

# 最終報告書

MutaMouse を用いる 2,3-ペンタンジオンの遺伝子突然変異試験  
【GLP 非適用】

試験番号: [REDACTED]

[REDACTED]

試験委託者  
国立医薬品食品衛生研究所



試験責任者の署名および日付

表 題： MutaMouse を用いる 2,3-ペンタンジオンの遺伝子突然変異試験

試験番号：

試験責任者：

目 次

要 約.....	5
1. 表題.....	6
2. 試験目的.....	6
3. 参照したガイドライン.....	6
4. 遵守した動物実験関連規則および遺伝子組換え生物等関連規則.....	6
5. 試験番号.....	6
6. 試験施設.....	6
7. 試験委託者.....	7
8. 試験責任者.....	7
9. 被験物質等管理責任者.....	7
10. 分担責任者.....	7
11. 試験日程.....	7
12. 被験物質.....	8
13. 対照物質.....	9
14. 試験材料および方法.....	10
15. 試験成立条件.....	22
16. 試験結果.....	22
17. 考察および結論.....	23
18. 試験関係資料の保管.....	23

Tables

Table 1	Induction of mutation in liver of transgenic mice treated with 2,3-pentanedione [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)] .....	24
Table 2	Induction of mutation in glandular stomach of transgenic mice treated with 2,3-pentanedione [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)] .....	25

Appendices

Appendix 1	Body weight in the gene mutation assay of 2,3-pentanedione [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	26
------------	--	----

Appendix 2	Clinical observations in the gene mutation assay of 2,3-pentanedione [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	28
Appendix 3	Gross findings in the gene mutation assay of 2,3-pentanedione [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	35
Appendix 4	Historical control data (Transgenic rodent gene mutation assay ( <i>LacZ</i> assay)) .....	38
Reference data		
Reference data 1	被験物質液の安定性結果.....	40

## 要 約

2,3-ペンタンジオンの変異原性について、トランスジェニックマウス (MutaMouse) を用いて肝臓および腺胃における遺伝子突然変異誘発性 (レポーター遺伝子: *lacZ*) を検討した。

用量設定試験の結果を基に最大耐量付近と考えられる 500 mg/kg/day を最高用量とし、以下、250, 125 および 62.5 mg/kg/day の用量で各群雄 6 匹に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。500 mg/kg/day 群の Day 8 および 15 において体重の減少傾向が認められた。また、500 mg/kg/day 群で投与 17 日目の投与後に 1 例の死亡が認められた。最終投与後 3 日に生存動物全例から肝臓および腺胃を摘出した。すべての投与群において、評価数 5 匹を確保することができたため、500, 250 および 125 mg/kg/day の 3 用量の肝臓および腺胃について、*lacZ* assay により遺伝子突然変異体頻度を算出した。

その結果、2,3-ペンタンジオン投与群の肝臓および腺胃のいずれにおいても陰性対照群と比較して遺伝子突然変異体頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。

陽性対照の *N*-エチル-*N*-ニトロソウレア (ENU, 投与量 100 mg/kg/day, 腹腔内投与, 1 日 1 回 2 日間) 投与群では、肝臓および腺胃ともに陰性対照群と比較して統計学的に有意な遺伝子突然変異体頻度の増加が認められたことから、当該試験は適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、当該試験条件下において、2,3-ペンタンジオンはトランスジェニックマウスの肝臓および腺胃に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの (陰性) と判定された。

1. 表題

MutaMouse を用いる 2,3-ペンタンジオンの遺伝子突然変異試験

2. 試験目的

被験物質による標的器官での遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検討する (レポーター遺伝子: *lacZ*) .

3. 参照したガイドライン

- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 488 (26 July 2013: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)

4. 遵守した動物実験関連規則および遺伝子組換え生物等関連規則

- 「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, 最終改正: 平成 26 年 5 月 30 日法律第 46 号)
- 「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 88 号, 最終改正: 平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号)
- 「動物実験に関する指針」([REDACTED], 2018 年 6 月 14 日)
- 「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号, 最終改正: 平成 29 年 5 月 31 日法律第 41 号)

当該試験は [REDACTED] の動物実験委員会により試験開始前に審査, 承認されており (動物実験委員会承認番号 19-0227A, 遺伝子組換え実験承認受付番号 19-8), 遺伝子組換え生物等は適正に使用した.

5. 試験番号

[REDACTED]

6. 試験施設

[REDACTED]  
[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]  
[REDACTED]

7. 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

8. 試験責任者

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

9. 被験物質等管理責任者

[REDACTED]

10. 分担責任者

検疫： [REDACTED]  
飼育管理： [REDACTED]  
遺伝子突然変異試験： [REDACTED]  
投与液等調製： [REDACTED]  
病理学的検査： [REDACTED]

11. 試験日程

試験開始日：  
動物搬入日 (Day -8)：  
投与液調製日：  
  
群分け日 (Day 1)：  
《陰性対照群, 被験物質群》  
投与開始日 (Day 1, 実験開始日)：  
投与終了日 (Day 28)：  
標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 31)：

[REDACTED]

《陽性対照群》

投与日 (Day 9, Day 10) :  
標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 20) :  
実験終了日 :  
試験終了日 :



【Day の定義】

被験物質の投与開始日を Day 1 と定義し、その前日を Day -1 とした。

12. 被験物質

12.1. 名称

和名 : 2,3-ペンタンジオン  
英名 : 2,3-pentanedione

12.2. 別名 (化学名, 一般名等)

Acetylpropionyl

12.3. 提供元



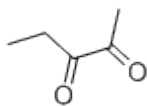
12.4. ロット番号



12.5. CAS No.

600-14-6

12.6. 構造式



12.7. 分子式

C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>

12.8. 分子量

100.12

12.9. 純度

98.5%

- 12.10. 比重  
0.955 (25°C)
  - 12.11. 沸点  
110-112°C
  - 12.12. 蒸気圧  
20.000 mm/Hg at 20°C
  - 12.13. 物質の状態
    - 12.13.1. 外観  
黄色から黄緑色の透明な液体
    - 12.13.2. 臭い  
Creamy, sweet, buttery, brown roasted, with a Fruity nuance
  - 12.14. 溶解性  
コーン油に溶解
  - 12.15. 保管条件  
冷所, 密閉, 遮光
  - 12.16. 取り扱い上の注意  
火気厳禁  
マスク, 手袋を着用
  - 12.17. 残余被験物質の処理  
実験終了後, 被験物質等管理責任者へ返却した.
- 13. 対照物質
    - 13.1. 陰性対照物質  
被験物質液調製に媒体として使用するコーン油を陰性対照物質に選択した.
      - 13.1.1. 物質名  
コーン油
      - 13.1.2. 製造元  
富士フイルム和光純薬株式会社
      - 13.1.3. 保管条件  
室温

13.2. 陽性対照物質

ガイドラインで推奨されている、下記の物質を陽性対照物質に選択した。

13.2.1. 物質名

*N*-エチル-*N*-ニトロソウレア (ENU)

13.2.2. 製造元

Toronto Research Chemicals Inc.

13.2.3. 保管条件

冷凍 (-30~-5°C)

14. 試験材料および方法

本試験では、使用する動物がトランスジェニックマウスであることから、PIA レベルの拡散防止処置をとった。

14.1. 試験動物

14.1.1. 種

マウス (トランスジェニックマウス)

14.1.2. 系統 [グレード]

CD<sub>2</sub>-LacZ80/HazfBR (MutaMouse) [SPF]

14.1.3. 購入先

株式会社トランスジェニック

14.1.4. 試験系の選択理由

遺伝子導入マウスとして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トランスジェニックマウスを選択した。

14.1.5. 週齢

8 週齢の動物を購入し、被験物質の投与は 9 週齢に開始した。

14.1.6. 購入動物数

雄 40 匹

14.1.7. 使用動物数

雄 36 匹

## 14.2. 飼育管理

### 14.2.1. 飼育環境

バリアシステムの [REDACTED] (W 4.8 × D 10.3 × H 2.6 m) で動物を飼育した。環境調節の基準値は、次のとおりとした。なお、飼育期間中、出入り口にネズミ返しを設置した。

温度	20～26°C
湿度	35～70%RH
換気回数	12 回以上/h
照明	12 時間 (7 時点灯, 19 時消灯)

プラスチック製ケージ (W 18.2 × D 26.0 × H 12.8 cm) に床敷き (ALPHA-dri™, Shepherd Specialty Papers) を入れ、動物を 2～3 匹ずつ収容した。飼育ケージおよび給餌器は、群分け時および週 1 回、給水瓶は 2, 3 日に 1 回の頻度で交換した。床敷き中の汚染物質に関する分析証明書を製造元から入手し、その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た。

### 14.2.2. 飼料

放射線滅菌固型飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業) を自由に摂取させた。

使用した飼料中の汚染物質に関する分析成績書を製造元から入手し、分析値が日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることを確認した。なお、餌の補給は、給餌器の交換と同時に行った。

### 14.2.3. 給水

水道水を給水瓶から自由に摂取させた。

水道法に基づく水質検査を 6 ヶ月に 1 回、外部機関で行い、検査結果が上水道水質基準の基準値内であることを確認した。また、水質検査を実施しない月には [REDACTED] で細菌検査 (一般細菌および大腸菌検査) を実施し、細菌が検出されていないことを確認した。

## 14.3. 検疫・馴化

搬入後、動物の一般状態および体重推移を観察した。Day -8～1 の間、動物を検疫・馴化させ、この間一般状態を 1 日 1 回以上観察した。体重を搬入時および検疫・馴化期間終了時 (Day 1) に測定した。

## 14.4. 群分け

安全性試験システム (LATOX-F/V5) を用いて、Day 1 の群分け前に測定した体重を基に層別化し、無作為割り付け法により各試験群を構成するように割り付けた。

試験に用いる動物の体重範囲は、平均体重±20%以内とした。

#### 14.5. 個体識別

動物入荷時に通し番号（仮動物番号）を付し，仮動物番号カードを飼育ケージに掲示して識別した．さらに，動物の耳介に仮動物番号が刻印されたタグ（ら・ピース，サイテック）を装着した．

群分け後，仮動物番号と動物番号が記載された動物識別番号カード（ID カード）を飼育ケージに掲示し，動物を識別した．

#### 14.6. 余剰動物の取り扱い

余剰動物は炭酸ガスを用いて安楽死させた．

#### 14.7. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

##### 14.7.1. ダウンス緩衝液

約 16000 mL の超純水に下記の試薬を溶解させた．

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.50	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50	g
NaCl	16.0	g
KCl	0.40	g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0] (ニッポンジーン)	40	mL

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 8.0 に調整後，超純水を用いて 2000 mL に定容した．オートクレーブ（121°C，20 分）で滅菌し，室温保管した．

##### 14.7.2. RNase 含有ダウンス緩衝液

下記の試薬を混合させた．

ダウンス緩衝液	166.6	mL
RNase 溶液 (RNase A 10 mg/mL, ニッポンジーン)	3.332	mL

用時調製した．

##### 14.7.3. 0.5 mol/L ショ糖溶液

ショ糖 (MW = 342.30) 68.4 g を約 320 mL のダウンス緩衝液に溶解し，ダウンス緩衝液を用いて 400 mL に定容した．フィルター（孔径 0.20 μm）ろ過除菌後，冷蔵保管した．

#### 14.7.4. 組織破碎用緩衝液

下記の試薬を混合させた.

ダウンス緩衝液	74.97	mL
0.5 mol/L ショ糖溶液	74.97	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]	16.66	mL
RNase 溶液 (10 mg/mL)	3.332	mL

用時調製した.

#### 14.7.5. 10 w/v%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液

SDS (富士フィルム和光純薬) 20.0 g を約 160 mL の遺伝子工学用滅菌水 (ニッポンジーン) に溶解し, 遺伝子工学用滅菌水を用いて 200 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20  $\mu\text{m}$ ) をろ過除菌後, 室温保管した.

#### 14.7.6. プロティナーゼ K 溶液

下記の試薬を混合させた.

プロティナーゼ K (富士フィルム和光純薬)	340	mg
遺伝子工学用滅菌水	102	mL
10 w/v% SDS 溶液	34	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 7.5] <sup>注1)</sup>	34	mL

注1) pH 8.0 の EDTA 溶液 (ニッポンジーン) を 0.5~2 mol/L の塩酸で pH 7.5 に調整した後に使用した.

用時調製した.

#### 14.7.7. フェノール/クロロホルム (Ph/Cl) 混液

下記の試薬を混合させた.

クロロホルム (関東化学)	375	mL
TE 飽和フェノール (ニッポンジーン)	375	mL

用時調製した.

#### 14.7.8. クロロホルム/イソアミルアルコール混液

下記の試薬を混合させた.

クロロホルム (関東化学)	288	mL
イソアミルアルコール (富士フィルム和光純薬)	12	mL

用時調製した.

14.8. 培地および培養液等の調製

14.8.1. LB 培養液

下記の試薬を混合させた.

Tryptone (ナカライテスク)	10	g
Bacto yeast extract (Becton, Dickinson and Company)	5	g
NaCl	5	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 冷蔵保管した.

14.8.2. LB 寒天培地

下記の試薬を混合させた.

Tryptone	11	g	12	g
Bacto yeast extract	5.5	g	6	g
NaCl	5.5	g	6	g
バクトアガー (Becton, Dickinson and Company)	16.5	g	18	g
超純水	1100	mL	1200	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, シャーレ (直径 150 mm) に 20 mL ずつ分注した. 分注後のプレートは, 室温保管した.

14.8.3. LB トップアガー

下記の試薬を混合させた.

Tryptone	11	g	10	g	9	g
Bacto yeast extract	5.5	g	5	g	4.5	g
NaCl	5.5	g	5	g	4.5	g
バクトアガー	7.7	g	7	g	6.3	g
超純水	1100	mL	1000	mL	900	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 使用時までウォーターバスを用いて 50°C の条件で保温した. 用時調製した.

14.8.4. 200 mg/mL マルトース水溶液

マルトース水和物 (富士フィルム和光純薬) 21.1 g を約 80 mL の超純水に溶解し, 超純水を用いて 100 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) をろ過除菌後, 冷蔵保管した.

14.8.5. 50 mg/mL アンピシリン水溶液

アンピシリンナトリウム（注射用ビクシリン，Meiji Seika ファルマ）250 mg（力価）に注射用水 5 mL を加えて溶解させ，冷凍保管した。

14.8.6. 20 mg/mL カナマイシン水溶液

カナマイシン硫酸塩 48 mg を約 1.6 mL の注射用水に溶解し，注射用水を用いて 2 mL に定容した。フィルター（孔径 0.20  $\mu\text{m}$ ）ろ過除菌後，冷凍保管した。

14.8.7. 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液

硫酸マグネシウム七水和物 73.8 g を約 240 mL の超純水に溶解し，超純水を用いて 300 mL に定容した。オートクレーブ（121 $^{\circ}\text{C}$ ，20 分）で滅菌した後，室温保管した。

14.8.8. SM 緩衝液

約 800 mL の超純水に下記の試薬を溶解させた。

NaCl	5.84	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.03	g
1 mol/L Tris-HCl [pH 7.5]（ニッポンジーン）	50.0	mL
ゼラチン末（関東化学）	100	mg

超純水を用いて 1000 mL に定容し，オートクレーブ（121 $^{\circ}\text{C}$ ，20 分）で滅菌した後，室温保管した。

14.8.9. P-gal 溶液

下記の試薬を混合させた。

Phenyl $\beta$ -D-galactoside [P-gal]	5400	mg	6000	mg
ジメチルスルホキシド [DMSO]（富士フィルム和光純薬）	18	mL	20	mL

用時調製した。

14.9. 被験物質液等

14.9.1. 被験物質液等の調製

被験物質は水に不溶でコーン油に溶解することからコーン油を媒体として使用した。各被験物質液を各投与用にプラスチック製気密容器に小分け（3～5 日分および予備 1 本）し，投与日まで冷蔵，遮光で保管した。

14.9.1.1. 100 mg/mL 被験物質液

被験物質 2.00 g を 20 mL 容メスフラスコに正確に秤量した。コーン油を少しずつ添加し，溶解させた後，20 mL に定容し，100 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.2. 50.0 mg/mL 被験物質液

被験物質 1.00 g を 20 mL 容メスフラスコに正確に秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、20 mL に定容し、50.0 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.3. 25.0 mg/mL 被験物質液

被験物質 0.500 g を 20 mL 容メスフラスコに正確に秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、20 mL に定容し、25.0 mg/mL 液を準備した。

14.9.1.4. 12.5 mg/mL 被験物質液

被験物質 0.250 g を 20 mL 容メスフラスコに正確に秤量した。コーン油を少しずつ添加し、溶解させた後、20 mL に定容し、12.5 mg/mL 液を準備した。

14.9.2. 被験物質液の安定性（試験施設データ）

被験物質液（媒体：コーン油）中の 2,3-ペンタンジオンは、0.500~200 mg/mL の濃度範囲において、冷蔵（1~9°C）、遮光、気密容器にて 4 日間保管後、室温、遮光、気密容器にて 24 時間安定であることが確認されている（Reference data 1）。

14.9.3. 陽性対照物質液の調製

ENU 50 mg を量り、目盛り付試験管に移した後、1/15 M リン酸緩衝液（pH 6）を加えて 5 mL に定容し、10 mg/mL 液を準備した。陽性対照物質液は、用時調製した。

14.9.4. 残余被験物質液および陽性対照物質液の処分

専用の容器に廃棄した。

14.10. 対照群

14.10.1. 陰性対照群

被験物質液調製に用いる媒体であるコーン油を使用した。

14.10.2. 陽性対照群

ENU を使用し、用量は 100 mg/kg とした。

## 14.11. MutaMouse を用いる遺伝子突然変異試験

## 14.11.1. 試験群の構成

用量 (mg/kg/day)	投与液 の濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
0*	0	5	雄	6	1001～1006
62.5	12.5	5	雄	6	1101～1106
125	25.0	5	雄	6	1201～1206
250	50.0	5	雄	6	1301～1306
500	100	5	雄	6	1401～1406
100**	10	10	雄	6	1501～1506

\*: 陰性対照 (媒体のみを投与した.)    \*\*: 陽性対照 (ENU)

## 14.11.2. 用量設定根拠

「Muta<sup>TM</sup>Mouse を用いる 2,3-ペンタンジオンの遺伝子突然変異試験のための予備試験：試験番号 XXXXXXXXXX ■■■ において、被験物質を雄雌マウスに 30.0, 100, 300 および 1000 mg/kg/day の用量で各群 3 匹に 1 日 1 回、14 日間連続強制経口投与した。その結果、雄では、1000 mg/kg/day 群で投与 3 日目の投与後以降に自発運動の低下および腹臥位が 3/3 例、立毛、痩せおよび呼吸不整が 2/3 例で認められ、Day 6 に 1 例死亡が認められた。また、Day 9 に自発運動の低下、立毛、痩せおよび呼吸不整が残りの 2 例について認められ、瀕死と判断して安楽死させた。さらに、死亡動物を含む全例において顕著な体重減少が認められた。雌では、1000 mg/kg/day 群で投与 3 日目の投与後以降に自発運動の低下、立毛および痩せが 3/3 例、呼吸不整が 2/3 例および腹臥位が 1/3 例で認められ、Day 7 および Day 8 にそれぞれ 1 例死亡が認められた。また、Day 9 に自発運動の低下、立毛および痩せが残りの 1 例について認められ、瀕死と判断して安楽死させた。さらに、死亡動物を含む全例において顕著な体重減少が認められた。

300 mg/kg/day 群以下の用量では、雌雄ともに一般状態の変化および顕著な体重減少は認められなかった。

したがって、当該試験においては、最大耐量付近と考えられる 500 mg/kg/day を最高用量とし、以下、250, 125 および 62.5 mg/kg/day の計 4 用量を設定した。また、予備試験の結果、明確な性差が認められなかったため、雄のみを使用した。

## 14.11.3. 投与動物数および評価対象

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。すべての投与群において、評価数 5 匹を確保することができたため、500, 250 および 125 mg/kg/day の 3

用量ついて遺伝子突然変異解析を実施した。評価に使用しない動物については、14.11.7.の項に記載する各器官（臓器）を摘出した後保管し、ゲノム DNA の抽出は行わなかった。

#### 14.11.4. 投与方法および投与回数

媒体および被験物質の投与経路は、ヒトへの暴露経路と考えられる経口とした。

プラスチック製注射筒およびテフロン製胃ゾンデを用いて被験物質液を強制経口投与した。

投与容量は、体重 10 g 当たり 0.05 mL とし、14.11.6.の項で測定した最新の体重に基づいて算出した。

ガイドラインに従い、1 日 1 回、28 日間連続投与を行った。

陽性対照物質の投与経路は、腹腔内投与とし、25G 注射針を装着したプラスチック製注射筒を用いて 1 日 1 回、2 日間腹腔内投与した。投与容量は、体重 10 g 当たり 0.1 mL とし、Day 1 の体重に基づいて算出した。

#### 14.11.5. 投与期間および発現期間

Day 1 から Day 28 までを投与期間、Day 29 から Day 31 までを発現期間とするとともに、Day 1～7 を Week 1、Day 8～14 を Week 2、Day 15～21 を Week 3、Day 22～28 を Week 4 とした。最終投与後 3 日（Day 31）に器官を摘出した。陽性対照群については、Day 9 および 10 に投与し、最終投与後 10 日（Day 20）に器官を摘出した。

#### 14.11.6. 体重測定および一般状態観察

陰性対照群および被験物質投与群は、Day 1（群分け日）、8、15、22、29 および 31（器官摘出直前）に体重を測定した。陽性対照群については、Day 1、8 および 20（器官摘出前）に体重を測定した。また、死亡動物については、発見時に体重を測定した。

器官摘出まで、1 日 1 回以上、動物の一般状態を観察した。

#### 14.11.7. 器官（臓器）摘出、肉眼的観察および保管

炭酸ガスを用いて安楽死させた動物から肝臓および胃（腺胃）を摘出し、これら器官の肉眼的観察を行った。各器官の摘出・保管は、以下の方法に従った。なお、解剖室の出入り口にはネズミ返しを設置した。

肝臓：外側左葉を生検トレパン（BP-50F、貝印）を用いて 2 ヶ所くり抜いた。くり抜いた肝臓は、それぞれ別のマイクロチューブに入れ、液体窒素（LN<sub>2</sub>）で凍結させた。残った左葉およびその他の葉は、ビニール袋に入れ、LN<sub>2</sub>を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。

胃：大弯側を切開した後、内容物を生理食塩液で洗い出した。前胃と腺胃に分割し、腺胃を保管袋に入れ、LN<sub>2</sub>で凍結させた。前胃は、廃棄した。

凍結後は超低温フリーザー（設定値：-80°C，基準値：-90~-60°C）に保管した。すべての摘出器官（臓器）は、最終報告書作成まで保管される。その後の保管については、試験委託者と[REDACTED]で協議し、別途定める。

#### 14.11.8. 摘出器官の選択理由

肝臓：主要な代謝器官であり、ガイドラインで推奨されているため。

腺胃：経口投与では初期に被験物質と接触する器官であり、ガイドラインで推奨されているため。

#### 14.11.9. ゲノム DNA の抽出

ダウンス型ホモジナイザーに組織破碎用緩衝液（RNase を含む）3 mL を分注し、氷中で冷却しておいた。次いで、凍結組織片を入れ、ペッスルを用いてホモジナイズした（組織破碎液）。あらかじめ 0.5 mol/L ショ糖溶液 3 mL を入れて氷冷しておいた 15 mL 容の遠心管に上記の組織破碎液を静かに重層し、3000 rpm（1710 G）で 10 分間遠心した。上清を除去後、冷却した RNase 含有ダウンス緩衝液 3 mL を加え、よく懸濁した（核／細胞懸濁液）。

上記の核／細胞懸濁液にプロテイナーゼ K 溶液 3 mL を加えて静かに転倒混和し、2 時間程度（懸濁液が透明になるまで）50°C の条件で保温し、消化させた。等量（約 6 mL）の Ph/Cl 混液を加え、数回転倒混和し、さらに 10 分間回転混和させた後、2500 rpm（1190 G）で 10 分間遠心した。上層（水相）をトランスファーピペットで静かに回収し、新たな 15 mL 容の遠心管に移した。回収した水相と等量の Ph/Cl 混液を加え、数回転倒混和し、さらに 10 分間回転混和させた後、2500 rpm（1190 G）で 10 分間遠心し、水相を回収した。回収した水相と等量のクロロホルム／イソアミルアルコール混液を加え、数回転倒混和し、さらに 10 分間回転混和させた後、2500 rpm（1190 G）で 10 分間遠心した。水相を回収し、50 mL 容の遠心管に移した。遠心管にエタノールを徐々に加え、ゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA を 70%エタノールの入ったマイクロチューブに移し、およそ 10 分間浸した。次いで、13000 rpm（13240 G）で 10 分間遠心した。上清をマイクロピペットで可能な限り除いた後、チューブを室温に放置することにより残ったエタノールを蒸散させた。適量（100 μL）の TE 緩衝液（ニッポンジーン）を加え、一晚室温に放置し、残渣の DNA を溶解させた。溶解後は、冷蔵にて保管した。ゲノム DNA 溶液中の DNA 濃度を NanoDrop（AGC TECHNO GLASS）を用いて測定した。DNA 濃度が 100~600 μg/mL 程度の濃度になるように、適量の TE 緩衝液を用いて希釈した。

#### 14.11.10. 試験菌株の準備

容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに LB 培養液 30 mL, マルトース水溶液 (200 mg/mL) 300  $\mu$ L, アンピシリン溶液 (50 mg/mL) 30  $\mu$ L およびカナマイシン溶液 (20 mg/mL) 30  $\mu$ L を添加した. 凍結保管 (設定値:  $-80^{\circ}\text{C}$ ) しておいた大腸菌 C 株 (*lacZ*<sup>-</sup>, *gal E*<sup>-</sup>) 懸濁液を融解した後, これに 50  $\mu$ L 接種した.  $37^{\circ}\text{C}$ , 120 回/分の振盪条件で一晩培養し, 前培養液とした.

容量 500 mL のバッフル付三角フラスコに新鮮な LB 培養液 100 mL および 200 mg/mL マルトース水溶液 1 mL を添加し, 次いで先の前培養液を 1 mL 植菌した後, 同様に 2 時間程度 (OD: 約 0.8~0.9) 培養を続けた. 培養終了後, 菌懸濁液を 10 分間遠心分離 (1000 rpm) した. 10 mmol/L の硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を用いて再懸濁した (大腸菌懸濁液).

#### 14.11.11. ゲノム DNA を用いた *in vitro* パッケージング

Transpack (Agilent Technologies) 製品添付の Instruction Manual に従ってパッケージングを実施した. Transpack のチューブ (RED) を解凍した. ゲノム DNA 溶液約 10  $\mu$ L をチューブ (RED) に加え, ピペッティングにより混合した後,  $30^{\circ}\text{C}$  の条件で 90 分間インキュベートした. 次いで, チューブ (BLUE) を解凍し, その 10  $\mu$ L をチューブ (RED) に加え, 同様に混合した. さらに,  $30^{\circ}\text{C}$  の条件で 90 分間インキュベートした. 各チューブに SM 緩衝液 700  $\mu$ L を加え, 十分に攪拌した (パッケージング溶液).

#### 14.11.12. パッケージング溶液のプレーティング

大腸菌懸濁液を総プラーク算出用 (タイター用) に 1 mL, 突然変異算出用 (セクション用) に 2 mL, それぞれのチューブに分注しておいた. パッケージング DNA の全量 (およそ 700  $\mu$ L) をセクション用チューブに加えた後 (およそ 2700  $\mu$ L になる) 攪拌し, 室温に 30 分放置してファージを大腸菌に感染させた. 本溶液 30  $\mu$ L を 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 270  $\mu$ L に加えて 10 倍希釈した. 本希釈液 30  $\mu$ L をタイター用チューブに加えて攪拌した.

タイター用トップアガーの場合は, LB トップアガー 100 容量に対して, 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液 2 容量を加えた. セクション用トップアガーの場合は, LB トップアガー 100 容量に対して, P-gal 溶液 2 容量を加えた.

タイター用チューブに, タイター用トップアガー 17 mL を加えて混和し, LB 寒天培地に全量を重層した. セクション用チューブには, セクション用トップアガー 16 mL を加え, タイター用と同様に LB 寒天培地に重層した. 各プレートを  $37^{\circ}\text{C}$  の条件で一晩培養した.

総プラーク数が 30 万に達するまで上記のパッケージング操作を繰り返した.

#### 14.11.13. 総プラーク数の算出

タイター用プレートに出現したプラーク数 (N) を計数し、下記の式を用いて総プラーク数を求めた。

$$\begin{aligned} \text{総プラーク数} &= \frac{N \times 300(\mu\text{L}) \times 2700(\mu\text{L})}{30(\mu\text{L}) \times 30(\mu\text{L})} \\ &= 900 \times N \end{aligned}$$

#### 14.11.14. 変異プラーク数の算出

セレクション用プレートに出現したプラーク数を計数した。出現したプラーク数を変異プラーク数とした。

#### 14.11.15. 突然変異体頻度 (Mutant Frequency) の算出

出現した変異プラーク数を総プラーク数で除して、当該組織での突然変異体頻度を求めた。

$$\text{突然変異体頻度} = \frac{\text{変異プラーク数}}{\text{総プラーク数}}$$

### 14.12. 結果の評価

#### 14.12.1. 統計解析

陰性対照群と各被験物質投与群の体重および体重増加量 (Day 1~31) について、最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散 (有意差が認められなかった) の場合は、Dunnnett の多重比較検定で陰性対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定し、不等分散 (有意差が認められた) の場合は、Steel の検定で陰性対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した。

各被験物質投与群の突然変異体頻度について、最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散 (有意差が認められなかった) の場合は、Dunnnett の多重比較検定で陰性対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定し、不等分散 (有意差が認められた) の場合は、Steel の検定で陰性対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した。

陰性対照群と陽性対照群での突然変異体頻度の比較は、最初に F 検定を実施し、有意差が認められない場合は、Student の t 検定を実施した。F 検定で有意差が認められる場合は、Aspin-Welch の t 検定を実施した。

各検定の有意水準は両側 5%とした。

#### 14.12.2. 結果の判定

陰性対照群と比較し、被験物質群の突然変異体頻度において統計学的な有意差が認められた場合に、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、用量依存性および試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

## 15. 試験成立条件

陽性対照群の突然変異体頻度において、陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が認められたため、試験は成立したと判断した。

## 16. 試験結果

### 16.1. MutaMouse を用いる遺伝子突然変異試験

#### 16.1.1. lacZ assay (肝臓)

結果を Table 1 に示す。

陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は、 $44.7 \pm 24.0 (\times 10^{-6})$  であった。

2,3-ペンタンジオン投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は、125, 250 および 500 mg/kg/day 群で、それぞれ  $44.5 \pm 29.4 (\times 10^{-6})$ ,  $39.3 \pm 10.6 (\times 10^{-6})$  および  $38.1 \pm 5.7 (\times 10^{-6})$  であり、陰性対照群と比較し統計学的に有意な差は認められなかった。

陽性対照群における突然変異体頻度の平均値±SD は、 $118.2 \pm 22.3 (\times 10^{-6})$  であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

#### 16.1.2. lacZ assay (腺胃)

結果を Table 2 に示す。

陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は、 $37.1 \pm 7.6 (\times 10^{-6})$  であった。

2,3-ペンタンジオン投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は、125, 250 および 500 mg/kg/day 群で、それぞれ  $36.3 \pm 8.2 (\times 10^{-6})$ ,  $37.1 \pm 10.3 (\times 10^{-6})$  および  $39.9 \pm 14.4 (\times 10^{-6})$  であり、陰性対照群と比較し統計学的に有意な差は認められなかった。

陽性対照群における突然変異体頻度の平均値±SD は、 $411.4 \pm 24.5 (\times 10^{-6})$  であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

#### 16.1.3. 体重および一般状態観察

結果を Appendix 1 および 2 に示す。

2,3-ペンタンジオン投与群では、250 mg/kg/day 群で、投与 28 日目の投与前に脱肛が 1/6 例で認められ、500 mg/kg/day 群で投与 17 日目の投与後に 1 例の死亡が認められた。

また、500 mg/kg/day 群の Day 8 および 15 において体重の減少傾向が認められたが、統計学的に有意な体重減少ではなかった。その他の投与群において統計学的に有意な体重減少は認められなかった。ただし、500 mg/kg/day 群の体重増加量 (Day 1~31) は、陰性対照群と比較して有意に低値を示した。

#### 16.1.4. 解剖時の肉眼観察

結果を Appendix 3 に示す。

250 mg/kg/day 群で前胃の肥厚が 6/6 例で認められ、肝臓に結節（赤色）が 1/6 例で認められた。また、500 mg/kg/day 群の肝臓において胃、脾臓および腹壁との癒着が 1/5 例で認められ、斑点（黒色）が 1/5 例で認められた。さらに 500 mg/kg/day 群の胃において前胃および腺胃の肥厚が 5/5 例、脾臓および腹壁との癒着が 2/5 例、腹壁との癒着が 1/5 例で認められた。その他の投与群において、被験物質の影響と考えられる肉眼的異常は認められなかった。

#### 17. 考察および結論

2,3-ペンタンジオンの肝臓および腺胃における遺伝子突然変異誘発性を検討するため、トランスジェニックマウス（MutaMouse）を用いた遺伝子突然変異誘発性（レポーター遺伝子：*lacZ*）試験を実施した。

用量設定試験の結果を基に最大耐量付近と考えられる 500 mg/kg/day を最高用量とし、以下、250、125 および 62.5 mg/kg/day の用量で各群雄 6 匹に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。500 mg/kg/day 群の Day 8 および 15 において体重の減少傾向が認められた。また、500 mg/kg/day 群で投与 17 日目の投与後に 1 例の死亡が認められた。最終投与後 3 日に生存動物全例から肝臓および腺胃を摘出した。すべての投与群において、評価数 5 匹を確保することができたため、500、250 および 125 mg/kg/day の 3 用量の肝臓および腺胃について、*lacZ* assay による遺伝子突然変異体頻度を算出した。

その結果、2,3-ペンタンジオン投与群の肝臓および腺胃のいずれにおいても陰性対照群と比較して遺伝子突然変異体頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。

陽性対照の ENU 投与群では、肝臓および腺胃ともに陰性対照群と比較して統計学的に有意な遺伝子突然変異体頻度の増加が認められたことから、当該試験は適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、当該試験条件下において、2,3-ペンタンジオンはトランスジェニックマウスの肝臓および腺胃に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの（陰性）と判定された。

#### 18. 試験関係資料の保管

当該試験の試験関係資料は、[REDACTED] 資料保存施設にて最終報告書作成後 10 年間保管される。その後の保管については、試験委託者と [REDACTED] で協議し、別途定める。なお、最終報告書作成後、DNA 溶液および凍結器官の保管については試験委託者と [REDACTED] で協議し、別途定める。

Table 1. Induction of mutation in liver of transgenic mice treated with 2,3-pentanedione  
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
Corn oil	0	1001	521,100	1	15	28.8	44.7 $\pm$ 24.0
		1002	616,500	1	22	35.7	
		1003	663,300	1	56	84.4	
		1004	549,000	1	27	49.2	
		1005	393,300	1	10	25.4	
2,3-pentanedione	125	1201	493,200	1	16	32.4	44.5 $\pm$ 29.4
		1202	733,500	1	70	95.4	
		1203	887,400	1	21	23.7	
		1204	547,200	1	24	43.9	
		1205	440,100	1	12	27.3	
	250	1301	390,600	1	13	33.3	39.3 $\pm$ 10.6
		1302	441,900	1	21	47.5	
		1303	510,300	1	18	35.3	
		1304	401,400	1	11	27.4	
		1305	396,900	1	21	52.9	
	500	1401	341,100	1	10	29.3	38.1 $\pm$ 5.7
		1403	763,200	2	29	38.0	
		1404	470,700	1	20	42.5	
		1405	412,200	1	18	43.7	
		1406	457,200	1	17	37.2	
ENU	100	1501	895,500	2	126	140.7	118.2 $\pm$ 22.3 *(S)
		1502	436,500	1	40	91.6	
		1503	311,400	1	44	141.3	
		1504	368,100	1	38	103.2	
		1505	428,400	1	49	114.4	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

\*: Significant difference from negative control ( $p \leq 0.05$ )

(S): Student's *t* test

Table 2. Induction of mutation in glandular stomach of transgenic mice treated with 2,3-pentanedione  
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
Corn oil	0	1001	520,200	1	19	36.5	37.1 $\pm$ 7.6
		1002	626,400	1	30	47.9	
		1003	555,300	1	16	28.8	
		1004	703,800	1	22	31.3	
		1005	342,900	1	14	40.8	
2,3-pentanedione	125	1201	550,800	1	22	39.9	36.3 $\pm$ 8.2
		1202	563,400	1	24	42.6	
		1203	716,400	1	16	22.3	
		1204	444,600	1	18	40.5	
		1205	413,100	1	15	36.3	
	250	1301	452,700	1	23	50.8	37.1 $\pm$ 10.3
		1302	656,100	1	27	41.2	
		1303	468,000	1	13	27.8	
		1304	674,100	1	27	40.1	
		1305	657,900	1	17	25.8	
	500	1401	409,500	1	25	61.1	39.9 $\pm$ 14.4
		1403	475,200	1	10	21.0	
		1404	671,400	1	28	41.7	
		1405	943,200	2	38	40.3	
		1406	675,900	1	24	35.5	
ENU	100	1501	514,800	1	216	419.6	411.4 $\pm$ 24.5 * (AW)
		1502	536,400	1	223	415.7	
		1503	528,300	1	198	374.8	
		1504	520,200	1	230	442.1	
		1505	385,200	1	156	405.0	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

\*: Significant difference from negative control ( $p \leq 0.05$ )

(AW): Aspin-Welch's *t* test

Appendix 1. Body weight in the gene mutation assay of 2,3-pentanedione  
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)								Gain (g)
			Day -8 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 15	Day 17	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)	
Corn oil	0	1001	22.8	25.0	24.3	25.9		25.7	25.8	26.6	1.6
		1002	24.8	26.6	27.4	28.2		28.5	28.8	29.0	2.4
		1003	24.4	26.9	26.4	26.8		27.3	27.7	27.7	0.8
		1004	24.0	27.4	26.7	27.7		28.0	27.9	28.5	1.1
		1005	23.4	25.7	26.2	26.7		27.6	27.9	28.4	2.7
		1006	24.5	28.3	27.5	28.1		29.4	29.4	29.5	1.2
		Mean±S.D.	24.0±0.8	26.7±1.2	26.4±1.2	27.2±0.9		27.8±1.2	27.9±1.2	28.3±1.0	1.6±0.8
2,3-pentanedione	62.5	1101	23.1	25.3	25.7	26.5		26.9	26.9	27.0	1.7
		1102	24.7	27.6	27.6	27.4		27.4	27.8	27.7	0.1
		1103	24.6	27.1	27.5	28.6		29.1	28.8	29.3	2.2
		1104	23.3	25.6	25.7	26.3		26.5	26.7	26.5	0.9
		1105	26.5	28.3	29.6	29.7		30.3	30.4	30.8	2.5
		1106	23.8	26.3	27.5	27.2		27.3	27.6	27.6	1.3
		Mean±S.D.	24.3±1.2	26.7±1.2	27.3±1.5	27.6±1.3		27.9±1.5	28.0±1.4	28.2±1.6	1.5±0.9
	125	1201	24.6	26.6	27.3	27.6		28.4	29.3	30.0	3.4
		1202	24.1	27.1	28.1	28.2		28.6	28.9	29.8	2.7
		1203	23.9	27.2	26.6	27.6		28.4	29.8	29.9	2.7
		1204	23.0	26.0	26.1	27.0		26.7	27.3	28.1	2.1
		1205	25.0	28.0	28.2	29.1		29.5	29.7	30.9	2.9
		1206	22.6	25.0	25.1	26.0		25.8	25.0	25.4	0.4
		Mean±S.D.	23.9±0.9	26.7±1.0	26.9±1.2	27.6±1.1		27.9±1.4	28.3±1.9	29.0±2.0	2.4±1.1
	250	1301	25.8	27.8	27.9	28.6		29.7	29.8	30.0	2.2
		1302	23.1	25.9	26.2	26.9		27.8	28.5	28.2	2.3
		1303	21.9	24.9	24.1	24.8		25.6	25.1	25.7	0.8
		1304	25.1	27.8	28.4	28.3		28.6	29.2	28.9	1.1
		1305	23.6	26.7	26.4	27.2		27.6	28.2	28.2	1.5
		1306	24.3	26.4	26.8	27.6		28.4	28.3	28.4	2.0
		Mean±S.D.	24.0±1.4	26.6±1.1	26.6±1.5	27.2±1.4		28.0±1.4	28.2±1.6	28.2±1.4	1.7±0.6
500	1401	22.8	27.0	22.6	23.8		24.5	25.3	25.1	-1.9	
	1402	22.5	25.7	24.3	22.5	21.2D					
	1403	24.8	27.3	25.6	26.7		27.5	27.1	27.6	0.3	
	1404	23.0	25.3	21.2	20.2		22.4	21.7	22.3	-3.0	
	1405	23.9	26.1	27.1	28.1		27.9	27.9	28.1	2.0	
	1406	24.2	28.2	26.5	27.5		27.7	27.6	27.9	-0.3	
	Mean±S.D.	23.5±0.9	26.6±1.1	24.6±2.3	24.8±3.1		26.0±2.4	25.9±2.6	26.2±2.5	0.6±1.9* (D)	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg) Gain= Day 31(Sacrificed) - Day 1(Allocated) D: Dead

\*: Significant difference from negative control (p<0.05) (D): Dunnett's test

Appendix 1. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Animal ID No.	Body weight (g)				Gain (g)
			Day -8 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 20 (Sacrificed)	
ENU	100	1501	23.2	26.5	27.6	25.5	-1.0
		1502	23.9	25.2	26.4	25.2	0.0
		1503	23.2	25.7	26.3	25.8	0.1
		1504	24.2	26.8	27.3	27.0	0.2
		1505	24.3	27.1	27.4	26.5	-0.6
		1506	25.1	28.2	29.2	28.5	0.3
		Mean±S.D.	24.0±0.7 NA	26.6±1.1 NA	27.4±1.0 NA	26.4±1.2 NA	-0.2±0.5NA

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

Gain= Day 20 (Sacrificed) - Day 1 (Allocated)

NA: Not statistically analyzed

Appendix 2. Clinical observations in the gene mutation assay of 2,3-pentanedione  
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment													
			1		2		3		4		5		6		7	
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2,3-pentanedione	62.5	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	125	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	250	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
500	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

1st: Just before the administration 2nd: After the administration

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			1	2	3	4	5	6	7
ENU	100	1501	N	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N	N
		1505	N	N	N	N	N	N	N
		1506	N	N	N	N	N	N	N

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment													
			8		9		10		11		12		13		14	
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2,3-pentanedione	62.5	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	125	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
500	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

1st: Just before the administration 2nd: After the administration

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment								
			8	9		10		11	12	13	14
				1st	2nd	1st	2nd				
ENU	100	1501	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1505	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1506	N	N	N	N	N	N	N	N	N

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

1st: Just before the administration 2nd: After the administration

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment													
			15		16		17		18		19		20		21	
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2,3-pentanedione	62.5	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	125	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
500	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1402	N	N	N	N	N	D									
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

1st: Just before the administration    2nd: After the administration

N: Normal,    D: dead

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment					
			15	16	17	18	19	20 (Sacrificed)
ENU	100	1501	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N
		1505	N	N	N	N	N	N
		1506	N	N	N	N	N	N

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment														
			22		23		24		25		26		27		28		
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
2,3-pentanedione	62.5	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	125	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	250	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
500	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

1st: Just before the administration 2nd: After the administration

N: Normal, P: Prolapse of anus

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment		
			29	30	31 (Sacrificed)
Corn oil	0	1001	N	N	N
		1002	N	N	N
		1003	N	N	N
		1004	N	N	N
		1005	N	N	N
		1006	N	N	N
2,3-pentanedione	62.5	1101	N	N	N
		1102	N	N	N
		1103	N	N	N
		1104	N	N	N
		1105	N	N	N
		1106	N	N	N
	125	1201	N	N	N
		1202	N	N	N
		1203	N	N	N
		1204	N	N	N
		1205	N	N	N
		1206	N	N	N
	250	1301	P	P	P
		1302	N	N	N
		1303	N	N	N
		1304	N	N	N
		1305	N	N	N
		1306	N	N	N
500	1401	N	N	N	
	1403	N	N	N	
	1404	N	N	N	
	1405	N	N	N	
	1406	N	N	N	

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

N: Normal, P: Prolapse of anus

Appendix 3. Gross findings in the gene mutation assay of 2,3-pentanedione  
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Classification	Day at necropsy	Organs	Findings and comments
Corn oil	0	1001	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1002	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1003	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
2,3-pentanedione	62.5	1004	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1005	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1006	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
2,3-pentanedione	62.5	1101	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1102	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1103	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
2,3-pentanedione	62.5	1104	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1105	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-
		1106	Sacrificed	31	Liver	-
					Glandular stomach	-

Corn oil: Negative control (5 mL/kg)

-: No remarkable change

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Classification	Day at necropsy	Organs	Findings and comments	
2,3-pentanedione	125	1201	Sacrificed	31	Liver	-	
					Glandular stomach	-	
		1202	Sacrificed	31	Liver	-	
					Glandular stomach	-	
		1203	Sacrificed	31	Liver	-	
					Glandular stomach	-	
			1204	Sacrificed	31	Liver	-
						Glandular stomach	-
			1205	Sacrificed	31	Liver	-
						Glandular stomach	-
			1206	Sacrificed	31	Liver	-
						Glandular stomach	-
	250	1301	Sacrificed	31	Liver	-	
					Forestomach	thickening	
					Glandular stomach	-	
		1302	Sacrificed	31	Liver	-	
					Forestomach	thickening	
					Glandular stomach	-	
		1303	Sacrificed	31	Liver	-	
				Forestomach	thickening		
				Glandular stomach	-		
		1304	Sacrificed	31	Liver	nodule, caudate leaf tail, red, single, 5x4x3 mm	
				Forestomach	thickening		
				Glandular stomach	-		
		1305	Sacrificed	31	Liver	-	
				Forestomach	thickening		
				Glandular stomach	-		
		1306	Sacrificed	31	Liver	-	
				Forestomach	thickening		
				Glandular stomach	-		

-: No remarkable change

## Appendix 3. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Classification	Day at necropsy	Organs	Findings and comments	
2,3-pentanedione	500	1401	Sacrificed	31	Liver	adhesion, stomach, spleen, abdominal wall	
					Forestomach	thickening	
					Glandular stomach	adhesion, abdominal wall, thickening	
		1403	Sacrificed	31	Liver	black patch	
					Forestomach	thickening	
		1404	Sacrificed	31	Sacrificed	Liver	-
Forestomach	adhesion, spleen, abdominal wall, thickening						
Glandular stomach	adhesion, spleen, abdominal wall, thickening						
1405	Sacrificed	31	Sacrificed	Liver	-		
				Forestomach	thickening		
				Glandular stomach	thickening		
1406	Sacrificed	31	Sacrificed	Liver	-		
				Forestomach	adhesion, spleen, abdominal wall, thickening		
				Glandular stomach	adhesion, spleen, abdominal wall, thickening		
ENU	100	1501	Sacrificed	20	Liver	-	
					Glandular stomach	-	
		1502	Sacrificed	20	Sacrificed	Liver	-
						Glandular stomach	-
		1503	Sacrificed	20	Sacrificed	Liver	-
						Glandular stomach	-
		1504	Sacrificed	20	Sacrificed	Liver	-
						Glandular stomach	-
		1505	Sacrificed	20	Sacrificed	Liver	-
						Glandular stomach	-
		1506	Sacrificed	20	Sacrificed	Liver	-
						Glandular stomach	-

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

-: No remarkable change

Appendix 4. Historical control data (Transgenic rodent gene mutation assay (*lacZ* assay))

[MutaMouse: male; liver]

Group	n	Mutant frequency [ $\times 10^{-6}$ ] (Mean $\pm$ S.D.)	Acceptable range	
			Lower	Upper
Negative control	112	43.1 $\pm$ 13.5	16.6	69.6

[MutaMouse: male; stomach]

Group	n	Mutant frequency [ $\times 10^{-6}$ ] (Mean $\pm$ S.D.)	Acceptable range	
			Lower	Upper
Negative control	107	43.8 $\pm$ 12.8	18.7	68.9

Negative control: Including water for injection, 0.5% methylcellulose, corn oil, *etc.*

The range of negative control is 95% confidence interval.

The above historical control data consists of those pooled [REDACTED]

Reference data 1

被験物質液の安定性結果

## 結果報告書

表 題： 2,3-ペンタンジオンの濃度測定法バリデーションおよびコーン油中における  
2,3-ペンタンジオンの安定性の検討

試験番号： [REDACTED]

要 約： コーン油中 2,3-ペンタンジオンのガスクロマトグラフシステム（以下、GC）を用いる濃度測定法バリデーションとして、特異性、直線性、真度および併行精度を検討した。その結果、すべての項目で判定基準を満たしていたため、GC を用いた本測定法は、2,3-ペンタンジオンの濃度測定法として適用可能と判断した。また、オートサンプラー上での標準溶液および試料溶液の安定性を確認した結果、ともに判定基準を満たしていたため、標準溶液および試料溶液はオートサンプラー上（室温条件下）にセット後、24 時間まで安定して測定に供することが可能であると判断した。

また、コーン油中 2,3-ペンタンジオン（設定濃度：0.5 および 200 mg/mL）について、冷蔵、遮光、気密容器にて 4 日間、続いて室温、遮光、気密容器にて 24 時間保管後の安定性、および冷蔵、遮光、気密容器にて 8 日間、続いて室温、遮光、気密容器にて 24 時間保管後の安定性を評価した。冷蔵、遮光、気密容器にて 4 日間、続いて室温、遮光、気密容器にて 24 時間保管後の測定結果、0.5 および 200 mg/mL の被験物質液の残存率は、それぞれ 92.3 および 97.5%であった。冷蔵、遮光、気密容器にて 8 日間、続いて室温、遮光、気密容器にて 24 時間保管後の測定結果、0.5 および 200 mg/mL の被験物質液の残存率は、それぞれ 88.8 および 97.6%であった。したがって、被験物質液が安定であると判断する判定基準（残存率：100.0±10.0%以内）を、冷蔵、遮光、気密容器にて 4 日間、続いて室温、遮光、気密容器にて 24 時間保管は満たした。しかし、冷蔵、遮光、気密容器にて 8 日間、続いて室温、遮光、気密容器にて 24 時間保管は 0.5 mg/mL 被験物質液のみ判定基準を満たさなかったため、コーン油を媒体とした 2,3-ペンタンジオンは、0.5～200 mg/mL の濃度範囲において、遮光下、気密容器保管にて、冷蔵 4 日間に続いて室温 24 時間まで安定であると判断した。

《濃度測定法概要》

適用検体	0.5~200 mg/mL 被験物質液 (媒体: コーン油)
標準溶液	2,3-ペンタンジオンを 0.002~0.05 mg/mL の濃度になるよう n-ヘキサンを用いて希釈する。
測定機器	GC-2014 システム (島津製作所)
GC に供する試料溶液	被験物質液を, 0.01 mg/mL の濃度になるよう n-ヘキサンを用いて希釈する。

《GC 条件》

カラム	DB-Wax (長さ 30 m × 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm, Agilent Technologies)
カラムオープン温度	35°C (hold 15 min) → 100°C/min → 200°C (hold 20 min)
キャリアガス	He
カラム入口圧	145.1 kPa
試料気化室	220°C
検出器	FID, 230°C
注入モード	スプリット法
スプリット比	1:5
注入量	1 μL

《結果》

項目	判定基準	結果	適否
特異性	媒体および希釈液のクロマトグラム上で、被験物質のピーク検出位置に妨害ピークが認められないこと。また、ピークが検出された場合、標準溶液（設定濃度 0.002 mg/mL）のピーク面積の 1/10 未満であること。	2,3-ペンタンジオンの保持時間に測定を妨害するピークは検出されなかった。	適
直線性	相関係数：0.99 以上	0.9999	適
真度および併行精度	相対誤差：±10.0%以内	0.3% (0.5 mg/mL 被験物質液) -1.2% (200 mg/mL 被験物質液)	適
	相対標準偏差：5.0%以下	0.5% (0.5 mg/mL 被験物質液) 0.5% (200 mg/mL 被験物質液)	
標準溶液および試料溶液の安定性	残存率：95.0～105.0%	98.3% (0.002 mg/mL 標準溶液) 99.5% (0.05 mg/mL 標準溶液) 99.1% (0.5 mg/mL 被験物質液) 97.5% (200 mg/mL 被験物質液)	適
媒体中被験物質の安定性 <sup>1)</sup>	残存率：100.0±10.0%以内	92.3% (0.5 mg/mL 被験物質液) 97.5% (200 mg/mL 被験物質液)	適
媒体中被験物質の安定性 <sup>2)</sup>	残存率：100.0±10.0%以内	88.8% (0.5 mg/mL 被験物質液) 97.6% (200 mg/mL 被験物質液)	不適

1) 冷蔵、遮光、気密容器にて 4 日間、続いて室温、遮光、気密容器にて 24 時間保管後

2) 冷蔵、遮光、気密容器にて 8 日間、続いて室温、遮光、気密容器にて 24 時間保管後

試験責任者： [REDACTED]