

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether
[Continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Number of cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse				oth
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	24	100.0	200	0	2	1	0	0	0	3 (1.5)	200	2 (1.0)
	393	24	93.8	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	785	24	95.8	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	1570	24	91.6	200	2	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
MMC b)	0.05	24	86.3	200	9	12	38	0	2	0	49 (24.5) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

b): Positive control(Mitomycin C)

Appendix 1. Chromosome aberration test of 2-ethylhexyl vinyl ether
 [Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)		
					gap	ctb	cte	csb	cse					oth	
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	6	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
		6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
	393	6	94.3	100	1	0	2	0	0	0	1.0	2.0	100	0.0	
		6	85.4	100	2	1	1	0	0	0	1.0	2.0	100	0.0	
	785	6	93.2	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	1.0	
		6	98.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
	1570	6	84.3	100	3	0	0	0	0	0	3.0	0.0	100	1.0	
		6	87.0	100	2	0	0	0	0	0	2.0	0.0	100	0.0	
	MMC b)	0.1	6	75.6	100	7	17	30	0	0	0	3.0	39.0	100	1.0
			6	81.6	100	9	16	37	0	0	0	2.0	45.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap
 a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
 b): Positive control (Mitomycin C)

Appendix 2. Chromosome aberration test of 2-ethylhexyl vinyl ether
 [Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)		
					gap	ctb	cte	csb	cse					oth	
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0	
		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
	393	6	86.4	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
		6	87.6	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0	
	785	6	86.9	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	2.0	
		6	91.8	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
	1570	6	93.8	100	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0	
		6	86.2	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0	
	CP b)	12.5	6	86.1	100	4	4	23	0	0	0	1.0	27.0	100	1.0
			6	91.8	100	1	4	20	0	0	0	1.0	21.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap
 a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)
 b): Positive control (Cyclophosphamide)

Appendix 3. Chromosome aberration test of 2-ethylhexyl vinyl ether
 [Continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	24	100.0	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	2.0	
		24	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
	393	24	93.8	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0	
		24	93.8	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
	785	24	97.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
		24	94.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
	1570	24	91.3	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
		24	91.9	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
	MMC b)	0.05	24	83.9	100	6	8	20	0	1	0	2.0	27.0	100	0.0
			24	88.6	100	3	4	18	0	1	0	3.0	22.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap
 a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
 b): Positive control (Mitomycin C)

B-5804

3. 試験実施概要

3.1 試験計画書

試験番号 : B-5804
試験表題 : 2-エチルヘキシルビニルエーテルのラットを用いた
2週間回復性観察を含む28日間経口投与毒性試験

3.2 試験目的

被験物質をラットに28日間経口投与し、その影響を明らかにするとともに、その後2週間の回復期間を設けて障害の可逆性を調べることを目的とした。なお、本試験は株式会社ボゾリサーチセンター動物実験委員会の承認を受けている。

3.3 試験委託者

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.4 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

3.5 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

4. 要約

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD (SD)] を用いて、2-エチルヘキシルビニルエーテルの反復投与による毒性並びにその回復性を検討した。投与量は 0 (オリーブ油：対照群)、8、30 及び 125 mg/kg/day とし、28 日間反復強制経口投与した。1 群の動物数は対照群及び 125 mg/kg 投与群で雌雄各 12 匹、8 及び 30mg/kg 投与群で雌雄各 6 匹とした。このうち、対照群及び 125 mg/kg 投与群の雌雄各 6 例については、28 日間投与後 2 週間休薬させた。

1) 一般状態の観察、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定、体重並びに摂餌量測定

投与及び回復期間を通じ、いずれの検査項目にも、被験物質投与の影響は認められなかった。

2) 尿検査 (摂水量測定含む)

尿 pH の低値傾向が 125mg/kg 投与群の雌雄に、潜血陽性例の増加傾向が 125mg/kg 投与群の雄に認められた。これらの変化は休薬によりいずれも消失し、回復性が認められた。

3) 血液学検査

いずれの検査項目にも、被験物質投与の影響は認められなかった。

4) 血液化学検査

ALP の高値が 30mg/kg 投与群の雄及び 125 mg/kg 投与群の雌雄に、総コレステロール及びリン脂質の高値が 125mg/kg 投与群の雌雄に認められた。これらの変化は休薬によりいずれも消失し、回復性が認められた。

5) 病理学検査

肝臓では、相対重量の高値と組織学検査で小葉中心性肝細胞肥大が 30mg/kg 投与群の雄及び 125mg/kg 投与群の雌雄に、単細胞壊死が 125mg/kg 投与群の雌雄に認められた。また、腎臓では、相対重量の高値と組織学検査で尿細管上皮細胞の好酸性小体の発現頻度の増加が 125mg/kg 投与群の雄に認められた。更に、精巣では、相対重量の高値が 125mg/kg 投与群に認められた。これらの変化は、精巣重量の高値を除く、いずれの変化も休薬により消失あるいは軽減し、回復性が認められた。

以上の結果から、2-エチルヘキシルビニルエーテルの本試験条件下における無影響量は雄で 8mg/kg/day、雌で 30mg/kg/day と推定された。なお、精巣重量の高値を除く他の変化については、いずれも休薬により回復性が認められた。

5. 緒言

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、2-エチルヘキシルビニルエーテルをラットに 28 日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、2 週間休薬し、障害の回復性を調べたのでその成績を報告する。なお、本試験は、以下の基準を遵守及びガイドラインに準拠して実施した。

1) GLP

- ・ 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」
(平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 17 年 4 月 1 日 最終改正)

2) 毒性試験ガイドライン

- ・ 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
(平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成 17 年 4 月 1 日 最終改正)
- ・ 「OECD Guideline for Testing of Chemicals 407」
(OECD 理事会：1995 年 7 月 27 日)

3) 動物の福祉

- ・ 「動物の愛護及び管理に関する法律」
(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 17 年 6 月 22 日最終改正)
- ・ 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」
(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第八十八号)
- ・ 「動物実験に関する指針」
((社) 日本実験動物学会、昭和 62 年 5 月 22 日)

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質2-エチルヘキシルビニルエーテルは日本カーバイド工業株式会社より提供された。当試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、試験成績を添付資料1に記載した。

名称	:	2-エチルヘキシルビニルエーテル 2-Ethylhexyl vinyl ether
CAS 番号	:	103-44-6
構造式又は示性式	:	$\text{CH}_2=\text{CHO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$
ロット番号	:	06F002
純度	:	99.9%
入手量	:	500g
性状	:	無色透明液体
沸点	:	177°C
分子量	:	156.27
比重	:	0.81
溶解度	:	難溶（水）
安定性	:	動物試験終了後に日本カーバイド工業株式会社に返却し安定性の結果を添付資料2に記載した。
保存方法	:	室温暗所(安定剤 KOH 5ppm 含有)(実測値:17~27°C)
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用する。 取扱い場所及び周囲の火気を厳禁し、高温物及び強酸化剤との接触を避ける。
返却	:	被験物質 5g を保存試料として保存する。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、残量は提供者に返却し安定性を確認した ^{注)} 。

注) : 試験計画書では被験物質の残量は廃棄することになっていたが、すべての被験物質(分析用に小分けした被験物質を除く)の残量を提供者に返却した。

6.1.2 媒体

名称	:	オリブ油
ロット番号	:	6203
メーカー	:	丸石製薬株式会社
保存方法	:	室温

保存場所 : 御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室

6.2 投与液の調製

6.2.1 被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確にビーカーに採取し、オリーブ油を加え希釈させメスシリンダーで規定量にメスアップした。希釈液は週1回以上の頻度で調製し、調製後8日以内に使用した（ただし、8日間の安定性が確認されるまでは用時調製とした）。

6.2.2 投与液の保存方法

投与液（対照群投与液を含む）は1日の必要分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、使用時まで冷蔵庫内に保存した（実測温度：4～6℃）。

6.2.3 媒体中での安定性

1及び200 mg/mL 溶液（媒体：オリーブ油）は、褐色ガラス瓶に入れ冷蔵庫内8日間保存後、室温24時間保存する時安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認されている（試験番号：A-1906、添付資料3）。

6.2.4 調製物の濃度確認

投与第1週と第4週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所でGC法を用いて確認した。その結果、表示値に対する濃度の割合は97.6～102.3%（許容範囲：表示値±10%）であり、許容範囲内であった（添付資料4-1、4-2）。分析法の概略を次に示す。

1濃度当たりの採取本数（採取量）

: 1本（10mL）

測定対象物質 : 2-エチルヘキシルビニルエーテル

測定対象標準物質

名称 : 2-エチルヘキシルビニルエーテル

ロット番号 : 06F002

保存方法 : 室温暗所（実測値：18～23℃）

使用機器 : GCシステム；Agilent Technologies Inc.

GC（HP6890N）

インジェクタ（G2613A）

オートサンプラトレイ（G2614A）

データ処理ソフト（GC ChemStation G2070AJ）

GC 測定条件

カラム	:	HP-1 (0.53 mm I.D.×15 m、膜厚 1.5 μm、Agilent Technologies Inc.)
キャリアガス	:	He
流量モード	:	コンスタントフローモード
キャリアガス流量	:	4.5 mL/min
注入口	:	スプリットレス注入口
注入口温度	:	200°C
検出器	:	Flame Ionization Detector (FID)
検出器温度	:	300°C
H ₂ 流量	:	40 mL/min
Air 流量	:	450 mL/min
オープン温度	:	100°C から 200°C の昇温プログラム (10°C/min)
試料注入量	:	1 μL

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用される系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD (SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 52 匹^註を 5 週齢で入手し、当所で 8 日間検疫・馴化飼育した後、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (3 回) 及び詳細な一般状態 (1 回) を行い、体重増加が順調で一般状態等に異常のみられない健康と思われる動物雌雄各 36 匹 (主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹) を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 192~220 g、雌で 151~176 g であり、投与開始時の予定体重範囲 (雄: 100~190g、雌: 90~180g) を雄で上回ったが各群の平均体重とばらつきに差はなく試験成績には影響がないと判断した。

動物は、検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日 (投与開始の 2 日前) の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てる) により行った。また、余剰動物は投与開始時点で試験系から除外した。

^註: 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 50 匹であったが、実際には雌雄各 52 匹が納入された。