

陳 述 書

表 題：2-エチル酪酸のマウスを用いる小核試験

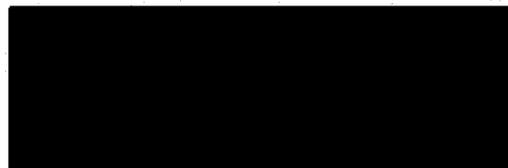
試験番号：6879 (115-176)

本試験は、新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第4条に規定する試験施設について（平成12年3月1日環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号）およびOECD Principles of Good Laboratory Practice (Revised 1997, Issued Jan. 1998) [Decision of the Council Concerning Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals, ENV/MC/CHEM(98)17] に従って実施されたものである。

平成 16 年 11 月 8 日

所属：財団法人
食品農医薬品安全性評価センター
試験責任者

氏名：



最終報告書

2-エチル酪酸のマウスを用いる小核試験

試験番号：6879 (115-176)

平成16年11月8日

試験委託者
厚生労働省 医薬食品局

食品農医薬品安全センター

信 頼 性 保 証 書

表 題 : 2-エチル酪酸のマウスを用いる小核試験

試験番号 : 6879 (115-176)

本試験は、新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第4条に規定する試験施設について（平成12年3月1日環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号）およびOECD Principles of Good Laboratory Practice (Revised 1997, Issued Jan. 1998) [Decision of the Council Concerning Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals, ENV/MC/CHEM(98)17] に従って実施され、本最終報告書に記載された成績は、試験の生データを正確に反映していることを保証する。

なお、本試験の信頼性保証部門による調査記録を次頁に示す。

平成16年11月8日

所属：財団法人
食品農医薬品安全性評価センター
信頼性保証部門責任者

氏名：



調査記録

調査項目	調査実施日	試験責任者および 運営管理者への報告日	調査 担当者
試験計画書	平成 15 年 1 月 30 日	平成 15 年 1 月 30 日	[REDACTED]
試験計画書の変更書 (I)	平成 15 年 2 月 5 日	平成 15 年 2 月 5 日	
試験計画書の変更書 (II)	平成 15 年 4 月 3 日	平成 15 年 4 月 3 日	
試験計画書の変更書 (III)	平成 15 年 4 月 9 日	平成 15 年 4 月 9 日	
試験計画書の変更書 (IV)	平成 15 年 4 月 16 日	平成 15 年 4 月 16 日	
試験計画書の変更書 (V)	平成 15 年 5 月 12 日	平成 15 年 5 月 13 日	
動物搬入	平成 15 年 5 月 12 日	平成 15 年 5 月 13 日	
投与液の調製および投与 (1 日目)	平成 15 年 5 月 19 日	平成 15 年 5 月 19 日	
再調査	平成 15 年 5 月 21 日	平成 15 年 5 月 22 日	
骨髄標本作製	平成 15 年 5 月 21 日	平成 15 年 5 月 22 日	
鏡検	平成 15 年 6 月 3 日	平成 15 年 6 月 3 日	
生データおよび最終報告 書草案	平成 15 年 8 月 13 日	平成 15 年 8 月 13 日	
試験計画書の変更書 (VI)	平成 15 年 8 月 18 日	平成 15 年 8 月 18 日	
生データおよび最終報告 書	平成 16 年 11 月 8 日	平成 16 年 11 月 8 日	

目 次

1. 要約.....	6
2. 表題.....	7
3. 試験目的.....	7
4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP.....	7
5. 試験番号.....	7
6. 試験施設.....	7
7. 試験委託者.....	8
8. 試験責任者.....	8
9. 試験責任者の署名および日付.....	8
10. 分担責任者および試験従事者.....	8
11. 試験日程.....	9
12. 被験物質.....	10
13. 試験材料および方法.....	12
14. 試験結果.....	18
15. 考察および結論.....	19
16. 参考文献.....	20
17. 参考とした資料.....	20
18. 試験関係資料の保存.....	21
19. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 および試験計画書に従わなかつたこと.....	21

Figure

Figure 1 Dose-effect relationship for Butanoic acid, 2-ethyl- obtained
in the micronucleus assay [male mice receiving two doses] F-1

Table T-1~3

Table 1 Mortality in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl-
[male mice receiving two doses] T-1

Table 2 Mortality in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl-
[female mice receiving two doses] T-2

Table 3 Micronucleus assay with Butanoic acid, 2-ethyl-
[male mice receiving two doses] T-3

Appendices		A-1~9
Appendix 1	Body weight in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl- [male mice receiving two doses]	A-1
Appendix 2	Body weight in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl- [female mice receiving two doses]	A-2
Appendix 3	Clinical observations in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl- [male mice receiving two doses]	A-3
Appendix 4	Clinical observations in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl- [female mice receiving two doses]	A-4
Appendix 5	Frequency of MNPCE in mice treated with Butanoic acid, 2-ethyl- [male mice receiving two doses]	A-5
Appendix 6	Body weight in the micronucleus assay with Butanoic acid, 2-ethyl- [male mice receiving two doses]	A-6
Appendix 7	Clinical observations in the micronucleus assay with Butanoic acid, 2-ethyl- [male mice receiving two doses]	A-8
Appendix 8	Historical control data (micronucleus assay on BDF ₁ mice)	A-9

1. 要約

本試験条件下において、2-エチル酪酸はマウス赤血球に対して小核を誘起しないもの（陰性）と判断した。

2-エチル酪酸の変異原性、小核多染性赤血球誘発性の有無を検討するため、BDF₁系雄マウスを用いた *in vivo* 小核試験を実施した。

用量設定試験の結果、高用量の 2000 mg/kg 群において雌雄とも死亡は観察されなかった。したがって、ガイドラインの上限である 2000 mg/kg を含む 1000 および 500 mg/kg の 3 用量を雄マウスに 1 日 1 回 2 日間連続して強制経口投与し、小核誘発性を検討した。2-エチル酪酸投与群における小核多染性赤血球 (MNPCE) 出現頻度は陰性対照群と同等の値を示し、統計学的に有意な増加は認められなかった。また、全赤血球中の多染性赤血球 (PCE) の割合については陰性対照と比較し統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な減少傾向が認められ、骨髄が被験物質により暴露されたものと推察された。

なお、陽性対照マイトマイシン C 静脈内投与群（投与量 2 mg/kg）においては、全個体とも MNPCE の出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加を示した。

2. 表題

2-エチル酪酸のマウスを用いる小核試験

3. 試験目的

被験物質の *in vivo* における小核赤血球誘発性を検討した。

4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP

ガイドライン

- 『新規化学物質に係る試験の方法について』の一部改正等について (環保安第 287 号, 衛生第 127 号, 平成 09-10-31 基局第 2 号平成 9 年 10 月 31 日および環保安第 946 号, 医薬発第 1271 号, 平成 13-11-01 製局第 1 号, 平成 13 年 11 月 21 日)
- OECD 化学品ガイドライン 474 (1997 年 7 月 21 日 : ほ乳類赤血球を用いる小核試験)

GLP

- 新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第 4 条に規定する試験施設について (平成 12 年 3 月 1 日環保安第 41 号, 生衛発第 268 号, 平成 12-02-14 基局第 1 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (Revised 1997, Issued Jan. 1998) [Decision of the Council Concerning Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals, ENV/MC/CHEM(98)17]

5. 試験番号

6879 (115-176)

6. 試験施設

郵便番号 437-1213

静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2

財団法人食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

運営管理者

電話番号 0538-58-1266 Fax 番号 0538-58-1393

7. 試験委託者

郵便番号 100-8916
東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号
厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室
担当者 
電話番号 03-3595-2298 Fax 番号 03-3593-8913

8. 試験責任者

郵便番号 437-1213
静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2
財団法人食品農医薬品安全性評価センター

電話番号 0538-58-3572 Fax 番号 0538-58-1368

9. 試験責任者の署名および日付

平成 16 年 11 月 8 日

所属：財団法人
食品農医薬品安全性評価センター
試験責任者

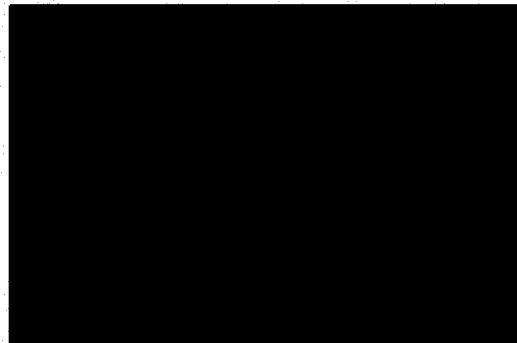
氏名：



10. 分担責任者および試験従事者

遺伝毒性実験：
検疫，飼育管理：

被験物質液の調製：
陽性対照物質液の調製：
被験物質液の投与：
一般状態の観察：

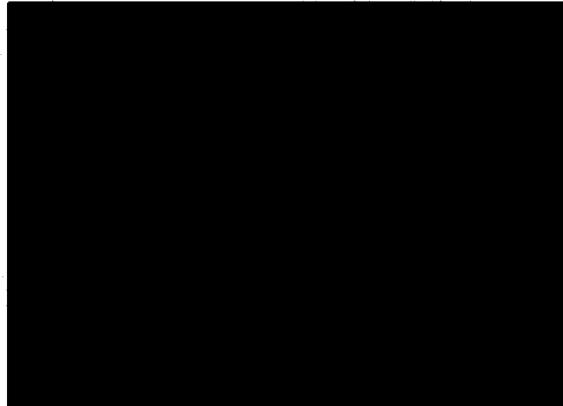


骨髓標本作製 :

標本のコード化 :

標本観察 :

統計解析 :



11. 試験日程

試験開始日 :	平成 15 年 1 月 27 日
実験開始日 :	平成 15 年 4 月 21 日
【用量設定試験】	
動物入荷日 :	平成 15 年 4 月 14 日
投与開始日 :	平成 15 年 4 月 21, 22 日
動物観察終了日 :	平成 15 年 4 月 23 日
【小核試験】	
動物入荷日 :	平成 15 年 5 月 12 日
投与開始日 :	平成 15 年 5 月 19, 20 日
骨髓標本作製日 :	平成 15 年 5 月 21 日
小核観察終了 :	平成 15 年 6 月 10 日
実験終了日 :	平成 15 年 6 月 10 日
試験終了日 :	平成 16 年 11 月 8 日

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

2-エチル酪酸

Butanoic acid, 2-ethyl-

12.2. ロット番号

01-20704

12.3. 純度／含量

99.9%

12.4. 提供元

██████████

12.5. 保存条件

冷蔵, 遮光

12.6. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-1)

12.7. 化学名

2-Ethyl butanoic acid

2-Ethyl butyric acid

12.8. CAS No.

88-09-5

12.9. 分子式

$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{CHCOOH}$

12.10. 分子量

116.16

12.11. 物質の状態

無色透明の液体, 特殊臭あり

12.12. 沸点

194°C

12.13. 融点

-9.4°C

12.14. 溶解性

水に 0.22 wt%可溶
アルコール，エーテルに可溶

12.15. 安定性

安定

12.16. 蒸気圧

20°C : 8.0 kPa (0.06 mmHg)

12.17. 取り扱い上の注意

皮膚刺激は軽度であるが，目の傷害は激しい
酸化剤と激しく反応する
火気厳禁

12.18. 残余被験物質の処理

被験物質の一部を保存した後，残りは品質試験等の実施のため被験物質
提供元へ返却した。

13. 試験材料および方法

13.1. 試験動物

13.1.1. 種

マウス

13.1.2. 系統

BDF₁ (C57BL/6 × DBA/2) [SPF]

13.1.3. 購入先

日本エスエルシー株式会社

13.1.4. 週齢および体重

購入時：8 週齢

投与時：9 週齢（用量設定試験 [雄]：27.6～29.8 g, 用量設定試験 [雌]：
20.0～23.3 g, 小核試験：26.3～28.4 g)

13.1.5. 試験動物数

用量設定試験：雄 15 匹, 雌 15 匹（購入数）；雄 16 匹, 雌 16 匹（入荷数）

小核試験：雄 38 匹（購入数）；雄 40 匹（入荷数）

13.1.6. 使用動物数

各試験群雄雌各 3 匹, 4 試験群, 計 24 匹（用量設定試験）

各試験群雄 6 匹, 5 試験群, 計 30 匹（小核試験）

13.1.7. 種・系統選択理由

安全性試験ならびに小核試験で広く利用されており, 入手のし易さ等を考慮して本系統のマウスを使用した。

13.2. 飼育管理

13.2.1. 飼育環境

温度ならびに湿度を制御したマウス飼育室 [801 号室] (W 3.5 × D 5.5 × H 2.5 m, 48.1 m³) で動物を飼育した。試験期間中の温度は, 23.6～24.3°C (用量設定試験), 23.6～24.4°C (小核試験), 相対湿度は 49～61% (用量設定試験), 51～62% (小核試験) であった。換気回数 1 時間当たり 18 回, 照明 12 時間 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) に設定した。

Micro-IsolatorTM System (Lab Products Inc.) を使用し, zyfone 製飼育ケージ (W 19.0 × D 32.7 × H 14.2 cm, 飼育スペース 8822 cm³) に床敷き

(ALPHA-dri™ : Shepherd Specialty Papers, Inc. ; Lot No. 01103) を入れ、動物を検疫期間中は 2 匹、群分け後は 3 匹ずつ収容した。使用した床敷き中の汚染物質の分析値が日本実験動物飼料協会／コンタミナント分析基準案の許容基準値内であることを確認し、その分析結果 (L0310612-1 : 2003 年 1 月 27 日) を当センターで保存した。

なお、動物の検疫・馴化期間を含めた飼育期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

13.2.2. 飼料

動物には固型飼料 (MF : オリエンタル酵母工業株式会社 ; Lot No. 030108) を自由に摂取させた。

使用した飼料中の汚染物質の分析をロット毎に、財団法人日本食品分析センターで実施した。分析値は日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であり、その分析結果 (第 103011059-001 号 : 2003 年 1 月 20 日) を当センターで保存した。

13.2.3. 給水

動物には水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた。

水道法に基づいた水道水の分析を 3 ヶ月に 1 回、株式会社エコプロ・リサーチで実施した。検査値は上水道水質基準 (平成 4 年 12 月 21 日厚生省令第 69 号および平成 14 年 3 月 27 日厚生労働省令第 43 号) の基準値内であり、その検査結果 (第 030609-5 号 : 2003 年 2 月 13 日) を当センターで保存した。

13.3. 検疫および馴化

各動物について疾病の有無を 7 日観察すると共に、その間動物を飼育環境に馴化させた。

なお、検疫期間中、用量設定試験の雌動物の仮動物番号 4 (体重減少) と 9 (増加抑制) を除き、体重の増加量ならびに一般状態に異常を示した動物はみられなかった。

13.4. 個体識別および群分け

検疫期間中は毛刈り法で、群分け後はフェルトペン法を用いて個体の識別をした。

1 回目の投与当日に動物を体重により層別化し、無作為抽出法を用いて各試験群 (用量設定試験で 3 匹/群、小核試験で 6 匹/群) を構成するように分けた。ただし、用量設定試験の雌動物の仮動物番号 4 と 9 の個体は群

分けに使用しなかった。ケージには検疫期間中は仮動物番号を、群分け後は試験番号、動物番号等を記入したラベルを装着した。

なお、余剰動物については炭酸ガスを用いて安楽死させた。

13.5. 被験物質液の調製

溶解性試験の結果、使用媒体はトウモロコシ油（ナカライテスク；Lot No. V2P1660）とした。

用量設定試験では1回目の投与直前に200 mg/mL液を準備した後、使用媒体で順次希釈し160, 128 および102.4 mg/mL溶液を調製した。小核試験では1回目の投与直前に200 mg/mL液を準備した後、使用媒体で順次希釈し100 および50.0 mg/mL溶液を調製した。

いずれの場合も各調製液を投与初日用ならびに投与2日目に小分けした。投与初日用は調製後速やかに投与し、投与2日目の調製液は冷蔵（4°C）にて保存し、翌日の投与に用いた。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性（媒体）対照

使用媒体（トウモロコシ油）を投与した。

13.6.2. 陽性対照

マイトマイシンC（MMC：協和醗酵工業株式会社；2 mg力価；Lot No. 378ABC）を注射用水（株式会社大塚製薬工場；Lot No. K2K80）5 mLに溶解し、その2 mLを生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K2H96）を用いて2倍希釈した後、2 mg/kg用量を投与した。投与直前に調製した。

13.7. 用量設定試験（予備試験）

13.7.1. 試験用量

ガイドラインで定めている2000 mg/kgを最高用量とし、以下1600, 1280 および1024 mg/kgの計4用量を被験物質処理群として設定した。雄雌の両性で実施した。

13.7.2. 試験群の構成

試験群	性	試験用量 (mg/kg)	動物数	動物番号
2-エチル酪酸	雄	1024	3	1101~1103
		1280	3	1201~1203
		1600	3	1301~1303
		2000	3	1401~1403
	雌	1024	3	2101~2103
		1280	3	2201~2203
		1600	3	2301~2303
		2000	3	2401~2403

13.7.3. 投与方法および投与回数

ガイドラインに従って被験物質の投与経路は経口とし、ディスポーザブルシリンジとテフロン製ゾンデを用いて1日1回、24時間間隔で2日間連続強制投与した。投与容量は体重10g当たり0.1mLとし、群分け時の体重から投与液量(mL)を求めた。

13.7.4. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時、検疫期間終了時(群分け時)および最終投与後24時間に電子天秤(PG802-S: Mettler Toledo AG)を用いて体重を測定した。

初回投与後0.5, 2, 4および24時間ならびに最終投与後0.5, 2, 4および24時間に動物の一般状態を観察した後、各用量の最終投与後24時間での生存率を求めた。

13.8. 小核試験(本試験)

13.8.1. 試験用量

用量設定試験の結果、投与群全例の生存が確認されたためガイドラインの上限である2000mg/kgを高用量とし、以下1000および500mg/kgの計3用量を被験物質処理群として設定した。また、雄雌の毒性発現に顕著な差が認められなかったため小核試験は雄のみで実施した。

13.8.2. 試験群の構成

試験群	試験用量 (mg/kg)	動物数		動物番号
		投与数	評価数	
陰性対照	0	6	5	3001~3006
500	500	6	5	3101~3106
1000	1000	6	5	3201~3206
2000	2000	6	5	3301~3306
陽性対照*	2	6	5	3401~3406

* : MMC

13.8.3. 投与動物数

評価数 5 匹を確保するため、いずれの試験群とも 6 匹に投与した。高用量の 2000 mg/kg で 1 匹の死亡 (動物番号 3306) が認められたことから同群では全例、他の試験群では死亡ならびに評価に不適切な動物が認められなかったことから、動物番号の小さい順に 5 匹を評価に使用した。生存動物全例について骨髄塗抹標本を作製した。

13.8.4. 投与方法および投与回数

媒体および被験物質の投与方法等については 13.7.3. に記載した方法に準じた。
陽性対照物質の場合、小核試験で通常用いられていることから腹腔内投与とし、マイクロシリンジと 25G 注射針を用いて 1 回投与した。投与容量は体重 10 g 当たり 0.1 mL とし、群分け時の体重から投与液量 (mL) を求めた。

13.8.5. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時、検疫期間終了時 (群分け時) および標本作製直前に電子天秤 PG802-S あるいは PG2002 (Mettler Toledo AG) を用いて体重を測定した。
標本作製直前に、動物の一般状態を観察した。なお、陰性対照および被験物質投与群については、初回投与後 1, 21, 24 時間、最終投与後 2, 19 時間ならびに標本作製時に、陽性対照群については、投与後 2, 19 時間ならびに標本作製時に一般状態の観察を実施した。

13.8.6. 骨髄塗抹標本の作製

最終投与後 24 時間 (陽性対照群は投与後 24 時間) に動物を炭酸ガス吸

入法で安楽死させた。大腿骨を摘出し少量の非働化 (56°C, 30 分) 済みウシ胎児血清 (Invitrogen Corp.; Lot No. 1158685) を用いて骨髓細胞を洗い出し、遠心分離法 (トミー精工 LC-122 : 190 × g, 5 分間) により余剰血清を除いた後、各動物につき 2 枚の塗抹標本を作製した。十分に乾燥させた塗抹標本を 99.8%メタノールで固定した後、3%ギムザ液 (Merck KGaA ; OB132628) で 30 分間染色した。1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Merck KGaA ; pH 6.8 : TP 571474) および精製水で洗浄し、乾燥させた。さらに 0.001%クエン酸水溶液および精製水で洗浄した後、再び乾燥させた。

13.8.7. 小核を有する多染性赤血球 (小核多染性赤血球) の観察

全ての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

動物 1 匹当たり 2000 個の多染性赤血球 (Polychromatic erythrocyte : PCE) を顕微鏡下 (× 1000 程度) で観察した。小核多染性赤血球 (Micronucleated polychromatic erythrocyte : MNPCE) 数を計測するとともに、骨髓に対する影響を調べるため全赤血球 500 個中の多染性赤血球数についても計測した。

13.8.8. 全赤血球中多染性赤血球の割合の算出

全赤血球に対する多染性赤血球の割合を次式により算出した。

$$\text{多染性赤血球の割合 (\%)} = \frac{\text{多染性赤血球数}}{\text{観察赤血球数}} \times 100$$

13.8.9. 小核多染性赤血球出現頻度の算出

小核多染性赤血球の出現頻度を次式により算出した。

$$\text{小核多染性赤血球出現頻度 (\%)} = \frac{\text{小核多染性赤血球数}}{\text{観察多染性赤血球数}} \times 100$$

13.9. 結果の解析

各試験群の小核多染性赤血球の出現頻度は条件付き二項検定 (Kastenbaum and Bowman の推計学的方法 : 有意水準 0.05) を用い、また、観察赤血球中の多染性赤血球の割合については Dunnett の t-検定法を用いて有意差 (有意水準 0.05) を判定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群あるいは陽性対照群において統計学的な有意差が認められた場合、陽性と判定した。

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

14.1.1. 試験結果

試験結果を Table 1, 2 に示した.

最高用量の 2000 mg/kg 群を含めた全ての用量で雄雌いずれとも死亡は認められなかった.

14.1.2. 体重および一般状態

試験結果を Appendix 1~4 に示した.

2-エチル酪酸処理群では雄雌とも 2000 mg/kg 群で明確な体重の減少が観察された. また, 雌の 2000 mg/kg 群では最終投与後 2 時間から継続して自発運動減少を示した個体が 1 例認められた.

14.2. 小核試験

試験結果を Figure 1, Table 3 および Appendix 5 に示した.

個体別に多染性赤血球 2000 個を観察した結果, 陰性対照群では小核 (MNPCE) が 2~7 個認められ, その出現頻度は 0.21%であった. また, 全赤血球中における多染性赤血球の割合 (PCE 比) は 41.4%であった.

2-エチル酪酸投与による MNPCE の出現頻度は, 500 mg/kg で 0.22%, 1000 mg/kg で 0.24%および 2000 mg/kg で 0.14%であり, 陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった. また, 被験物質の骨髄細胞に対する影響の指標である PCE 比は, 500, 1000 および 2000 mg/kg 群でそれぞれ 43.4, 33.0 ($p \leq 0.05$) および 21.2% ($p \leq 0.05$) であり, 陰性対照群と比較して統計学的に有意な減少傾向が認められた.

一方, 陽性対照群の MNPCE 出現頻度は 7.71% (多染性赤血球 2000 個中 121~185 個) と明確に増加し, 陰性対照群に比べ統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加を示した. さらに, PCE 比は 19.7% ($p \leq 0.05$) に減少しており, 骨髄細胞の分裂抑制作用が確認された.

14.2.1. 体重および一般状態

試験結果を Appendix 6 および 7 に示した.

2-エチル酪酸処理群の場合, 2000 mg/kg 群で明確な体重減少傾向が観察された. 2000 mg/kg 群では最終投与後 19 時間に 1 例 (動物番号 3306) の死亡が確認されたほか, 自発運動減少が 3 例に, 立毛が 2 例に認められた.

15. 考察および結論

用量設定試験の結果、2-エチル酪酸投与群において全例の生存が確認された。したがって、ガイドラインの上限である2000 mg/kgを高用量とした1000 および 500 mg/kg の計3用量を被験物質処理群として設定し小核誘発性を検討した。ただし、用量設定試験において雄雌の毒性発現に顕著な差が認められなかったことから小核試験は雄のみで実施した。

2-エチル酪酸投与群におけるMNPCE出現頻度は各処理群とも陰性対照群と同等の値を示し、統計学的に有意な増加は認められなかった。また、全赤血球中のPCE比については統計学的に有意な減少がみられ、骨髄が被験物質に暴露されたものと推察された。

本被験物質2-エチル酪酸(Butanoic acid, 2-ethyl-)について細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性¹⁾、CHL細胞を用いた染色体異常試験で陽性¹⁾との報告があったが、発がん性に関する報告はなかった。

類縁体である酢酸ブチル(N-Butyl acetate)、酪酸(Butyric acid)、イソ吉草酸エチル(Ethyl isovaletate)およびギ酸イソアミル(Isoamyl formate)は細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性²⁾、また、氷酢酸(Glacial acetic acid)、酪酸および乳酸(Lactic acid)はCHL細胞を用いた染色体異常試験の連続処理法で陰性³⁾との報告があった。

また、陰性対照および陽性対照のMNPCE出現頻度、全赤血球中のPCE比は概ね背景データの範囲内(Appendix 8)であることから、本試験が適切な条件下でなされたと判断された。

以上の試験結果から、本試験条件下において2-エチル酪酸のマウスに対する小核の誘発性、すなわち染色体異常ないし紡錘体形成阻害誘発性は陰性と判定した。

16. 参考文献

- 1) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 9, 90-97, 2002
- 2) 石館基監修, “微生物を用いる変異原性試験データ集”, エル・アイ・シー, 東京, 1991
- 3) 祖父尼俊雄監修, “染色体異常試験データ集〈改訂 1998 年版〉”, エル・アイ・シー, 東京, 1999

17. 参考とした資料

- Hayashi M, Sofuni T, Ishidate M Jr. A pilot experiment for the micronucleus test -The multi-sampling at multi-dose levels method. *Mutat Res* 1984; 141: 165-9.
- Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31: 9-15.
- Schmid W. In: Hollaender A editor. The micronucleus test for cytogenetic analysis. *Chemical Mutagens*. Vol. 4. New York; Plenum press; 1976. p. 31-53.
- Salamone M, Heddle J, Stuart E, Katz M. Towards an improved micronucleus test. Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat Res* 1980; 74: 347-56.
- Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 1970; 9: 527-49.
- Dunnett, CW. New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 1964; 20: 482-91.
- SAS/STAT User's Guide, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC; 2000.

18. 試験関係資料の保存

本試験の下記資料は安評センターにて最終報告書提出後10年間保存する。その後の保存については試験委託者と安評センターで協議の上別途定める。

- 試験計画書（正本）
- 被験物質，被験物質に関する資料（管理記録，調製記録，その他）
- 試験データ（投与記録，体重測定記録，症状観察記録，小核標本作製記録，小核試験観察記録，その他）
- 骨髄塗抹標本
- 最終報告書（正本）
- 試験関係資料

19. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかつたこと

【内容】

試験計画書，11.8.5. 体重および一般状態の観察において，電子天秤 BB600 あるいは PG802-S を用いて体重を測定すると記載されているが，小核試験標本作製直前の体重測定には PG2002 を用いた。

【判定】

使用した天秤も GLP 機器であることから，試験結果に影響を及ぼすことはないと判断した。

【内容】

試験計画書，11.1.4. 週齢および体重において，投与時の体重範囲は 24～32 g と記載されているが，雌マウスでは 20.0～23.3 g であることからすべての個体で基準外となっていた。

【判定】

試験計画書記載の体重範囲は雄のものであり，雌の体重範囲は 18～25 g である。したがって，今回の雌マウスは全例基準内であることから，試験結果に影響を及ぼすことはないと判断した。

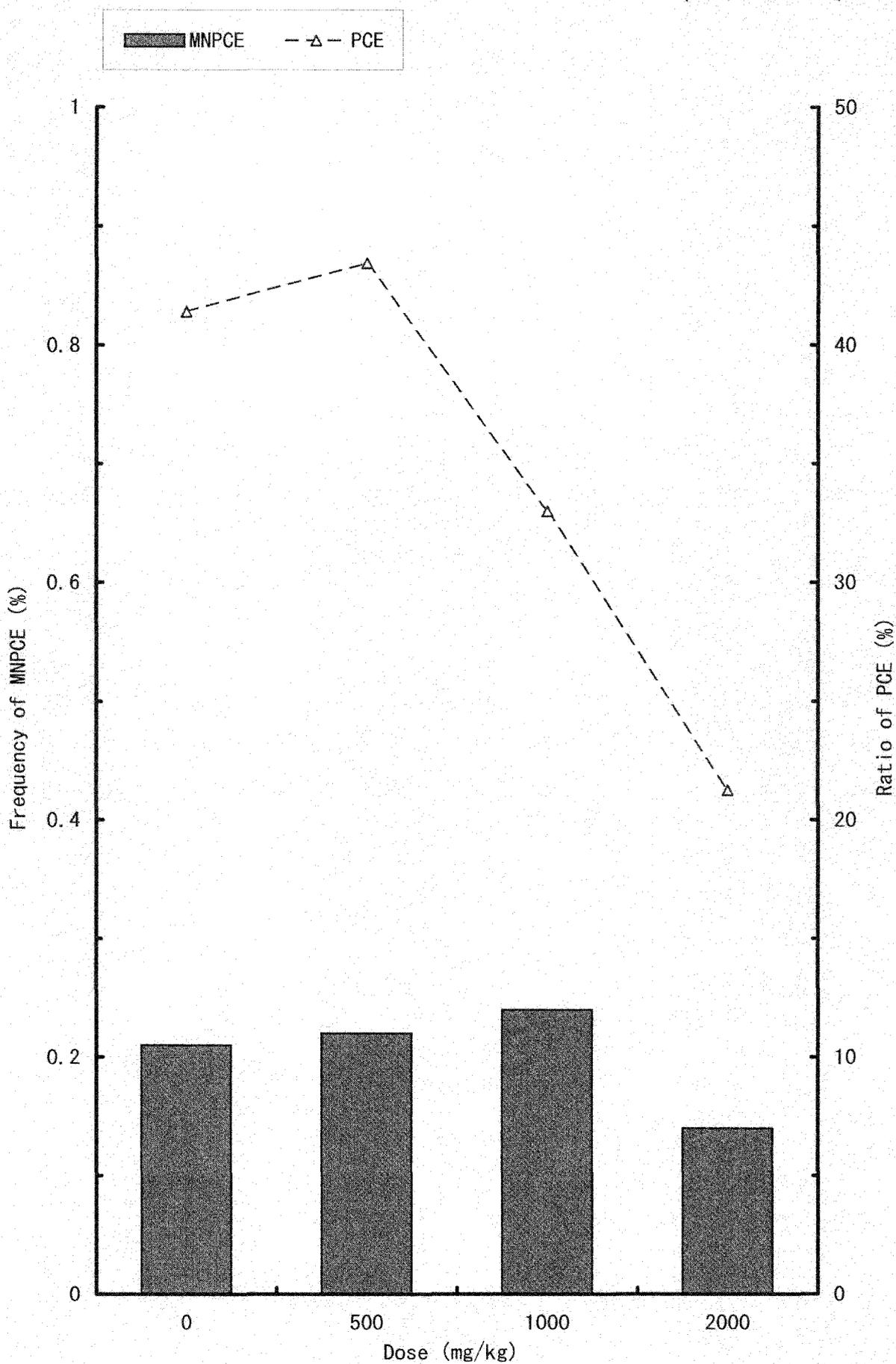


Figure 1. Dose-effect relationship for Butanoic acid, 2-ethyl- obtained in the micronucleus assay [male mice receiving two doses]

Exp. No. 6879 (115-176)

Table 1. Mortality in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl-
[male mice receiving two doses]

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Time after the 1st administration							Mortality	
			0.5h	2h	4h	24h	24.5h	26h	28h		48h
Test substance	1024	1101	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		1102	live	live	live	live	live	live	live	live	
		1103	live	live	live	live	live	live	live	live	
	1280	1201	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		1202	live	live	live	live	live	live	live	live	
		1203	live	live	live	live	live	live	live	live	
	1600	1301	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		1302	live	live	live	live	live	live	live	live	
		1303	live	live	live	live	live	live	live	live	
	2000	1401	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		1402	live	live	live	live	live	live	live	live	
		1403	live	live	live	live	live	live	live	live	

Exp. No. 6879 (115-176)

Table 2. Mortality in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl-
[female mice receiving two doses]

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Time after the 1st administration								Mortality	
			0.5h	2h	4h	24h	24.5h	26h	28h	48h		
Test substance	1024	2101	live	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		2102	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
		2103	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
	1280	2201	live	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		2202	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
		2203	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
	1600	2301	live	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		2302	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
		2303	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
	2000	2401	live	live	live	live	live	live	live	live	live	0 / 3
		2402	live	live	live	live	live	live	live	live	live	
		2403	live	live	live	live	live	live	live	live	live	

Table 3. Micronucleus assay with Butanoic acid, 2-ethyl-
 [male mice receiving two doses] Exp. No. 6879 (115-176)

Compound	Dose (mg/kg)	Number of animals	Frequency of MNPCE [%] (Mean ± S.D.)	Range of MNPCE/2000PCE (Min - Max)	Ratio of PCE [%] (Mean ± S.D.)
Corn oil a)	0	5	0.21 ± 0.11	2 - 7	41.4 ± 1.5
Test substance	500	5	0.22 ± 0.04	3 - 5	43.4 ± 1.5
	1000	5	0.24 ± 0.08	2 - 6	33.0 ± 5.6 #
	2000	5	0.14 ± 0.08	1 - 5	21.2 ± 6.9 #
MMC b)	2	5	7.71 ± 1.16 *	121 - 185	19.7 ± 1.2 #

Significant difference from control : Kastenbaum and Bowman *p<0.05, Dunnett #p<0.05

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

Exp. No. 6879 (115-176)

Appendix 1. Body weight in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl-
[male mice receiving two doses]

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Body weight of each period (g)			Gain (g)
			Received	Allocated	Sacrificed	
Test substance	1024	1101	24.4	27.6	26.8	-0.8
		1102	24.7	28.3	27.2	-1.1
		1103	25.1	29.6	29.3	-0.3
		Mean \pm S.D.	24.7 \pm 0.4	28.5 \pm 1.0	27.8 \pm 1.3	-0.7 \pm 0.4
	1280	1201	24.7	29.8	29.1	-0.7
		1202	26.1	28.8	26.2	-2.6
		1203	25.0	29.7	29.0	-0.7
		Mean \pm S.D.	25.3 \pm 0.7	29.4 \pm 0.6	28.1 \pm 1.6	-1.3 \pm 1.1
	1600	1301	24.8	28.2	28.9	0.7
		1302	25.1	28.2	28.6	0.4
		1303	25.0	27.7	27.7	0.0
		Mean \pm S.D.	25.0 \pm 0.2	28.0 \pm 0.3	28.4 \pm 0.6	0.4 \pm 0.4
	2000	1401	24.2	28.8	27.0	-1.8
		1402	24.2	27.9	25.8	-2.1
		1403	24.3	29.1	24.9	-4.2
		Mean \pm S.D.	24.2 \pm 0.1	28.6 \pm 0.6	25.9 \pm 1.1	-2.7 \pm 1.3

Exp. No. 6879 (115-176)

Appendix 2. Body weight in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl-
[female mice receiving two doses]

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Body weight of each period (g)			Gain (g)
			Received	Allocated	Sacrificed	
Test substance 1024		2101	20.9	23.1	22.4	-0.7
		2102	21.0	23.3	21.5	-1.8
		2103	20.0	22.8	21.5	-1.3
		Mean \pm S.D.	20.6 \pm 0.6	23.1 \pm 0.3	21.8 \pm 0.5	-1.3 \pm 0.6
1280		2201	19.3	23.0	21.4	-1.6
		2202	19.7	21.3	21.5	0.2
		2203	19.5	22.4	21.6	-0.8
		Mean \pm S.D.	19.5 \pm 0.2	22.2 \pm 0.9	21.5 \pm 0.1	-0.7 \pm 0.9
1600		2301	19.0	20.0	20.2	0.2
		2302	21.4	22.0	22.0	0.0
		2303	19.2	21.2	20.3	-0.9
		Mean \pm S.D.	19.9 \pm 1.3	21.1 \pm 1.0	20.8 \pm 1.0	-0.2 \pm 0.6
2000		2401	19.1	21.8	19.5	-2.3
		2402	20.6	23.1	21.0	-2.1
		2403	20.2	23.0	18.8	-4.2
		Mean \pm S.D.	20.0 \pm 0.8	22.6 \pm 0.7	19.8 \pm 1.1	-2.9 \pm 1.2

Appendix 3. Clinical observations in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl-
[male mice receiving two doses]

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Time after the 1st administration										
			0.5h	2h	4h	24h	24.5h	26h	28h	48h			
Test substance	1024	1101	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		1102	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		1103	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	1280	1201	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		1202	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		1203	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	1600	1301	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		1302	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		1303	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	2000	1401	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		1402	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		1403	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal

Appendix 4. Clinical observations in the dose-finding study with Butanoic acid, 2-ethyl-
[female mice receiving two doses]

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Time after the 1st administration										
			0.5h	2h	4h	24h	24.5h	26h	28h	48h			
Test substance	1024	2101	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		2102	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		2103	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	1280	2201	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		2202	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		2203	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	1600	2301	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		2302	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		2303	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	2000	2401	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
		2402	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	DLA	DLA	DLA	DLA
		2403	normal	normal	normal	normal	normal	DLA	DLA	DLA	DLA	DLA	DLA

DLA: Decrease in locomotor activity

Appendix 5. Frequency of MNPCE in mice treated with Butanoic acid, 2-ethyl-
 [male mice receiving two doses] Exp. No. 6879 (115-176)

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.				
Corn oil a)	0	3001	3002	3003	3004	3005
		0.35	0.15	0.30	0.10	0.15
		[42.6]	[42.2]	[39.2]	[40.4]	[42.6]
		[PCE%]				
Test substance	500	3101	3102	3103	3104	3105
		0.20	0.25	0.15	0.25	0.25
		[44.2]	[41.2]	[42.8]	[45.2]	[43.8]
		[PCE%]				
Frequency of MNPCE	1000	3201	3202	3203	3204	3205
		0.30	0.25	0.10	0.30	0.25
		[38.8]	[32.0]	[36.4]	[24.2]	[33.6]
		[PCE%]				
Frequency of MNPCE	2000	3301	3302	3303	3304	3305
		0.20	0.25	0.05	0.10	0.10
		[22.2]	[12.8]	[29.8]	[16.0]	[25.4]
		[PCE%]				
MMC b)	2	3401	3402	3403	3404	3405
		9.25	6.05	8.15	7.60	7.50
		[19.2]	[20.2]	[18.8]	[21.6]	[18.6]
		[PCE%]				

a) : Negative control
 b) : Positive control (Mitomycin C)

Appendix 6. Body weight in the micronucleus assay with Butanoic acid, 2-ethyl-
[male mice receiving two doses]

Exp. No. 6879 (115-176)

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Body weight of each period (g)				Gain (g)
			Received	Allocated	Sacrificed	Dead	
Corn oil a)	0	3001	25.3	26.8	26.8		0.0
		3002	24.1	27.2	25.6		-1.6
		3003	25.9	27.9	26.6		-1.3
		3004	26.0	27.9	27.6		-0.3
		3005	24.9	26.7	25.8		-0.9
		3006	25.2	27.3	26.3		-1.0
		Mean ± S.D.	25.2 ± 0.7	27.3 ± 0.5	26.5 ± 0.7		-0.8 ± 0.6
Test substance	500	3101	23.6	26.5	26.2		-0.3
		3102	23.6	26.4	26.4		0.0
		3103	23.7	27.4	27.0		-0.4
		3104	23.1	26.3	25.2		-1.1
		3105	23.1	26.5	25.5		-1.0
		3106	26.0	28.3	28.1		-0.2
		Mean ± S.D.	23.9 ± 1.1	26.9 ± 0.8	26.4 ± 1.1		-0.5 ± 0.4
a): Negative control	1000	3201	25.7	26.9	26.6		-0.3
		3202	23.8	26.9	26.2		-0.7
		3203	26.0	28.4	27.2		-1.2
		3204	24.2	28.1	27.3		-0.8
		3205	26.2	27.8	26.3		-1.5
		3206	25.9	27.3	25.7		-1.6
		Mean ± S.D.	25.3 ± 1.0	27.6 ± 0.6	26.6 ± 0.6		-1.0 ± 0.5

a): Negative control

Appendix 6. -continued

Exp. No. 6879 (115-176)

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Body weight of each period (g)				Gain (g)
			Received	Allocated	Sacrificed	Dead	
Test substance	2000	3301	24.9	27.1	25.0		-2.1
		3302	24.5	27.1	22.6		-4.5
		3303	24.5	26.6	24.5		-2.1
		3304	25.6	27.9	22.8		-5.1
		3305	24.9	26.7	21.7		-5.0
		3306	24.8	27.0		23.7	
		Mean ± S.D.	24.9 ± 0.4	27.1 ± 0.5	23.3 ± 1.4	23.7	-3.8 ± 1.5
MMC b)	2	3401	25.5	27.8	27.5		-0.3
		3402	25.1	26.7	26.4		-0.3
		3403	25.6	27.9	28.0		0.1
		3404	26.1	28.0	28.0		0.0
		3405	25.0	27.8	27.9		0.1
		3406	25.9	28.1	27.7		-0.4
		Mean ± S.D.	25.5 ± 0.4	27.7 ± 0.5	27.6 ± 0.6		-0.1 ± 0.2

b): Positive control (Mitomycin C)

Appendix 7. Clinical observations in the micronucleus assay with Butanoic acid, 2-ethyl-
[male mice receiving two doses]

Compound	Dose (mg/kg)	Animal ID-No.	Time after the 1st administration*										
			1h	2h	19h	21h	24h	26h	43h	48h			
Corn oil a)	0	3001	normal	—	—	normal							
		3002	normal	—	—	normal							
		3003	normal	—	—	normal							
		3004	normal	—	—	normal							
		3005	normal	—	—	normal							
		3006	normal	—	—	normal							
Test substance	500	3101	normal	—	—	normal							
		3102	normal	—	—	normal							
		3103	normal	—	—	normal							
		3104	normal	—	—	normal							
		3105	normal	—	—	normal							
		3106	normal	—	—	normal							
	1000	3201	normal	—	—	normal							
		3202	normal	—	—	normal							
		3203	normal	—	—	normal							
		3204	normal	—	—	normal							
		3205	normal	—	—	normal							
		3206	normal	—	—	normal							
	2000	3301	normal	—	—	normal							
		3302	normal	—	—	normal	normal	normal	normal	normal	DLA	DLA	normal
		3303	normal	—	—	normal	normal	normal	normal	normal	DLA	DLA, P	normal
		3304	normal	—	—	normal	normal	normal	normal	normal	DLA	DLA, P	P
		3305	normal	—	—	normal	normal	normal	normal	normal	DLA	DLA, P	DLA, P
		3306	normal	—	—	normal	normal	normal	normal	normal	DLA	DLA	dead
MMIC b)	2	3401	—	normal	normal	—	—	—	normal	normal	normal	normal	normal
		3402	—	normal	normal	—	—	—	—	—	—	—	—
		3403	—	normal	normal	—	—	—	—	—	—	—	—
		3404	—	normal	normal	—	—	—	—	—	—	—	—
		3405	—	normal	normal	—	—	—	—	—	—	—	—
		3406	—	normal	normal	—	—	—	—	—	—	—	—

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

*: In the positive control group, time after the administration

—: Not observed

P: Piloerection

DLA: Decrease in locomotor activity

Appendix 8. Historical control data (micronucleus assay on BDF₁ mice)

Historical control values of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE)					
Group	Dose (mg/kg)	n	Frequency of MNPCE [%] (Mean \pm S.D.)	Acceptable range	
				Lower	Upper
Negative control	0	158	0.228 \pm 0.122	0.00	0.59
Positive control	2	135	6.830 \pm 1.547	2.19	11.47

Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to total erythrocytes					
Group	Dose (mg/kg)	n	Ratio of PCE [%] (Mean \pm S.D.)	Acceptable range	
				Lower	Upper
Negative control	0	158	55.6 \pm 5.6	38.9	72.3
Positive control	2	135	40.2 \pm 5.4	24.0	56.3

Negative control: Including Saline, 0.5% CMC, 0.5% MC, *etc.*

Positive control: Mitomycin C (2mg/kg i.p. single administration)

The above are pooled data from June 1, 1986 to September 30, 2002.

The acceptable range was calculated by the control limit from Mean \pm 3 \times S.D.