

2-エチル酪酸の細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Ethylbutyric acid in Bacteria

要約

2-エチル酪酸について *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰変異試験を実施した。

予備試験の結果をもとに本試験では, S9 mix 非共存下のすべての菌株は 5000~313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の5用量を, 共存下の TA100, TA1535, TA98 および TA1537 は 5000~156 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の6用量, WP2 *uvrA* は 5000~313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の5用量をそれぞれ設定した。

2回の本試験の結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から, 2-エチル酪酸は本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

材料および方法

1. テスト菌株

カリフォルニア大学 B. N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および 東京大学医科学研究所 松島教授より 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の 5 菌株を用いた。テスト菌株は菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO: 関東化学(株))を加え, 0.2 mL ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結した後, 超低温槽で -80°C 以下に凍結保存したものを使用した。これら菌株はアミノ酸要求性, 紫外線感受性, 膜変異, 薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ, 特性を備えていることを確認した。

2. テスト菌株の前培養

L 字型試験管に 2.5% ニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath 社) 溶液を 10 mL 分注し, これに凍結保存した菌懸濁液を解凍して 20 μL を接種した。37 $^\circ\text{C}$ で 8 時間振盪培養した後, 濁度計を用いて菌濃度を測定し, 生菌数が $1 \times 10^9/\text{mL}$ 以上であることを確認した。

3. 被験物質

2-エチル酪酸(ロット番号: 01-91101, チッソ(株)(東京)提供)は, 純度 99.2% (不純物として, 水分 0.03% を含む) の無色液体である。被験物質は使用時まで冷蔵, 暗

所に保存した。

被験物質原体は, 通常の取り扱い条件で安定である。酸化剤と激しく反応する。

4. 被験物質溶液の調製

DMSO を用いて最高用量の溶液を調製した後, 同溶媒で所定用量に段階希釈し, 速やかに試験に使用した。

5. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを用いた。陽性対照物質溶液は, あらかじめ所定の濃度に調製し, -80°C 以下に凍結保存したものを使用した。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

NaN₃ : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン(Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩(Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

NaN₃ は注射用水(株大塚製薬工場)に, その他は DMSO に溶解したものを使用した。

6. 培地および S9 mix の組成

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として, 精製水を用いて 0.5 mM D-ピオチン, L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または 0.5 mM L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を調製し, これをろ過滅菌後, 冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して, 粉末寒天(Bacto-Agar, Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後, 上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し, 約 45 $^\circ\text{C}$ に保温した。

2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し, 使用した。なお, 培地 1 L あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g

寒天(OXOID Agar No.1) 15 g
 径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めてある。

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム六水塩	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	残量

*: 購入したS9(キッカーマン株)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを用いて併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 \times g遠心上清分画である。

7. 試験方法

試験はブレインキューベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)を0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。ブレインキューベーション後、トップアガー2 mLを上記の混合液に加え混和し、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

8. 試験結果の判定基準

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無によらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性(溶媒)対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する(陽性)と判定した。なお、試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

結果および考察

1. 予備試験

予備試験を *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535,

TA98, TA1537および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いて、5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88および1.22 μ g/plateの7用量で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix共存下ではTA100, TA1535, TA98およびTA1537の5000 μ g/plateで抗菌性が認められた。従って本試験では、S9 mix非共存下のすべての菌株は5000, 2500, 1250, 625, 313 μ g/plateの5用量を、共存下のTA100, TA1535, TA98, TA1537は5000, 2500, 1250, 625, 313, 156 μ g/plateの6用量、WP2 *uvrA*は5000, 2500, 1250, 625, 313 μ g/plateの5用量をそれぞれ設定した。

2. 本試験

試験の結果をTable 1, 2に示した。本試験を2回実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix共存下ではTA100, TA1535, TA98およびTA1537の5000 μ g/plateで抗菌性が認められた。

なお、S9 mix非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数は、各菌株の陰性対照の復帰変異コロニー数と比較して、明らかに2倍を超えて増加し、陽性の結果を示した。

以上の結果から、2-エチル酪酸は本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

なお、類似化合物である酢酸ブチル³⁾、酪酸³⁾、イソ吉草酸エチル³⁾およびギ酸イソアミル³⁾は、いずれも細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている。

参考文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173(1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3(1976).
- 3) 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, pp.70-71, pp.84-85, pp.234-235, pp.324-325.

連絡先

試験責任者：榎本佳明

試験担当者：榎本佳明, 清水優子

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Yoshiaki Enomoto (Study director)

Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,

Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,

Ibaraki, 314-0255 Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Mutagenicity of 2-ethylbutyric acid in reverse mutation test (I) in bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	116 124 (126) 138 (\pm 11)	13 18 (14) 10 (\pm 4)	24 35 (29) 27 (\pm 6)	15 18 (16) 15 (\pm 2)	10 9 (10) 10 (\pm 1)
	313	106 118 (116) 125 (\pm 10)	8 12 (9) 8 (\pm 2)	37 39 (39) 41 (\pm 2)	15 18 (16) 15 (\pm 2)	15 13 (14) 13 (\pm 1)
	625	129 129 (129) 128 (\pm 1)	12 7 (9) 9 (\pm 3)	34 25 (34) 42 (\pm 9)	15 18 (16) 16 (\pm 2)	14 15 (13) 11 (\pm 2)
	1250	107 141 (120) 112 (\pm 18)	11 11 (10) 8 (\pm 2)	29 47 (37) 34 (\pm 9)	14 13 (14) 16 (\pm 2)	17 13 (16) 17 (\pm 2)
	2500	116 100 (114) 125 (\pm 13)	9 11 (10) 9 (\pm 1)	36 33 (35) 36 (\pm 2)	18 18 (17) 16 (\pm 1)	13 19 (16) 15 (\pm 3)
	5000	101 94 (94) 87 (\pm 7)	7 5 (7) 8 (\pm 2)	28 38 (35) 38 (\pm 6)	13 12 (14) 18 (\pm 3)	11 13 (12) 12 (\pm 1)
S9 mix (+)	0	111 118 (112) 108 (\pm 5)	10 10 (11) 12 (\pm 1)	36 29 (33) 35 (\pm 4)	29 22 (23) 18 (\pm 6)	19 19 (19) 19 (\pm 0)
	156	123 124 (122) 120 (\pm 2)	8 13 (10) 9 (\pm 3)	/	27 29 (25) 20 (\pm 5)	18 21 (20) 22 (\pm 2)
	313	118 124 (116) 106 (\pm 9)	15 10 (13) 14 (\pm 3)	41 29 (37) 42 (\pm 7)	31 26 (26) 21 (\pm 5)	22 27 (24) 24 (\pm 3)
	625	103 118 (114) 122 (\pm 10)	13 12 (12) 10 (\pm 2)	39 35 (35) 31 (\pm 4)	23 23 (25) 28 (\pm 3)	23 26 (25) 26 (\pm 2)
	1250	113 103 (111) 116 (\pm 7)	8 11 (10) 10 (\pm 2)	46 41 (38) 28 (\pm 9)	33 26 (29) 27 (\pm 4)	17 17 (17) 18 (\pm 1)
	2500	102 126 (116) 120 (\pm 12)	11 9 (10) 9 (\pm 1)	32 26 (30) 32 (\pm 3)	30 23 (24) 20 (\pm 5)	18 26 (21) 18 (\pm 5)
	5000	100* 108* (105) 108* (\pm 5)	8* 6* (7) 6* (\pm 1)	28 38 (30) 23 (\pm 8)	21* 26* (23) 21* (\pm 3)	18* 22* (17) 12* (\pm 5)
Positive control	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 mix (-)	Number of revertants	618 603 (608) 603 (\pm 9)	446 518 (486) 495 (\pm 37)	973 954 (964) 966 (\pm 10)	697 666 (682) 682 (\pm 16)	443 278 (329) 267 (\pm 99)
Positive control	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
S9 mix (+)	Number of revertants	1600 1562 (1512) 1374 (\pm 121)	313 241 (264) 239 (\pm 42)	1080 1140 (1173) 1299 (\pm 113)	459 582 (488) 422 (\pm 84)	205 187 (203) 217 (\pm 15)

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, NaN₃:sodium azideENNG: *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine hydrochloride

2-AA:2-aminoanthracene

(Mean)

(\pm S.D.)

*:Microbial toxicity was observed.

Table 2 Mutagenicity of 2-ethylbutyric acid in reverse mutation test (II) in bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	97 106 (101) 100 (\pm 5)	11 13 (13) 15 (\pm 2)	40 37 (37) 34 (\pm 3)	18 19 (18) 17 (\pm 1)	9 12 (10) 9 (\pm 2)
	313	97 94 (102) 114 (\pm 11)	16 15 (14) 11 (\pm 3)	34 40 (39) 43 (\pm 5)	20 19 (20) 21 (\pm 1)	12 7 (10) 11 (\pm 3)
	625	103 112 (107) 107 (\pm 5)	15 11 (11) 8 (\pm 4)	38 39 (41) 45 (\pm 4)	19 20 (19) 17 (\pm 2)	10 10 (10) 10 (\pm 0)
	1250	114 104 (104) 95 (\pm 10)	10 14 (14) 17 (\pm 4)	44 39 (43) 45 (\pm 3)	19 19 (20) 22 (\pm 2)	9 10 (10) 12 (\pm 2)
	2500	103 102 (114) 137 (\pm 20)	12 16 (13) 12 (\pm 2)	41 33 (35) 30 (\pm 6)	18 21 (19) 17 (\pm 2)	9 10 (10) 11 (\pm 1)
	5000	100 95 (101) 108 (\pm 7)	14 11 (13) 15 (\pm 2)	41 28 (33) 30 (\pm 7)	18 18 (20) 23 (\pm 3)	8 11 (10) 11 (\pm 2)
S9 mix (+)	0	111 97 (104) 104 (\pm 7)	12 8 (11) 14 (\pm 3)	42 45 (44) 45 (\pm 2)	27 22 (24) 23 (\pm 3)	15 19 (17) 17 (\pm 2)
	156	98 112 (107) 110 (\pm 8)	16 12 (14) 15 (\pm 2)	/	26 31 (28) 28 (\pm 3)	20 20 (19) 17 (\pm 2)
	313	97 115 (106) 106 (\pm 9)	16 13 (13) 11 (\pm 3)	36 36 (39) 46 (\pm 6)	29 30 (30) 32 (\pm 2)	16 16 (16) 17 (\pm 1)
	625	100 105 (102) 102 (\pm 3)	12 16 (14) 15 (\pm 2)	45 44 (43) 39 (\pm 3)	32 26 (29) 29 (\pm 3)	14 14 (16) 20 (\pm 3)
	1250	106 112 (107) 104 (\pm 4)	14 15 (15) 17 (\pm 2)	38 42 (41) 42 (\pm 2)	32 22 (28) 30 (\pm 5)	13 12 (14) 16 (\pm 2)
	2500	107 97 (104) 109 (\pm 6)	11 14 (12) 11 (\pm 2)	37 37 (39) 43 (\pm 3)	26 31 (27) 25 (\pm 3)	12 12 (14) 18 (\pm 3)
	5000	113* 93* (104) 106* (\pm 10)	9* 6* (7) 6* (\pm 2)	41 40 (42) 46 (\pm 3)	22* 28* (26) 27* (\pm 3)	13* 13* (14) 15* (\pm 1)
Positive control	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 mix (-)	Number of revertants	585 545 (554) 533 (\pm 27)	488 493 (503) 527 (\pm 21)	892 880 (916) 975 (\pm 52)	537 480 (494) 465 (\pm 38)	309 312 (319) 336 (\pm 15)
Positive control	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
S9 mix (+)	Number of revertants	1362 1242 (1276) 1223 (\pm 75)	267 274 (256) 228 (\pm 25)	1230 1217 (1224) 1225 (\pm 7)	432 440 (425) 403 (\pm 19)	197 186 (182) 163 (\pm 17)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, NaN₃: sodium azide
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride
 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)
 (\pm S.D.)

*: Microbial toxicity was observed.

2-エチル酪酸のチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 2-Ethylbutyric acid in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2-エチル酪酸の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下、非存在下で1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公比2で4濃度を設定した。連続処理法の24時間処理では、1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公差400で4濃度を設定した。

短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。また連続処理法の24時間処理の1200, 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、染色体の構造異常細胞の出現頻度はそれぞれ17.0, 74.0%であった。連続処理法24時間処理において、倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下では2-エチル酪酸は、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

材料および方法

1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1999年8月, 入手時:継代14代, 凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代5代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(GIBCO BRL, ロット番号:1019033)を10 vol%添加したイーグルMEM(日水製薬(株)培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。

短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。また連続処理法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間処理した。

4. 被験物質

2-エチル酪酸(ロット番号:01-91101, チッソ(株)(東京)

提供)は、純度99.2%(不純物として、水分0.03%を含む)の無色液体である。被験物質は使用時まで冷蔵、暗所に保存した。

被験物質原体は、通常の取り扱い条件で安定である。酸化剤と激しく反応する。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はジメチルスルホキシド(関東化学(株), ロット番号:010G1456, 104G1307, 108G2036)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5 vol%になるように加えた。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、血球計算盤を用いて各群の細胞を計数し、陰性対照群に対する割合をもって指標とした。

その結果、2-エチル酪酸の約50%の増殖抑制を示す濃度を、生存曲線において細胞増殖率が50%前後を示す2点を結ぶ直線式より算出したところ、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下でいずれも1002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また連続処理法の24時間処理における約50%の増殖抑制を示す濃度は1272 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、短時間処理法のS9 mix存在下、非存在下で1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公比2で4濃度を設定した。連続処理法の24時間処理では、1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公差400で4濃度を設定した。

陽性対照として、短時間処理法のS9 mix存在下では、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業(株), ロット番号:GG01)の濃度を20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, S9 mix非存在下では、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:283AIG)の濃度を0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 連続処理法では、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:286AIH)の濃度を0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。

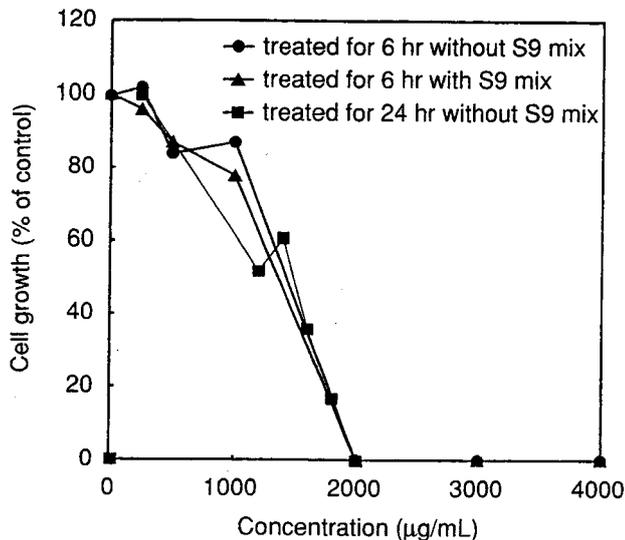


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-ethylbutyric acid

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 µg/mLになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき2枚作製した。作製した標本を、3 vol%ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型の切断、交換などの構造異常およびギャップの有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。ギャップは構造異常には含めなかった。また、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。ただし、連続処理法24時間処理の1600 µg/mLでは、細胞毒性のため、一方のプレートの標本については50個以上の分裂中期細胞が得られず、集計から除外した。

10. 記録と測定

溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

11. 細胞増殖率の測定

染色体標本作製と同一のサンプルにおける細胞増殖率を測定した。標本作製時に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。

結果および考察

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。2-エチル酪酸を加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

連続処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。2-エチル酪酸を加えて24時間連続処理した結果、1200, 1600 µg/mLで染色体の構造異常細胞の出現頻度はそれぞれ17.0, 74.0%であった。倍数性細胞の出現頻度は全ての処理条件で5%未満であった。

なお、処理開始時および処理終了時の細胞処理液のpHを測定したところ、連続処理法24時間処理の1200, 1600 µg/mLにおける細胞処理液の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。

以上の結果から、2-エチル酪酸は本試験条件下において、染色体異常を誘発すると結論した。

なお、類似化合物である氷酢酸、酪酸ならびに乳酸は、いずれも連続処理法で陰性の結果が報告されている²⁾。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス”, 朝倉書店, 東京, 1988, pp.16-37.
- 2) 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.

連絡先

試験責任者: 中川宗洋
 試験担当者: 太田絵律奈, 石毛裕子, 成見香瑞範
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Munehiro Nakagawa (Study director)
 Erina Ohta, Yuko Ishige,
 Kazunori Narumi
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
 Kashima Laboratory
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
 Ibaraki, 314-0255 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-ethylbutyric acid with and without S9 mix

Group	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid ^{b)} (%)	Judgement ^{c)}	
						ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Solvent ^{a)}	0	-	6-18	100	200	3	0	0	0	0	3	3(1.5)	0	0.0	-	-
Test Substance	200	-	6-18	125	200	0	1	1	0	0	2	2(1.0)	0	0.0	-	-
	400	-	6-18	117	200	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	0	0.0	-	-
	800	-	6-18	91	200	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	0	0.0	-	-
	1600 A	-	6-18	54	200	2	1	0	0	0	3	2(1.0)	0	0.5	-	-
MMC	0.1	-	6-18	62	200	51	33	0	0	0	84	66(33.0)	0	0.5	+	-
Solvent	0	+	6-18	100	200	0	0	2	0	0	2	2(1.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	200	+	6-18	84	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
	400	+	6-18	93	200	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	0	0.0	-	-
	800	+	6-18	86	200	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	0	1.0	-	-
	1600 A	+	6-18	0	TOXIC											
BP	20	+	6-18	68	200	25	105	1	0	0	131	116(58.0)	0	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C(positive control), BP:benzo [a] pyrene(positive control)

a) Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

b) Two hundred cells were analyzed in each group except 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with S9 mix.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

A: The color of the medium was changed yellow and it indicated that pH of the medium became low.

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-ethylbutyric acid without S9 mix

Group	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid ^{b)} (%)	Judgement ^{c)}	
					ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Solvent ^{a)}	0	24	100	200	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	400	24	94	200	11	0	0	0	0	11	11(5.5)	2	0.0	±	-
	800	24	83	200	10	0	1	0	0	11	10(5.0)	2	1.0	±	-
	1200	24	62	200	33	0	2	0	0	35	34(17.0)	1	0.5	+	-
	1600 A	24	2	100	72	2	0	0	0	74	74(74.0)	4	0.0	+	-
MMC	0.03	24	79	200	37	19	5	0	0	61	59(29.5)	2	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C(positive control)

a) Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

b) Two hundred cells were analyzed in each group except 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

A: The color of the medium was changed yellow and it indicated that pH of the medium became low.

2-エチル酪酸のラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2-Ethylbutyric acid by Oral Administration in Rats

要約

2-エチル酪酸は、抗痙攣薬のバルプロ酸の類縁化学物質として知られている有機酸である。本物質の安全性評価の資料を得るために、2-エチル酪酸0(媒体対照、コーン油)、10、50および250 mg/kgを10週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット(各13匹/群)に、交配前2週間から2週間の交配期間を経て、雄は42日間、交尾した雌は妊娠期間を経て分娩後4日まで、交尾したが分娩しなかった雌は妊娠25日相当日まで、それぞれ連日投与して翌日剖検し、雌雄動物に対する反復投与毒性および生殖発生毒性を検討した。また、出生児は哺育4日まで観察して剖検し、出生児に対する影響も検討した。結果は以下のように要約される。

1. 反復投与毒性

雌雄ともに被験物質投与に起因する、死亡および瀕死動物は認められなかった。

雌雄ともに250 mg/kg投与群において、投与後一過性の流涎が1例ずつに認められた他に、被験物質投与に起因した一般状態の異常は認められなかった。また、体重増加および摂餌量にも投与の影響は認められなかった。

雌雄ともに250 mg/kg投与群において腎臓重量がやや増加したが、病理組織学検査では被験物質投与に起因すると考えられる異常は認められなかった。その他の器官の重量および病理組織学検査所見にも被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学検査では、50 mg/kg以上の投与群の雄において白血球数が軽度減少し、250 mg/kg投与群において血小板数が減少したが、雌では被験物質投与の影響は認められなかった。血液生化学検査成績については、雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

性周期に被験物質投与の影響は認められず、全例が交尾した。また、受胎率にも投与の影響は認められなかった。

被験物質各投与群の妊娠期間は対照群と同様であり、出産率にも被験物質投与の影響は認められなかった。また、妊娠黄体数、着床数、着床率、産児数および分娩率といった出生までの胚および胎児の生存性にも投与の影響は認められなかった。しかし、50 mg/kg以上の投与群において、少数例に産児を集める行動や胎盤を処理する行動の欠如、あるいは分娩の遅延といった分娩異常が

認められた。さらに、250 mg/kg投与群では出生産児数が減少し、生児出産率および出生率が減少し、このために、哺育4日における生存産児数も減少した。哺育0日および4日における性比ならびに新生児の4日の生存率には投与の影響は認められず、出生児の体重にも投与の影響は認められなかった。形態異常を示す出生児も認められなかった。

以上の試験成績から、本試験条件下における2-エチル酪酸の無作用量は、反復投与毒性に関しては、雄では10 mg/kg/dayであり、雌では50 mg/kg/dayと推定された。生殖発生毒性に関しては、雄では250 mg/kg/dayであり、雌では10 mg/kg/dayと推定され、出生児では50 mg/kg/dayであると推定された。

方法

1. 被験物質

本試験に使用した2-エチル酪酸(ロット番号:01-91101, 純度:99.2%, 不純物として水分0.03%を含有する無色透明の液体)は、チッソ株式会社(熊本)から提供を受けたもので、入手後は室温保管した。被験物質の試験期間中の安定性は、残余被験物質を提供元で再分析することにより確認された。

投与検体は、被験物質を秤量してコーン油(英名:corn oil, ナカライテスク(株)Lot, No. V9F1299)に溶解し、いずれの用量においても1回の投与液量が2 mL/kg体重になるように含量を調製した。投与検体の安定性については、冷蔵、遮光条件下における8日間の安定性を確認しているため、1週間に1回以上の頻度で調製し、調製後7日以内に使用した。投与検体中に含まれる被験物質の含量は秦野研究所において確認した。

2. 使用動物および飼育方法

試験には、日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産のSprague-Dawley系(Crj:CD(SD)IGS, SPF)ラットを使用した。雌雄動物は7週齢で購入し、入荷後6日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間毎日一般状態を観察して異常が認められなかった動物を、さらに2週間予備飼育した。この間、雄は一般状態を観察し、雌は一般状態を観察するとともに性周期を観察した。雌雄とも投与開始前日に体重を測定し、体重別層化無作為抽出法により群分けした。雌動物については、入荷後7日から群分け日まで性周期を毎日観察し、定期的に発情を回帰している動物を選択して群分けに用いた。

各動物は、基準温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、基準湿度50~65%、換気回数約15回/時間、照明12時間(7~19時点灯)にそれぞれ制御された飼育室で、金属製金網床ケージに個別に収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア(株))および飲料水(水道水、秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。妊娠18日(膣栓あるいは精子発見日=妊娠0日)以後の母動物は、ラット用プラスチック製繁殖ケージに収容し、哺育5日(哺育0日=分娩日)まで紙パルプ製チップ(ALPHA-dri、加商(株))を床敷として供給して飼育した。

3. 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の結果に基づいて決定した。すなわち、本試験と同系統のラット各群雌雄各5匹に、2-エチル酪酸をコーン油に溶解して、0、250、500あるいは1000 mg/kgを2週間反復経口投与し、その間、一般状態を観察して体重推移、摂餌量、尿の性状を調べた後、最終投与後に絶食してその翌日に剖検し、器官重量を測定した。その結果、1000 mg/kg投与により投与初期に自発運動が減少し、体重増加および摂餌量が抑制された。その後は流産が認められるようになり、呼吸異常を示した雄の1例は瀕死状態に至った。さらに、2週間の反復投与後には前胃粘膜の肥厚が認められ、雌雄の肝臓重量が増加し、雄の脾臓が腫大して雌の腎臓重量が増加した。これらの結果ならびに、本試験では投与期間がさらに延長し、雌には妊娠、分娩および哺育といった生理的負荷が加えられることを考慮すると、1000 mg/kgは、耐量を超える量であると推測された。一方、250 mg/kgおよび500 mg/kg投与群は、瀕死状態に至らなかったものの呼吸異常も認められ、肝臓および腎臓重量の増加傾向が認められた。また、呼吸異常を認めなかった雄には脾臓重量の増加傾向が認められた。さらに、器官形成期の妊娠ラットに2-エチル酪酸を150 mg/kg反復投与すると、母動物の一部が呼吸異常を示して瀕死あるいは死に至ることが報告されていることから¹⁾、本試験における高用量には、予備試験において2週間の生存が確認された250 mg/kgを設定し、以下公比5で除して、中用量には50 mg/kgを、低用量には10 mg/kgを設定することとした。

4. 観察および検査

1) 一般状態観察

雌雄とも、全例について毎日、投与前後に一般状態を観察し、症状が発現した場合は、速やかな回復が期待されない所見を除き、症状の発現している間、断続的に可能な限り観察を継続した。死亡例については発見後体重を測定して剖検した。

2) 体重

雌雄の全例について体重を測定した。測定は、雄では投与1(投与開始日)、7、14、21、28、35、42日および解剖日に行い、雌では、交尾を確認するまでは投与1、7、14、21日に、交尾確認後は、妊娠0、7、14、20日に、

分娩後は哺育0、4日および解剖日に行った。分娩しなかった例は、妊娠26日相当日の剖検日に測定した。これらのうち、投与21日の雌については、交尾が確認されていない動物についてのみ測定したので評価の対象から除外した。

3) 摂餌量

雌雄の全例について投与1~2、7~8および14~15日に摂餌量を測定した。これらの他に、雄では投与14~15、29~30、35~36および41~42日に、雌では妊娠0~1、7~8、14~15および20~21日ならびに分娩後の哺育3~4日にも測定した。

4) 性周期

雌の全例について群分け日までの観察に引き続き、交尾確認日まで性周期を観察した。膣スミア標本の細胞像から性周期を判定し、発情期の回帰間隔を基に性周期のタイプを、4日周期、4および5日周期ならびに不正性周期に分類し、投与開始後性周期が変化した動物の頻度を群毎に算出した。また、群ごとに平均発情回帰日数(個体毎の発情期から次回発情期までの日数の平均)を求めた。

5) 交配

雌雄ともに2週間投与後(投与15日)の12週齢から交尾を確認するまで、2週間を限度として同群内の雌雄1:1で連日同居させた。交配期間中は、毎朝、膣スミア中の精子、あるいは膣栓の有無を確認した。これらのうちのいずれかが確認された雌動物は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率 $[(\text{交尾動物数}/\text{交配動物数}) \times 100, \text{\%}]$ を求め、剖検時に子宮に着床痕の確認された雌動物を受胎動物として受胎率 $[(\text{受胎動物数}/\text{交尾動物数}) \times 100, \text{\%}]$ を算出した。また、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数も求めた。

6) 分娩・哺育観察

各群とも、交尾した雌は、全例を自然分娩させて哺育させた。分娩の確認は、妊娠21日から分娩が確認されるまで、妊娠25日を限度として毎日行い、11時までには分娩が完了した例についてその日を哺育0日とした。分娩状態を直接観察できた例については、異常の有無を断続的に観察し、直接観察ができなかった例については、分娩前後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。妊娠25日相当日までに分娩が確認されない動物は翌日剖検し、子宮に着床痕の認められなかった例を不妊と判定した。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日~分娩日の日数)を算定し、出産率 $[(\text{生児出産雌数}/\text{受胎動物数}) \times 100, \text{\%}]$ を各群について求めた。また、哺育1日から毎日、哺育状態を観察し、哺育5日の剖検において数えられた着床数および妊娠黄体数から着床率 $[(\text{着$

床数/妊娠黄体数)×100, %] を算出した。

出生児は、哺育0日に、雌雄別に産児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率 [(産児数/着床痕数)×100, %]、生児出生率 [(出生生児数/着床痕数)×100, %] および出生率 [(出生生児数/産児数)×100, %] を算出した。生存児については外表奇形の有無を観察した。翌日(哺育1日)から哺育4日まで毎日一般状態を観察し、生児数と死亡児数を雌雄別に数えて新生児の4日の生存率 [(哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100, %] を算出した。生存児については、哺育0および4日に個別の体重を測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出するとともに哺育0および4日における性比 [(哺育0あるいは4日雄生児数/哺育0あるいは4日雌生児数)×100] を算出した。

7) 剖検

(1) 雄

投与42日に絶食を開始し、その18~24時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈から抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて血液を採取し、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間測定に用いた。次いで、腹部後大静脈から抗凝固剤としてEDTA-3Kを用いて採血し、その他の血液学検査に用いた。さらに、腹部後大静脈から抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、血液生化学検査に用いた。動物は、採血終了後に放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。また、全例について、脳、下垂体、脊髄、上部気道を含む上顎、甲状腺、心臓、肺、気管、気管支、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨髄、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、凝固腺を含む精囊、病変部を採取し、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量を測定して相対重量を算出した。採取した器官および組織のうち、精巣ならびに精巣上体はブアン液(長期保存は0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液を使用)に固定し、その他は0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定して保存した。肺は、摘出前に0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液を注入してから固定・保存した。

(2) 雌

死亡例は発見後直ちに剖検した。交尾したが分娩しなかった例については妊娠25日相当日に、また、分娩した例は哺育4日に絶食を開始し、いずれも絶食開始18~24時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で雄と同様に採血後、放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。また、全例について脳、下垂体、脊髄、上部気道を含む上顎、甲状腺、心臓、肺、気管、気管支、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨髄、卵巣、子宮、膈および病変部を採取し、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および副腎の重量を測定して相対重量を算出した。子宮に

ついては着床数を数え、分娩した雌の卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた後、いずれも0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定して保存した。肺は雄と同様に0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液による注入固定を行った。

(3) 出生児

死亡児は発見後速やかに剖検し、0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定して保存した。生存児は全例を哺育4日にエーテル吸入により致死させ剖検し、異常の認められた器官を0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定し保存した。

8) 血液学検査

プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間は全自動血液凝固測定装置CA-1000(東亜医用電子)を用いて光散乱法によって測定した。また、血液自動分析装置CELL-DYN3500SL(ダイナボット)を用いて赤血球数(RBC)、平均赤血球容積(MCV)ならびに血小板数を電気抵抗法で、白血球数および白血球分類をフローサイトメトリー・レーザー光散乱法で測定し、血色素量を吸光度法により測定した。さらに、RBC、MCVあるいは血色素量からヘマトクリット値、平均赤血球血色素濃度(MCHC)あるいは平均赤血球血色素量(MCH)を算出した。

9) 血液生化学検査

遠心方式生化学自動分析装置COBAS-FARA(ロシュ)を用い、総蛋白濃度はビウレット法で、アルブミン濃度はBCG法で、尿素窒素濃度(BUN)は、ウレアーゼGl.DH法で、クレアチニン濃度はJaffé法で、ブドウ糖濃度はグルコキナーゼG6PDH法で、総コレステロール濃度はCOD・DAOS法で、トリグリセライド濃度はGPO・DAOS法で、アルカリフォスファターゼ活性(ALP)はGSCC法で、GPTおよびGOT活性はIFCC法で、γ-GTP活性はγ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法で、総ビリルビン濃度はJendrassik/Grof法で、無機リン濃度はモリブデン酸直接法で、カルシウム濃度はOCPC法で測定し、A/G比は算出した。また、全自動電解質分析装置EA05(A&T)を用い、イオン電極法によって、ナトリウム、カリウムおよび塩素の各濃度を測定した。

10) 病理組織学検査

雄から得られた固定保存器官のうち、精巣および精巣上体は全例について、その他は対照群5例および250 mg/kg投与群6例について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

雌では採取した器官および組織のうち、卵巣は全例について、その他は不妊例を除く対照群7例および250 mg/kg投与群5例について雄と同様に病理組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

病変部については雌雄ともに脱毛を除き病理組織学検

査を行った。

5. 統計解析

性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率ならびに出生児の形態異常の出現頻度についてはFisherの直接確率検定を行った。病理組織学検査所見では、グレード分けをしたデータはMann-WhitneyのU検定により、陽性グレードの合計値はFisherの直接確率片側検定により対照群と2-エチル酪酸各投与群との間の有意差検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいはlitterごとの平均値を1標本として先ずBartlett法により各群の分散の一樣性について検定を行った。分散が一樣である場合には一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められる場合はDunnett法により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が0となる場合および分散が一樣でない場合には、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett型の検定法により多重比較を行った。有意水準はいずれも5%とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

雄動物に死亡はなかった。雄では250 mg/kg投与群の1例に投与後一過性の流涎が認められた他に、被験物質投与に起因すると考えられる異常は観察されなかった。

雌では対照群の1例が投与38日の分娩中に死亡した。死亡するまで異常は全く観察されなかったが、病理組織学検査において肺および腎臓系球体の毛細血管内にフィブリン血栓が認められたことから、フィブリン血栓に関連した原因により死亡したものと推測される。この他に死亡および瀕死例はなかった。雌の一般状態については、250 mg/kg投与群の1例に投与後一過性の流涎が認められた他に被験物質投与に起因すると考えられる異常は観察されなかった。

2) 体重(Figs. 1, 2)

雌雄ともにいずれの時期の体重も対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められず、体重増加に被験物質投与の影響は認められなかった。

3) 摂餌量(Figs. 3, 4)

雌雄ともにいずれの時期の摂餌量も対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められず、被験物質投与の影響は認められなかった。

4) 器官重量(Table 1)

雌雄ともに250 mg/kg投与群において腎臓重量が増加し、雄では相対重量のみが、また、雌では重量および相対重量のいずれもが対照群と比較して有意に増加した。その他の器官については雌雄ともに対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

5) 血液学検査所見(Table 2)

雄では赤血球系の各測定値には対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。白血球系については、50 mg/kg以上の投与群において白血球数が対照群と比較して有意($p<0.05$)に減少した。また、白血球百分比については対照群との間に有意差は認められなかったが、リンパ球以外の白血球比率はむしろ対照群より高い値を示していた。凝固系については、250 mg/kg投与群において血小板数が有意($p<0.01$)に減少していたが、血液凝固時間には対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

雌ではいずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

6) 血液生化学検査所見(Table 3)

雄ではいずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

雌では、50 mg/kg以上の投与群において γ -GTP活性が対照群と比較して軽度ながら有意($p<0.05$, $p<0.01$)に上昇した。また、対照群と比較すると、50 mg/kg投与群において総ビリルビン濃度の有意($p<0.01$)な減少およびカルシウム濃度の有意($p<0.01$)な増加が認められたが、その他の投与群については対照群との間に有意差は認められなかった。上記以外の項目については、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

7) 剖検所見

雄では、50 mg/kgおよび250 mg/kg投与群の各2例に肝臓および腎臓の腫大が認められ、そのうちの250 mg/kg投与群の1例には右側腎臓の皮質に淡色域が認められた。これらの他に250 mg/kg投与群では胸腺の腫大が1例に、小型化が2例に観察された。生殖器の変化としては、対照群および250 mg/kg投与群の2および1例の精巣上体に黄色あるいは乳白色の結節が片側性に観察された。

雌では、妊娠26日相当日に剖検した不妊例2例については、対照群の1例に所見は認められなかったが、50 mg/kg投与群の1例の胸腺に小型化が認められた。哺育5日の定期解剖では胸腺の小型化が対照群を含む各投与群に1例ずつ認められた。また、対照群の2例および10 mg/kg投与群の1例の腺胃粘膜に赤色点が認められ、10 mg/kg投与群の別の1例において前胃粘膜の肥厚が観察された。50 mg/kg投与群では1例の左側子宮角に赤色域が観察された。この他、対照群では1例に左側子宮角の限局性拡張が認められ、一般状態の観察において右腋窩皮下に結節の認められた例にはその部位に腫瘍が認められた。

8) 病理組織学検査所見(Table 4)

雄では精巣、精巣上体、肝臓、腎臓、脾臓、肺および気管、心臓、および甲状腺に所見が認められたが、いずれも被験物質投与に起因した変化ではなかった。

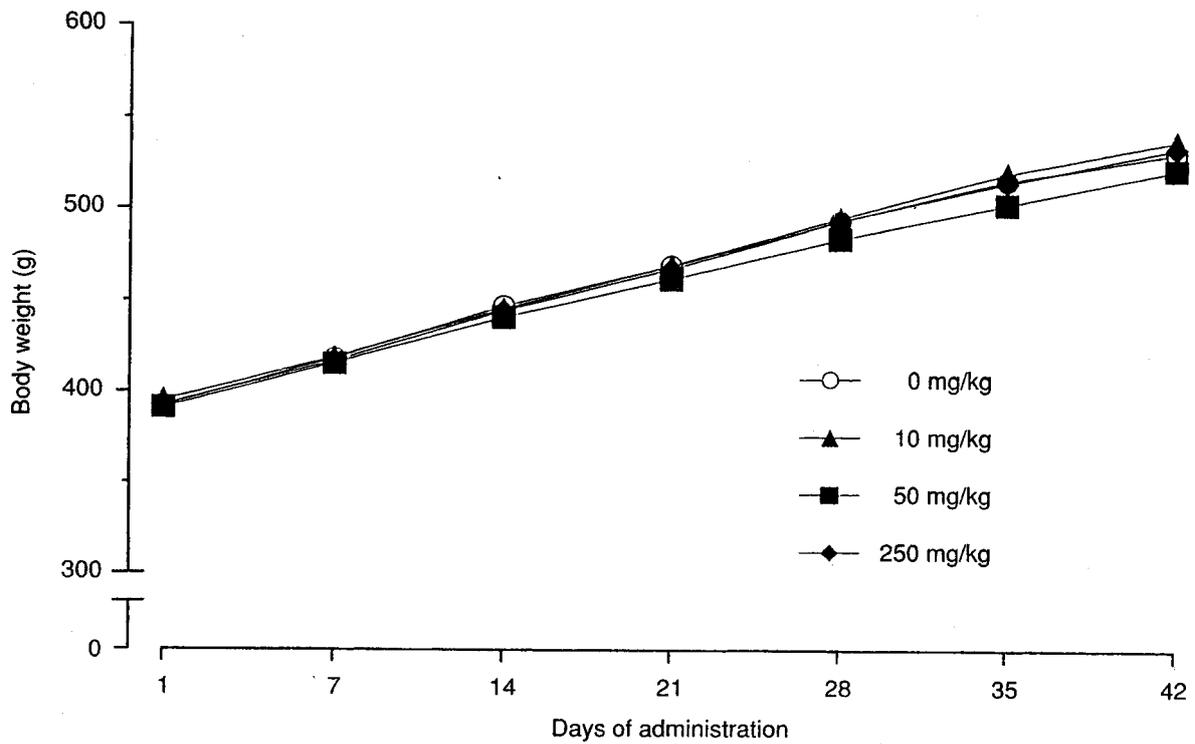


Fig. 1 Body weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

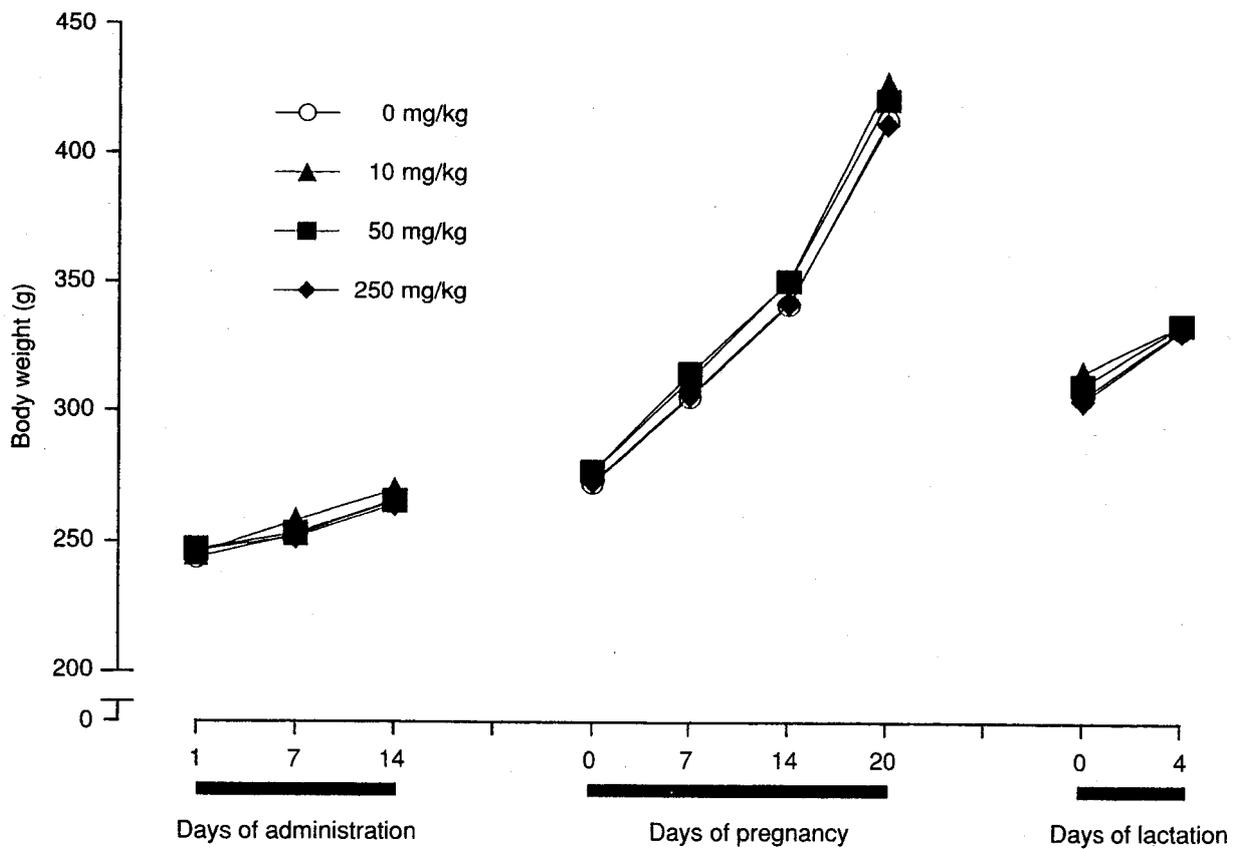


Fig. 2 Body weight of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

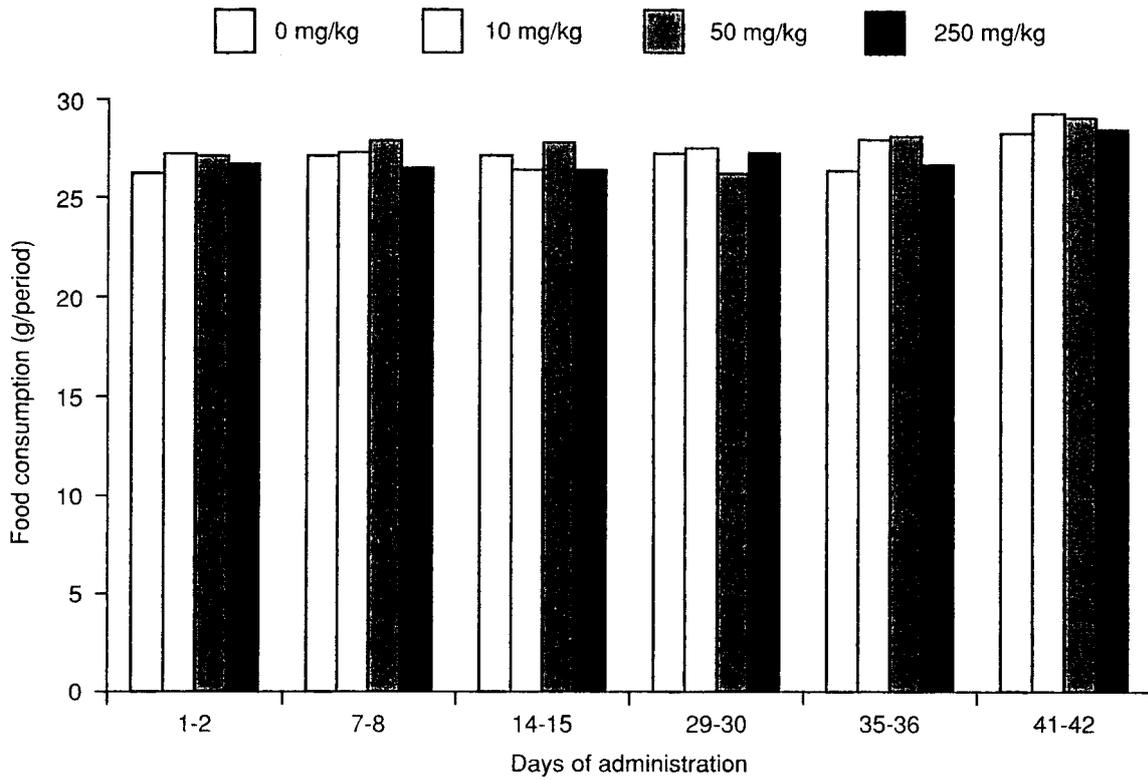


Fig. 3 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

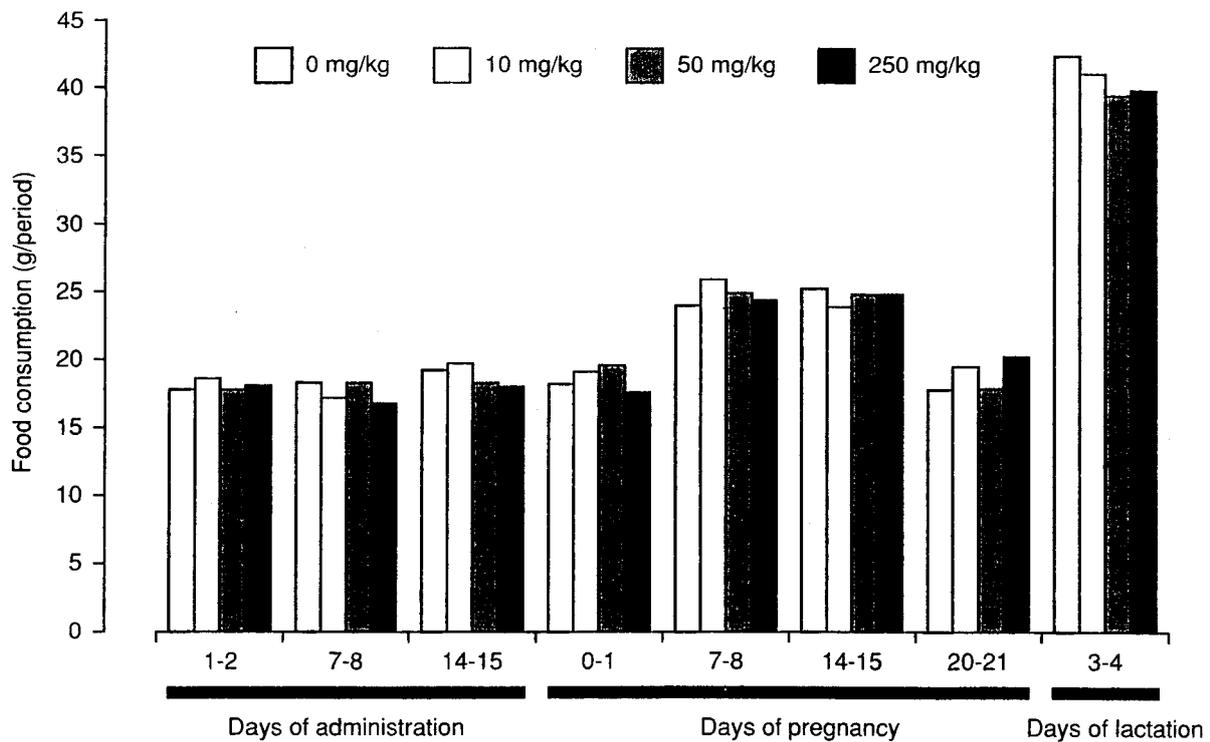


Fig. 4 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

雌でも子宮、肝臓、腎臓、脾臓、肺および気管、胸腺、膀胱、甲状腺に所見が認められたが、いずれも被験物質投与に起因した変化ではなかった。また、対照群の1例において右腋窩皮下に腫瘤が認められた例には、腋窩部の乳腺にリンパ球およびマクロファージの浸潤が認められ、乳管内には細胞残屑が認められた。

2. 生殖発生毒性

1) 性周期所見 (Table 5)

投与開始後に性周期の変化した動物の頻度および平均発情回帰日数には、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 交配成績 (Table 5)

全例が交尾し、対照群および50 mg/kg投与群の各1例を除き受胎した。また、同居開始から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数にも対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

3) 分娩および哺育所見

対照群において分娩を直接観察した6例中1例は、妊娠22日の分娩中に死亡したが、分娩状態に異常は認められなかった。しかし、娩出された産児の中には皮下出血が認められたことから、これら2例の娩出時には分娩困難があったものと推測された。被験物質投与群では、10 mg/kg投与群の9例、50 mg/kg投与群の5例、および250 mg/kg投与群の9例の分娩を直接観察した。これらのうち、50 mg/kg投与群の2例には産児を集める行動が認められず、出生児が多数死亡した例が認められた。また、妊娠22日に分娩を開始したが、分娩が遅延して4時間が経過しても3匹しか分娩せず、翌日に死亡児1匹を含む18匹の分娩が確認された例も認められた。250 mg/kg投与群の1例には妊娠23日の分娩時に胎盤処理および産児を集める行動が認められず出生児の多数が死亡した例が認められ、この例の分娩状態は不良であったと判断された。しかし、10 mg/kg投与群の動物に分娩状態の異常は観察されず、妊娠期間および出産率については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった (Table 6)。

哺育状態の異常はいずれの投与群の動物にも認められなかった。

4) 黄体数および着床数 (Table 6)

対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められず、排卵および着床には被験物質投与の影響は認められなかった。

5) 出生児所見 (Table 6)

いずれの投与群の動物も行動を含む一般状態に異常は認められなかった。

出生児の生存性を対照群と比較すると、250 mg/kg投与群において出産児数、生児出産率および出生率が有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) に低下した。産児数および分娩率

もやや低下したが、有意差は認められなかった。哺育0日における性比については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。哺育期間中にはいずれの投与群においても死亡児が増加することはなく、新生児の4日の生存率は対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。しかし、250 mg/kg投与群では哺育0日において低下していた生児数がそのまま維持されたため、対照群と比較すると、哺育4日における生児数に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。哺育4日における性比については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

体重については雌雄ともにいずれの時期も対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

生存産児の形態観察 (表には示さず) では、分娩途中で母動物が死亡した対照群の1腹の雌産児2例に、胸部および両前肢皮下に血液の貯留、皮膚の乾燥、ならびに左側後肢末端の皮下血腫および尾の小血腫あるいは吻部および両後肢の皮下血腫が認められたが、内臓に異常は観察されなかった。死亡児の形態に異常は観察されなかった。哺育4日における剖検では50 mg/kg投与群の1腹の雌2例に曲尾が観察された他に、いずれの投与群にも異常は観察されなかった。

考察

1. 反復投与毒性

雌雄ともに250 mg/kg投与群において流涎が観察されたが、各1例に投与後一過性に認められた軽微な変化であった。

予備試験では1000 mg/kgの反復投与を受けた雄が呼吸異常を示して瀕死状態に至ったが、本試験では瀕死あるいは死亡動物は認められなかった。Narotskyら¹⁾は、器官形成期にあたる妊娠時期に2-エチル酪酸を150あるいは250 mg/kg経口投与すると母動物が誤嚥により呼吸異常を示して死亡することを報告し、これは被験物質の消化管に対する刺激作用によるものであると推定している。予備試験において瀕死状態に至った動物に誤嚥は認められなかったが、呼吸異常の成因を知るために本試験では病理組織学検査に上部気道を加えた。また、予備試験のそれより最高用量を減らし、胃管の外壁に被験物質が全く付着しないように投与したところ、死亡および瀕死のみならず呼吸異常も観察されなかった。病理学検査においても上部気道から肺に至るまで呼吸器に異常は観察されなかったため、予備試験でみられた呼吸異常の成因を知ることはできなかった。

体重増加および摂餌量には被験物質投与の影響は認められなかった。

雌雄ともに、250 mg/kg投与群において腎臓重量あるいはその相対重量が増加した。高用量群に認められた変化であり、予備試験においても腎臓重量の増加が雌雄に認められていたことから被験物質投与による影響であると考えられる。しかし、血液生化学検査では腎機能を示す各指標に被験物質投与の影響は認められず、病理組織

学検査においても異常は観察されなかったことからその成因は不明である。その他の器官の重量には雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学検査では、50 mg/kg以上の投与群の雄において白血球数が軽度減少し、250 mg/kg投与群では血小板数も減少した。いずれも軽微な変化であるが、用量に依存して変動していることから被験物質投与に起因した変化であると考えられる。白血球数の減少については、リンパ球以外の白血球比率はむしろ対照群より高い値を示していたことから、リンパ球数の減少に由来するものと推測される。雌動物の血液学検査には投与の影響は認められなかった。

雌の血液生化学検査において50 mg/kg以上の投与群のγ-GTP活性がやや上昇した。しかしその程度はごく軽微であり、50 mg/kgおよび250 mg/kg両群間で被験物質の用量に関連した変化が認められなかった。また、その他の肝機能を表す指標に投与の影響は認められず、肝臓重量および肝臓の病理組織学検査においても投与に起因する異常は観察されなかったことから、50 mg/kg以上の投与群において認められたγ-GTP活性の僅かな上昇は偶発的な変化であると判断された。その他の変化はいずれも被験物質の投与量とは無関係に認められた変化であることから被験物質投与による影響ではないものと考えられる。雄の血液生化学検査成績には投与の影響は認められなかった。

病理学検査ではいずれの器官にも被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

雌動物について観察した性周期には被験物質投与の影響は認められなかった。また、交配成績にも被験物質投与の影響は認められなかったことから、250 mg/kgまでの2-エチル酪酸は親動物の生殖能力に影響を及ぼさないものと考えられる。

対照群の1例が分娩中にフィブリン血栓に関連した原因により死亡した。分娩状態の異常は50 mg/kg以上の投与群にも少数例ずつ認められたが、いずれも分娩翌日以降の哺育状態には異常が認められなかったことから、対照群の死亡例とは異なる原因により分娩状態に異常をきたしたものと推測される。

250 mg/kg投与群において出産生児数が減少した。着床数には投与の影響は認められず、産児数は軽度な減少に留まっていたことから、出生時の死亡が増加したことによるものと考えられる。250 mg/kg投与では、1例ではあるが、分娩状態の異常が認められ、その例では生児出産率および出生率も著しい低値(いずれも38.5%)を示した。その他の動物の分娩状態に異常は認められなかったが、250 mg/kg投与では生児出産率および出生率が有意に低下していたことから、250 mg/kgの2-エチル酪酸投与は分娩に影響を及ぼし、産児の生存性を低下させるものと考えられる。50 mg/kg投与群においても2例に分娩の異常が観察された。2例のうち1例は生児出産率および出生率がやや低かった(いずれも68.8%)。また、50

mg/kg投与群の生児出産率および出生率は対照群との間に有意差は認められなかったが、やや低い値を示していたことから50 mg/kg投与も分娩に影響を及ぼす可能性があるものと推測される。10 mg/kg投与群では分娩および出生児の生存性のいずれにも投与の影響は認められなかった。出生児の性比および発育ならびに分娩翌日以降の生存性についてはいずれの投与群においても被験物質投与の影響は認められなかった。

2-エチル酪酸は、催奇形物質であるバルプロ酸と類似した化学構造を有する化学物質である。本試験では50 mg/kg投与群の同腹の2例に曲尾が認められた。曲尾は本系統のラットでしばしば観察される奇形であり、用量とは無関係に1腹のみに観察されたことから、本例は自然発生によるものと判断された。従って、250 mg/kgまでの投与量の2-エチル酪酸に催奇形性はないものと判断された。

3. 無作用量

以上の試験成績から、本試験条件下における2-エチル酪酸の無作用量は、雄に対する反復投与毒性に関しては、白血球数が軽度減少したことから10 mg/kg/dayと推定された。雌に対する反復投与毒性に関しては、投与後一過性の流涎が認められ、腎臓重量およびその相対重量が増加したことから50 mg/kg/dayと推定された。生殖発生毒性に関しては雄では250 mg/kg/dayと推定された。雌では50 mg/kg/day以上の投与群の少数例に分娩異常が認められたことから10 mg/kg/dayであると推定された。出生児では、250 mg/kg/day投与群において出生日における生存性が低下したことから50 mg/kg/dayであると推定された。

文献

- 1) M. G. Narotsky, E. Z. Francis, R. J. Kavlock, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **22**, 251(1994).

連絡先

試験責任者：代田真理子

試験担当者：佐藤昌子、一原佐知子

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Mariko Shirota (Study director)

Masako Sato, Sachiko Ichihara

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257-8523,

Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Organ weights of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Male				
Number of animals	13	13	13	13
Final body weight (g)	502.1 ± 47.6	509.8 ± 52.2	492.1 ± 52.0	501.7 ± 45.2
Brain (g)	2.02 ± 0.07	2.02 ± 0.08	2.01 ± 0.08	1.99 ± 0.10
(g%)	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.05	0.40 ± 0.04
Heart (g)	1.36 ± 0.13	1.38 ± 0.21	1.35 ± 0.13	1.36 ± 0.10
(g%)	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02
Thymus (mg)	270.5 ± 75.2	270.4 ± 78.9	290.1 ± 129.6	259.6 ± 98.2
(mg%)	53.3 ± 11.4	52.7 ± 12.8	58.1 ± 21.9	51.5 ± 18.5
Liver (g)	13.75 ± 2.19	13.80 ± 2.41	13.64 ± 2.58	13.89 ± 2.05
(g%)	2.73 ± 0.21	2.69 ± 0.23	2.76 ± 0.30	2.76 ± 0.20
Kidneys (g)	3.05 ± 0.42	3.13 ± 0.37	3.09 ± 0.26	3.36 ± 0.29
(g%)	0.61 ± 0.06	0.61 ± 0.03	0.63 ± 0.06	0.67 ± 0.05*
Spleen (g)	0.82 ± 0.15	0.83 ± 0.13	0.83 ± 0.14	0.77 ± 0.09
(g%)	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.02
Adrenal glands (mg)	57.1 ± 6.1	53.5 ± 10.9	58.6 ± 9.2	54.0 ± 6.3
(mg%)	11.5 ± 1.5	10.5 ± 1.6	12.0 ± 2.1	10.8 ± 1.3
Testes (g)	3.25 ± 0.33	3.26 ± 0.27	3.36 ± 0.32	3.08 ± 0.24
(g%)	0.65 ± 0.07	0.64 ± 0.07	0.69 ± 0.11	0.62 ± 0.07
Epididymides (g)	1.21 ± 0.10	1.24 ± 0.13	1.25 ± 0.10	1.18 ± 0.11
(g%)	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.24 ± 0.03
Female				
Number of animals	11	13	12	13
Final body weight (g)	307.8 ± 27.0	309.5 ± 29.4	306.6 ± 17.3	306.1 ± 20.4
Brain (g)	1.89 ± 0.10	1.91 ± 0.05	1.91 ± 0.08	1.92 ± 0.06
(g%)	0.62 ± 0.05	0.62 ± 0.06	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.04
Heart (g)	0.93 ± 0.09	0.90 ± 0.06	0.92 ± 0.09	0.93 ± 0.08
(g%)	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Thymus (mg)	169.7 ± 59.3	172.7 ± 70.8	197.4 ± 78.6	185.4 ± 81.2
(mg%)	54.8 ± 17.7	55.2 ± 19.9	64.3 ± 24.5	60.2 ± 26.0
Liver (g)	10.24 ± 1.29	9.85 ± 0.66	10.19 ± 0.78	10.25 ± 0.94
(g%)	3.32 ± 0.22	3.19 ± 0.22	3.32 ± 0.12	3.35 ± 0.24
Kidneys (g)	1.89 ± 0.16	1.94 ± 0.16	2.01 ± 0.21	2.12 ± 0.24*
(g%)	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.70 ± 0.08*
Spleen (g)	0.71 ± 0.09	0.67 ± 0.08	0.69 ± 0.07	0.68 ± 0.13
(g%)	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.04
Adrenal glands (mg)	69.3 ± 8.4	72.5 ± 10.4	67.9 ± 10.3	67.7 ± 7.9
(mg%)	22.5 ± 1.8	23.6 ± 3.8	22.2 ± 3.4	22.2 ± 2.6

Values represent mean ± S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

Table 2 Hematological examination of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Male				
Number of animals	13	13	13	13
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	850 \pm 48	825 \pm 42	850 \pm 60	828 \pm 31
Hemoglobin (g/dL)	15.2 \pm 0.7	15.0 \pm 0.5	15.1 \pm 0.9	15.0 \pm 0.6
Hematocrit (%)	44.6 \pm 1.9	44.2 \pm 1.6	44.5 \pm 2.9	44.5 \pm 1.6
MCV (fL)	52.5 \pm 1.4	53.6 \pm 1.2	52.4 \pm 1.8	53.7 \pm 1.4
MCH (pg)	17.9 \pm 0.5	18.3 \pm 0.5	17.8 \pm 0.6	18.1 \pm 0.5
MCHC (g/dL)	34.1 \pm 0.3	34.0 \pm 0.4	34.0 \pm 0.4	33.8 \pm 0.4
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	111.4 \pm 20.3	103.8 \pm 13.2	103.6 \pm 10.2	93.8 \pm 7.4**
PT (sec)	16.2 \pm 3.4	14.7 \pm 1.3	15.9 \pm 3.0	15.9 \pm 2.6
APTT (sec)	22.1 \pm 2.6	21.1 \pm 2.4	21.9 \pm 2.3	21.5 \pm 1.9
WBC ($\times 100/\text{mm}^3$)	87.8 \pm 20.2	75.1 \pm 23.5	65.0 \pm 20.1*	64.7 \pm 16.0*
Differential leukocyte counts (%)				
Neutrophil (%)	13 \pm 4	14 \pm 3	15 \pm 5	16 \pm 5
Eosinophil (%)	1 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1
Basophil (%)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte (%)	3 \pm 2	4 \pm 2	4 \pm 1	4 \pm 2
Lymphocyte (%)	82 \pm 4	79 \pm 5	79 \pm 6	78 \pm 7
Female				
Number of animals	11	13	12	13
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	646 \pm 32	633 \pm 48	650 \pm 46	657 \pm 40
Hemoglobin (g/dL)	12.7 \pm 0.7	12.5 \pm 0.7	12.7 \pm 0.7	12.9 \pm 0.6
Hematocrit (%)	37.5 \pm 2.2	36.9 \pm 2.1	37.4 \pm 2.2	38.1 \pm 1.9
MCV (fL)	58.1 \pm 1.5	58.4 \pm 2.0	57.6 \pm 1.8	58.1 \pm 3.1
MCH (pg)	19.7 \pm 0.6	19.8 \pm 0.7	19.5 \pm 0.7	19.7 \pm 1.0
MCHC (g/dL)	33.9 \pm 0.5	33.9 \pm 0.3	33.9 \pm 0.4	34.0 \pm 0.3
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	111.7 \pm 15.9	119.1 \pm 11.5	110.2 \pm 15.0	102.8 \pm 10.8
PT (sec)	13.2 \pm 0.7	13.2 \pm 0.7	12.9 \pm 0.5	13.2 \pm 0.6
APTT (sec)	17.7 \pm 2.4	16.6 \pm 1.0	16.9 \pm 0.8	16.7 \pm 0.8
WBC ($\times 100/\text{mm}^3$)	97.4 \pm 24.5	91.2 \pm 22.8	96.4 \pm 25.8	90.0 \pm 18.8
Differential leukocyte counts (%)				
Neutrophil (%)	19 \pm 5	24 \pm 9	21 \pm 5	20 \pm 6
Eosinophil (%)	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 1	1 \pm 0
Basophil (%)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte (%)	8 \pm 5	5 \pm 3	5 \pm 2	6 \pm 3
Lymphocyte (%)	72 \pm 9	70 \pm 10	72 \pm 6	73 \pm 5

Values represent mean \pm S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

**: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 3 Blood chemical examination of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Male				
Number of animals	13	13	13	13
Total protein (g/dL)	5.5 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.2 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.2
A/G	1.36 ± 0.13	1.26 ± 0.11	1.28 ± 0.15	1.34 ± 0.09
BUN (mg/dL)	16 ± 3	17 ± 3	17 ± 3	16 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	152 ± 21	144 ± 24	140 ± 15	148 ± 17
Total cholesterol (mg/dL)	44 ± 7	44 ± 7	40 ± 10	41 ± 9
Triglyceride (mg/dL)	47 ± 18	41 ± 13	35 ± 14	39 ± 18
ALP (U/L)	193 ± 42	214 ± 39	233 ± 53	225 ± 44
GPT (U/L)	30 ± 3	32 ± 4	31 ± 5	39 ± 29
GOT (U/L)	67 ± 10	66 ± 6	69 ± 10	79 ± 35
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1
Total bilirubin (mg/dL)	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02
Inorganic phosphate (mg/dL)	5.7 ± 0.7	5.8 ± 0.8	5.8 ± 0.8	6.1 ± 0.7
Ca (mg/dL)	8.9 ± 0.2	8.8 ± 0.3	8.8 ± 0.3	8.9 ± 0.2
Na (mEq/L)	145.5 ± 1.3	145.5 ± 1.1	146.3 ± 1.2	145.4 ± 1.5
K (mEq/L)	4.00 ± 0.35	3.91 ± 0.31	3.96 ± 0.25	4.10 ± 0.22
Cl (mEq/L)	109.0 ± 1.8	109.4 ± 1.5	110.0 ± 0.8	108.3 ± 1.7
Female				
Number of animals	11	13	12	13
Total protein (g/dL)	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.2	5.7 ± 0.4	5.4 ± 0.4
Albumin (g/dL)	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.1	3.3 ± 0.3	3.2 ± 0.2
A/G	1.34 ± 0.12	1.33 ± 0.12	1.38 ± 0.13	1.46 ± 0.18
BUN (mg/dL)	17 ± 3	15 ± 3	17 ± 3	18 ± 3
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	124 ± 12	128 ± 9	135 ± 13	136 ± 15
Total cholesterol (mg/dL)	49 ± 11	48 ± 14	49 ± 11	47 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	63 ± 20	64 ± 22	76 ± 28	53 ± 18
ALP (U/L)	103 ± 25	129 ± 51	128 ± 53	138 ± 57
GPT (U/L)	40 ± 6	40 ± 5	38 ± 7	41 ± 9
GOT (U/L)	62 ± 7	65 ± 10	59 ± 8	64 ± 13
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0*	1 ± 1**
Total bilirubin (mg/dL)	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.03**	0.10 ± 0.03
Inorganic phosphate (mg/dL)	6.8 ± 0.7	6.3 ± 0.5	6.6 ± 0.9	6.6 ± 1.0
Ca (mg/dL)	9.0 ± 0.5	9.2 ± 0.3	9.7 ± 0.2**	9.4 ± 0.5
Na (mEq/L)	143.2 ± 1.0	143.7 ± 1.0	142.9 ± 1.0	143.4 ± 1.0
K (mEq/L)	4.31 ± 0.55	3.98 ± 0.27	4.04 ± 0.29	3.95 ± 0.25
Cl (mEq/L)	107.6 ± 1.7	108.4 ± 1.2	107.5 ± 1.4	107.9 ± 1.6

Values represent mean ± S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 4 Histopathological findings of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Organ [Number of animals examined]	Sex:	Male				Female			
		Dose(mg/kg)	0	10	50	250	0	10	50
Testis		[13]	[13]	[13]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Atrophy, seminiferous tubule	-	10	13	13	12				
	±	3	0	0	0				
	+	0	0	0	1				
	total	3	0	0	1				
Epididymis		[13]	[13]	[13]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Cell debris, lumen	-	11	13	13	12				
	±	2	0	0	0				
	+	0	0	0	1				
	total	2	0	0	1				
Spermatid granuloma	-	11	13	11	11				
	±	0	0	2	2				
	+	1	0	0	0				
	++	1	0	0	0				
	total	2	0	2	2				
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	-	10	13	11	11				
	±	3	0	2	2				
	total	3	0	2	2				
Prostate: ventral lobe		[5]	[0]	[0]	[6]	[0]	[0]	[0]	[0]
Cellular infiltration, lymphocyte & plasma cell, interstitium/epithelium	-	2			2				
	±	2			1				
	+	0			1				
	++	1			2				
	total	3			4				
Uterus		[0]	[0]	[0]	[0]	[7]	[0]	[1]	[5]
Dilatation, cystic, lumen, focal	-					6		1	5
	++					1		0	0
	total					1		0	0
Cellular infiltration, macrophage, with brown pigment, muscular layer	-					7		0	5
	++					0		1	0
	total					0		1	0
Liver		[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Fatty change, periportal	-	0		0	0	1			0
	±	4		0	5	6			5
	+	1		1	2	0			0
	++	0		1	0	0			0
	total	5		2	7	6			5
Microgranuloma	-	1		1	5	7			4
	±	4		1	0	0			1
	+	0		0	2	0			0
	total	4		1	2	0			1
Hematopoiesis, extramedullary	-	5		2	7	7			4
	±	0		0	0	0			1
	total	0		0	0	0			1
Kidney		[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Ectopic tissue, epididymis-like duct, cortex, right side	-	5		2	6	7			5
	++	0		0	1	0			0
	total	0		0	1	0			0
Eosinophilic body	-	3		1	5	7			5
	±	0		0	2	0			0
	+	1		1	0	0			0
	++	1		0	0	0			0
	total	2		1	2	0			0

-: Negative, ±: Very slight, +: Slight, ++: Moderate, +++: Severe, total: Total of positive grade
[]: Number of animals examined

Table 4 (continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex:	Dose(mg/kg)	Male				Female			
			0	10	50	250	0	10	50	250
Kidney			[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Basophilic tubule, cortex	-		2		0	4	3			3
	±		3		2	2	4			2
	+		0		0	1	0			0
	total		3		2	3	4			2
Cast, hyalin, medulla	-		5		2	6	7			5
	+		0		0	1	0			0
	total		0		0	1	0			0
Cast, hyalin, cortex	-		5		2	6	7			5
	±		0		0	1	0			0
	total		0		0	1	0			0
Cyst, cortico-medullary junction	-		4		2	7	7			5
	±		1		0	0	0			0
	total		1		0	0	0			0
Mineralization	-		4		1	7	4			3
	±		1		1	0	3			1
	+		0		0	0	0			1
	total		1		1	0	3			2
Spleen			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Hematopoiesis, extramedullary	±		1			1	0			0
	+		4			5	1			0
	++		0			0	6			5
	total		5			6	7			5
Deposit, pigment, brown	±		5			6	7			5
	total		5			6	7			5
Lung & Bronchus			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Accumulation, foam cell	-		4			4	2			3
	±		1			2	5			1
	+		0			0	0			1
	total		1			2	5			2
Heart			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Degeneration/fibrosis, myocardium	-		4			5	7			5
	±		1			1	0			0
	total		1			1	0			0
Thymus			[5]	[0]	[0]	[8]	[8]	[1]	[1]	[5]
Atrophy	-		5			8	8	1	0	4
	±		0			0	0	0	0	1
	++		0			0	0	0	1	0
	total		0			0	0	0	1	1
Urinary bladder			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria	-		5			6	7			4
	±		0			0	0			1
	total		0			0	0			1
Thyroid gland			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Cellular infiltration, plasma cell & lymphocyte, interstitium	-		5			6	6			5
	±		0			0	1			0
	total		0			0	1			0
Ectopic thymus	-		5			5	7			5
	±		0			1	0			0
	total		0			1	0			0
Subcutaneous tissue of axilla			[0]	[0]	[0]	[0]	[1]	[0]	[0]	[0]
Cellular infiltration, lymphocyte & macrophage, mammary gland	±						1			
	total						1			
Cell debris, lactiferous duct, mammary gland	+						1			
	total						1			

-: Negative, ±: Very slight, +: Slight, ++: Moderate, +++: Severe, total: Total of positive grade
 []: Number of animals examined

Table 5 Estrous cycle and reproductive performance of rats in combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose(mg/kg)	0	10	50	250
Estrous cycle				
Number of females examined	13	13	13	13
Pre-treatment period				
Number of females showing 4-day cycle	13	13	13	13
Treatment period				
Number of animals showing:				
4-day cycle	12	13	13	12
4- and 5- day cycle	0	0	0	1
Irregular cycle	1	0	0	0
Mean length of estrous cycle in days				
Mean \pm S.D.	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.1
Number of vaginal estrus during mating period				
Mean \pm S.D.	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
Reproductive performance				
Number of pairs examined (A)	13	13	13	13
Number of pairs copulated (B)	13	13	13	13
Copulation index [(B/A) \times 100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile pairs (C)	12	13	12	13
Fertility index [(C/B) \times 100, %]	92.3	100.0	92.3	100.0
Pairing days until copulation				
Mean \pm S.D.	2.6 \pm 1.7	2.0 \pm 1.1	2.8 \pm 1.2	2.3 \pm 1.3

Table 6 Development of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0		10		50		250	
Number of pregnant females	12		13		12		13	
Number of pregnant females with live newborns	11		13		12		13	
Gestation index	91.7		100.0		100.0		100.0	
Gestation length in days	22.5 ± 0.5	(11)	22.3 ± 0.5	(13)	22.4 ± 0.5	(12)	22.6 ± 0.5	(13)
Number of corpora lutea	16.1 ± 1.4	(12)	16.0 ± 1.9	(13)	16.2 ± 2.4	(12)	15.8 ± 1.8	(13)
Number of implantations	15.2 ± 1.9	(12)	15.4 ± 1.5	(13)	15.2 ± 2.5	(12)	15.1 ± 1.6	(13)
Implantation index	94.4 ± 9.2	(12)	96.4 ± 4.6	(13)	93.7 ± 6.7	(12)	95.8 ± 4.4	(13)
Day 0 of lactation								
Number of newborns	14.4 ± 2.2	(11)	14.5 ± 1.8	(13)	14.3 ± 3.2	(12)	13.5 ± 2.0	(13)
Delivery index	95.0 ± 6.2	(11)	94.4 ± 5.3	(13)	93.1 ± 9.8	(12)	89.3 ± 9.7	(13)
Number of live newborns	14.4 ± 2.2	(11)	14.4 ± 1.6	(13)	13.4 ± 3.1	(12)	11.5 ± 3.1*	(13)
Birth index	95.0 ± 6.2	(11)	93.5 ± 4.7	(13)	87.9 ± 11.2	(12)	76.0 ± 16.8**	(13)
Live birth index	100.0 ± 0.0	(11)	99.1 ± 2.3	(13)	94.8 ± 10.1	(12)	86.4 ± 21.1**	(13)
Sex ratio on day 0	1.49 ± 1.08	(11)	0.95 ± 0.56	(13)	1.27 ± 0.55	(12)	1.18 ± 1.05	(13)
Day 4 of lactation								
Number of live pups	14.1 ± 2.0	(11)	14.3 ± 1.7	(13)	13.4 ± 3.1	(12)	11.5 ± 3.0*	(13)
Viability index	98.3 ± 4.0	(11)	99.5 ± 2.0	(13)	100.0 ± 0.0	(12)	99.4 ± 2.1	(13)
Sex ratio on day 4	1.45 ± 1.07	(11)	0.96 ± 0.56	(13)	1.27 ± 0.55	(12)	1.18 ± 1.05	(13)
Body weights of pups (g)								
Day 0								
Male	6.8 ± 0.7	(11)	6.8 ± 0.4	(13)	6.8 ± 1.0	(12)	7.0 ± 0.9	(13)
Female	6.4 ± 0.6	(11)	6.5 ± 0.4	(13)	6.4 ± 0.8	(12)	6.6 ± 0.8	(13)
Day 4								
Male	10.6 ± 1.2	(11)	10.6 ± 0.9	(13)	11.4 ± 2.5	(12)	11.8 ± 2.0	(13)
Female	10.1 ± 1.2	(11)	10.2 ± 0.9	(13)	10.9 ± 1.9	(12)	11.2 ± 2.1	(13)

Values represent mean ± S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

** : Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Gestation index = (number of pregnant females with live newborns / number of pregnant females) × 100, %

Implantation index = (number of implantations / number of corpora lutea) × 100, %

Delivery index = (number of newborns / number of implantations) × 100, %

Birth index = (number of live newborns / number of implantations) × 100, %

Live birth index = (number of live newborns / number of newborns) × 100, %

Sex ratio on day 0 = number of male live newborns / number of female live newborns

Viability index = (number of live pups on day 4 of lactation / number of live newborns) × 100, %

Sex ratio on day 4 = number of male live pups on day 4 of lactation / number of female live pups on day 4 of lactation