食薬セ研第１１－１７３６号

２００１年　６月１８日

2-エチル酪酸のラットを用いる急性経口投与毒性試験

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
方法 …… 3
1．被験物質 …… 3
2．使用動物および飼育方法 …… 3
3．投与検体の調製 …… 4
4．投与量の設定および投与方法 …… 4
5．観察および検査 …… 5
1) 一般状態の観察 …… 5
2) 体重測定 …… 5
3) 病理学検査 …… 5
6．データ解析法 …… 6
結果 …… 7
1．死亡動物 …… 7
2．一般状態 …… 7
3．体重推移 …… 7
4．病理学検査 …… 8
考察 …… 9
文献 …… 10

Tables　1～5

【要　　約】

雌雄各5匹の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] ラットに、2-エチル酪酸（以下 BA2E と略記）2000 mg/kg を単回経口投与し、投与日（観察第1日）から14日間観察を行い、観察第15日に屠殺して剖検した。この間体重を測定し、媒体（コーン油 10 mL/kg ）投与群と比較した。

雌雄ともに死亡はみられなかった。

BA2E 投与により、1時間以内に一過性の流涎が雄に1例および雌に2例みられた。ラッセル音が雄に1例および雌に3例みられ、数日間にわたり継続して聴取される例、あるいは遅発する例が認められた。

体重増加抑制が雌雄に認められた。雄では、観察第4日には回復していたが、雌では、観察第11日に至るまで増加抑制が認められ、観察第15日に至っても、有意差は認められなかったものの、対照群の値まで復することはなく、体重増加抑制に関して性差が認められた。

観察第15日に実施した剖検では BA2E 投与に起因した異常はみられなかった。

これらのことより、本試験条件下における BA2E の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると判断された。

【緒　　言】

OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、2-エチル酪酸の安全性確認の資料を得るために、ラットを用いる急性経口投与毒性試験を実施したので、その結果を報告する。

本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401] 急性経口毒性試験」（1987年2月24日採択）」および「化学物質 GLP」（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、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方　　法】

1．被験物質

被験物質として用いた、2-エチル酪酸（以下 BA2E と略記）の性状は下記のとおりである。

化学名	2-エチル酪酸
別名	ジエチル酢酸
英名	Butanoic acid, 2-ethyl-
CAS No.	88-09-5
分子量	116.16
分子式	$C_6H_{12}O_2$
物理化学的性質	
性状	無色透明の液体
比重	0.923 (20/4℃)
沸点	194℃
蒸気圧	8.0 kPa (20℃)
溶解度	水において 0.22 wt%
構造式	$CH_3CH_2CH(COOH)CH_2CH_3$

本試験には、　　より提供された純度 99.2 %（不純物：水分 0.03 %）の BA2E（ロット番号：　　）を用いた。受領物質は、使用時まで被験物質受領保管室において、室温で保管した。使用した被験物質は、　　に返却し、再度品質試験を実施することにより、使用中の安定性を確認した（Appendix A）。

2．使用動物および飼育方法

4週齢の Sprague-Dawley 系［Crj:CD(SD)IGS, SPF］雌雄ラットを、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて7日間予備飼育した。予備飼育中、動物の一般状態に異常は認められなかった。試験には、雌雄各10匹を用い、検疫終了時（投与前日）の測定体重を基に体重別層化無作為抽出法により1群5匹からなる2群に分けた。投与開始時の週齢は、雌雄ともに5週齢であった（注）。

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に1匹ずつ収容し、基準温度22～25℃、基準湿度50～65%、換気回数約15回／時、照明12時間（7時～19時点灯）に制御された飼育室で、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道

（注）動物入荷日：2000年3月22日
入荷時匹数：雄13匹、雌13匹
入荷時体重：雄 79.9～88.5g、雌 68.4～74.4g
投　与　日：2000年3月29日
投与時体重：雄 117.3～123.6g、雌 96.3～104.8g

水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ 23.0～24.0℃、47.5～65.5%で、湿度は基準値をわずかながらはずれる値を示したが、いずれも1時間以内の逸脱であり、試験に影響を及ぼさないものと判断された。それ以外は基準の範囲内にあった。また、供給した飼料および水には試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

動物の個体識別は、各動物の尾にフェルトペンで雄から雌に一連の番号を付した。また、各飼育ケージには個体識別の補助として試験計画番号、投与量、性および動物番号を記入した動物カードを掛けた。

3．投与検体の調製

投与検体の調製においては、供給物質を正確に秤量し、コーン油（英名：corn oil、Lot No. V9F1299、ナカライテスク株式会社）に溶解して被験物質濃度として 20 w/v%溶液を調製し、投与時まで冷蔵・遮光下で保存し、調製2日後に使用した。

本試験に先立ち、被験物質の 0.5 および 20 w/v%調製検体の、冷蔵、遮光条件下における8日間の安定性を確認した（Appendix B）。また、投与検体中の被験物質の含量を測定し、規定範囲内にあることを確認した（Appendix C）。なお、本投与検体は溶液であることから、均一性試験は実施しなかった。

調製検体中の被験物質濃度の測定は、各濃度の調製検体を2mLずつ採取し、ヘキサンを加えて一定量とした後、適宜ヘキサンで希釈し、ガスクロマトグラフ（GC）により測定した。内標準物質には n-ヘプタン酸を用い、同時に作成する検量線（BA2E：25～100 μg/mL）を用いて濃度を求めた。GC の条件を以下に示す。

分析カラム	：TC-FFAP、0.32 mm i.d.×30 m、膜厚 0.25 μm [ジーエルサイエンス㈱]
カラム温度	：50℃ → 10℃/min → 230℃
キャリアガス	：ヘリウム、80 kPa
水素	：60 kPa
空気	：50 kPa
注入口温度	：200℃
検出器温度	：200℃
試料注入量	：1 μL

4．投与量の設定および投与方法

本試験における投与量は、本試験に先立ち実施した予備試験（試験計画番号：A-99-056）の結果に基づいて決定した。すなわち、文献検索の結果、非絶食下における被験物

質のラット経口投与時の50%致死量が 2200 mg/kg であると報告[1]されていることから、予備試験では死亡状況を推察するとともに、死亡の認められない用量を求めることを目的に、絶食下で 500、1000、1500 および 2000 mg/kg を雌雄各3匹のラットに単回経口投与し、1週間の観察を行った。その結果、雌雄とも観察第2日での軽微な体重増加抑制傾向が認められた以外、被験物質投与によると判断される変化がみられなかったことより、雌雄とも OECD 化学物質試験法ガイドラインに定める限度試験を実施することとし、2000 mg/kg の1群および媒体（コーン油）投与群を設けた。

投与容量は体重1kg 当たり 10 mL とし、動物を投与前日の16時より絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。投与は9時37分～9時48分の間に行い、給餌は投与後約3時間に行った。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は次の通りである。

投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
				雄	雌
コーン油（対照群）	0	0	10	1～5	11～15
BA2E	2000	20	10	6～10	16～20

5．観察および検査

1）一般状態の観察

観察第1日（投与日）から14日間にわたって死亡の有無を確認し、各動物の一般状態を観察した。観察は投与日においては投与直後から1時間まで連続して行い、その後は投与後6時間まで約1時間間隔で実施した。観察第2日から15日までは毎日1回行った。

2）体重測定

体重は全例について、投与直前、観察第2、4、8、11および15日に測定した。

3）病理学検査

剖検は、観察第15日に全例をペントバルビタール・ナトリウム麻酔下で放血屠殺して実施した。剖検時に、脳、下垂体、眼球、甲状腺、心臓、気管、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、消化管、生殖器、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髄、膵臓、顎下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚および病変部の肉眼的観察を行った。これらのうち、各群の動物番号の若い例（動物番号：1、6、11、16）を1例ずつ、および体重増加が著明でなく、ラッセル音が遅れて出現した1例（動物番号：20）の主要器官

・組織（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管）を 0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。なお、剖検時に異常所見がみられなかったことより、組織学検査は実施しなかった。

6．データ解析法

体重の測定値について、群ごとに平均値と標準偏差を求めた。ついで、F-検定を行い、等分散の場合は Student の t 検定を行い、不等分散の場合は Aspin-Welch の検定を行い、対照群と被験物質投与群との平均値の差を検定した。いずれの検定においても有意水準は5%とした。

【結　　果】

1．死亡動物

雌雄ともに、死亡例はなかった。

2．一般状態（Tables 1、2）

BA2E 投与により、流涎が投与後約10～20分の間に雄1例（動物番号：8）および雌2例（動物番号：17、20）に認められたが、1時間以内に回復した。ラッセル音が雄では投与後1時間以内に1例（動物番号：8）に聴取され、観察第2日まで持続した。雌では3例にラッセル音が聴取された。これらのうち、1例（動物番号：17）では投与1時間以内にラッセル音が聴取され、観察2時間まで持続した後回復したが、観察第2日に再発し、観察第5日まで継続して聴取された。別の1例（動物番号：19）では観察第2日にのみラッセル音が聴取され、別の1例（動物番号：20）ではさらに遅れて、観察第4日から8日にわたって聴取された。また、雌では、排便量の減少および肛門周囲の汚れが観察第2日に3例（動物番号：17、19、20）にみられた。なお、投与当日、粘液便の排泄が対照群の雄2例（動物番号：3、4）および雌1例（動物番号：14）ならびに BA2E 投与群の雌では2例（動物番号：16、19）にみられた。また、軟便が雌の対照群で1例（動物番号：15）に認められたが、いずれも媒体であるコーン油投与によるものである。なお、雌の対照群の1例（動物番号：12）は、剖検所見（後述）から投与過誤があったものと判断されたが、投与後の一般状態に異常は認められず、観察第15日まで生存した。本例については、投与過誤が体重増加に及ぼす影響を考慮して体重測定値を評価の対象から除外した。

3．体重推移（Tables 3、4）

雄の BA2E 投与群では、対照群と比較し、観察第2日に有意（$p<0.05$）な低値が認められたが、観察第4日以降は回復し、その後、対照群と同様に推移した。雌の BA2E 投与群では、観察第2日に体重減少あるいは増加抑制が認められ、対照群と比較し、有意差（$p<0.05$）を生じた。観察第4、8および11日日においても体重は有意（$p<0.05$）な低値を示し、観察第15日では、有意差は認められなかったものの、対照群の値にまでは至らなかった。

4．病理学検査（Table 5）

観察第15日に実施した剖検では、対照群の雌1例（動物番号：12）の胸郭に乳白色で粘性のある液体の貯留がみられたほか、肺門部付近の肺胸膜には同様の色調で塊状になった不定形物質が付着していた。また、胸郭の胸膜および横隔膜にも同様の小塊の付着が観察され、投与時に誤操作があったものと判断された。対照群のその他の例ならびに BA2E 投与群の各例の器官・組織に肉眼的異常所見は認められなかった。

【考　　察】

BA2E の 2000 mg/kg を、5週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] 雌雄ラットに単回強制経口投与し、BA2E の単回投与毒性を検討した。

その結果、雌雄ともに死亡例はみられなかった。

BA2E のラットにおける経口投与による LD_{50} 値については、非絶食下では 2200 mg/kg であるとする報告[1)]があるが、本試験において 2000 mg/kg を投与しても死亡のみならず一般状態にも重篤な異常は認められなかった。BA2E を含む26種の化学物質について、11年にわたりラットにおける経口投与による LD_{50} 値を毎年求めた成績[2)]では、BA2E の非絶食下における LD_{50} 値に約3倍の開きが認められている。その要因を解析した結果、使用動物の体重が LD_{50} 値に影響することが示唆されている。しかし、前試験[1)]と本試験との間で使用動物の体重に隔たりは認められないことから、毒性の程度の違いは絶食の有無によるものと推測される。

一般状態の変化として、BA2E 投与により、一過性の流涎が雄1例および雌2例に観察されたが、1時間以内に全て消失した。また、ラッセル音が雄に1例および雌に3例に投与後から翌日にかけて、あるいは投与後日数を経た後に聴取された。催奇形実験を目的としてコーン油に溶解した BA2E を妊娠動物に 150 mg/kg/day 反復投与するとラッセル音が聴取され、やがて死亡することが報告[3)]されており、ラッセル音は BA2E の一次刺激による被験物質の誤嚥が原因ではないかと推察されている。しかし、本試験では単回投与にも係わらず遅延して発症する例が認められたことより、ラッセル音は必ずしも一次刺激によるものではないと推察された。剖検時までにラッセル音は聴取されなくなり、また、上部気道および鼻腔に異常がみられなかったことより、本試験からはラッセル音発症の原因は特定できなかった。

BA2E 投与により体重の増加抑制が雌雄に認められた。雄では観察第4日には回復したのに対し、雌では観察終了日に至っても対照群の値に復することがなく、体重増加に関して性差が認められた。

これらのことより、本試験条件下における BA2E の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると判断された。

【文　　献】

1) Smyth, H.F.Jr., Carpenter, C.P., Weil, C.S., Pozzani, U.C.: Range-finding toxicity data list V. Ind. Hyg. Occup. Med., 10:61-68 (1954).

2) Weil, C.S., Carpenter, C.P., West, J.S., Smyth, H.F.Jr.: Reproducibility of single oral toxicity testing. Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., 27:483-487 (1966).

3) Narotsky, M.G., Francis, E.Z., Kavlock, R.J.: Developmental toxicity and structure-activity relationships of aliphatic acids, including dose-response assessment of valproic acid in mice and rats. Fundam. Appl. Toxicol., 22:251-265 (1994)

Table 1 Clinical findings in male rats after single oral administration of BA2E

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration						Days of observation								
			0～1	2	3	4	5	6	2 [a]	3	4	5	6	7	8	9	10～15
0 (Corn oil)	1	No abnormality															
	2	No abnormality															
	3	Mucous feces	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	4	Mucous feces	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	5	No abnormality															
2000	6	No abnormality															
	7	No abnormality															
	8	Salivation	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Rale	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
	9	No abnormality															
	10	No abnormality															

[a], the next day of administration
+, positive; −, negative

Table 2 Clinical findings in female rats after single oral administration of BnzE

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration						Days of observation								
			0～1	2	3	4	5	6	2 [a]	3	4	5	6	7	8	9	10～15
0 (Corn oil)	11	No abnormality															
	12	No abnormality															
	13	No abnormality															
	14	Mucous feces	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	15	Soft feces	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2000	16	Mucous feces	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	17	Salivation	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Rale	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−
		Decrease in feces volume							+	−	−	−	−	−	−	−	−
		Perianal smudge	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
	18	No abnormality															
	19	Mucous feces	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Rale	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
		Decrease in feces volume							+	−	−	−	−	−	−	−	−
		Perianal smudge	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
	20	Salivation	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Rale	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−
		Decrease in feces volume							+	−	−	−	−	−	−	−	−
		Perianal smudge	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−

[a], the next day of administration
+, positive; −, negative

Table 3 Body weight changes in male rats after single oral administration of BA2E

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation 1 [a]	2	4	8	11	15
0 (Corn oil)	1	118.7[b]	139.1	161.7	203.0	225.6	263.5
	2	121.8	144.4	163.4	206.7	229.7	265.4
	3	123.6	151.6	172.0	214.2	241.8	282.0
	4	119.6	138.5	154.7	190.4	211.1	246.6
	5	121.8	140.5	161.7	206.5	232.0	270.3
	Mean	121.1	142.8	162.7	204.2	228.0	265.6
	±S.D.	2.0	5.4	6.2	8.7	11.2	12.8
2000	6	120.7	138.8	163.4	203.4	226.9	268.9
	7	117.3	134.4	157.2	194.8	216.8	249.6
	8	122.4	130.6	155.4	193.7	219.7	258.2
	9	122.6	137.5	169.7	211.3	240.3	292.1
	10	118.9	134.7	160.1	199.2	227.5	261.6
	Mean	120.4	135.2*	161.2	200.5	226.2	266.1
	±S.D.	2.3	3.2	5.7	7.2	9.1	16.1

[a], the day of administration, [b], g

* $p<0.05$, significantly different from the corn oil treatment group values

Table 4 Body weight changes in female rats after single oral administration of BA2E

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation 1 [a]	2	4	8	11	15
0 (Corn oil)	11	102.9 [b]	123.1	136.1	155.9	169.3	181.7
	12	Excluded due to an intubation error					
	13	98.4	118.2	132.3	152.7	165.7	181.0
	14	103.6	122.9	144.4	169.5	184.4	206.0
	15	98.0	118.3	136.4	164.5	172.9	193.2
	Mean	100.7	120.6	137.3	160.7	173.1	190.5
	±S.D.	2.9	2.7	5.1	7.7	8.1	11.8
2000	16	100.1	117.7	134.4	156.8	163.5	179.3
	17	102.9	92.1	118.1	148.1	164.2	187.8
	18	96.3	101.9	127.0	144.3	150.8	162.4
	19	100.1	101.0	122.2	145.5	152.9	167.5
	20	104.8	94.7	109.3	149.1	158.9	172.2
	Mean	100.8	101.5*	122.2*	148.8*	158.1*	173.8
	±S.D.	3.2	10.0	9.4	4.9	6.1	10.0

[a], the day of administration, [b], g

* $p<0.05$, significantly different from the corn oil treatment group values

Table 5 Macroscopic findings in rats after single oral administration of BA2E

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Findings
Male	0 (Corn oil)	1	No abnormality
		2	No abnormality
		3	No abnormality
		4	No abnormality
		5	No abnormality
	2000	6	No abnormality
		7	No abnormality
		8	No abnormality
		9	No abnormality
		10	No abnormality
Female	0 (Corn oil)	11	No abnormality
		12	Excluded due to an intubation error
		13	No abnormality
		14	No abnormality
		15	No abnormality
	2000	16	No abnormality
		17	No abnormality
		18	No abnormality
		19	No abnormality
		20	No abnormality