ± 1.48	32.8 ± 1.65	33.0 ± 1.54	
250	125	33.2	33.4	33.9	
	126	31.8	31.9	32.2	
	127	30.8	31.4	31.1	
	128	29.9	29.8	29.7	
	129	31.9	32.5	32.9	
	130	32.2	32.6	32.5	
平均値±標準偏差		31.6 ± 1.15	31.9 ± 1.25	32.1 ± 1.47	
陽性対照 [MMC]	2	131	/	32.1	32.1
		132		34.8	34.9
		133		33.5	33.9
		134		32.7	32.6
		135		30.4	30.6
		136		30.3	30.2
	平均値±標準偏差			32.3 ± 1.76	32.4 ± 1.83

MMC: マイトマイシンC

表 8 小核試験における標本観察結果

使用動物: 7週齢・雄CrIj: CD1 (ICR) マウス

投与回数: 24時間間隔で2回連続投与 (陽性対照は単回投与)

投与経路: 強制経口投与 (陽性対照は腹腔内投与)

投与容量: 10 mL/kg

投与群	投与用量 (mg/kg/day)	最終投与後の 標本作製時間 (hours)	動物 番号	全赤血球中の多染性 赤血球の割合 ^{a)} (%)	小核を有する多染性赤 血球の出現頻度 ^{b)} (%)	
陰性対照 [コーン油]	0	24	101	57.5	0.00	
			102	58.5	0.10	
			103	68.5	0.10	
			104	60.0	0.25	
			105	66.0	0.10	
			平均±標準偏差	62.1 ± 4.87	0.11 ± 0.089	
			最大値/最小値	68.5 / 57.5	0.25 / 0.00	
被験物質 [2-(ジ-n-ブチル アミノ) エタノール]	62.5	24	113	69.5	0.10	
			114	58.5	0.05	
			115	52.0	0.20	
			116	64.5	0.15	
			117	54.0	0.10	
				平均±標準偏差	59.7 ± 7.29	0.12 ± 0.057
				最大値/最小値	69.5 / 52.0	0.20 / 0.05
	125	24	119	60.0	0.00	
			120	51.5	0.30	
			121	47.0	0.05	
122			59.5	0.20		
			123	58.5	0.00	
			平均±標準偏差	55.3 ± 5.77	0.11 ± 0.134	
			最大値/最小値	60.0 / 47.0	0.30 / 0.00	
250	24	125	67.0	0.05		
		126	63.5	0.10		
		127	59.0	0.00		
		128	60.0	0.05		
		129	54.0	0.05		
			平均±標準偏差	60.7 ± 4.89	0.05 ± 0.035	
			最大値/最小値	67.0 / 54.0	0.10 / 0.00	
陽性対照 [MMC]	2	24	131	46.0	8.50	
			132	38.5	8.10	
			133	42.0	7.85	
			134	35.5	6.25	
			135	40.5	9.80	
			平均±標準偏差	40.5 ± 3.92 #	8.10 ± 1.278 **	
			最大値/最小値	46.0 / 35.5	9.80 / 6.25	

MMC: マイトマイシンC

a) 赤血球200個/動物を観察

b) 多染性赤血球2000個/動物を観察

: 陰性対照との間に有意差 (p<0.01) がみられた (Studentのt検定)

** : 陰性対照との間に有意差 (p<0.01) がみられた (条件付二項検定 (Kastenbaum and Bowman))

添付資料1 マウスを用いた小核試験の背景データ

対照の種類	全赤血球中の 多染性赤血球の割合	小核を有する多染性赤血球の出現頻度		実験数
	mean ± S.D.(%)	mean ± S.D.(%)	range(%)	
陰性対照	48.5 ± 5.06	0.10 ± 0.032	0.00 - 0.20 (mean ± 3 S.D.)	20
陽性対照	41.8 ± 4.40	6.04 ± 1.406	1.82 - 10.26 (mean ± 3 S.D.)	20

陽性対照は、MMCを2 mg/kg/dayで腹腔内に単回投与したもの

2011年11月24日以前に終了した最新20実験のデータ

信頼性保証書

一般財団法人化学物質評価研究機構
日田事業所

試験委託者：厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室

試験の表題：2-(ジ-n-ブチルアミノ)エタノールのマウス小核試験

試験番号：K11-0272

当試験は一般財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所の信頼性保証部門が監査又は査察を実施しており、監査又は査察を行った日付、試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下のとおりである。

監査又は査察対象	監査又は査察実施日	監査又は査察結果報告日
試験計画書	2011年11月28日	2011年11月28日
動物入荷	2011年11月29日	2011年11月29日
検疫・馴化	2011年11月29日	2011年11月29日
体重測定	2011年11月29日	2011年11月29日
回答書の確認(試験計画書)	2011年12月2日	2011年12月2日
飼育管理	2011年12月5日	2011年12月5日
群分け及び動物の識別	2011年12月5日	2011年12月5日
被験物質液の調製	2011年12月6日	2011年12月7日
投与、一般状態観察	2011年12月6日	2011年12月7日
試験計画書の変更1	2011年12月6日	2011年12月7日
試験計画書の変更2	2011年12月16日	2011年12月16日
陽性対照物質溶液の調製及び管理	2011年12月21日	2011年12月21日
解剖及び標本作製	2011年12月22日	2011年12月22日
標本観察	2012年1月30日	2012年1月30日
生データ及び最終報告書草案	2012年2月21日	2012年2月21日
生データ及び最終報告書草案再査察	2012年2月23日	2012年2月23日
最終報告書	2012年3月14日	2012年3月14日

本報告書には、試験で使用した方法、手順が正確に記載されており報告結果は試験の生データを正確に反映している。

2012年3月14日

信頼性保証責任者