

食薬セ研第7-986号

1997年 6月 5日

メタクリル酸2,3-エポキシプロピルエステル  
のマウスを用いる  
小核試験

厚生省 生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

## 【目 次】

要 約 .....	1
緒 言 .....	2
実験材料 .....	3
1. 実験動物および飼育条件 .....	3
2. 被験物質 .....	3
毒性予備試験（投与量の決定） .....	4
1. 方 法 .....	4
2. 結 果 .....	5
毒性予備試験（追加試験） .....	5
1. 方 法 .....	5
2. 結 果 .....	5
小核予備試験（標本作製時期の決定） .....	6
1. 方 法 .....	6
2. 結 果 .....	7
小核本試験 .....	7
1. 方 法 .....	7
2. 結果および考察 .....	8
結 論 .....	10
特記事項 .....	10
文 献 .....	11
Tables 1～8	

## 【要 約】

被験物質メタクリル酸2,3-エポキシプロピルエステル（E PMA）の生体内における細胞遺伝学的影響を評価するために、Crj:BDF<sub>1</sub>雄および雌マウスを用い、強制経口投与による小核試験を実施した。毒性予備試験および小核予備試験を行い、投与量および標本作製時期を設定した後、小核本試験を実施し、陽性の結果を得た。

毒性予備試験を行った結果、E PMAの雄および雌マウスにおける最大耐量は、それぞれ 750 mg/kg および 1000 mg/kg であった。

小核予備試験において、雄および雌マウスにそれぞれE PMAの 750 および 1000 mg/kg を投与し、投与後24、48および72時間に骨髓の塗抹標本を作製した。小核出現頻度（小核を有する幼若赤血球の比率）は、24時間群と比較し他の群では明らかな増加が認められた。また、赤血球中に占める幼若赤血球の比率を指標とした骨髓細胞の増殖抑制も認められた。これらの結果から、小核本試験での最高用量を雄雌それぞれ 750 および 1000 mg/kg とし、標本作製時期をいずれも投与後48時間に決定した。

雄マウスにはE PMAの 188、375 および 750 mg/kg を投与し、雌マウスには 250、500 および 1000 mg/kg を投与し、投与後48時間目に標本を作製した。小核出現頻度は、雄雌いずれにおいても、被験物質の高用量群で、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められ、用量依存性も認められた。また、全赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、雄雌ともにE PMAの高用量群において、溶媒対照群との間に有意な低下が認められた。

以上の結果から、E PMAは、本試験条件下で Crj:BDF<sub>1</sub> 雄および雌マウスの骨髓細胞において、染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示し、さらに高用量において、骨髓細胞の増殖抑制作用も有するものと結論した。

## 【緒 言】

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、メタクリル酸2,3-エポキシプロピルエステルの生体内における細胞遺伝学的影響を調べるために、雄および雌マウスを用いて骨髄細胞における小核試験を実施した。まず、小核本試験に用いる投与量を決定するために毒性予備試験を行って最大耐量を求め、次に小核本試験における標本作製時期を決定するために小核予備試験を行い、それらの結果に基づいて小核本試験を行った。

本試験は「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）および「OECD 毒性試験ガイドライン：474」に準拠し、「化学物質 GLP 基準」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

## 【実 験 材 料】

### 1. 実験動物および飼育条件

実験には、日本チャールス・リバー(株) (CRJ) から購入した8週齢の Crj:BDF<sub>1</sub> (C57BL/6 と DBA/2 の近交系間 F<sub>1</sub>) 雄および雌マウスを、1週間以上予備飼育したのち、異常の認められなかった動物を9週齢で試験に供した。入荷日とその匹数は以下の通りである。

試験	入荷日	入荷匹数
毒性予備試験 小核予備試験	1995年10月25日 1995年11月1日	雄雌各36匹 雄雌各31匹 雄雌各10匹は毒性予備 試験(追加)に使用
小核本試験 小核本試験	1995年11月29日 1995年12月6日	雄 31匹 雌 31匹

動物は、床敷としてホワイト・フレーク® (CRJ) を入れた TPX 樹脂製ケージ (143×293×148 mm, CRJ) に1匹ずつ収容し、環境条件を設定した飼育室(設定温度: 23 ± 1℃、設定湿度: 50~65%、換気回数: 約15回/時間、明暗サイクル: 午前7時点灯、午後7時消灯)で、マウス繁殖用固型飼料(NMF、オリエンタル酵母工業(株))と水道水を自由に摂取させて飼育した。動物の群分けは自由群分け(無作為抽出)により行った。個体識別はフェルトペンによりマウスの尾に群と個体番号を記し、ケージには群ごとに色の異なるカードに、試験系識別番号、群および個体番号を記載して個体識別の補助とした。

なお、投与経路および投与回数は「新規化学物質に係る試験の方法について」および「OECD 毒性試験ガイドライン: 474」に準拠し、単回強制経口投与とした。

### 2. 被験物質

名 称 : メタクリル酸2,3-エポキシプロピルエステル (CAS No. 106-91-2)  
英名(略称) : 2,3-Epoxypropyl methacrylate (E PMA)  
ロット番号 :  
純 度 : 99.93% (不純物: 2-メチル-3-メトキシプロパン酸2,3-エポキシ  
プロピルエステル: 0.07%、ヒドロキノンモノメチルエーテル  
(重合禁止剤): 46 ppm)

物理化学的性質 : 性状 : 無色透明液体  
分子量 : 142.16  
分子式 :  $C_7H_{10}O_3$   
比重 : 1.073  
融点 (凝固点) :  $-50^{\circ}C$   
沸点 :  $189^{\circ}C$   
保管条件 : 冷蔵遮光  
提供元 :

### 【毒性予備試験 (投与量の決定)】

#### 1. 方法

##### 1) 実験群の設定

小核試験に用いるメタクリル酸2,3-エポキシプロピルエステル (EPMA) の投与量を決定するため、雄雌ともに各群5匹ずつからなる5群を設け、物性調査資料のマウス経口投与の $LD_{50}$ 値を参考に、最高用量を500 mg/kgとし、以下公差を100 mg/kgとして400、300、200 および 100 mg/kg の用量で投与した。

##### 2) 検体の調製および投与方法

検体の投与容量はマウスの体重 kg 当たり 10 ml とした。投与検体はEPMAの所要量を正確に採取し、局方オリブ油 (吉田製薬(株)、製造番号: 895520) に溶解して最高用量の原液を調製した。それ以下の用量の投与検体については、最高用量の調製液を上記の溶媒で希釈して所定の濃度に調製した。また、投与検体はすべて用時調製とした。

投与は強制経口投与とした。投与は、雄雌ともに1995年11月6日に行った。投与時の体重範囲は雄が24~29 g、雌が19~23 gであった。

##### 3) 死亡率および一般状態の観察

投与当日を1日として4日間にわたり毎日一般状態を観察し、死亡の有無を調べた (1995年11月6~9日)。

## 2. 結果

投与直後から、400 mg/kg 以上の投与群において軽度を含む自発運動の低下が認められたが、死亡例は、雄雌ともに認められなかった (Table 1、2)。そこで、さらに用量を上げた追加試験を実施することとした。

### 【毒性予備試験 (追加試験)】

#### 1. 方法

##### 1) 実験群の設定

毒性予備試験で雄雌ともに 500 mg/kg の投与量においても 3 日間の観察期間中に死亡例が認められなかったため、投与量を上げて追加試験を実施した。雄雌ともに各群 5 匹ずつからなる 4 群を設け、公差を 250 mg/kg とすることにより、投与量をそれぞれ、750、1000、1250 および 1500 mg/kg とした。

##### 2) 検体の調製および投与方法

検体調製と投与方法は毒性予備試験の場合と同様に行った。

投与は、雄雌ともに 1995 年 11 月 8 日に行った。投与時の体重範囲は雄が 24~29 g、雌が 19~23 g であった。

##### 3) 死亡率および一般状態の観察

投与当日を 1 日として 4 日間にわたり毎日一般状態を観察し、死亡の有無を調べた (1995 年 11 月 8~11 日)。

## 2. 結果

投与 6 時間後から、すべての投与群において自発運動の低下が認められ、時間の経過とともに、振戦、よろめき歩行、立毛、呼吸促迫などの毒性徴候が現れた。雄では 1000 mg/kg 以上の投与群で、全例の死亡が確認され、雌では 1500 mg/kg 投与群で 5 匹全例、1250 mg/kg 投与群で 1 匹の死亡が確認された (Table 3、4)。したがって、本実験条件下で、E PMA の強制経口投与による Crj:BDF<sub>1</sub> マウスの最大耐量は、雄では 750 mg/kg、雌では 1000 mg/kg であると判断し、それぞれを小核予備試験に用いる E PMA の投与量とした。

## 【小核予備試験（標本作製時期の決定）】

### 1. 方法

#### 1) 実験群の設定

雄および雌マウスに、それぞれE P M Aの 750 および 1000 mg/kg を投与し、各5匹ずつからなる3群（24時間群、48時間群、72時間群）を設け、小核本試験における適切な標本作製時期を決定することとした。

#### 2) 検体の調製と投与方法

検体の調製と投与方法は毒性予備試験の場合と同様に行った。雄および雌マウスへの投与は、1995年11月13日に行った。投与時の体重範囲は、雄が25～27 g、雌が20～23 gであった。

#### 3) 標本の作製

小核の観察のための骨髓標本は、Schmid の方法<sup>1, 2)</sup>に従って作製した。すなわち、投与後所定の時間に頸椎脱臼法によりマウスを致死させて左右の大腿骨を摘出した。その両骨端を切断して、骨髓細胞を 0.6 ml のウシ胎児血清（GIBCO、ロット番号：200-6140PJ）で洗い出し、遠沈管に集め、1000 rpm で5分間遠心分離して、上清を除いた。沈渣をピペティング後、細胞浮遊液の一部をスライドグラス上に塗抹（各個体につき3枚の標本）し、それぞれの骨髓標本に試験系識別番号およびコード番号を記し、室温で一晩自然乾燥させた。乾燥した骨髓標本は5分間メタノールで固定し、標本観察時まで室温保存した。

#### 4) 骨髓標本のアクリジンオレンジ（A.O.）蛍光染色および小核の観察

骨髓標本のアクリジンオレンジ（A.O.）蛍光染色および小核の観察は、林らの方法<sup>3, 4)</sup>に従って行った。0.04 mg/ml の A.O. 溶液を上記のメタノールで固定済の骨髓標本上に数滴滴下し、カバーグラスをかけ、カバーグラス上から濾紙で余分な溶液を十分吸い取り、蛍光顕微鏡下で観察した。

骨髓標本はそれぞれの個体について、2名の観察者により観察した。1個体あたり2000個の幼若赤血球（polychromatic erythrocytes）を観察し、その中の小核を有するものの数を記録した。また赤血球を1個体あたり1000個観察し、そのなかの幼若赤血球の比率を調べて、骨髓細胞の増殖抑制の指標とした。



## 2. 結果

結果は Table 5 および 6 に示した。小核出現頻度に関しては、24時間群と比較し、48および72時間群では明らかな増加が認められた。また、雄の72時間群において、骨髓細胞の増殖抑制が強く認められたこと、および多くの化学物質で小核が投与後48時間以内に誘発されていることから、雄雌ともに小核本試験における標本作製時期を投与後48時間に決定した。また、E PMAの 750 あるいは 1000 mg/kg 投与により、いずれの時間群においても、骨髓細胞の増殖抑制が認められたが、幼若赤血球の比率が10%まで低下しておらず、観察は可能であったことにより、小核本試験に用いるE PMAの最高用量を雄および雌について、それぞれ 750、1000mg/kg と決定した。

### 【小核本試験】

#### 1. 方法

##### 1) 実験群の設定

毒性予備試験および小核予備試験の結果に基づき、小核本試験に用いる実験群を設定した。雄は高用量を 750 mg/kg とし、これをもとに公比2で減じ、中用量を 375 mg/kg、低用量を 188 mg/kg とし、雌は高用量を 1000 mg/kg とし、中用量を 500 mg/kg、低用量を 250 mg/kg とした。なお、標本作製時期は雄雌ともに投与後48時間に設定した。各群5匹ずつからなる5群を以下のように設けた。

雄

- i) 溶媒対照群 (局方オリブ油)
- ii) E PMA 188 mg/kg 投与群
- iii) E PMA 375 mg/kg 投与群
- iv) E PMA 750 mg/kg 投与群
- v) 陽性対照群 (cyclophosphamide, C P A : 50 mg/kg) \*

雌

- i) 溶媒対照群 (局方オリブ油)
- ii) E PMA 250 mg/kg 投与群
- iii) E PMA 500 mg/kg 投与群
- iv) E PMA 1000 mg/kg 投与群
- v) 陽性対照群 (C P A : 50 mg/kg) \*

- \* 当研究室で、本用量のCPAの強制経口投与により小核が有意に誘発されることが認められている。

## 2) 検体の調製および投与方法

投与検体の調製および投与方法は毒性予備試験の場合と同様に行った。また、陽性対照物質（CPA, Sigma Chemical Co.、ロット番号：73H0846）は、局方生理食塩液（小林製薬㈱製、製造番号：31A3B）に溶解して所定の濃度に調製し、10 ml/kg の容量で単回強制経口投与した。投与は、雄は1995年12月11日に行い、雌は同年12月19日に行った。投与時の体重範囲は、雄が24～28 g、雌が20～23 gであった。

## 3) 標本の作製方法および小核の観察

標本の作製および小核の観察は、小核予備試験の場合と同様に行った。ただし標本の作製時期は小核予備試験の結果に基づき、雄雌ともに溶媒および検体投与群は投与後48時間（雄：1995年12月13日、雌：同年12月21日）とし、陽性対照群は投与後24時間（雄：同年12月12日、雌：同年12月20日）とした。

## 4) 有意差検定

それぞれの小核出現頻度について、Fisher の正確確率検定法<sup>5)</sup>により、溶媒対照群と、各検体投与群および陽性対照群との間で有意差検定を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して、Bonferroni の補正<sup>6)</sup>を行った。更に、小核出現頻度の用量（対数值）依存性について、Cochran-Armitage の傾向検定<sup>7)</sup>を行った。有意差検定の結果、小核出現頻度が溶媒対照群と比較して5%水準で有意に高い被験物質投与群が認められ、さらに5%水準で有意な用量依存性が認められた場合は、陽性（被験物質が染色体異常誘発作用または紡錘体形成阻害作用をもつ）と判定することとした。また、赤血球中に占める幼若赤血球の比率について、それぞれ溶媒対照群と、各検体投与群および陽性対照群との間で、t検定（両側検定）を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して、Bonferroni の補正を行った。

## 2. 結果および考察

雄および雌の小核本試験の結果をそれぞれ Table 7 および 8 に示す。雄雌ともに溶媒対照群および陽性対照群の小核出現頻度は、それぞれの過去2年間の背景データのばらつき範囲内（平均値±3×標準偏差）であった。

雄雌ともに小核出現頻度は、Fisher の正確確率検定法 (Bonferroni の補正) による有意差検定の結果、E PMA の高用量群において、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。さらに、Cochran-Armitage の傾向検定の結果においても、小核出現頻度はE PMAの用量に依存した有意な増加傾向が認められた。一方、CPAを 50 mg/kg 投与した陽性対照群での小核出現頻度も、雄雌ともに有意な増加がみられた。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、E PMA の高用量群および雄マウスの陽性対照群において溶媒対照群との間に有意に低下した。

E PMA の変異原性について、Canter ら<sup>8)</sup> は Ames 試験を行い、S9 mix 無添加の条件下で TA100 および TA1535 において、強い陽性の結果を得ている。また、von der Hude ら<sup>9)</sup> は、大腸菌を用いた SOS 修復誘発試験でも用量依存性のある陽性の結果を得ている。さらに、本毒性調査事業で実施された培養細胞を用いる染色体異常試験において、E PMA は、24時間および48時間の連続処理および S9 mix 存在および非存在下の短時間処理のすべてにおいて、用量依存的に構造異常を誘発し、さらに、48時間の連続処理および S9 mix 非存在下の短時間処理によって倍数性細胞を誘発することが認められている<sup>10)</sup>。

## 【結 論】

以上の結果から、本試験条件下では被験物質E PMAは、マウス骨髄細胞において、染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示し、また骨髄細胞の増殖抑制作用も示すものと結論した。

## 【特 記 事 項】

全試験期間を通して、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態は認められなかった。

【文 献】

- 1) Schmid, W. : The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31 : 9-15 (1975)
- 2) Schmid, W. : The micronucleus test for cytogenetic analysis. in "Chemical Mutagens" Hollaender, A. ed., Plenum Press, N.Y.-London (1976), vol. 4. pp.76-78.
- 3) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. : An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.* 120 : 241-247 (1983)
- 4) 林 真 : 「小核試験」, サイエнтиスト社, 東京 (1991), pp. 44-55.
- 5) 吉村 功 編 : 「毒性・薬効データの統計解析」, サイエнтиスト社, 東京 (1987), pp. 76-78.
- 6) 吉村 功、大橋靖雄 編 : 「毒性試験講座14、毒性試験データの統計解析」 地人書館, 東京 (1992), pp.18-222
- 7) 吉村 功 編 : 「毒性・薬効データの統計解析」, サイエнтиスト社, 東京 (1987), pp. 67-69.
- 8) Canter, D.A., E. Zeiger, S. Haworth, T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck : *Mutat. Res.* 172 : 105-138 (1986)
- 9) von der Hude, W., A. Seelbach, A. Basler : *Mutat. Res.* 231 : 205-218 (1990)
- 10) 秦野研究所 : 食薬セ研第 8 - 1 8 8 号 (G-95-014) (1996)

Table 1. Mortality of BDF<sub>1</sub> male mice after single administration of 2,3-epoxypropyl methacrylate by gavage

Dose (mg/kg)	Number of mice administrated	Number of dead mice				Mortality
		Days after administration				
		1	2	3	4	
100	5	0	0	0	0	0 / 5
200	5	0	0	0	0	0 / 5
300	5	0	0	0	0	0 / 5
400	5	0	0	0	0	0 / 5
500	5	0	0	0	0	0 / 5

Purity was 99.93 wt % and 0.07 wt % 2,3-epoxypropyl 2-methyl-3-methoxypropanoate and 46 ppm hydroquinone monomethyl ether were contained as impurities.

Table 2. Mortality of BDF<sub>1</sub> female mice after single administration of 2,3 epoxypropyl methacrylate by gavage

Dose (mg/kg)	Number of mice administrated	Number of dead mice				Mortality
		Days after administration				
		1	2	3	4	
100	5	0	0	0	0	0 / 5
200	5	0	0	0	0	0 / 5
300	5	0	0	0	0	0 / 5
400	5	0	0	0	0	0 / 5
500	5	0	0	0	0	0 / 5

Purity was 99.93 wt % and 0.07 wt % 2,3-epoxypropyl 2-methyl-3-methoxypropanoate and 46 ppm hydroquinone monomethyl ether were contained as impurities.

Table 3. Mortality of BDF<sub>1</sub> male mice after single administration of 2,3-epoxypropyl methacrylate by gavage (additional toxicity test)

Dose (mg/kg)	Number of mice administered	Number of dead mice				Mortality
		Days after administration				
		1	2	3	4	
750	5	0	0	0	0	0 / 5
1000	5	0	0	4	1	5 / 5
1250	5	0	1	4	-	5 / 5
1500	5	0	5	-	-	5 / 5

Purity was 99.93 wt % and 0.07 wt % 2,3-epoxypropyl 2-methyl-3-methoxypropanoate and 46 ppm hydroquinone monomethyl ether were contained as impurities.



Table 4. Mortality of BDF<sub>1</sub> female mice after single administration of 2,3-epoxypropyl methacrylate by gavage (additional toxicity test)

Dose (mg/kg)	Number of mice administrated	Number of dead mice				Mortality
		Days after administration				
		1	2	3	4	
750	5	0	0	0	0	0 / 5
1000	5	0	0	0	0	0 / 5
1250	5	0	0	0	1	1 / 5
1500	5	0	2	3	-	5 / 5

Purity was 99.93 wt % and 0.07 wt % 2,3-epoxypropyl 2-methyl-3-methoxypropanoate and 46 ppm hydroquinone monomethyl ether were contained as impurities.

Table 5. Results of preliminary micronucleus test in BDF<sub>1</sub> male mice after single administration of 2,3-epoxypropyl methacrylate by gavage (750 mg/kg)

Time after administration	Animal No.	a		b	
		MNPCE	PCE	PCE	ERY
24 h	1	6	2000	291	1000
	2	2	2000	473	1000
	3	6	2000	372	1000
	4	2	2000	279	1000
	5	6	2000	412	1000
	Total	22	10000	1827	5000
	%(Mean±S.D.)	( 0.22 ± 0.11 )	( 36.5 ± 8.2 )		
48 h	6	9	2000	387	1000
	7	15	2000	325	1000
	8	6	2000	325	1000
	9	15	2000	230	1000
	10	5	2000	494	1000
	Total	50	10000	1761	5000
	%(Mean±S.D.)	( 0.50 ± 0.24 )	( 35.2 ± 9.7 )		
72 h	11	41	2000	282	1000
	12	8	2000	251	1000
	13	7	2000	214	1000
	14	20	2000	261	1000
	15	11	2000	194	1000
	Total	87	10000	1202	5000
	%(Mean±S.D.)	( 0.87 ± 0.71 )	( 24.0 ± 3.6 )		

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes / total number of erythrocytes observed

Purity was 99.93 wt % and 0.07 wt % 2,3-epoxypropyl 2-methyl-3-methyl-methoxypropanoate and 46 ppm hydroquinone monomethyl ether were contained as impurities.

Table 6. Results of preliminary micronucleus test in BDF<sub>1</sub> female mice after single administration of 2,3-epoxypropyl methacrylate by gavage (1000 mg/kg)

Time after administration	Animal No.	a		b	
		MNPCE	PCE	PCE	ERY
24 h	51	5	2000	569	1000
	52	8	2000	564	1000
	53	2	2000	485	1000
	54	6	2000	291	1000
	55	7	2000	391	1000
	Total	28	10000	2300	5000
	%(Mean±S.D.)	( 0.28 ± 0.12 )	( 46.0 ± 11.9 )		
48 h	56	13	2000	366	1000
	57	15	2000	383	1000
	58	9	2000	349	1000
	59	22	2000	370	1000
	60	12	2000	365	1000
	Total	71	10000	1833	5000
	%(Mean±S.D.)	( 0.71 ± 0.24 )	( 36.7 ± 1.2 )		
72 h	61	9	2000	448	1000
	62	13	2000	404	1000
	63	17	2000	416	1000
	64	14	2000	364	1000
	65	15	2000	319	1000
	Total	68	10000	1951	5000
	%(Mean±S.D.)	( 0.68 ± 0.15 )	( 39.0 ± 5.0 )		

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes / total number of erythrocytes observed

Purity was 99.93 wt % and 0.07 wt % 2,3-epoxypropyl 2-methyl-3-methoxypropanoate and 46 ppm hydroquinone monomethyl ether were contained as impurities.

Table 7. Results of micronucleus test in BDF<sub>1</sub> male mice after single administration of 2,3-epoxypropyl methacrylate by gavage

Group	Animal No.	a	b
		MNPCE / PCE	PCE / ERY
Solvent control Olive oil 10 ml/kg	1	5 / 2000	599 / 1000
	2	6 / 2000	542 / 1000
	3	4 / 2000	569 / 1000
	4	4 / 2000	548 / 1000
	5	1 / 2000	609 / 1000
	Total	20 / 10000	2867 / 5000
	%(Mean±S.D.)	( 0.20 ± 0.09 )	( 57.3 ± 3.0 )
EPMA 188 mg/kg	6	3 / 2000	521 / 1000
	7	1 / 2000	585 / 1000
	8	6 / 2000	578 / 1000
	9	6 / 2000	569 / 1000
	10	1 / 2000	555 / 1000
	Total	17 / 10000	2808 / 5000
	%(Mean±S.D.)	( 0.17 ± 0.13 )	( 56.2 ± 2.5 )
EPMA 375 mg/kg	11	2 / 2000	568 / 1000
	12	5 / 2000	571 / 1000
	13	1 / 2000	495 / 1000
	14	3 / 2000	527 / 1000
	15	4 / 2000	543 / 1000
	Total	15 / 10000	2704 / 5000
	%(Mean±S.D.)	( 0.15 ± 0.08 )	( 54.1 ± 3.1 )
EPMA 750mg/kg	16	27 / 2000	474 / 1000
	17	12 / 2000	523 / 1000
	18	14 / 2000	412 / 1000
	19	7 / 2000	394 / 1000
	20	20 / 2000	414 / 1000
	Total	80 / 10000	2217 / 5000
	%(Mean±S.D.)	( 0.80 ± 0.39 )***	( 44.3 ± 5.4 )**
Positive control CPA 50 mg/kg	21	56 / 2000	407 / 1000
	22	40 / 2000	482 / 1000
	23	22 / 2000	365 / 1000
	24	38 / 2000	401 / 1000
	25	62 / 2000	437 / 1000
	Total	218 / 10000	2092 / 5000
	%(Mean±S.D.)	( 2.18 ± 0.79 )***	( 41.8 ± 4.4 )***

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes / total number of erythrocytes observed

CPA: Cyclophosphamide

EPMA: 2,3-epoxypropyl methacrylate

Purity was 99.93 wt % and 0.07 wt % 2,3-epoxypropyl 2-methyl-3-methoxypropanoate and 46 ppm hydroquinone monomethyl ether were contained as impurities.

\*\* : Data significantly different from the solvent control at 1 % level

\*\*\* : Data significantly different from the solvent control at 0.1 % level

Table 8. Results of micronucleus test in BDF<sub>1</sub> female mice after single administration of 2,3-epoxypropyl methacrylate by gavage

Group	Animal No.	a		b	
		MNPCE / PCE	PCE / ERY		
Solvent control Olive oil 10 ml/kg	51	5 / 2000	614 / 1000		
	52	1 / 2000	602 / 1000		
	53	5 / 2000	639 / 1000		
	54	5 / 2000	616 / 1000		
	55	3 / 2000	573 / 1000		
	Total	19 / 10000	3044 / 5000		
	%(Mean±S.D.)	( 0.19 ± 0.09 )	( 60.9 ± 2.4 )		
EPMA 250 mg/kg	56	6 / 2000	572 / 1000		
	57	2 / 2000	648 / 1000		
	58	4 / 2000	617 / 1000		
	59	5 / 2000	554 / 1000		
	60	4 / 2000	581 / 1000		
	Total	21 / 10000	2972 / 5000		
	%(Mean±S.D.)	( 0.21 ± 0.07 )	( 59.4 ± 3.8 )		
EPMA 500 mg/kg	61	9 / 2000	621 / 1000		
	62	5 / 2000	634 / 1000		
	63	10 / 2000	582 / 1000		
	64	5 / 2000	572 / 1000		
	65	3 / 2000	580 / 1000		
	Total	32 / 10000	2989 / 5000		
	%(Mean±S.D.)	( 0.32 ± 0.15 )	( 59.8 ± 2.8 )		
EPMA 1000mg/kg	66	15 / 2000	467 / 1000		
	67	9 / 2000	599 / 1000		
	68	13 / 2000	503 / 1000		
	69	20 / 2000	527 / 1000		
	70	6 / 2000	556 / 1000		
	Total	63 / 10000	2652 / 5000		
	%(Mean±S.D.)	( 0.63 ± 0.27 )***	( 53.0 ± 5.0 )*		
Positive control CPA 50 mg/kg	71	66 / 2000	547 / 1000		
	72	71 / 2000	622 / 1000		
	73	55 / 2000	563 / 1000		
	74	45 / 2000	548 / 1000		
	75	33 / 2000	515 / 1000		
	Total	270 / 10000	2795 / 5000		
	%(Mean±S.D.)	( 2.70 ± 0.77 )***	( 55.9 ± 3.9 )		

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes / total number of erythrocytes observed

CPA: Cyclophosphamide

EPMA: 2,3-epoxypropyl methacrylate

Purity was 99.93 wt % and 0.07 wt % 2,3-epoxypropyl 2-methyl-3-methoxypropanoate and 46 ppm hydroquinone monomethyl ether were contained as impurities.

\*: Data significantly different from the solvent control at 5 % level

\*\*\*: Data significantly different from the solvent control at 0.1 % level