

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-naphthylisobutyl ether
[Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 9890(115-209)

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Number of cell growth cells (%)	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			
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
2-Naphthylisobutyl ether	76.8	6	77.2	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	96.0	6	53.5	200	0	2	1	0	0	0	3 (1.5)	200	0 (0.0)
	120	6	24.1	200	0	2	4	0	0	0	5 (2.5)	200	1 (0.5)
	150	6	11.0	NA									
MMC b)	0.1	6	85.6	200	2	30	69	0	1	0	88 (44.0)	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

NA: Not analyzed

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

b): Positive control: Mitomycin C

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-naphthylisobutyl ether
[Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9890(115-209)

Compound	Dose (µg/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			
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
2-Naphthylisobutyl ether	16.1	6	64.3	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	20.1	6	56.2	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	25.2	6	40.2	200	0	1	2	0	0	0	3 (1.5)	200	2 (1.0)
	31.5	6	14.6	NA									
CP b)	12.5	6	88.0	200	3	8	28	0	0	0	34 (17.0)	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

NA: Not analyzed

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Cyclophosphamide

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

Exp. No. 9890(115-209)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative Number of cell growth cells (%)	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			
DMSO a)	0	24	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
2-Naphthylisobutyl ether	61.4	24	72.5	200	0	2	0	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	76.8	24	83.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	96.0	24	66.5	200	1	2	0	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	120	24	40.3	182	2	3	1	0	0	0	4 (2.2)	200	0 (0.0)
	150	24	26.3	Toxic									
MMC b)	0.05	24	123.1	200	5	33	68	0	0	0	84 (42.0)	200	1 (0.5)

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

要 約

2-ナフチルイソブチルエーテルの毒性学的性質を評価するため、当該物質の0（溶媒のコーンオイルのみ投与）、20、100 および 500 mg/kg/day を CrI:CD(SD)系ラットの雌雄各5例に28日間反復経口投与した。また、0 mg/kg（対照群）および500 mg/kg 群には、雌雄各5例の回復群を設け、28日間の反復投与終了後、14日間の休薬による毒性の回復性についても検討した。

試験期間を通じて、一般状態の観察、機能観察総合検査（FOB）、体重および摂餌量の測定を行い、投与期間および回復期間終了時に、臨床検査（血液学検査、血液凝固能検査、血液生化学検査、血清蛋白電気泳動検査および尿検査）および病理学検査（器官重量測定、肉眼観察および病理組織学検査）を実施した。

その結果の要約は、次の通りである。

500 mg/kg 群の雌で Day 6 および 7 の投与前に各1例が死亡した。

投与後の一般状態の変化として、500 mg/kg 群の雌雄で流涎、軟便、粘液便および水様下痢が観察された。

体重では、500 mg/kg 群の雌雄で体重増加抑制が認められ、雄では回復期間終了時にも低体重が認められたものの、休薬による回復傾向が認められた。

摂餌量では、500 mg/kg 群の雌雄で投与期間中に減少が認められた。

機能観察総合検査（FOB）では、投与期間中に500 mg/kg 群の雄で自発運動量の減少および反応性の低下が認められた。

尿検査では、投与期間終了時に500 mg/kg 群の雌雄で尿量の増加および尿浸透圧の低下、同群の雄でナトリウムおよびカリウム排泄量の減少、尿 pH の中性化が認められた。

血液学検査では、投与期間終了時に500 mg/kg 群の雌で貧血が認められた。

血液生化学検査では、投与期間終了時に500 mg/kg 群の雌で総蛋白が低下、中性脂肪およびALPが上昇し、回復期間終了時に500 mg/kg 群の雄で総蛋白が低下、雌で中性脂肪および総コレステロールが上昇を示し、蛋白・脂質代謝系への影響が示唆された。また、500 mg/kg 群の雄で投与期間終了時および回復期間終了時に血糖が低下した。

病理学検査では、主に脾臓、前胃、盲腸、結腸、肝臓および副腎に対する影響が認められた。500 mg/kg 群の雌雄あるいは雌雄のいずれかで、脾臓の鬱血および色素沈着、前胃の扁平上皮過形成、出血、繊維化、浮腫および潰瘍、盲腸の粘膜上皮細胞の好塩基化および核分裂像増加、結腸の粘膜上皮細胞の好塩基化および核分裂像増加、肝臓の肝細胞好酸性化および小葉中心帯肝細胞肥大、副腎の血管拡張、空胞変性、壊死、マクロファージ集簇および皮質肥大が観察された。なお、結腸の粘膜上皮細胞の核分裂像増加

は、100 mg/kg 群の雄でも観察された。消化管および肝臓での変化は、休薬による回復性が認められた。脾臓および副腎での変化については、休薬による回復傾向は認められたものの、変化は継続していた。

以上のことから、当該試験条件下において、2-ナフチルイソブチルエーテルの反復投与に起因する変化が、雄では100 mg/kg/day 以上の投与で、雌では500 mg/kg/day の投与で認められたことから、無毒性量は、雄では20 mg/kg/day、雌では100 mg/kg/day と判断された。また、14 日間の回復期間後、雄の体重および病理学検査における雌雄の脾臓および副腎に投与の影響は残ったものの、概ね回復傾向を示した。

1. 表題

2-ナフチルイソブチルエーテルのラットにおける 28 日間反復投与毒性試験

2. 試験目的

既存化学物質の毒性学的性質を評価する一環として、ラットを用いる反復経口投与毒性試験を行い、一般毒性学的影響を検討する。また、2 週間の休薬期間を設け、一般毒性学的影響に対する回復性を検討する。

3. 準拠したガイドラインと遵守した GLP および動物実験関連規則

毒性試験ガイドライン

OECD テストガイドライン 407 (1995 年 7 月 27 日)

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)

- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

動物実験関連規則

動物の飼育および動物の取り扱いについては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、
「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」および「財団法人 食品農
医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針」を遵守し、動物を適正に使用し
た。

4. 試験番号

9933 (115-212)

5. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 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)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1293

6. 試験委託者

〒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

Tel: 03-3253-1111 Fax: 03-3593-8913

11. 試験日程

試験開始日 :	平成 18 年 7 月 6 日
投与液の安定性分析	
調製直後 :	平成 18 年 7 月 10 日
保存 10 日後 :	平成 18 年 7 月 20 日
動物搬入日 :	平成 18 年 7 月 19 日
群分け日 :	平成 18 年 7 月 26 日
投与開始日 (実験開始日) :	平成 18 年 7 月 26 日
解剖日 (毒性試験群) :	平成 18 年 8 月 23 日
回復性試験終了日 (解剖日) :	平成 18 年 9 月 6 日
被験物質の安定性分析 :	平成 18 年 9 月 13 日
実験終了日 :	平成 19 年 1 月 26 日
試験終了日 :	平成 19 年 11 月 12 日

12. 試験材料および方法

12.1. 被験物質

被験物質として使用した 2-ナフチルイソブチルエーテル (CAS No. 2173-57-1, Lot No. GI01, 純度 99.1%, 分子量 200.28, 東京化成工業) は, 白色の結晶塊であり, 安評センター 7 号館 2 階被験物質調製室 B 内プレハブ低温庫 ch. 72 に保存した. 被験物質の受領日から最終使用日までの保管庫温度実測値は 3.0~7.9°C であった. 受領時の被験物質の品質について, 分析結果を Reference data 1 に示した. 試験期間中の被験物質の安定性を確認するため, 投与期間終了後に被験物質の純度分析を実施した. その結果, 純度は 99.6% であり, 安定性評価の判定基準 (純度 98% 以上) を満たしていた. したがって, 試験期間中の被験物質が安定であることが確認された (Reference data 2).

被験物質を約 40°C に温めたコーンオイル (Lot No. V5R8265, V6A8960, V6F9868, ナカライテスク) に溶解し, 2, 10 および 50 mg/mL の投与液を調製した.

投与液の濃度および均一性分析は, 初回調製時に調製した全ての試験群の投与液について行った. その結果, 設定濃度 (2, 10 および 50 mg/mL) に対する割合が, それぞれ 103.4, 102.1 および 103.1%, 相対標準偏差がそれぞれ 0.5, 0.4 および 0.4% であり, 濃度/均一性評価の判定基準 (濃度平均値 : 設定濃度の 90~110% 以内, 相対標準偏差 : 10% 以下) を満たしていた (Reference data 3). したがって, 投与液は適切に調製されていることが確認された.

また、2 および 50 mg/mL 濃度の投与液を遮光条件下で 10 日間室温放置した後、濃度分析を行った。その結果、調製直後の被験物質濃度の平均値に対する割合が、投与液の安定性の判定基準（90%以上）を満たしていたことから、安定であることが確認された（Reference data 3）。したがって、投与液は、投与まで遮光・室温条件下で保存（保存場所：被験物質調製室 A 内室温保管庫 ch. 67）し、調製後 10 日以内に使用した。

被験物質は、投与終了後に 2 g を安評センターに保存し、残りは廃棄された。

12.2. 使用動物および飼育条件

日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センターから生後 4 週齢の Crl:CD(SD)系 SPF ラット雌雄各 36 匹を購入し、試験に雌雄各 30 匹を使用した。

購入した動物は 7 日間検疫・馴化飼育した。検疫・馴化期間中の体重推移および一般状態に異常は認められなかった。

動物は、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ （実測値： $22.4\sim 23.3^{\circ}\text{C}$ ）、湿度 $55\pm 20\%$ （実測値： $52\sim 70\%$ ）、換気回数 10 回以上/h、空気差圧外気+2 mmH₂O以上、照明時間 12 時間（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）に設定されたバリアシステムの 101 号飼育室（W 8.0 × D 8.0 × H 2.5 m, 160.0 m³）で飼育した。株式会社 東京技研サービスの自動水洗式飼育機を使用し、アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W 15.8 × D 25.0 × H 16.0 cm, 6,320.0 cm³）に動物を 1 匹ずつ収容し飼育した。飼育ケージは隔週 1 回、給餌器は週 1 回交換した。

飼料は、放射線滅菌固型飼料（CRF-1, Lot No. 051202, オリエンタル酵母工業）を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水（磐田市上水）を給水ノズルより自由に摂取させた。供給した飼料および水に、試験に支障を来す可能性のある汚染物質の混在はなかった。

したがって、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。

12.3. 群分け

群分けは、雌雄ともに検疫・馴化期間終了後の投与開始日に行った。

群分け日の動物の体重は、平均体重の 20%以内に収まっており、群分け終了時の体重は、雄で 134～153 g、雌で 110～122 g の範囲にあった。投与開始日の体重を基に、無作為抽出法により対照群および高用量群に各 10 匹（その内の各 5 匹は回復性試験用動物）、低および中用量群に各 5 匹を振り分けた。

余剰動物は、群分け後に炭酸ガス吸入により安楽死させた。

12.4. 個体識別

動物の個体識別は、機能観察総合検査（Functional Observational Battery : FOB）を盲検法で実施するため、動物入荷時に雌雄別に通し番号を割り付け、検疫・馴化期間中に動

物の耳介にその通し番号（仮動物番号）を入れ墨した。群分け時に仮動物番号カードと群分け後の動物識別番号カード（ID カード）を用意し、群分け終了時に動物識別番号カードを表にし、対となる仮動物番号カードと重ね、個別飼育ケージに付けて動物を識別した。機能観察総合検査以外の観察、測定および検査は動物識別番号に基づき実施した。

12.5. 投与量, 群構成, 投与期間および投与方法

投与用量は、本被験物質の毒性に関する情報として、Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)にラットに対する経口投与でのLD₅₀が 5,930 mg/kgと記載（RTECS番号：KO1255000）されていることから、当該試験に先立って0, 30, 100, 300 および1,000 mg/kg/dayの用量で、2週間投与予備試験（試験番号9960）を実施し、その結果を参考に設定した。予備試験では、1,000 mg/kg群の雄で4/5例、雌で5例（全例）が投与後4から7日の間に死亡した。投与後の症状として、雄の100 mg/kg以上および雌の300 mg/kg以上の投与群で軟便、雌雄の1,000 mg/kg群で下痢、雌雄の300 mg/kg以上の投与群で流涎が認められ、雄の300 mg/kg群で体重増加抑制傾向が認められた。血液生化学検査では、雄の300 mg/kg群で血糖の低値およびカリウムの高値、雌の300 mg/kg群でASTの低値およびγ-GTPの高値が認められた。病理学検査では、雌の300 mg/kg群で肝臓および腎臓の相対重量が高値を示したが、剖検所見としては、被験物質投与に関連する異常所見は認められなかった。以上の結果から、当該試験では、明らかに毒性影響が発現すると考えられる500 mg/kg/dayを最高用量に設定し、以下公比5で除し、100および20 mg/kg/dayを設けた。

投与経路は、OECD ガイドライン407で指示されている投与経路に準じて強制経口投与とした。

投与容量は、体重100 g当たり1 mLとし、個体別に測定した最新体重に基づいて算出した。投与液は、胃ゾンデを用いて、1日1回、午前8時30分～11時34分に強制経口投与した。対照群には媒体（コーンオイル）のみを投与した。

投与期間は、雌雄ともに28日間とした。回復性試験用動物の投与期間は、連続28日間とし、その後の休薬期間は14日間とした。

13. 観察および検査方法

下記の項目について観察および検査を行った。投与開始日をDay 1、Day 1～7を投与1週とした。また、Day 29以降を回復期間とし、Day 29～36を回復1週とした。

13.1. 一般状態の観察

全動物について、毎日、投与前、投与30～60分後および3～4時間後を含む3回以上（剖検日は動物搬出前に1回）観察し、観察所見を記録するとともに生死の確認を行っ