



試験番号： 

最終報告書

2-メチル-2-ペンテナールのマウスを用いる小核試験

試験番号： 





目次





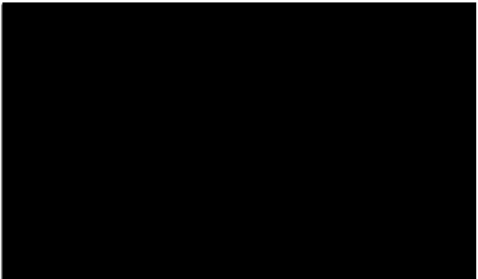
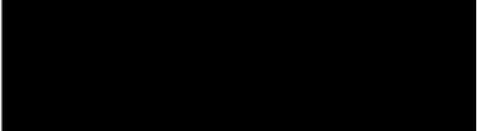
目次.....	2
試験情報.....	5
最終報告書の作成.....	7
試験責任者及び試験従事者.....	8
1 要約.....	9
2 緒言.....	10
3 試験材料及び方法.....	10
3.1 被験物質.....	10
3.2 陽性対照物質.....	11
3.3 媒体.....	11
3.3.1 被験物質の調製に用いた媒体.....	11
3.3.2 陽性対照物質の調製に用いた媒体.....	12
3.4 供試動物.....	12
3.5 試験系選択理由.....	12
3.6 動物管理.....	12
3.6.1 飼育条件.....	12
3.6.2 収容ケージ及び床敷.....	13
3.6.3 飼料及び給餌方法.....	13
3.6.4 飲料水及び給水方法.....	13
3.6.5 個体識別法.....	14
3.7 群分け方法.....	14
3.8 投与方法.....	14
3.9 投与経路及び投与方法の選択理由.....	14
3.10 投与量及び群構成.....	14
3.10.1 用量設定試験.....	14
3.10.2 本試験.....	15
3.11 投与量の設定理由.....	15
3.12 投与回数及び標本作製時期とその選択理由.....	15
3.13 被験物質投与液の調製方法及び調製頻度.....	16
3.13.1 用量設定試験の投与液濃度及び調製量.....	16

3.13.2	本試験の投与液濃度及び調製量	16
3.14	陽性対照物質の投与液の調製方法	16
3.15	測定項目及び観察	16
3.15.1	一般状態	16
3.15.2	体重	16
3.15.3	用量設定試験の動物の処置	17
3.15.4	標本作製	17
3.15.5	標本観察	17
3.15.6	試験の成立条件	17
3.16	統計処理	17
3.17	判定基準	18
3.18	資料の保管	18
3.19	予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと	18
4	試験結果	18
4.1	生存率及び一般状態	18
4.2	体重	19
4.3	小核標本観察結果	19
5	考察	19
6	総括表	21
	Table 1: 生存率	22
	Table 2: 一般状態	23
	Table 3: 体重	24
	Table 4: 小核標本観察結果	25
7	個体別表	26
	Appendix 1: 一般状態	27
	Appendix 2: 体重	28
	Appendix 3: 小核標本観察結果	29
8	添付資料	
8.1:	用量設定試験 総括表及び個体別表	30
	Attachment table 1: 生存率	31
	Attachment table 2: 一般状態	32

Attachment table 3: 体重	34
Attachment appendix 1: 一般状態	35
Attachment appendix 2: 体重	37
8.2: Background Data for Micronucleus Tests	38

(最終頁 39)

試験情報

- 試験表題 : 2-メチル-2-ペンテナールのマウスを用いる小核試験
- 試験番号 : 
- 試験目的 : 2-メチル-2-ペンテナールの安全性に関する試験の一環として、2-メチル-2-ペンテナールのマウスを用いる小核試験を行い、生体内での染色体異常誘発性の有無について検討することを目的とした。
- 実施基準 : 本試験は、GLPの対象外として取り扱うが、種々の操作、データの取り扱いなどは試験実施施設の標準操作手順書（SOP）に則って実施した。
- ガイドライン : 本試験は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」（平成8年3月22日付衛化第29号生活衛生局長通知）及び「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS」に定める474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test（29 July 2016）に準じて実施した。
- 動物愛護 : 「動物の愛護及び管理に関する法律」（令和元年6月 法律第39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25年9月 環境省告示第84号）、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（平成18年6月 日本学術会議）並びに厚生労働省及び農林水産省の定める動物実験等の実施に関する基本指針に基づいた   に従って実施した。
- 試験委託者 : 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 変異遺伝部 

- 試験実施施設 : 

試験開始日 : 

試験日程

【用量設定試験】

動物入荷日 :

群分け日 :

被験物質投与日 :

観察終了日 :

【本試験】

動物入荷日 :

群分け日 :

被験物質投与日 :

:

観察終了及び標本作製日 :

標本観察終了日 :

試験終了日 :



試験番号： [REDACTED]

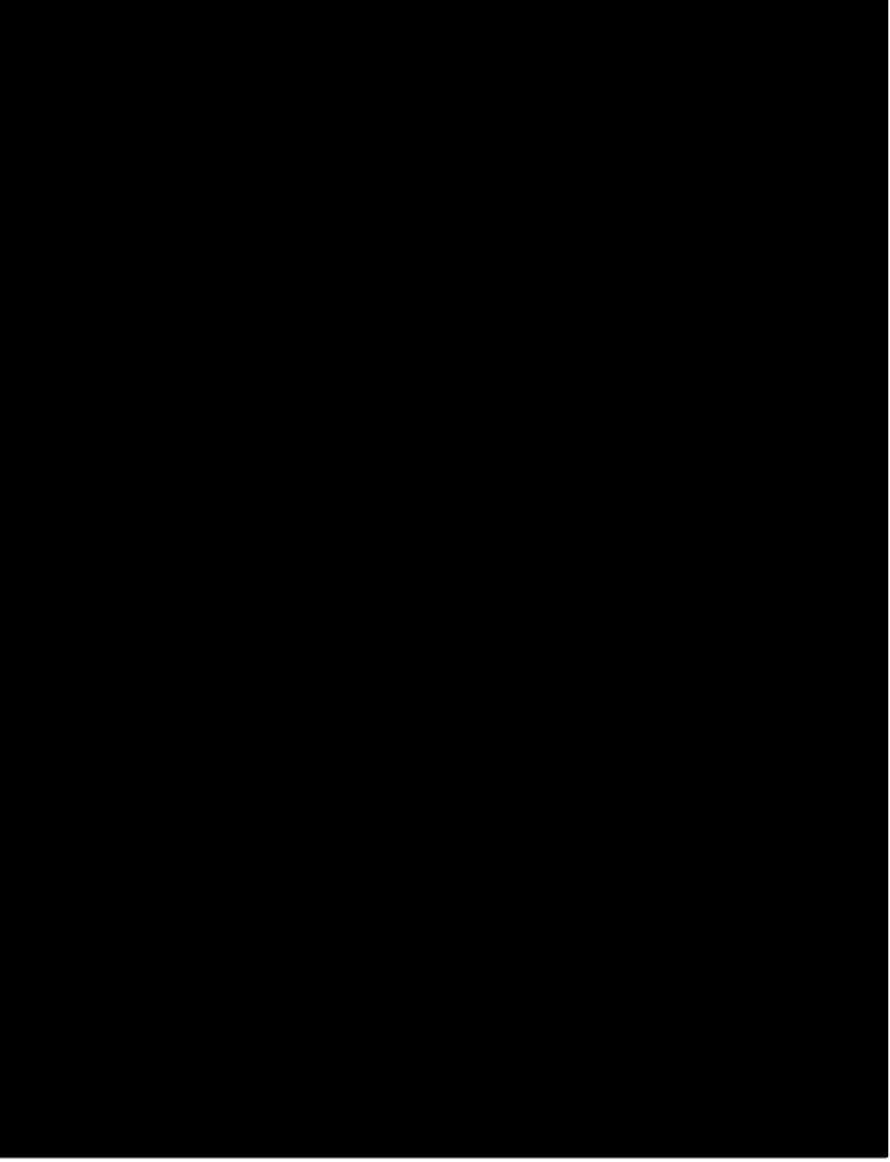
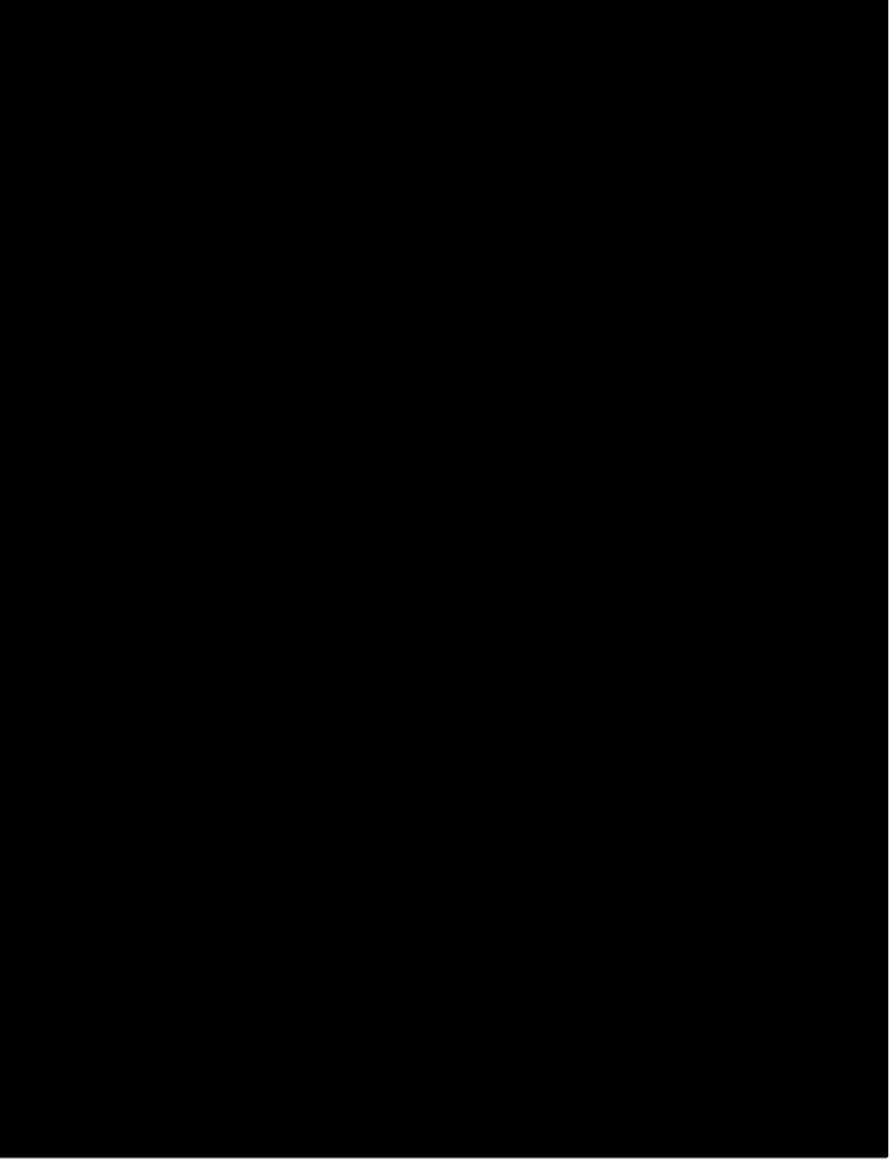
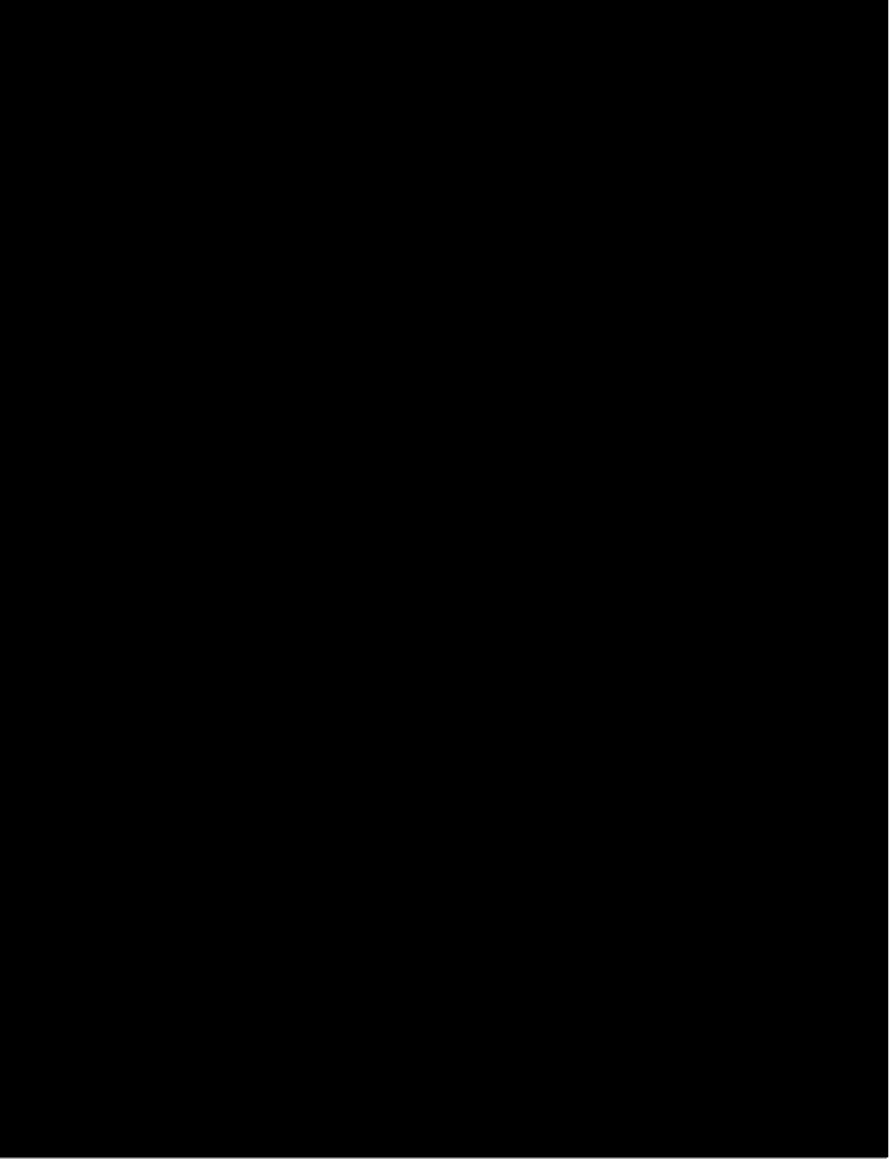
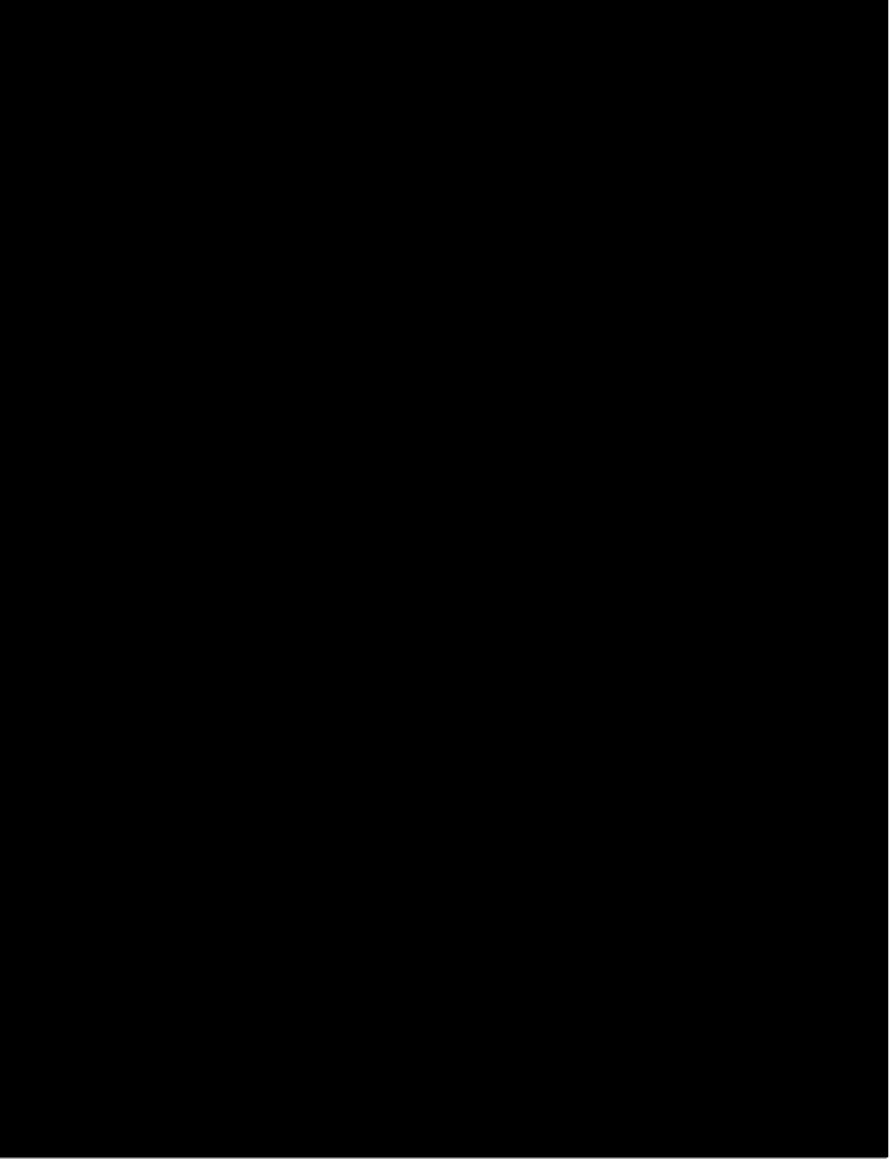
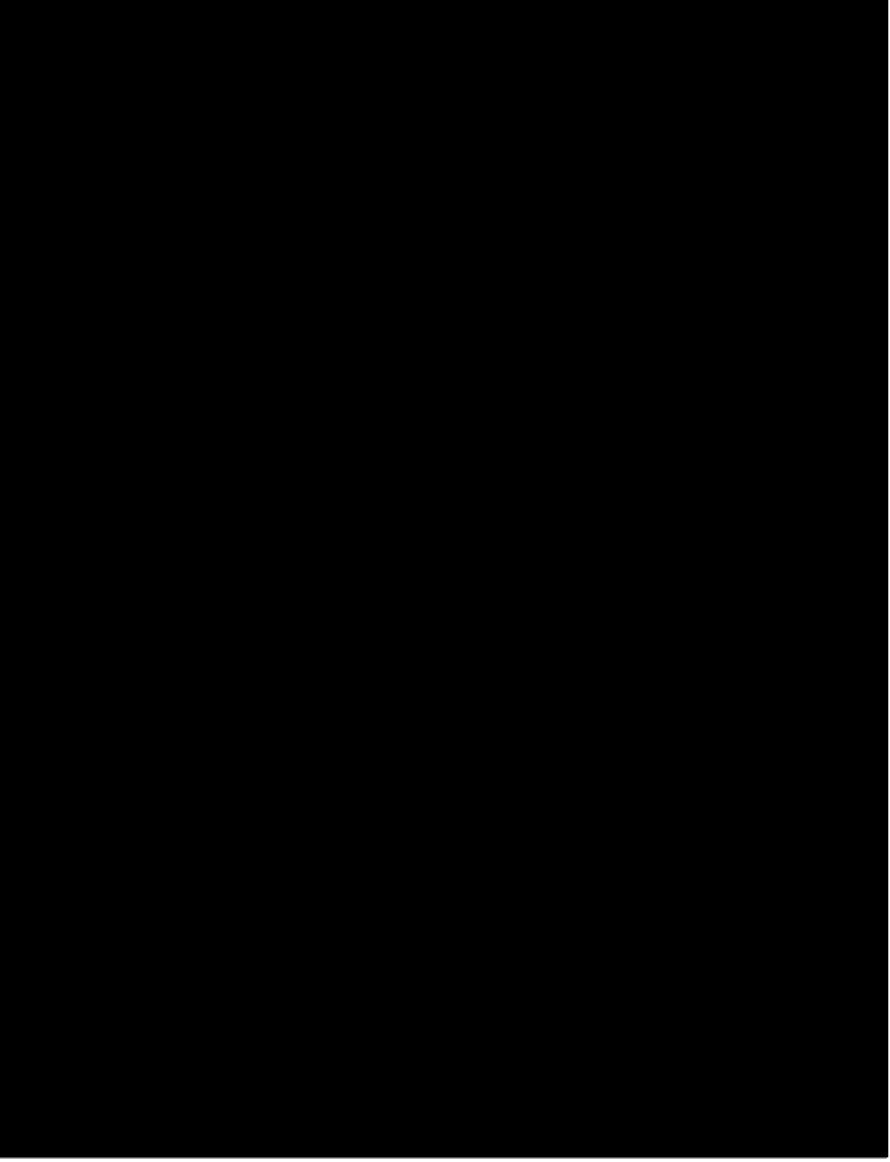
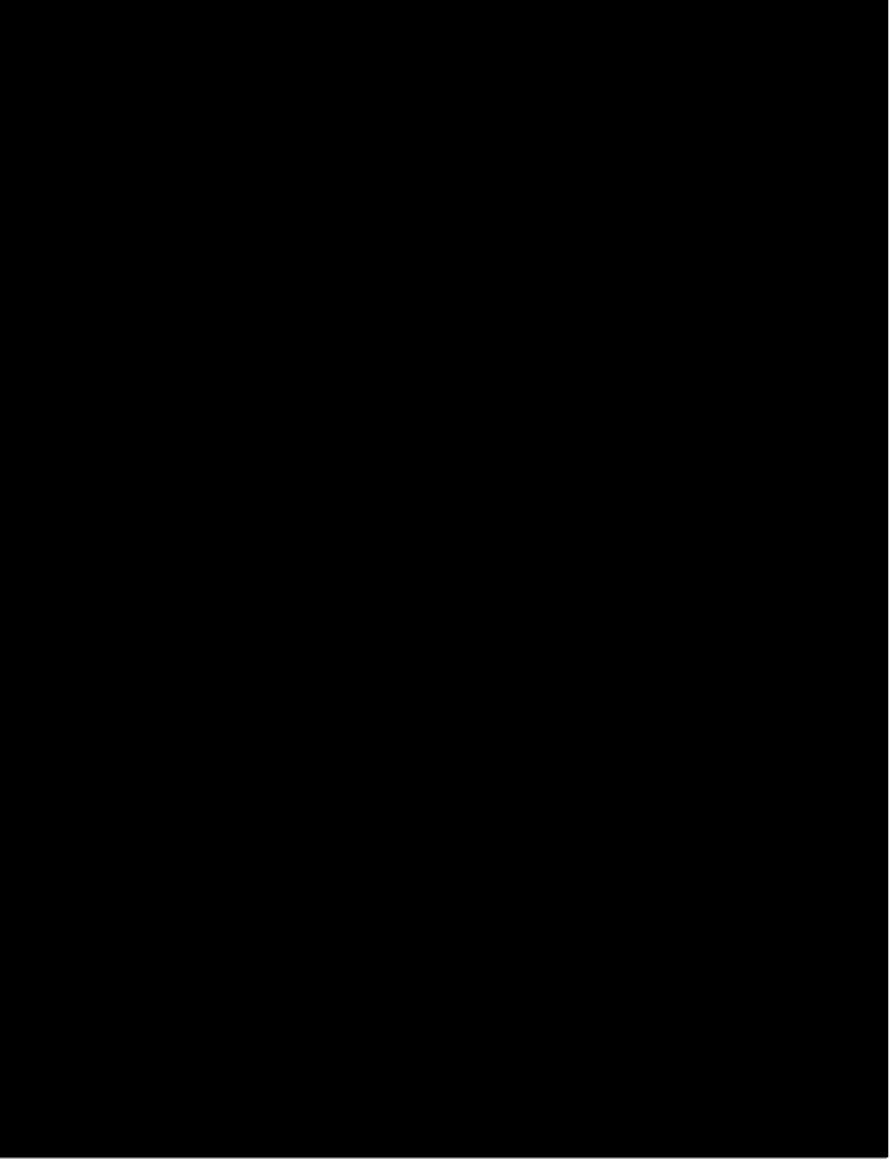
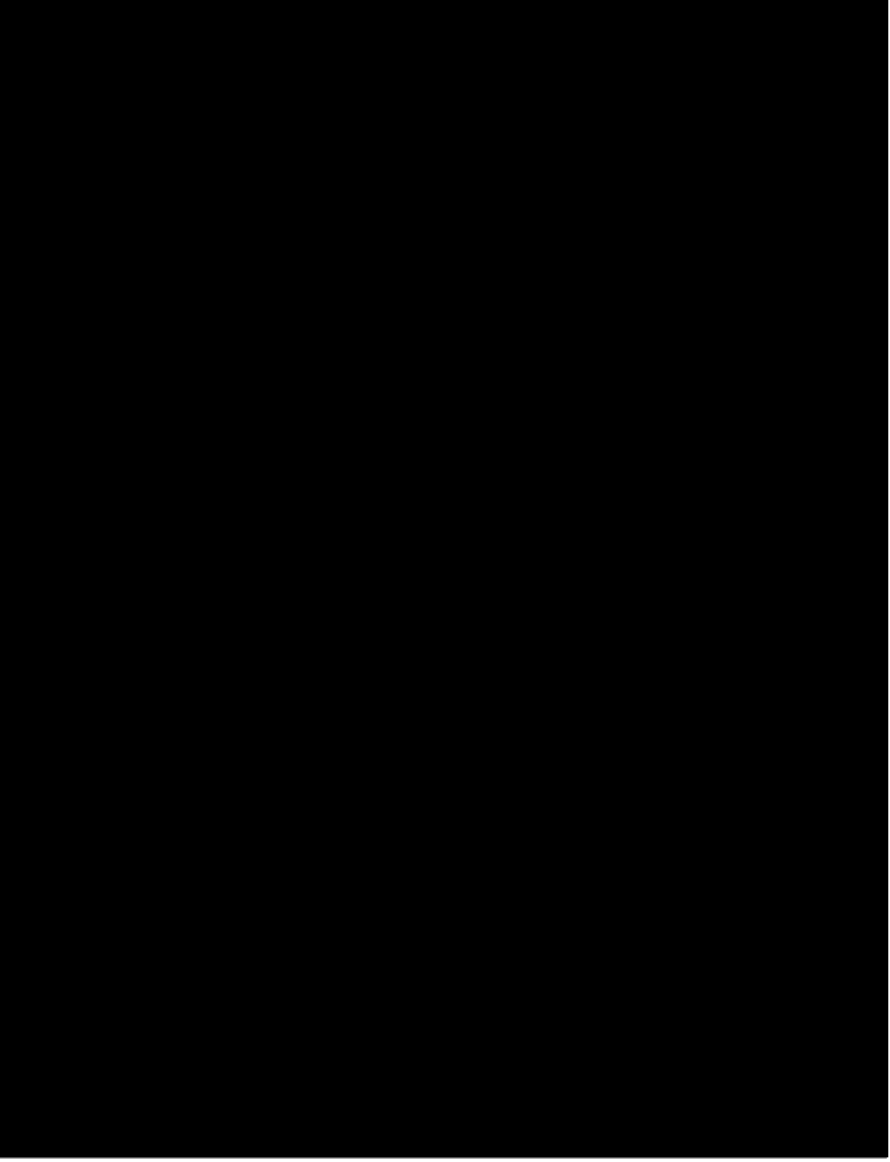
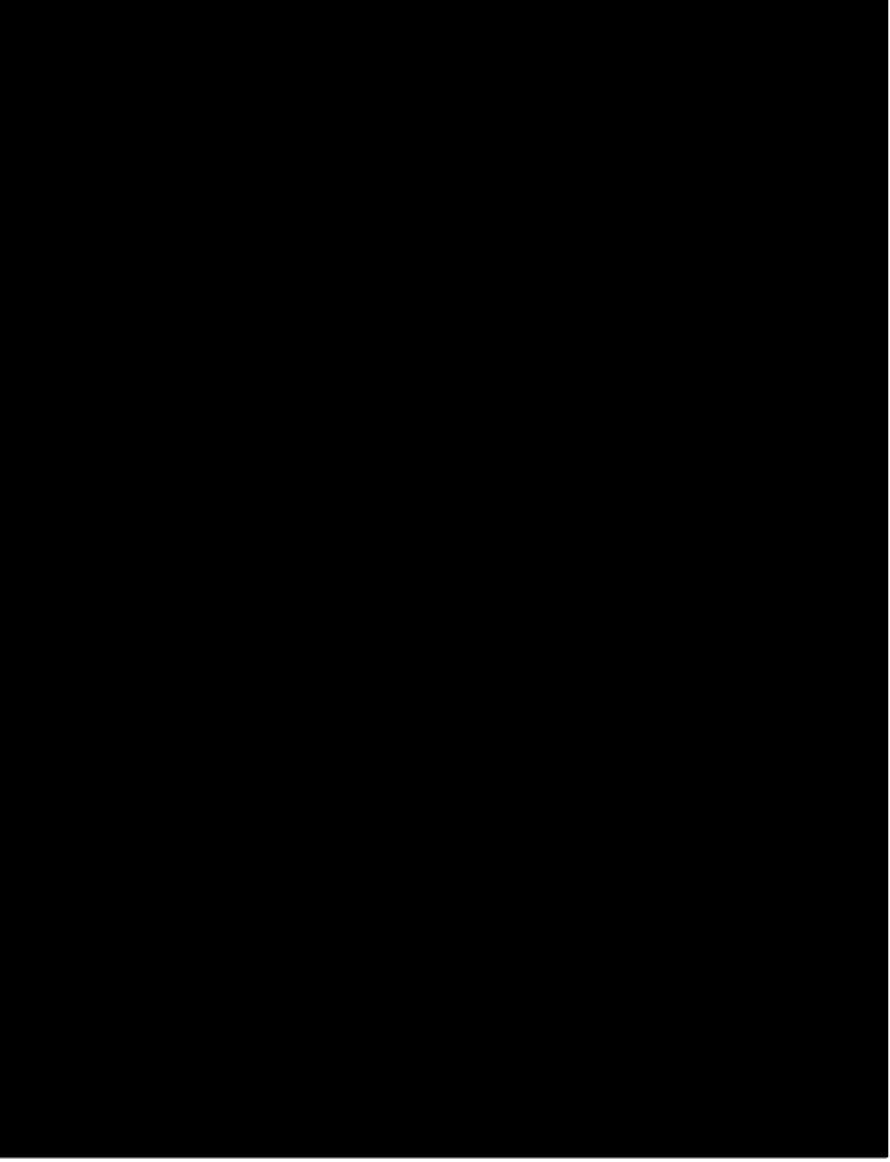
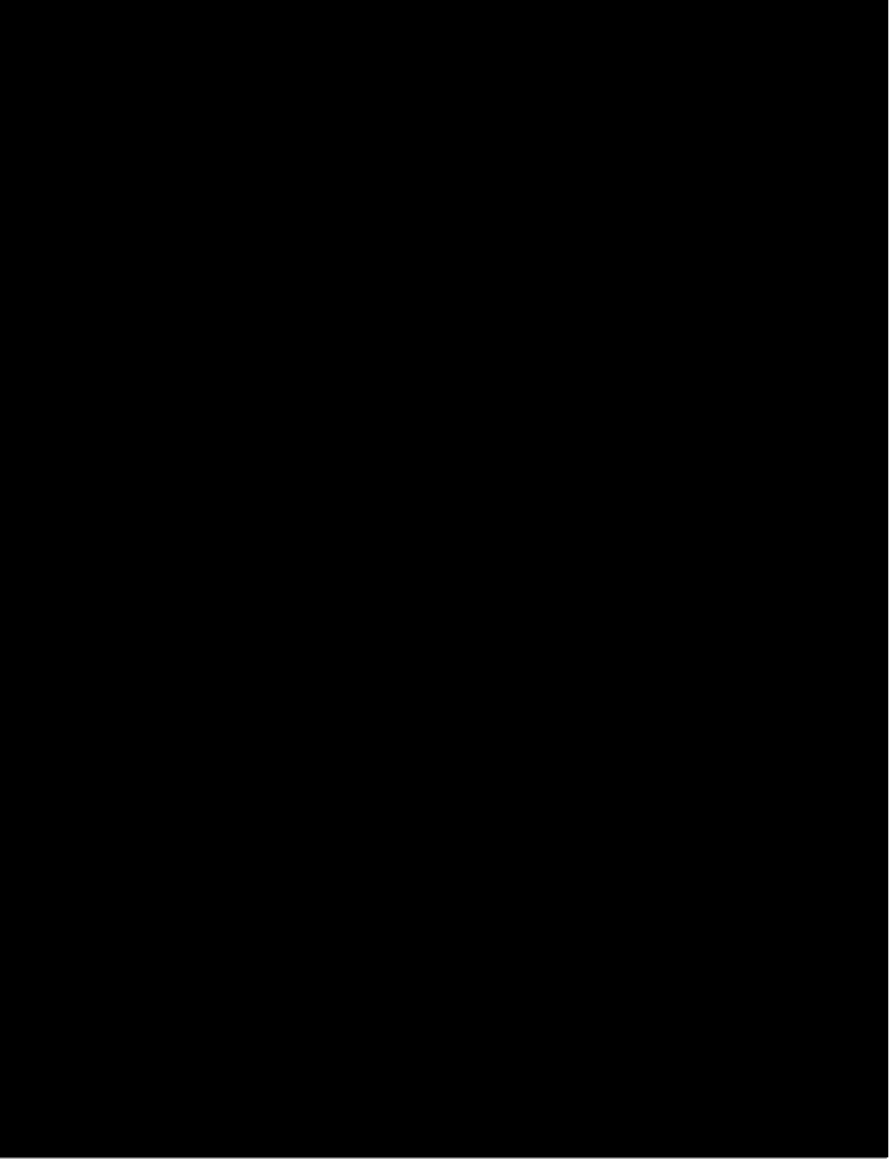
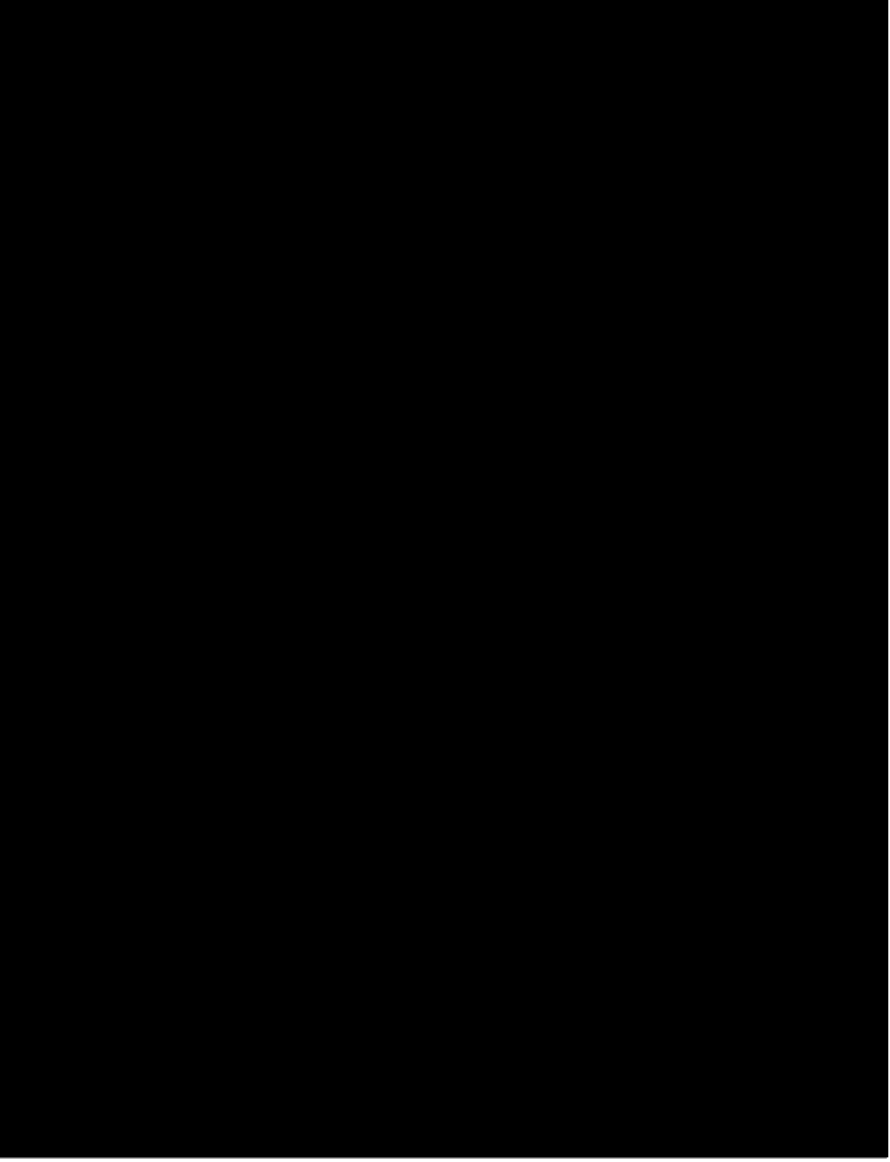
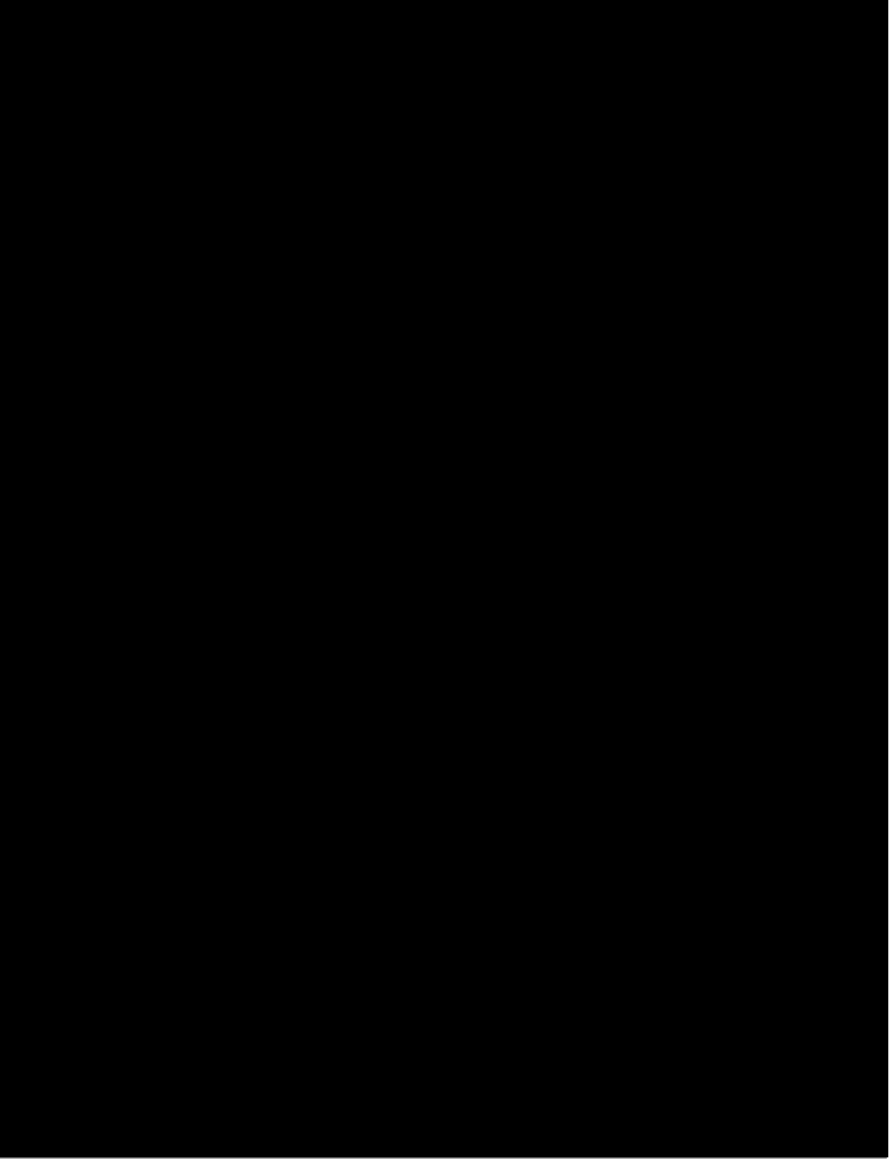
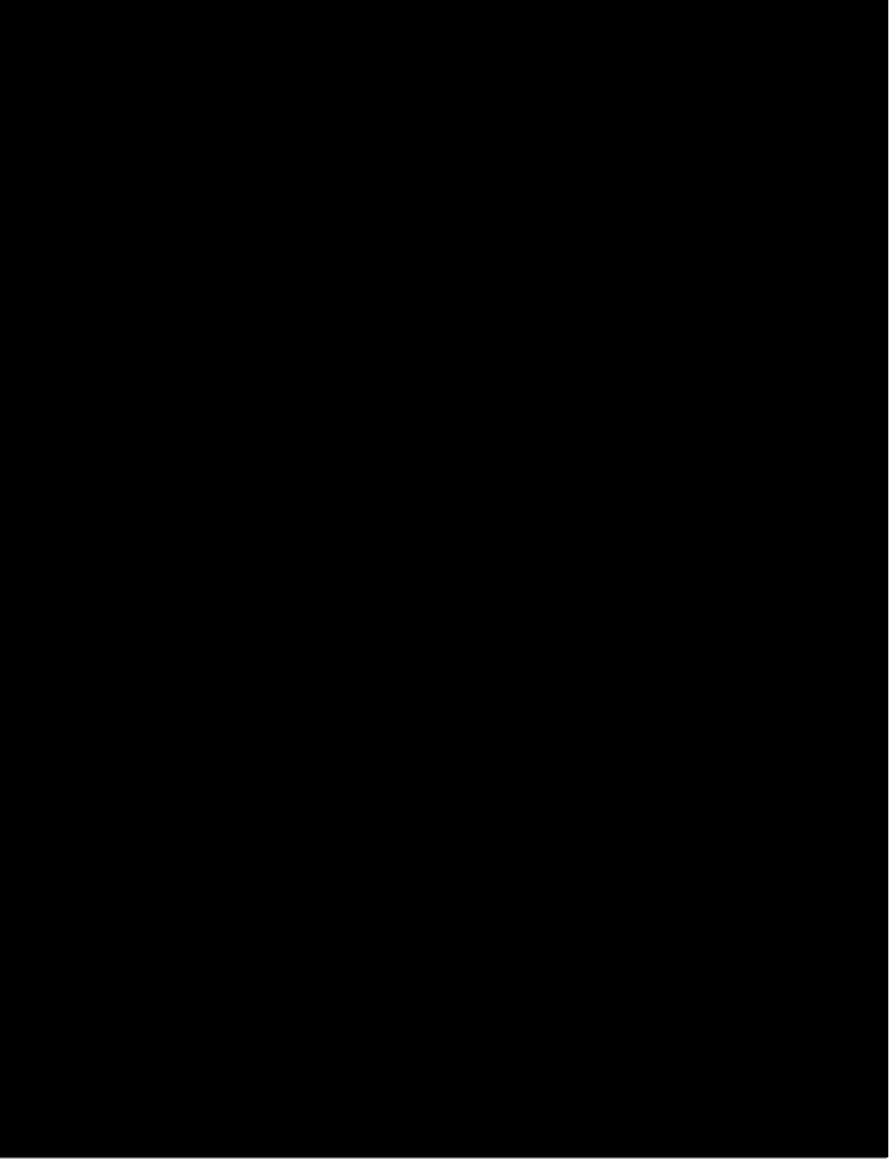
最終報告書の作成

試験表題 : 2-メチル-2-ペンテナールのマウスを用いる小核試験

試験番号 : [REDACTED]

試験責任者 : [REDACTED]

試験責任者及び試験従事者

試験責任者	:	
試験主担当者	:	
動物飼育管理	:	
動物入荷・群分け	:	
投与液の調製・投与	:	
一般状態観察	:	
体重測定	:	
標本作製	:	
標本観察	:	
集計処理	:	
被験物質管理責任者	:	
検疫管理責任者	:	

注) アンダーラインは部門責任者を示す。

1 要約

2-メチル-2-ペンテナールの安全性に関する試験の一環として、生体内での染色体異常誘発性の有無を検討するため、マウスを用いた小核試験を実施した。被験物質は純度 98.8%であり、純度換算は行わなかった。

小核試験の用量設定及び性別を設定するために雄雌 Crl:CD1 (ICR) 系マウス各 3 匹を各用量群に割り付け、被験物質である 2-メチル-2-ペンテナールをオリブ油に混合し、250、500、1000 及び 2000 mg/kg の投与量で 1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間強制経口投与し、その後 24 時間まで一般状態観察及び体重測定を実施した。その結果、死亡はなく、一般状態として 1000 及び 2000 mg/kg 投与群の雄で立毛が、2000 mg/kg 投与群の雄雌では自発運動の低下がみられた。

以上より、毒性徴候に明らかな性差がみられなかったことから、本試験では雄のみを用い、2000 mg/kg を最高投与量とし、以下公比 2 で 1000 及び 500 mg/kg の用量を設定した。

本試験では、雄の Crl:CD1 (ICR) 系マウスに 2-メチル-2-ペンテナールの 500、1000 及び 2000 mg/kg (10 mL/kg) を 1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。陰性対照群には、オリブ油を同様の方法で投与し、また、陽性対照群にはマイトマイシン C (MMC) の 2 mg/kg を単回腹腔内投与した。最終投与後 24 時間に骨髓細胞塗抹標本を作製した。標本観察では、多染性赤血球 (PCE) を個体あたり 4000 個観察し、小核を有する多染性赤血球 (MNPCE) の出現率を求めた。

その結果、被験物質投与群に死亡例はみられず、体重においても被験物質投与に起因すると思われる変動は観察されなかった。一般状態では、1000 mg/kg 投与群で立毛が、2000 mg/kg 投与群では自発運動の低下及び立毛がみられ、毒性徴候が確認されたことから、投与量の妥当性が示された。

標本観察では、いずれの被験物質投与群においても MNPCE の出現率 (0.082~0.102%) は陰性対照背景データの上限 (0.25%) を超えず、各群における PCE20000 個あたりの MNPCE の出現頻度 (16~20) に関しても Kastenbaum と Bowman の条件付き二項検定において陰性対照群の出現頻度 (14) との間には有意差は認められなかった。また、PCE の割合においても、各被験物質投与群に有意な差は認められなかった。

陰性対照群の MNPCE 出現率 (0.072%) は、陰性対照背景データの範囲内 (0.01~0.25%) であった。一方、陽性対照である MMC 投与群では、PCE20000 個あたりの MNPCE の出現頻度 (813) は陰性対照群との間に有意な差が認められ、MNPCE の出現率 (4.068%) についても陽性対照背景データの範囲内 (1.13~5.61%) であったことから、試験の妥当性が確認された。

以上の結果より、雄 Crl:CD1 (ICR) 系マウスを用いた本試験条件下において、2-メチル-2-ペンテナールの染色体異常誘発性は陰性であると判定した。

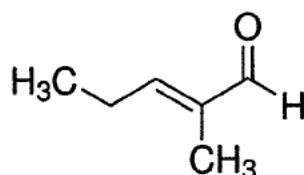
2 緒言

2-メチル-2-ペンテナールの安全性に関する試験の一環として、生体内での染色体異常誘発性の有無を検討するため、マウスを用いた小核試験を実施した。

3 試験材料及び方法

3.1 被験物質

名称	: 2-メチル-2-ペンテナール
英語化学名	: 2-Methyl-2-pentenal
CAS 番号	: 623-36-9
化学式	: C ₆ H ₁₀ O
分子量	: 98.14 g/mol
構造式	:



製造元	: [REDACTED]
入手先	: 国立医薬品食品衛生研究所
ロット番号	: [REDACTED]
純度	: 98.8%
外観及び性状	: 無色液体
不純物質情報	: データなし
融点	: データなし
沸点	: 137 - 138 °C at 1,020 hPa - lit.
引火点	: 32 °C - 密閉式引火点試験
溶解度	: データなし
試験責任者入手日	: [REDACTED]
保管条件	: 換気の良い場所で保管すること。涼しいところに置くこと。
保管場所	: [REDACTED] (許容範囲：2~10°C)
使用期限	: [REDACTED]
保管温度	: 被験物質管理責任者管理：実測値 4~7°C [REDACTED] 試験責任者管理：実測値 4~6°C [REDACTED]
取り扱い上の注意	: 換気フードの下で作業すること。吸い込まないこと。蒸気やエアロゾルが生じないようにすること。火災及び爆発の予防として

炎、熱及び発火源から遠ざける。静電気放電に対する予防措置を講ずること。保護具（眼鏡、手袋、マスク等）を使用する。

3.2 陽性対照物質

名称 : マイトマイシン C 【Mitomycin C】
 CAS No. : 50-07-7
 製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社
 規格・等級 : 生化学用
 ロット番号 : [REDACTED]
 純度 : 100%
 外観及び性状 : 暗紫色の粉末で、*N,N*-ジメチルアセトアミドに溶けやすく、水又はメタノールに溶けにくく、エタノールに極めて溶けにくい。
 安定性 : 光により変質するおそれがある。
 試験責任者入手日 : [REDACTED]
 保管条件 : 容器は遮光し、冷所（25°C 以下）に密閉して保管する。
 保管場所 : [REDACTED] (1~25°C)
 使用期限 : [REDACTED]
 保管温度 : 被験物質管理責任者管理：実測値 13.5~20.5°C
 ([REDACTED])
 試験責任者管理：実測値 13.5~18.5°C
 ([REDACTED])
 取り扱い上の注意 : 防塵マスク、ゴム手袋保護眼鏡等を着用し、吸飲や直接接触を避ける。

3.3 媒体

3.3.1 被験物質の調製に用いた媒体

媒体の選択は、2-メチル-2-ペンテナールの安全データシートに溶解度の情報がなかったため、小核試験で用いられる媒体の中から水、0.5%メチルセルロース（MC）水溶液及びオリブ油を用いて用量設定試験の最高投与量で使用する 20%(w/v)の調製検討を行った。

その結果、水及び 0.5%MC 水溶液では分離した状態であった。オリブ油では発泡、発熱、変色、沈殿、懸濁等の物理変化が無く、また、肉眼的に均一に溶解されていることを確認した。したがって、安定性及び均一性の確認は行っていないが、オリブ油を媒体とすることで問題はないと判断した。

名称 : オリブ油
 製造元 : ナカライテスク株式会社
 ロット番号 : [REDACTED]
 保管条件 : 室温
 保管場所 : [REDACTED] (許容範囲：1~30°C)

3.6.5 個体識別法

- 検疫・馴化期間中 : ケージラベルに試験番号、試験種（用量設定試験、本試験）、性別、仮動物番号及び検疫管理責任者名を明記した。動物の個体識別は、ケージラベル及び油性インク法（尾部）により行った。
- 群分け後 : ケージラベルに試験番号、試験種（用量設定試験、本試験）、性別、群番号、被験物質名及び投与濃度（投与濃度ごとに異なった色で表示を行い識別した）、動物番号、投与日、標本作製日（ただし用量設定試験は観察終了日）、試験責任者名を明記した。動物の個体識別は、ケージラベル及び油性インク法（尾部）により行った。

3.7 群分け方法

- 群分け方法 : コンピューターによる体重に基づく体重層別法
- 統計方法 : Bartlett 検定及び ANOVA（5%水準）で群間差がないことを確認した。
- 群分け実施日 : 投与開始前日

3.8 投与方法

被験物質投与群及び陰性対照（媒体）群は、ディスポーザブル注射筒（テルモ株式会社、1 mL）にディスポーザブルマウス用経口ゾンデ（有限会社フチガミ器械）を装着して、強制経口投与した。投与間隔は 24 時間（用量設定試験及び本試験共に±0分）とし、1日1回、2日間投与した。

陽性対照群は、ディスポーザブル注射筒（テルモ株式会社、1 mL）にディスポーザブル注射針（ニプロ株式会社、26G）を装着して腹腔内に単回投与した。

投与容量については投与日の体重に基づいて個体別に算出した。

3.9 投与経路及び投与方法の選択理由

投与経路は、ヒトが被験物質に暴露される可能性の高い経路である経口投与とし、強制経口投与方法を選択した。また、陽性対照物質は、通常の小核試験で実施される腹腔内投与を選択した。

これらの投与方法は、規定量を確実に投与可能な投与方法であるため選択した。

3.10 投与量及び群構成

3.10.1 用量設定試験

被験物質の投与量、投与容量、1群当たりの匹数及び動物番号は、次表の通りであった。

性別	群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	匹数	動物番号
雄	11M	2-メチル-2-ペンテナール	250	10	3	11M01 - 11M03
	12M	2-メチル-2-ペンテナール	500	10	3	12M01 - 12M03
	13M	2-メチル-2-ペンテナール	1000	10	3	13M01 - 13M03
	14M	2-メチル-2-ペンテナール	2000	10	3	14M01 - 14M03
雌	11F	2-メチル-2-ペンテナール	250	10	3	11F01 - 11F03
	12F	2-メチル-2-ペンテナール	500	10	3	12F01 - 12F03
	13F	2-メチル-2-ペンテナール	1000	10	3	13F01 - 13F03
	14F	2-メチル-2-ペンテナール	2000	10	3	14F01 - 14F03

3.10.2 本試験

被験物質の投与量、投与容量、1群当たりの匹数及び動物番号は、下表の通りであった。

性別	群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	匹数	動物番号
雄	01M	オリブ油 (媒体)	0	10	5	01M01 - 01M05
	02M	2-メチル-2-ペンテナール	500	10	5	02M01 - 02M05
	03M	2-メチル-2-ペンテナール	1000	10	5	03M01 - 03M05
	04M	2-メチル-2-ペンテナール	2000	10	5	04M01 - 04M05
	05M	MMC	2	10	5	05M01 - 05M05

3.11 投与量の設定理由

用量設定試験の投与量は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」及び「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS」を参考に最高投与量は2000 mg/kgを設定し、以下公比2で1000、500及び250 mg/kgを設定した。

その結果、雄雌とも被験物質投与群に死亡例はみられなかった。一般状態において、1000 mg/kg投与群の雄で立毛が2例みられた。2000 mg/kg投与群の雄で自発運動の低下及び立毛が3例、雌では自発運動の低下が2例にみられた。従って、毒性徴候に明らかな性差がみられなかったことから、本試験では雄のみを用い、最高投与量は2000 mg/kgとして、以下公比2で1000及び500 mg/kgを設定した。陰性対照は媒体のオリブ油を投与し、陽性対照のMMCは、明確な陽性反応の得られる用量として、2 mg/kgを設定した。

3.12 投与回数及び標本作製時期とその選択理由

投与回数は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」及びOECDガイドラインを参考に、被験物質投与群と陰性対照群とも24時間間隔で2回とし、標本採取は最終投与から24時間後に行った。陽性対照群は単回投与で、標本採取は投与24時間後に行った。

3.13 被験物質投与液の調製方法及び調製頻度

下表に従い必要量の被験物質を電子天秤 LA4200S（ザルトリウス株式会社）にてメスシリンダーに秤取し、オリブ油を加え所定量にメスアップした。秤取する際は、被験物質が純度 98.8%であったため純度換算は行わず、調製は用時とした。なお、投与に用いた投与液の濃度確認は実施しなかった。

3.13.1 用量設定試験の投与液濃度及び調製量

群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (%)	被験物質質量 (mg)	調製量 (mL)
11M、11F	2-メチル-2-ペンテナール	250	2.5	500	20
12M、12F	2-メチル-2-ペンテナール	500	5	500	10
13M、13F	2-メチル-2-ペンテナール	1000	10	1000	10
14M、14F	2-メチル-2-ペンテナール	2000	20	2000	10

3.13.2 本試験の投与液濃度及び調製量

群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (%)	被験物質質量 (mg)	調製量 (mL)
02M	2-メチル-2-ペンテナール	500	5	500	10
03M	2-メチル-2-ペンテナール	1000	10	1000	10
04M	2-メチル-2-ペンテナール	2000	20	2000	10

3.14 陽性対照物質の投与液の調製方法

MMC (10 mg) に媒体の生理食塩液を少量加えた。その後、メスシリンダーに移し、媒体で共洗いをしながら 50 mL にメスアップした。

3.15 測定項目及び観察

3.15.1 一般状態

下記に従い、すべての動物について一般行動、中毒症状、生死などについて観察し、個体別に記録した。

【用量設定試験】

投与日は、投与前 1 回、投与後 2 回（1-3 時間後・5-6 時間後）の計 3 回観察し、投与終了日の翌日は 1 回（午前）観察した。

【本試験】

投与日は、投与前 1 回、投与後 2 回（1-3 時間後・5-6 時間後）の計 3 回観察し、標本作製日の動物は 1 回（午前）観察した。

3.15.2 体重

全生存動物について、用量設定試験では最終投与の翌日まで毎日、本試験では標本作製日まで毎日、電子天秤 LA4200 型（ザルトリウス株式会社）を用いて個体別に体重を測定した。

3.15.3 用量設定試験の動物の処置

最終観察終了後の動物は、イソフルラン（マイラン製薬株式会社、ロット番号：[REDACTED]）麻酔下で頸椎脱臼により安楽死処理を行った。

3.15.4 標本作製

最終投与後、所定時間（24時間）経過後にマウスをイソフルラン（マイラン製薬株式会社、ロット番号：[REDACTED]）麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、大腿骨の両端を骨剪刀で切断し、骨髓細胞を牛胎仔血清（CORNING、FBS、ロット番号：[REDACTED]）1.0 mLで遠心管に洗い出し攪拌した。骨髓細胞を含むFBSを遠心分離した（日立小型冷却遠心機、CF7D2；日立工機株式会社）（1000 rpm [207.9×g]、5 min）。パスツールピペットを用いて上清を除去した後、残液を攪拌することにより骨髓細胞を再浮遊させ、この浮遊液より塗抹標本を2枚作製した。

乾燥させた塗抹標本をメタノール（富士フイルム和光純薬株式会社、ロット番号：[REDACTED]）で5分間固定後、リン酸緩衝液（株式会社LSIメディエンス、ロット番号：[REDACTED]）で3%に希釈したギムザ液（富士フイルム和光純薬株式会社、ロット番号：[REDACTED]）で30分間染色し、リン酸緩衝液で洗浄した後、0.004%クエン酸水溶液（富士フイルム和光純薬株式会社、ロット番号：[REDACTED]）に数秒間浸し、純水で洗浄を行い自然乾燥させた。

3.15.5 標本観察

小核標本の観察は、仮動物番号にてブラインド化した標本について10倍の接眼レンズと100倍の油浸対物レンズのセットされた顕微鏡を用いて行った。

赤芽球増殖抑制の程度の有無を判定するために個体あたり、多染性赤血球（PCE：polychromatic erythrocyte）と正染性赤血球（NCE：normochromatic erythrocyte）をあわせて1000個観察し、PCEの割合 $[PCE / (PCE + NCE)]$ を求めた。また、PCEを個体あたり4000個観察し、その内で小核を有する多染性赤血球（MNPCE：micronucleated polychromatic erythrocyte）を計測した。

3.15.6 試験の成立条件

以下に示す基準に該当する場合、試験が成立したと判断した。

- ① 陰性対照群のMNPCEの出現率が、当社の保有する陰性対照群の背景データの範囲（平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差）内であること。
- ② 陽性対照群のMNPCEの出現頻度が、陰性対照群と比較して統計学的に有意に増加し、陽性対照群のMNPCEの出現率が、当社の保有する陽性対照群の背景データの範囲（平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差）内であること。
- ③ 試験系に影響した要因が無いこと。

3.16 統計処理

用量設定試験及び本試験とも測定した体重については、統計処理は実施せず集計のみとした。

標本観察におけるいずれの測定値 [MNPCE の出現率、 $PCE / (PCE + NCE)$] とも、各群で平均値及び標準偏差を算出した。MNPCE 出現頻度の有意差判定は、Kastenbaum と Bowman (Mutation Res., 9, pp 527-549, 1970) の判定表を用い、条件付き二項検定を危険率 5% ($P < 0.05$) で行なった。

同時に観察した多染性赤血球の割合 [$PCE / (PCE + NCE)$] を、陰性対照群と被験物質投与群 (01M 群と 02M~04M 群) 及び陰性対照群と陽性対照群 (01M 群と 05M 群) との統計学的な有意差検定を行い、危険率 5% ($P < 0.05$) 又は 1% ($P < 0.01$) のレベルで判定した。統計学的解析は、多群間比較の場合は 5%有意水準で Bartlett 法による等分散検定を行った。等分散であったためパラメトリックの Dunnett 法による両側検定を行った。2 群間比較の場合は F 検定を行い、等分散であったため Student の t 検定 (両側) を行った。

3.17 判定基準

少なくとも 1 つの被験物質投与群で小核出現頻度が統計学的に有意に増加し、傾向検定により用量相関性が認められ、さらに陰性対照の背景データの範囲 (平均 \pm 2 \times 標準偏差) を超えている場合に陽性と判定した。一方、いずれの被験物質投与群においても小核出現頻度に統計学的に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。

3.18 資料の保管

本試験で発生した試験計画書及び試験計画変更書 (原本)、最終報告書 (原本)、動物、被験物質、飼育環境及び試験成績に関する記録、標本類、その他本試験に係る記録文書は、最終報告書提出後 5 年間、XXXXXXXXXXにて保管する。保管期間満了後は、試験委託者と協議の上、決定する。

3.19 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

特記すべき事項は無かった。

4 試験結果

4.1 生存率及び一般状態

各群の生存動物数を Table 1 に、一般状態を Table 2 に、個体別の一般状態を Appendix 1 に示した。また、用量設定試験の生存動物数及び一般状態は添付資料 (8 添付資料 8.1) にまとめた。

用量設定試験及び本試験ともに、被験物質投与群に死亡例は観察されなかった。

用量設定試験では、1000 及び 2000 mg/kg 投与群の雄で立毛が、2000 mg/kg 投与群の雄雌では自発運動の低下が 3 又は 2 例 (3/3 又は 2/3) にみられた。なお、250 及び 500 mg/kg 投与群の雄雌、1000 mg/kg 投与群の雌では、特記すべき症状は観察されなかった。

本試験では、1000 mg/kg 投与群で立毛が 3 例 (3/5) にみられ、2000 mg/kg 投与群では自発運動の低下が 3 例 (3/5)、立毛が 5 例 (5/5) にみられた。なお、500 mg/kg 投与群で、特記すべ

き症状は観察されなかった。

4.2 体重

各群の平均体重及び標準偏差を Table 3 に、個体別の値を Appendix 2 に示した。また、用量設定試験の体重は添付資料 (8 添付資料 8.1) にまとめた。

用量設定試験では、500 mg/kg 投与群の雄 1 例に体重減少傾向 (約 4%) がみられた。本試験では、被験物質投与に起因すると思われる体重変動は観察されなかった。

4.3 小核標本観察結果

小核標本観察結果を Table 4 に、個体別の値を Appendix 3 に示した。

MNPCE の出現率は、陰性対照群では $0.072 \pm 0.022\%$ 、被験物質投与群では 500、1000 及び 2000 mg/kg 投与群においてそれぞれ 0.102 ± 0.018 、 0.082 ± 0.047 及び $0.100 \pm 0.057\%$ であった。なお、これらの MNPCE の出現率は、陰性対照背景データ (8 添付資料 8.2) の分布から推定した MNPCE の上限 (0.25%) を超えなかった。陽性対照群では、MNPCE の出現率は $4.068 \pm 0.647\%$ であり、陽性対照背景データの分布から推定した MNPCE の範囲内 (1.13~5.61%) であった。

各群における PCE20000 個あたりの MNPCE の出現頻度は、Kastenbaum と Bowman の条件付き二項検定において、被験物質投与群 (MNPCE:16~20 / 20000) では陰性対照群 (MNPCE:14 / 20000) との間に有意差は認められなかった。陽性対照群 (MNPCE:813 / 20000) においては陰性対照群との間に有意な差が認められた。

同時に観察した PCE の割合においては、陰性対照群の 51.44% に対して被験物質投与群では 51.22~54.04% であり、統計学的に有意差は認められなかった。陽性対照群においては 44.38% で陰性対照群に対して統計学的に有意差が認められた。

5 考察

2-メチル-2-ペンテナールの生体内での染色体異常誘発性の有無を検討するため、マウスを用いた小核試験を実施した。

小核試験に使用する用量及び性別を設定するために実施した予備試験の結果を元に、本試験では雄の Crl:CD1 (ICR) 系マウスを用い、2-メチル-2-ペンテナールを 500、1000 及び 2000 mg/kg (10 mL/kg) の投与量で 1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。陰性対照群には、オリブ油を同様の方法で投与し、また、陽性対照群には MMC の 2 mg/kg を単回腹腔内投与した。最終投与後 24 時間に骨髓細胞塗抹標本を作製し、観察した。

その結果、被験物質投与群に死亡例はみられず、体重への影響も認められなかったが、一般状態では、1000 mg/kg 投与群で立毛が、2000 mg/kg 投与群では自発運動の低下及び立毛がみられ、毒性徴候が確認されたことから、投与量の妥当性が示された。

標本観察では、いずれの被験物質投与群においても MNPCE の出現率 (0.082~0.102%) は陰性対照背景データの上限 (0.25%) を超えず、各群における PCE20000 個あたりの MNPCE の出現頻度 (16~20) に関しても Kastenbaum と Bowman の条件付き二項検定において陰性対照群

の出現頻度（14）との間に有意な差は認められなかった。同時に観察した PCE の割合においても、各被験物質投与群に有意な差は認められなかった。

一方、陰性対照群および陽性対照である MMC 投与群における MNPCE の出現率は当施設の背景データの範囲内であったこと、また、MMC 投与群で MNPCE の出現頻度の有意な増加が認められたことから、本試験の妥当性が確認された。

以上の結果より、雄 Crl:CD1 (ICR) 系マウスを用いた本試験条件下において、2-メチル-2-ペンテナールの染色体異常誘発性は陰性であると判定した。

6 総括表



Table 1 Survival rate - Daily

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Day		
			1	2	3
Male	Olive oil	0	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	2-Methyl-2-pentenal	500	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	2-Methyl-2-pentenal	1000	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	2-Methyl-2-pentenal	2000	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	MMC	2	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	

Number of surviving / Total number of animals (Survival rate)



Table 2 General clinical observation

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Findings	(Frequency or time)	Day						
					1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Male	Olive oil	0	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
			Normal		5	5	5	5	5	5	5
	2-Methyl-2-pentenal	500	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
			Normal		5	5	5	5	5	5	5
	2-Methyl-2-pentenal	1000	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
			Normal		5	4	5	5	2	3	5
			Piloerection		0	1	0	0	3	2	0
	2-Methyl-2-pentenal	2000	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
			Normal		5	3	2	4	1	0	1
			Decrease in locomotor activity		0	1	3	0	1	3	0
			Piloerection		0	2	2	1	4	5	4
	MMC	2	No. of animals		5	5	5	5			
Normal				5	5	5	5				



Table 3 Body weights (g) - Group mean values (mean \pm S.D.)

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	No. of animals	Initial B.W.	Day	
					2	3
Male	Olive oil	0	5	34.4 \pm 1.3	34.3 \pm 1.6	34.9 \pm 1.6
	2-Methyl-2-pentenal	500	5	35.1 \pm 1.8	35.1 \pm 1.7	35.3 \pm 1.5
	2-Methyl-2-pentenal	1000	5	34.4 \pm 1.8	34.7 \pm 1.6	34.8 \pm 2.0
	2-Methyl-2-pentenal	2000	5	35.3 \pm 1.4	35.0 \pm 1.0	35.7 \pm 1.2
	MMC	2	5	34.8 \pm 1.5	35.1 \pm 1.4	

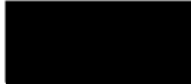


Table 4 Results of micronucleus observation

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Sampling time (hr)	No. of animals	MNPCE ^{a)}	Incidence of MNPCE ^{a)} (%)	Judgement	PCE/(PCE+NCE) (%)
Male	Olive oil	0	24	5	14	0.072 ± 0.022	-	51.44 ± 2.04
	2-Methyl-2-pentenal	500	24	5	20	0.102 ± 0.018	-	52.26 ± 3.37
	2-Methyl-2-pentenal	1000	24	5	16	0.082 ± 0.047	-	54.04 ± 1.92
	2-Methyl-2-pentenal	2000	24	5	19	0.100 ± 0.057	-	51.22 ± 2.88
	MMC	2	24	5	813 ^{##}	4.068 ± 0.647	+	44.38 ± 1.12**

MNPCE : micronucleated polychromatic erythrocyte

a) : Based on 4000 polychromatic erythrocytes per animal.

PCE/(PCE+NCE) : polychromatic erythrocytes/(polychromatic erythrocytes + normochromatic erythrocytes)

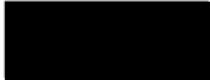
- : Negative

+ : Positive

Significantly different from the control group ; ^{##}:p<0.01 (Kastenbaum and Bowman).

Significantly different from the control group ; **:p<0.01 (t-test).

7 個体別表



Appendix 1 General clinical observation - Individual values

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	(Frequency or time)	Day						
						1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Male	Olive oil	0	01M01			-	-	-	-	-	-	-
			01M02			-	-	-	-	-	-	-
			01M03			-	-	-	-	-	-	-
			01M04			-	-	-	-	-	-	-
			01M05			-	-	-	-	-	-	-
	2-Methyl-2-pentenal	500	02M01			-	-	-	-	-	-	-
			02M02			-	-	-	-	-	-	-
			02M03			-	-	-	-	-	-	-
			02M04			-	-	-	-	-	-	-
			02M05			-	-	-	-	-	-	-
	2-Methyl-2-pentenal	1000	03M01			-	-	-	-	b	b	-
			03M02			-	-	-	-	-	-	-
			03M03			-	-	-	-	-	-	-
			03M04			-	-	-	-	b	b	-
			03M05			-	b	-	-	b	-	-
	2-Methyl-2-pentenal	2000	04M01			-	-	ab	-	ab	ab	b
			04M02			-	b	ab	b	b	ab	b
			04M03			-	-	-	-	b	b	b
			04M04			-	ab	a	-	b	ab	b
			04M05			-	-	-	-	-	b	-
MMC	2	05M01			-	-	-	-	-	-	-	
		05M02			-	-	-	-	-	-	-	
		05M03			-	-	-	-	-	-	-	
		05M04			-	-	-	-	-	-	-	
		05M05			-	-	-	-	-	-	-	

a : Decrease in locomotor activity; b : Piloerection

- : Normal

Appendix 2 Body weights (g) - Individual values

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	Initial B.W.	Day 2	3
Male	Olive oil	0	01M01		32.8	32.7	33.2
			01M02		35.8	36.1	36.8
			01M03		35.6	35.9	36.5
			01M04		33.7	33.6	34.4
			01M05		34.2	33.3	33.8
			Mean		34.4	34.3	34.9
			S.D.		1.3	1.6	1.6
	2-Methyl-2-pentenal	500	02M01		37.6	37.6	37.5
			02M02		34.6	34.8	34.6
			02M03		33.2	34.1	34.3
			02M04		36.3	35.8	36.3
			02M05		33.8	33.3	33.9
			Mean		35.1	35.1	35.3
			S.D.		1.8	1.7	1.5
	2-Methyl-2-pentenal	1000	03M01		34.1	34.5	33.1
			03M02		36.6	36.8	37.4
			03M03		34.0	34.7	35.3
			03M04		31.8	32.3	32.5
			03M05		35.7	35.4	35.6
			Mean		34.4	34.7	34.8
			S.D.		1.8	1.6	2.0
2-Methyl-2-pentenal	2000	04M01		35.1	35.5	36.2	
		04M02		33.9	34.2	34.7	
		04M03		36.7	36.6	37.3	
		04M04		36.8	34.8	36.2	
		04M05		34.0	34.1	34.3	
		Mean		35.3	35.0	35.7	
		S.D.		1.4	1.0	1.2	
MMC	2	05M01		33.2	33.9		
		05M02		35.2	35.7		
		05M03		36.2	36.6		
		05M04		33.1	33.3		
		05M05		36.1	36.0		
		Mean		34.8	35.1		
		S.D.		1.5	1.4		

Appendix 3 Results of micronucleus observation - Individual values

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Sampling time (hr)	Animal number	MNPCE ^{a)}	Incidence of MNPCE ^{a)} (%)	PCE/(PCE+NCE) (%)	
Male	Olive oil	0	24	01M01	3	0.08	52.6	
				01M02	3	0.08	48.7	
				01M03	2	0.05	54.1	
				01M04	4	0.10	50.6	
				01M05	2	0.05	51.2	
				Total	14			
				N		5	5	
				Mean		0.072	51.44	
				S.D.		0.022	2.04	
		2-Methyl-2-pentenal	500	24	02M01	5	0.13	54.0
	02M02				3	0.08	55.1	
	02M03				4	0.10	53.3	
	02M04				4	0.10	46.5	
	02M05				4	0.10	52.4	
				Total	20			
				N		5	5	
				Mean		0.102	52.26	
				S.D.		0.018	3.37	
		2-Methyl-2-pentenal	1000	24	03M01	2	0.05	54.6
	03M02				4	0.10	54.4	
03M03	1				0.03	53.7		
03M04	3				0.08	56.4		
03M05	6				0.15	51.1		
			Total	16				
			N		5	5		
			Mean		0.082	54.04		
			S.D.		0.047	1.92		
	2-Methyl-2-pentenal	2000	24	04M01	5	0.13	53.1	
04M02				3	0.08	55.3		
04M03				1	0.03	48.5		
04M04				3	0.08	49.2		
04M05				7	0.18	50.0		
			Total	19				
			N		5	5		
			Mean		0.100	51.22		
			S.D.		0.057	2.88		
	MMC	2	24	05M01	142	3.55	43.9	
05M02				175	4.38	44.1		
05M03				202	5.05	44.5		
05M04				141	3.53	43.2		
05M05				153	3.83	46.2		
			Total	813				
			N		5	5		
			Mean		4.068	44.38		
			S.D.		0.647	1.12		

MNPCE : micronucleated polychromatic erythrocyte

a) : Based on 4000 polychromatic erythrocytes per animal.

PCE/(PCE+NCE) : polychromatic erythrocytes/(polychromatic erythrocytes + normochromatic erythrocytes)

8 添付資料

8.1 用量設定試験 総括表及び個別表

Attachment table 1 Survival rate - Daily

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Day					
			1		2		3	
Male	2-Methyl-2-pentenal	250	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)
	2-Methyl-2-pentenal	500	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)
	2-Methyl-2-pentenal	1000	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)
	2-Methyl-2-pentenal	2000	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)
Female	2-Methyl-2-pentenal	250	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)
	2-Methyl-2-pentenal	500	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)
	2-Methyl-2-pentenal	1000	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)
	2-Methyl-2-pentenal	2000	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)	3 / 3	(100.0)

Number of surviving / Total number of animals (Survival rate)

Attachment table 2 General clinical observation

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Findings	(Frequency or time)	Day						
					1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Male	2-Methyl-2-pentenal	250	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
			Normal		3	3	3	3	3	3	3
	2-Methyl-2-pentenal	500	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
			Normal		3	3	3	3	3	3	3
	2-Methyl-2-pentenal	1000	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
			Normal		3	2	1	3	3	1	3
			Piloerection		0	1	2	0	0	2	0
	2-Methyl-2-pentenal	2000	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
			Normal		3	0	1	1	0	0	0
			Decrease in locomotor activity		0	3	1	0	2	2	0
			Piloerection		0	2	2	2	3	3	3

Attachment table 2 General clinical observation (Continued)

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Findings	(Frequency or time)	Day						
					1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Female	2-Methyl-2-pentenal	250	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
			Normal		3	3	3	3	3	3	3
	2-Methyl-2-pentenal	500	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
			Normal		3	3	3	3	3	3	3
	2-Methyl-2-pentenal	1000	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
			Normal		3	3	3	3	3	3	3
			Piloerection		0	0	0	0	0	0	0
	2-Methyl-2-pentenal	2000	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
			Normal		3	2	3	3	2	2	3
			Decrease in locomotor activity		0	1	0	0	1	1	0
			Piloerection		0	0	0	0	0	0	0

Attachment table 3 Body weights (g) - Group mean values (mean ± S.D.)

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	No. of animals	Initial B.W.	Day 2	3
Male	2-Methyl-2-pentenal	250	3	35.3 ± 2.6	35.1 ± 1.9	35.5 ± 1.7
	2-Methyl-2-pentenal	500	3	35.2 ± 1.7	35.2 ± 1.0	35.1 ± 0.4
	2-Methyl-2-pentenal	1000	3	34.8 ± 2.3	35.2 ± 2.3	35.4 ± 2.1
	2-Methyl-2-pentenal	2000	3	35.3 ± 1.6	35.4 ± 2.3	35.9 ± 2.5
Female	2-Methyl-2-pentenal	250	3	26.5 ± 2.0	26.6 ± 1.7	26.9 ± 1.7
	2-Methyl-2-pentenal	500	3	27.0 ± 1.1	27.1 ± 0.7	27.5 ± 1.1
	2-Methyl-2-pentenal	1000	3	26.9 ± 1.7	26.8 ± 1.5	26.5 ± 1.9
	2-Methyl-2-pentenal	2000	3	27.0 ± 1.6	26.6 ± 2.0	27.4 ± 1.8



Attachment appendix 1 General clinical observation - Individual values

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	(Frequency or time)	Day						
						1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Male	2-Methyl-2-pentenal	250	11M01			-	-	-	-	-	-	-
			11M02			-	-	-	-	-	-	-
			11M03			-	-	-	-	-	-	-
	2-Methyl-2-pentenal	500	12M01			-	-	-	-	-	-	-
			12M02			-	-	-	-	-	-	-
			12M03			-	-	-	-	-	-	-
	2-Methyl-2-pentenal	1000	13M01			-	b	b	-	-	b	-
			13M02			-	-	-	-	-	-	-
			13M03			-	-	b	-	-	b	-
	2-Methyl-2-pentenal	2000	14M01			-	ab	b	-	ab	ab	b
			14M02			-	ab	-	b	b	b	b
			14M03			-	a	ab	b	ab	ab	b

a : Decrease in locomotor activity; b : Piloerection
 - : Normal

Attachment appendix 1 General clinical observation - Individual values (Continued)

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	(Frequency or time)	Day						
						1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Female	2-Methyl-2-pentenal	250	11F01			-	-	-	-	-	-	-
			11F02			-	-	-	-	-	-	-
			11F03			-	-	-	-	-	-	-
	2-Methyl-2-pentenal	500	12F01			-	-	-	-	-	-	-
			12F02			-	-	-	-	-	-	-
			12F03			-	-	-	-	-	-	-
	2-Methyl-2-pentenal	1000	13F01			-	-	-	-	-	-	-
			13F02			-	-	-	-	-	-	-
			13F03			-	-	-	-	-	-	-
	2-Methyl-2-pentenal	2000	14F01			-	a	-	-	-	-	-
			14F02			-	-	-	-	-	-	-
			14F03			-	-	-	-	a	a	-

a : Decrease in locomotor activity

- : Normal

Attachment appendix 2 Body weights (g) - Individual values

Sex	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	Initial B.W.	Day 2	3
Male	2-Methyl-2-pentenal	250	11M01		36.6	35.7	35.7
			11M02		37.1	36.7	37.0
			11M03		32.3	33.0	33.7
			Mean		35.3	35.1	35.5
			S.D.		2.6	1.9	1.7
	2-Methyl-2-pentenal	500	12M01		34.7	35.0	35.0
			12M02		33.8	34.3	34.8
			12M03		37.1	36.3	35.6
			Mean		35.2	35.2	35.1
			S.D.		1.7	1.0	0.4
	2-Methyl-2-pentenal	1000	13M01		34.1	34.7	34.8
			13M02		32.9	33.2	33.6
			13M03		37.4	37.8	37.7
			Mean		34.8	35.2	35.4
			S.D.		2.3	2.3	2.1
	2-Methyl-2-pentenal	2000	14M01		36.8	37.9	38.3
			14M02		35.4	35.1	35.9
			14M03		33.7	33.3	33.4
			Mean		35.3	35.4	35.9
			S.D.		1.6	2.3	2.5
Female	2-Methyl-2-pentenal	250	11F01		28.1	27.7	27.7
			11F02		24.2	24.7	24.9
			11F03		27.1	27.4	28.0
			Mean		26.5	26.6	26.9
			S.D.		2.0	1.7	1.7
	2-Methyl-2-pentenal	500	12F01		28.3	27.8	28.7
			12F02		26.5	27.0	27.2
			12F03		26.3	26.5	26.5
			Mean		27.0	27.1	27.5
			S.D.		1.1	0.7	1.1
	2-Methyl-2-pentenal	1000	13F01		25.1	25.4	24.6
			13F02		28.4	28.4	28.4
			13F03		27.1	26.7	26.6
			Mean		26.9	26.8	26.5
			S.D.		1.7	1.5	1.9
	2-Methyl-2-pentenal	2000	14F01		25.7	24.4	25.6
			14F02		28.8	28.4	29.2
			14F03		26.4	27.0	27.4
			Mean		27.0	26.6	27.4
			S.D.		1.6	2.0	1.8

8 添付資料

8.2 Background Data for Micronucleus Tests

Background Data for Micronucleus Tests

Animal used: Mouse (SPF), CD1 (ICR), male, 7-8 week old.

Supplier of animal : Charles River Japan Inc.

Accumulation of data : 2015~2020

Group	Item	MNPCE (%)	PCE / (PCE+NCE) (%)
Negative control (n = 130)	MEAN ± S.D.	0.13 ± 0.06	50.09 ± 1.92
	min / max	0.03 / 0.35	44.8 / 54.6
	Control limits (MEAN ± 2×S.D.)	0.01 ~ 0.25	46.25 ~ 53.93
Positive control Mitomycin C 2 mg/kg i.p. (n = 130)	MEAN ± S.D.	3.37 ± 1.12	46.57 ± 3.14
	min / max	0.95 / 6.60	40.1 / 54.5
	Control limits (MEAN ± 2×S.D.)	1.13 ~ 5.61	40.29 ~ 52.85