

最 終 報 告 書

5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールのマウスを用いた小核試験

試験番号

試験期間

試験実施施設

試験委託者  
国立医薬品食品衛生研究所

試験受託者

# 1. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	4
2.1	試験番号	4
2.2	試験表題	4
2.3	試験目的	4
2.4	試験委託者	4
2.5	試験受託者	4
2.6	試験実施施設	4
2.7	試験日程	4
2.8	試験責任者	5
2.9	試験担当者	5
2.10	資料保存	5
2.11	試験責任者の記名・押印	5
3.	要約	6
4.	緒言	7
5.	試験材料及び方法	8
5.1	被験物質、媒体及び陽性対照物質	8
5.1.1	被験物質	8
5.1.2	媒体	8
5.1.3	陽性対照物質	9
5.2	投与液の調製	9
5.2.1	陰性対照群投与液（媒体）の調製	9
5.2.2	被験液の調製	9
5.2.2.1	調製方法	9
5.2.2.2	保存方法	9
5.2.2.3	安定性	10
5.2.3	陽性対照群投与液の調製	10
5.3	試験動物種及び系統の選択理由	10
5.4	試験動物	10
5.5	飼育条件	10
5.6	飼料、飲料水及び床敷中の混入物質	11
5.7	動物の識別及びケージへの表示	11
5.8	群分け	11
5.9	投与経路、投与方法及びそれらの選択理由	11
5.10	投与量及びその設定根拠並びに群構成	12
5.10.1	予備試験	12

5.10.2	本試験	12
5.11	観察及び検査の方法	13
5.11.1	一般状態の観察	13
5.11.2	体重測定	13
5.11.3	骨髓塗抹標本の作製	13
5.11.4	骨髓塗抹標本の観察	13
5.11.5	観察結果の算出	14
6.	試験結果	15
6.1	予備試験	15
6.1.1	一般状態	15
6.1.2	体重	15
6.2	本試験	15
6.2.1	一般状態	15
6.2.2	体重	15
6.2.3	骨髓塗抹標本の観察結果	15
7.	考察	16
8.	参考文献	17

## 表

Table 1	Clinical signs	18
Table 2	Body weight	19
Table 3	Observation of bone marrow smears (About 24 hours after the 2nd administration)	20

## 付表

Appendix 1-1、1-2	Clinical signs, individual data (Preliminary study)	21
Appendix 2-1、2-2	Body weight, individual data (Preliminary study)	23
Appendix 3	Clinical signs, individual data	25
Appendix 4	Body weight, individual data	26
Appendix 5	Observation of bone marrow smears, individual data (About 24 hours after the 2nd administration)	27

[Redacted]

## 2. 試験実施概要

### 2.1 試験番号

[Redacted]

### 2.2 試験表題

5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールのマウスを用いた小核試験  
(A micronucleus test of 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal in mice)

### 2.3 試験目的

マウスの骨髄細胞を用いて、5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの *in vivo* における染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

### 2.4 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

[Redacted]  
[Redacted]

### 2.5 試験受託者

[Redacted]  
[Redacted]

### 2.6 試験実施施設

[Redacted]  
[Redacted]

### 2.7 試験日程

試験開始日 : [Redacted]  
被験物質受領日 : [Redacted]  
試験責任者への被験物質配布日 : [Redacted]  
実験開始日 (予備試験 1 回目の投与日) : [Redacted]  
予備試験 : [Redacted]  
動物入荷日 : [Redacted]

[Redacted]

投与日 : [Redacted]

本試験  
動物入荷日 : [Redacted]  
投与日 : [Redacted]

骨髄採取日 : [Redacted]  
実験終了日 (本試験の標本観察終了日)  
: [Redacted]  
試験終了日 : [Redacted]

## 2.8 試験責任者

[Redacted]

[Redacted]

## 2.9 試験担当者

被験物質保存責任者 : [Redacted]  
試験主担当者 : [Redacted]

## 2.10 資料保存

試験計画書原本、記録文書、生データ及び報告書類 (最終報告書は原本) は [Redacted] の資料保存施設に保存する。保存期間は最終報告書提出後 5 年間とする。期間終了後の保存については、国立医薬品食品衛生研究所と [Redacted] 間で協議し、その処置を決定する。

## 2.11 試験責任者の記名・押印

[Redacted] [Redacted] [Redacted]

[Redacted]

### 3. 要約

5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの染色体異常誘発能の有無を検討するため、CrI:CD1(ICR)系マウスの骨髄細胞を用いて小核試験を実施した。

5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの 250、500 及び 1000 mg/kg/日を約 24 時間間隔で2回経口投与し、2回目投与後約24時間に骨髄塗抹標本を作製して観察を行った。

また、陰性対照としてコーン油を被験物質投与群と同じ用量及び同じ頻度で投与する群、陽性対照としてマイトマイシンCの1mg/kgを腹腔内に1回投与する群を設定し、投与後所定の時間に骨髄塗抹標本を作製して観察を行った。1群当たりの動物数は雄5匹とした。

その結果、各被験物質投与群の幼若赤血球 4000 個中に占める小核を有する幼若赤血球の出現頻度は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示さず、用量依存的な増加も認められなかった。

また、各被験物質投与群における全赤血球 500 個中に占める幼若赤血球の出現頻度は、陰性対照群と比較して、統計学的に有意な変化を示さなかった。

なお、陽性対照群では小核を有する幼若赤血球の出現頻度が陰性対照群と比較して統計学的に有意 ( $P < 0.05$ ) な増加を示した。更に、陰性対照群と陽性対照群の小核を有する幼若赤血球の出現頻度は、当施設における各々の背景データの Mean  $\pm$  3 S.D. の範囲内であったことから、試験は適切に実施されたことが示された。

以上の結果から、5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールは本試験条件下でCrI:CD1(ICR)系マウスの骨髄細胞において、染色体異常誘発能は無いと判定した。

#### 4. 緒言

国立医薬品食品衛生研究所からの委託により、5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの安全性評価の一環として、マウス骨髄を用いた小核試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して行った。

##### 毒性試験ガイドライン

- 「OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 474」  
(OECD : 2014年9月26日)
- 「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」  
(平成8年3月22日 : 衛化第29号厚生省生活衛生局長)

##### 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)
- 「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)
- 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」  
(日本学術会議、平成18年6月1日)

本試験は、試験施設の動物実験委員会の承認を受けて実施した(承認番号:G160334)。

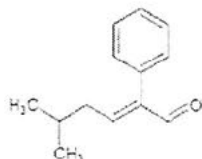
## 5. 試験材料及び方法

### 5.1 被験物質、媒体及び陽性対照物質

#### 5.1.1 被験物質

以下の被験物質情報は、供給者において得られたものである。当該試験に使用した被験物質のロット番号、性状等は以下の通りである。

供給者	:	████████████████████
被験物質名	:	5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナール
英名	:	5-methyl-2-phenyl-2-hexenal
ロット番号	:	████████████████
CAS 番号	:	21834-92-4
構造式	:	



分子式	:	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O
分子量	:	188.27
性状	:	無色~黄色の透明な液体、特有の香気を有する。
含量	:	95.9%
比重 (d <sub>20</sub> /20)	:	0.9751
屈折率 (n <sub>20</sub> /D)	:	1.5336
酸価 (KOH-mg/g)	:	4.85
融点	:	情報なし
沸点	:	100°C/0.9kPa
入手量	:	約 100 mL×2 本
保存方法	:	冷蔵 (実測値: 2.4°C~6.8°C)、開封後窒素封入
製造年月日	:	████████████████████
使用期限	:	████████████████████
保存場所	:	████████████████████
返却	:	動物試験終了後の残量は全て試験施設で廃棄した。

#### 5.1.2 媒体

名称	:	コーン油
規格	:	生化学用
メーカー	:	和光純薬工業株式会社

ロット番号 : [REDACTED]  
保存方法 : 室温  
保存場所 : [REDACTED]  
選択理由 : 被験物質が第4類 第三石油類であることから選択した。

### 5.1.3 陽性対照物質

名称 : マイトマイシン C (以下 MMC と記す。)  
メーカー : 協和発酵キリン株式会社  
ロット番号 : [REDACTED]  
力価 : 2 mg/vial  
保存方法 : 室温、遮光  
保存場所 : [REDACTED]  
選択理由 : MMC はマウス骨髄細胞に小核の誘発が知られており、小核試験に広く用いられ、背景データが豊富であることから選択した。

## 5.2 投与液の調製

### 5.2.1 陰性対照群投与液 (媒体) の調製

媒体をそのまま用いた。また、本試験では陰性対照用として被験物質を秤取する前に、1日必要量の媒体を褐色ガラス瓶に分注した。

### 5.2.2 被験液の調製

#### 5.2.2.1 調製方法

1. 濃度ごとに必要量の被験物質をビーカーに秤取した (秤量時の許容範囲は理論値の $\pm 1\%$ 以内)。
2. 最終調製量の 6~8 割程度の媒体をビーカーに入れ、マグネチックスターラーで攪拌しながら希釈した。
3. 希釈後、各被験液をメスシリンダーに移した。ビーカーを少量の媒体で数回洗浄してその液もメスシリンダーに加えた。
4. 媒体を加えて、各被験液を規定量とした後、メスシリンダーの口をラップで密封し、十分に転倒混和した。
5. 投与用として 1日必要量を褐色ガラス瓶に分注した。投与前は手で十分に混和した。

#### 5.2.2.2 保存方法

用時調製とし保存しなかった。

### 5.2.2.3 安定性

被験液の調製時において発泡、発熱の無いことを確認した。

### 5.2.3 陽性対照群投与液の調製

用時に、MMCの0.1 mg/mL水溶液を調製した。すなわち、MMC (2 mg/vial) 1瓶を注射用水<sup>注1</sup> 5 mLで溶解した後、2 mLを採取して、生理食塩液<sup>注2</sup>を6 mL加えて8 mLとした。

注1： 日本薬局方〔株式会社大塚製薬工場、ロット番号：[REDACTED]〕

注2： 日本薬局方〔株式会社大塚製薬工場、ロット番号：[REDACTED]〕

### 5.3 試験動物種及び系統の選択理由

マウスは小核試験に広く用いられており、この試験に使用される系統のマウス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。

### 5.4 試験動物

ICR系SPFマウス(CrI:CD1(ICR)、日本チャールス・リバー株式会社、日野飼育センター)を7週齢で、予備試験用として雌雄各15匹<sup>注1</sup>、本試験用として雄30匹<sup>注2</sup>を購入し、予備試験、本試験とも入荷日を1日と数え、8日間検疫・馴化飼育した。

検疫・馴化期間中には体重測定(入荷日、検疫終了日及び群分け日)及び体外表、栄養状態、行動などの一般状態を1日1回観察し、その結果をもとに異常のない動物(予備試験は雌雄各12匹、本試験では雄25匹)を選択し、8週齢で試験に供した。

使用した動物の群分け日(1回目投与日、陽性対照群は投与前日)における体重範囲は、予備試験が雄32.7~37.8 g、雌24.5~28.4 g、本試験が雄33.2~40.5 gであった。

群分け時の体重範囲は平均値±20%以内であった。

注1： 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各14匹であったが、実際には雌雄各15匹が納入された。

注2： 試験計画書に従い、注文匹数は雄29匹であったが、実際には雄30匹が納入された。

### 5.5 飼育条件

動物は温度(許容範囲23±3°C)が予備試験22~23°C、本試験23~24°C、相対湿度(許容範囲50±20%)が予備試験41~43%、本試験41~47%、換気回数1時間当たり10~15回、照明1日12時間(07:00~19:00)の飼育室(飼育室番号：[REDACTED])

[REDACTED])で床敷(ALPHA-dri: Shepherd Specialty Papers, Inc.、ロット番号：[REDACTED])を入れたプラスチックケージ(W230×D335×H140 mm: 日本クレア株式会社)に1匹ずつ収容し、固形飼料CR-LPF(放射線滅菌: オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：[REDACTED])

[REDACTED]、ステンレス製給餌器を使用)及び飲料水([REDACTED]水道水: 給水瓶使用)を自由に摂取させ飼育した。また、環境エンリッチメントとして7979C.CS certified/irradiated Diamond Twists (Envigo RMS, Inc.、ロット番号：[REDACTED])

) を 1 週間に 1 回以上の頻度で与えた。更に、個別飼育のためステンレス棒を設置した。

## 5.6 飼料、飲料水及び床敷中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用したロットについて Eurofins Food and Product Testing で分析を行い、飲料水については芝浦セムテック株式会社で水道法に準拠する水質検査を定期的に（年 4 回）行った。床敷中の混入物質に関しては使用したロットについて N.P ANALYTICAL LABORATORIES で分析を行った。これらの分析データは試験成績に及ぼす影響がないことを確認し、その写しを保存した。

## 5.7 動物の識別及びケージへの表示

- 小動物用耳標 : 予備試験では 861~875（雄）、876~890（雌）、本試験では 131~160（雄）の番号が刻印された耳標を入荷時に装着した。
- 動物番号 : 群ごとに 4 桁の番号をつけた。この場合、1000 の位は群（予備試験では低、中、高及び最高用量群の順、本試験では陰性対照群、低、中、高用量群及び陽性対照群の順）、100 の位は性（雄は 0 番、雌は 1 番）、10 と 1 の位は個体番号とした。個体番号は、予備試験では 1 から始まる番号、本試験では 11 から始まる番号とした。各飼育ケージに用量（群）ごとに色分けしたケージラベルを付け、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号及び耳標番号を明記した。

## 5.8 群分け

検疫・馴化期間中に、体重増加量（検疫初回の体重から群分け時の体重）及び一般状態に異常がみられなかった個体を使用した。群分け当日（1 回目投与日、陽性対照群は投与前日）の体重を基に、各群の平均体重ができるだけ均等に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り当てた）により行った。群分け後の余剰動物は、1 回目の投与日に予備試験、本試験とも試験より除外し、研修・研究用動物として動物管理責任者に移管した（予備試験： 、本試験： ）。

## 5.9 投与経路、投与方法及びそれらの選択理由

投与経路は、毒性試験に一般的に用いられる経口投与とした。投与容量は 10 mL/kg 体重とし、マウスにフレキシブル胃ゾンデを用いて、約 24 時間間隔で 2 回投与した。

陰性対照群には媒体を同様に投与した。陽性対照群には MMC を 26 G の注射針を用

いて腹腔内に1回投与した。陽性対照群の投与容量は10 mL/kg 体重とした。個体ごとの投与液量（表示単位：0.01 mL）は投与日の体重を基準に算出した。また、投与前に被験液を手で十分に混和してから投与に用いた。

## 5.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

### 5.10.1 予備試験

本試験における投与量を設定するために予備試験を行った。

予備試験の投与量は毒性試験ガイドラインで定める2000 mg/kg/日を最高用量とし、以下公比2で除して1000 mg/kg/日を高用量、500 mg/kg/日を中用量、250 mg/kg/日を低用量の4用量を設定して4群構成とした。1群当たりの動物数は雌雄各3匹とした。群構成を表5-1に示す。

なお、2回目投与から約24時間後に生存していた動物は炭酸ガスにより安楽死させた。

表 5-1. 予備試験群構成表

群	投与量 (mg/kg/日)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与 回数	性	動物数	動物番号
低用量	250	25	10	2	雄	3	1001~1003
					雌	3	1101~1103
中用量	500	50	10	2	雄	3	2001~2003
					雌	3	2101~2103
高用量	1000	100	10	2	雄	3	3001~3003
					雌	3	3101~3103
最高用量	2000	200	10	2	雄	3	4001~4003
					雌	3	4101~4103

### 5.10.2 本試験

予備試験の結果、2回目投与翌日までに2000 mg/kg/日投与群の雌1例の死亡が確認された。一般状態では自発運動の減少が2000 mg/kg/日投与群の雌1例にみられ、腹臥・横臥が2000 mg/kg/日投与群の雄2例、低温低下が2000 mg/kg/日投与群の雄1例にみられた。体重については減少傾向を示す動物が散見された。

したがって、本試験における投与量は、死亡例がみられず確実に骨髄塗抹標本の作製が可能と思われる1000 mg/kg/日を高用量とし、以下公比2で除して、500及び250 mg/kg/日の3用量を設定した。これに媒体を投与する陰性対照群及びMMCを投与する陽性対照群を加え、計5群とした。1群当たりの動物数は5匹とした。

骨髄採取時期は2回目投与後約24時間とした。また、毒性発現に明らかな性差はみられなかったことから、雄動物のみで実施した。

なお、MMCの投与量は1 mg/kgとし、投与後約24時間に骨髄を採取した。群構成表を表5-2に示す。

表 5-2. 本試験群構成表

群	投与量 (mg/kg/日)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与 回数	性	動物数	動物番号	骨髄採取時間 (投与後)
陰性対照	0	0	10	2	雄	5	1011~1015	約 24 時間 <sup>a)</sup>
低用量	250	25	10	2	雄	5	2011~2015	約 24 時間 <sup>a)</sup>
中用量	500	50	10	2	雄	5	3011~3015	約 24 時間 <sup>a)</sup>
高用量	1000	100	10	2	雄	5	4011~4015	約 24 時間 <sup>a)</sup>
陽性対照	1*	0.1*	10	1	雄	5	5011~5015	約 24 時間

\* : MMC の投与量及び濃度を示す。 a) : 2 回目の投与時間から起算

## 5.11 観察及び検査の方法

### 5.11.1 一般状態の観察

予備試験及び本試験とも、投与日は投与前、投与直後、投与後約 2 時間、また、その他の日は 1 日 1 回、一般状態（体外表、栄養状態、行動及び排泄物など）の観察を実施した。また、陽性対照群については、投与前日にも観察した。

### 5.11.2 体重測定

予備試験及び本試験とも、1 回目投与日から 2 回目投与翌日まで 1 日 1 回測定した。陽性対照群については投与前日にも測定した（予備試験：9:11~12:18 の間、本試験：9:15~11:25 の間）。

### 5.11.3 骨髄塗抹標本の作製

小核の観察のための標本を、Schmid の方法<sup>1,2)</sup>に従って行った。

標本作製前に試料番号と動物番号の対照表を作成した。試料番号順に動物をイソフルラン麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、両側の大腿骨を摘出し両端を切断した。

その後 1mL ディスポーザブル注射筒と 23 G 注射針を用いて、少量(約 0.1~0.2 mL)の牛胎児血清 (GIBCO BRL、ロット番号：[REDACTED]) で骨髄細胞を遠心管に洗い出した。次に、この注射筒及び注射針で骨髄細胞と牛胎児血清を混和して細胞をほぐし、1000 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を少量捨て、沈殿物をミキサーを用いて攪拌し、試料番号を記載したスライドグラスに塗抹した（塗抹標本は 1 動物につき左右大腿骨から各 1 枚を作製）。塗抹した標本は風乾させ、メタノール（和光純薬工業株式会社、ロット番号：[REDACTED]）で 3 分間固定した後、再び風乾した。なお、標本には試験番号、ステージ（骨髄採取時期）、試料番号、試験の種類及び作製日を明記したラベルを付けた（盲検法）。

### 5.11.4 骨髄塗抹標本の観察

観察は盲検法で行うため 1 個体ごとに連番となった試料番号をもとに、塗抹状態の良好なスライドグラス 1 枚を選択した。骨髄塗抹標本のアクリジンオレンジ蛍光染色及び観察は、Hayashi らの方法<sup>3,4)</sup>に従った。予め 40 µg/mL アクリジンオレンジ水溶液を少量滴下したカバーグラスにスライドグラスを載せた。波長 490 nm 付近の励起

光、観察用フィルターとして 515 nm 以上の波長を透過するものを備えた蛍光顕微鏡（システム生物顕微鏡 BX40：オリンパス株式会社、ユニバーサル落射蛍光装置 BX-FLA：オリンパス株式会社）を用いて、総合倍率 600 倍で観察した。

1 個体について、全赤血球 500 個中の幼若赤血球（以下 PCE と記す）数と 4000 個の PCE に対する小核を有する幼若赤血球（以下 MNPCE と記す）数を計数し、PCE と MNPCE の出現頻度（%）を求めた。

観察終了後の標本は廃棄した。また、観察に用いなかった標本は、全ての標本観察終了後廃棄した。

#### 5.11.5 観察結果の算出

群ごとに MNPCE 数とその出現頻度（%）、PCE 数とその出現頻度（%）について平均値と標準偏差を算出し、各出現頻度（%）については最大値と最小値も記録した。

小核の出現頻度に対する有意性の判定は、陰性対照群と陽性対照群の MNPCE の出現頻度（%）が当研究所の背景データの Mean $\pm$ 3S.D.内であることを確認した後、陰性対照群と被験物質投与群とを比較し、2 項分布に基づく Fisher の直接確率法の検定<sup>5)</sup>（有意水準：片側 5%、upper-tailed）並びに Cochran Armitage の傾向検定<sup>6)</sup>（有意水準：片側 1 及び 5%、upper-tailed）を行った。更に PCE の出現頻度については、陰性対照群と各被験物質投与群との間で Bartlett の検定<sup>7)</sup>を行い等分散性（有意水準：1%）を調べ、分散が均一であったため Dunnett の検定<sup>8)</sup>（有意水準：両側 1 及び 5%）を行った。また、陰性対照群と陽性対照群の MNPCE 出現頻度（%）を比較し、2 項分布に基づく Fisher の直接確率法の検定<sup>1)</sup>（有意水準：片側 5%、upper-tailed）を行った。

## 6. 試験結果

### 6.1 予備試験

#### 6.1.1 一般状態

成績を Appendix 1-1 及び 1-2 に示した。

2 回目投与翌日までに 2000 mg/kg/日投与群の雌 1 例の死亡が確認された。一般状態では自発運動の減少が 2000 mg/kg/日投与群の雌 1 例にみられ、腹臥・横臥が 2000 mg/kg/日投与群の雄 2 例、低温低下が 2000 mg/kg/日投与群の雄 1 例にみられた。

1000 mg/kg 以下の投与群では異常はみられなかった。

#### 6.1.2 体重

成績を Appendix 2-1 及び 2-2 に示した。

各投与群の雌雄で減少傾向を示す動物が散見された。

### 6.2 本試験

#### 6.2.1 一般状態

成績を Table 1 及び Appendix 3 に示した。

各被験物質投与群において一般状態に変化は認められなかった。陰性対照群及び陽性対照群においても一般状態に変化は認められなかった。

#### 6.2.2 体重

成績を Table 2 及び Appendix 4 に示した。

陰性対照群と比較して各被験物質投与群及び陽性対照群は、いずれも同様な体重推移を示し、異常は見られなかった。

#### 6.2.3 骨髓塗抹標本の観察結果

成績を Table 3 及び Appendix 5 に示した。

各被験物質投与群の PCE4000 個中に占める MNPCE の出現頻度は、250 mg/kg/日投与群で  $0.13 \pm 0.02\%$ 、500 mg/kg/日投与群で  $0.20 \pm 0.07\%$ 、1000 mg/kg/日投与群で  $0.18 \pm 0.07\%$ であった。これらの値を陰性対照群の  $0.15 \pm 0.09\%$ と比較した結果、いずれの被験物質投与群も統計学的に有意な増加は示さず、用量依存的な増加も認められなかった。

また、各被験物質投与群の全赤血球 500 個中に占める PCE の出現頻度は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な変化を示さなかった。

なお、陽性対照群の MNPCE の出現頻度  $3.93 \pm 0.74\%$ は、陰性対照群と比較して統計学的に有意 ( $P < 0.05$ ) な増加を示した。更に、陰性対照群及び陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、当施設における各々の背景データの Mean  $\pm$  3S.D.の範囲内であった。

## 7. 考察

5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの染色体異常誘発能の有無を検討するため、Crl:CD1(ICR)系マウスの骨髄細胞を用いて小核試験を実施した。

投与量を決定するための予備試験では、5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの250、500、1000及び2000 mg/kg/日を1群当たり雌雄各3匹のマウスに、約24時間間隔で2回経口投与した結果、2回目投与翌日までに2000 mg/kg/日投与群の雌1例の死亡が確認された。一般状態では自発運動の減少が2000 mg/kg/日投与群の雌1例にみられ、腹臥・横臥が2000 mg/kg/日投与群の雄2例、低温低下が2000 mg/kg/日投与群の雄1例にみられた。また、各投与群の雌雄で減少傾向を示す動物が散見された。


予備試験におけるこれらの結果をもとに、本試験では、死亡例がみられず確実に骨髄塗抹標本の作製が可能と思われる1000 mg/kg/日を高用量とし、以下公比2で除して、500及び250 mg/kg/日の3用量を設定し、約24時間間隔で2回経口投与した。2回目の投与約24時間後に骨髄塗抹標本を作製して観察を行った。また、陰性対照としてコーン油を被験物質投与群と同じ用量及び同じ頻度で投与する群、陽性対照としてMMCの1 mg/kgを腹腔内に1回投与する群を設定し、投与後所定の時間に骨髄塗抹標本を作製して観察を行った。1群当たりの動物数は雄5匹とした。

本試験の結果、各被験物質投与群におけるPCE4000個中に占めるMNPCEの出現頻度は陰性対照群に比べ統計学的に有意な増加を示さず、用量依存的な増加も認められなかった。

各被験物質投与群における全赤血球500個中に占めるPCEの出現頻度は、陰性対照群と比較して、統計学的に有意な変化を示さなかった。本試験において被験物質投与による骨髄細胞での暴露の証明は得られなかったが、最大耐量と推定される1000 mg/kg/日まで試験されており毒性（染色体異常誘発能）を評価する上で問題はないと考えられた。

なお、陽性対照群ではMNPCEの出現頻度が陰性対照群と比較して統計学的に有意（ $P<0.05$ ）な増加を示した。更に、陰性対照群と陽性対照群のMNPCEの出現頻度は、当施設における各々の背景データのMean $\pm$ 3S.D.の範囲内であったことから、試験は適切に実施されたことが示された。

以上の結果から、5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールは本試験条件下でCrl:CD1(ICR)系マウスの骨髄細胞において、染色体異常誘発能は無いと判定した。



## 8. 参考文献

- 1) W. Schmid, Mutation Res. 31, 9-15 (1975).
- 2) W. Schmid, "Chemical Mutagens," Vol. 4, ed. by A. Hollaender, Plenum Press, N.Y., London, 1976, pp.76-78.
- 3) M. Hayashi, T. Sofuni, M. Jr. Ishidate, Mutat. Res., 120, 241 (1983).
- 4) 林 真, "小核試験," サイエンティスト社, 東京, 1991, pp.44-55.
- 5) Siegel S, Castellan NJ. Jr. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1988.
- 6) 吉村 功 編, "毒性・薬効データの統計解析," サイエンティスト社, 東京, 1987, pp. 67-69.
- 7) Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. 8th ed. Ames: Iowa State University Press; 1989.
- 8) Dunnett CW. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J Am Stat Assoc 1955; 50: 1096-1121.

Table 1

A micronucleus test of 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal in mice

Clinical signs

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)		1st administration			2nd administration			1 day after the 2nd administration
			Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	
Negative control	0	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
Low	250	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
Middle	500	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
High	1000	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
Positive control <sup>a)</sup> (Mitomycin C)	1	Number of animals	5	-	-	5	5	5	5
		No abnormalities	5	-	-	5	5	5	5

- : No observation

a) : Administration was done only once for the positive control group.

Table 2 A micronucleus test of 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal in mice  
 Body weight  
 Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)		Before 1st administration	Before 2nd administration	1 day after the 2nd administration
Negative control	0	N	5	5	5
		Mean	35.9	35.3	35.6
		S.D.	2.0	1.9	2.0
Low	250	N	5	5	5
		Mean	35.7	35.5	35.4
		S.D.	2.1	2.2	2.5
Middle	500	N	5	5	5
		Mean	36.4	36.4	36.5
		S.D.	2.6	3.0	2.9
High	1000	N	5	5	5
		Mean	35.9	35.6	35.6
		S.D.	2.2	2.3	2.3
Positive control <sup>a)</sup> (Mitomycin C)	1	N	5	5	5
		Mean	36.2	35.8	35.6
		S.D.	2.6	3.0	2.6

Unit : g

a) : Administration was done only once for the positive control group.

Table 3

A micronucleus test of 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal in mice

Observation of bone marrow smears (About 24 hours after the 2nd administration)

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)		No. of MNPCE in 4000 PCE	MNPCE(%) <sup>b)</sup>	No. of PCE in 500 erythrocytes	PCE(%) <sup>c)</sup>
Negative control	0	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	6 ± 4	0.15 ± 0.09	276 ± 41	55.2 ± 8.3
		Min. / Max.		0.08 / 0.30		44.4 / 65.2
Low	250	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	5 ± 1	0.13 ± 0.02	254 ± 42	50.7 ± 8.4
		Min. / Max.		0.10 / 0.15		36.2 / 56.2
Middle	500	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	8 ± 3	0.20 ± 0.07	269 ± 35	53.8 ± 7.1
		Min. / Max.		0.10 / 0.28		46.8 / 65.4
High	1000	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	7 ± 3	0.18 ± 0.07	256 ± 28	51.1 ± 5.6
		Min. / Max.		0.10 / 0.28		44.4 / 59.4
Positive control <sup>a)</sup> (Mitomycin C)	1	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	157 ± 30	3.93 ± 0.74 <sup>d)</sup>	276 ± 26	55.2 ± 5.3
		Min. / Max.		2.68 / 4.55		50.4 / 62.4

a) : Administration was done only once for the positive control group.

b) : Proportion(%) of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) per 4000 polychromatic erythrocytes (PCE)

c) : Proportion(%) of polychromatic erythrocytes (PCE, including MNPCE) per 500 erythrocytes

d) : Statistically significant increase from the negative control value (Fisher's exact test, P&lt;0.05)

No significant difference in any treated groups from negative control group.

Sex	Group	Dose (mg/kg/day)		1st administration			2nd administration			1 day after the 2nd administration
				Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	
Male	Low	250	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	Middle	500	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	High	1000	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	Highest	2000	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	1
			Prone/Lateral position	0	0	0	0	0	0	2
			Hypothermia	0	0	0	0	0	0	1

Sex	Group	Dose (mg/kg/day)	1st administration			2nd administration			1 day after the 2nd administration
			Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	
Female	Low	250	Number of animals	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3
	Middle	500	Number of animals	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3
	High	1000	Number of animals	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3
	Highest	2000	Number of animals	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	2
			Decrease in spontaneous movement	0	0	0	0	0	1
			Dead	0	0	0	0	0	0

## Body weight, individual data (Preliminary study)

Sex	Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	Before 1st administration	Before 2nd administration	1 day after the 2nd administration
Male	Low	250	1001	37.8	36.5	36.2
			1002	34.1	33.9	34.3
			1003	34.2	34.1	34.0
			Mean	35.4	34.8	34.8
			S.D.	2.1	1.4	1.2
	Middle	500	2001	36.5	35.6	35.3
			2002	33.7	33.4	33.5
			2003	34.7	33.9	34.1
			Mean	35.0	34.3	34.3
			S.D.	1.4	1.2	0.9
	High	1000	3001	32.7	31.9	32.7
			3002	35.0	35.9	36.3
			3003	35.9	35.6	35.2
			Mean	34.5	34.5	34.7
			S.D.	1.7	2.2	1.8
	Highest	2000	4001	36.4	36.0	36.3
			4002	33.4	35.9	35.1
4003			34.9	34.5	33.9	
Mean			34.9	35.5	35.1	
S.D.			1.5	0.8	1.2	

Unit : g

Body weight, individual data (Preliminary study)

Sex	Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	Before 1st administration	Before 2nd administration	1 day after the 2nd administration
Female	Low	250	1101	24.7	24.7	24.5
			1102	27.7	27.0	27.1
			1103	26.7	26.6	26.8
			Mean	26.4	26.1	26.1
			S.D.	1.5	1.2	1.4
	Middle	500	2101	28.4	27.9	27.8
			2102	25.9	26.2	26.2
			2103	26.1	26.1	25.7
			Mean	26.8	26.7	26.6
			S.D.	1.4	1.0	1.1
	High	1000	3101	27.0	27.5	27.4
			3102	24.5	25.5	26.2
			3103	27.5	28.1	28.1
			Mean	26.3	27.0	27.2
			S.D.	1.6	1.4	1.0
	Highest	2000	4101	28.3	29.3	28.3
			4102	26.3	26.6	Dead
4103			25.3	24.1	24.1	
Mean			26.6	26.7	26.2	
S.D.			1.5	2.6		

Unit : g

Clinical signs, individual data

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	1st administration			2nd administration			1 day after the 2nd administration
			Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	
Negative control	0	1011	-	-	-	-	-	-	-
		1012	-	-	-	-	-	-	-
		1013	-	-	-	-	-	-	-
		1014	-	-	-	-	-	-	-
		1015	-	-	-	-	-	-	-
Low	250	2011	-	-	-	-	-	-	-
		2012	-	-	-	-	-	-	-
		2013	-	-	-	-	-	-	-
		2014	-	-	-	-	-	-	-
		2015	-	-	-	-	-	-	-
Middle	500	3011	-	-	-	-	-	-	-
		3012	-	-	-	-	-	-	-
		3013	-	-	-	-	-	-	-
		3014	-	-	-	-	-	-	-
		3015	-	-	-	-	-	-	-
High	1000	4011	-	-	-	-	-	-	-
		4012	-	-	-	-	-	-	-
		4013	-	-	-	-	-	-	-
		4014	-	-	-	-	-	-	-
		4015	-	-	-	-	-	-	-
Positive control <sup>a)</sup> (Mitomycin C)	1	5011	-	/	/	-	-	-	-
		5012	-	/	/	-	-	-	-
		5013	-	/	/	-	-	-	-
		5014	-	/	/	-	-	-	-
		5015	-	/	/	-	-	-	-

- : No abnormalities

/ : No observation

a) : Administration was done only once for the positive control group.

Appendix 4 A micronucleus test of 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal in mice

Body weight, individual data

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	Before 1st administration	Before 2nd administration	1 day after the 2nd administration
Negative control	0	1011	36.9	36.3	36.3
		1012	38.8	37.9	38.6
		1013	33.8	33.2	33.5
		1014	35.5	34.9	35.4
		1015	34.4	34.1	34.0
		Mean	35.9	35.3	35.6
		S.D.	2.0	1.9	2.0
Low	250	2011	34.7	33.9	33.8
		2012	38.0	37.8	37.8
		2013	34.7	34.4	34.3
		2014	37.9	37.9	38.5
		2015	33.2	33.3	32.8
		Mean	35.7	35.5	35.4
		S.D.	2.1	2.2	2.5
Middle	500	3011	36.7	36.5	36.9
		3012	40.5	40.9	40.7
		3013	36.6	37.1	37.3
		3014	34.0	34.4	34.3
		3015	34.2	33.2	33.4
		Mean	36.4	36.4	36.5
		S.D.	2.6	3.0	2.9
High	1000	4011	34.6	34.6	34.6
		4012	37.7	37.4	37.7
		4013	34.9	33.8	33.8
		4014	33.6	33.6	33.6
		4015	38.6	38.7	38.5
		Mean	35.9	35.6	35.6
		S.D.	2.2	2.3	2.3
Positive control <sup>a)</sup> (Mitomycin C)	1	5011	33.8	32.7	32.9
		5012	36.8	36.7	36.4
		5013	40.4	40.4	39.6
		5014	35.7	35.4	35.3
		5015	34.4	34.0	33.9
		Mean	36.2	35.8	35.6
		S.D.	2.6	3.0	2.6

Unit : g

a) : Administration was done only once for the positive control group.

Observation of bone marrow smears, individual data (About 24 hours after the 2nd administration)

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	No. of MNPCE in 4000 PCE	Mean $\pm$ S.D.	MNPCE(%) <sup>b)</sup>	Mean $\pm$ S.D. ( Min / Max )	No. of PCE in 500 erythrocytes	Mean $\pm$ S.D.	PCE(%) <sup>c)</sup>	Mean $\pm$ S.D. ( Min / Max )
Negative control	0	1011	4	6 $\pm$ 4	0.10	0.15 $\pm$ 0.09	326	276 $\pm$ 41	65.2	55.2 $\pm$ 8.3
		1012	6		0.15	( 0.08 / 0.30 )	290		58.0	( 44.4 / 65.2 )
		1013	3		0.08		296		59.2	
		1014	12		0.30		247		49.4	
		1015	5		0.13		222		44.4	
Low	250	2011	5	5 $\pm$ 1	0.13	0.13 $\pm$ 0.02	181	254 $\pm$ 42	36.2	50.7 $\pm$ 8.4
		2012	6		0.15	( 0.10 / 0.15 )	281		56.2	( 36.2 / 56.2 )
		2013	5		0.13		279		55.8	
		2014	4		0.10		274		54.8	
		2015	5		0.13		253		50.6	
Middle	500	3011	7	8 $\pm$ 3	0.18	0.20 $\pm$ 0.07	255	269 $\pm$ 35	51.0	53.8 $\pm$ 7.1
		3012	8		0.20	( 0.10 / 0.28 )	234		46.8	( 46.8 / 65.4 )
		3013	4		0.10		255		51.0	
		3014	10		0.25		327		65.4	
		3015	11		0.28		274		54.8	
High	1000	4011	6	7 $\pm$ 3	0.15	0.18 $\pm$ 0.07	259	256 $\pm$ 28	51.8	51.1 $\pm$ 5.6
		4012	5		0.13	( 0.10 / 0.28 )	297		59.4	( 44.4 / 59.4 )
		4013	11		0.28		222		44.4	
		4014	9		0.23		240		48.0	
		4015	4		0.10		260		52.0	
Positive control <sup>a)</sup> (Mitomycin C)	1	5011	167	157 $\pm$ 30	4.18	3.93 $\pm$ 0.74	252	276 $\pm$ 26	50.4	55.2 $\pm$ 5.3
		5012	175		4.38	( 2.68 / 4.55 )	295		59.0	( 50.4 / 62.4 )
		5013	182		4.55		256		51.2	
		5014	155		3.88		264		52.8	
		5015	107		2.68		312		62.4	

a): Administration was done only once for the positive control group.

b): Proportion(%) of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) per 4000 polychromatic erythrocytes (PCE)

c): Proportion(%) of polychromatic erythrocytes (PCE, including MNPCE) per 500 erythrocytes