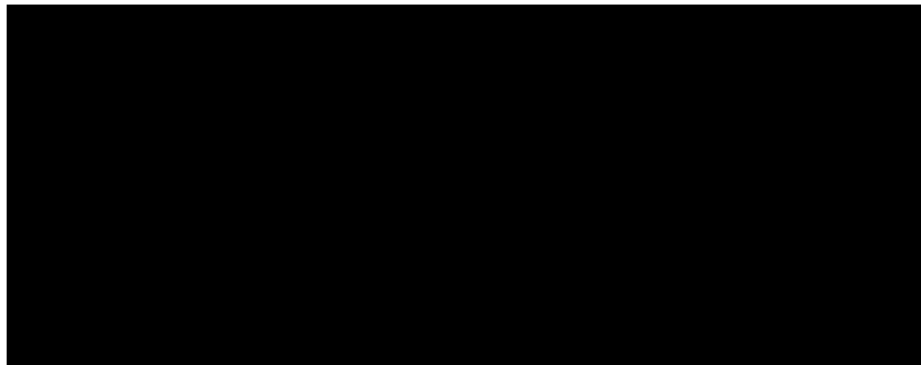




最終報告書

p-サイメンの マウス骨髄細胞を用いる小核試験

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 委託



試験契約書番号 [REDACTED]
試験委託者 [REDACTED]
試験番号 [REDACTED]
被験物質 p-サイメン
試験項目 小核試験
試験開始日 [REDACTED]
試験終了日 試験責任者の署名日
資料保存場所 [REDACTED]
保存期間 試験終了後 10 年間
その後の保存については試験委託者と協議する。

この報告書は、表題の試験について、試験計画書に従って確実に遂行されたものを正しく記載したものである。

[REDACTED]



試験従事者

試験責任者

試験担当者

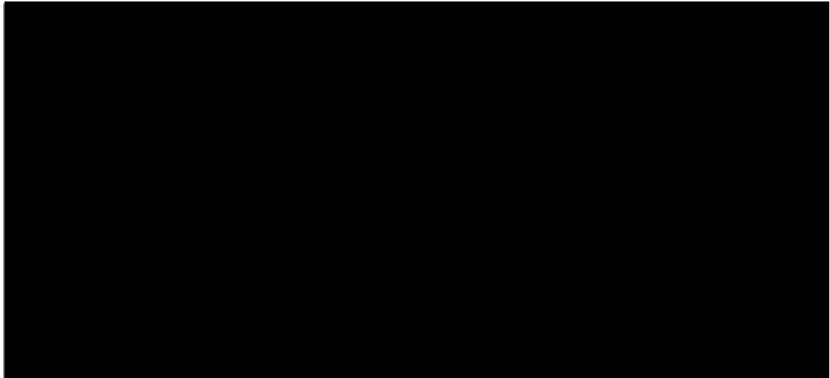
投与・動物観察

標本作製・観察

動物飼育管理 (検疫を含む)

検体調製

被験物質管理



目次

1. 要約	5
2. 試験目的	5
3. 試験ガイドライン	5
4. 動物愛護	5
5. 材料と方法	5
5.1 被験物質	5
5.2 陰性対照物質 (媒体)	6
5.3 陽性対照物質	6
5.4 使用動物	7
5.5 飼育環境	8
5.6 試験液の調製	9
5.7 投与方法	9
5.8 試験操作・観察	10
5.9 結果の表示	12
5.10 データの統計処理	12
5.11 判定	12
6. 試験成績と考察	12
6.1 毒性予備試験	12
6.2 小核本試験	13
7. 参考文献	13
表	14
資料	19

(最終ページ: 19 ページ)

1. 要約

p-サイメンの生体内における染色体異常誘発性の有無を評価するため、マウス骨髄細胞を用いる小核試験を実施した。まず、小核本試験の投与量を決定するために毒性予備試験を行って最大耐量を求め、その結果に基づいて小核本試験を実施した。

毒性予備試験は、雌雄マウスを用いて、被験物質を 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の用量で、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間強制経口投与した。その結果、雌雄ともに 2000 mg/kg/day において全例の死亡が認められた。また、雌雄ともに 250、500 および 1000 mg/kg/day においては、一般状態の変化および死亡は認められず、最大耐量は雌雄マウスともに 1000 mg/kg/day であった。

毒性予備試験の結果に基づき、小核本試験は、陰性対照群 (トウモロコシ油)、被験物質投与群 (250、500 および 1000 mg/kg/day) および陽性対照群 (cyclophosphamide monohydrate) の計 5 群を設定し、雄マウスを用いて行った。陰性対照群および被験物質投与群は、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間強制経口投与した。陽性対照群は 50 mg/kg の用量で、単回強制経口投与した。いずれの投与群も、最終投与の 18~24 時間後に骨髄塗抹標本を作製して小核の観察を行った。その結果、被験物質投与群の小核出現頻度に統計学的な有意差は認められなかった。一方、陽性対照群の小核出現頻度は 1%水準で有意な増加が認められ、本試験系の妥当性が確認された。赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、被験物質投与群と陰性対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、*p*-サイメンは、マウス骨髄細胞において染色体異常誘発作用を示さない (陰性) と結論した。

2. 試験目的

p-サイメンのマウス骨髄細胞を用いる小核試験を実施し、*p*-サイメンの生体内における染色体異常誘発性の有無を評価した。

3. 試験ガイドライン

- 1) 「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)
- 2) 「OECD 化学物質試験法ガイドライン 474、哺乳類赤血球小核試験」(OECD TG 474、2016 年 7 月 29 日)

4. 動物愛護

- 1) 「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)
- 2) 「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)
- 3) 「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 27 年 2 月 20 日、科発 0220 第 1 号)
- 4) [REDACTED]

なお、承認された動物実験計画からの変更はなかった。

5. 材料と方法

5.1 被験物質

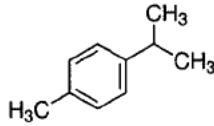
- 1) 名称
p-サイメン
- 2) 英名
p-Cymene
- 3) 化学名
1-Methyl-4-methylethylbenzene

4) CAS No.
99-87-6

5) 化学式
 $C_{10}H_{14}$

6) 分子量
134.22

7) 構造式



8) 物理化学的性質

性状: 無色または微黄色透明の液体、特異な臭気を有する

融点: -68.9°C

沸点: 177°C

引火点: 51.0°C (タグ密閉式)

オクタノール・水分配係数: 4.10

比重 (d₂₀/4): 0.856

屈折率 (n₂₀/D): 1.4909

9) ロット番号

10) 出荷年月日

11) 純度

99.2% (GC)

12) 安定性

通常条件下では安定で自己重合性はない

13) 保管条件

室温 ($1\sim 30^{\circ}\text{C}$)

14) 製造者

15) 提供者

国立医薬品食品衛生研究所

5.2 陰性対照物質 (媒体)

1) 名称

トウモロコシ油

2) 別名

Corn oil

3) ロット番号

4) 製造者

ナカライテスク

5.3 陽性対照物質

1) 名称

Cyclophosphamide monohydrate

2) 略称

CP

3) CAS No.

6055-19-2

4) ロット番号

5) 純度

100.8%

6) 保管条件

冷蔵

7) 購入年月日

8) 製造者

9) 使用期限

5.4 使用動物

1) 種、系統、品質

マウス、Cri:CD1(ICR)、SPF

2) 動物選択の理由

- (1) OECD TG 474 に準拠した動物種である。
- (2) 小核試験に関する当試験施設の背景データがある系統である。

3) 生産所

ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン
(旧社名 日本チャールス・リバー 厚木飼育センター)

4) 購入動物数、性

(毒性予備試験) 雄 15 匹、雌 15 匹
(小核本試験) 雄 30 匹

5) 入荷年月日

(毒性予備試験)

(小核本試験)

6) 入荷時週齢

雄: 8 週齢、雌: 8 週齢

7) 入荷時体重

(毒性予備試験) 雄 29.0~35.2 g、雌 23.1~25.8 g
(小核本試験) 雄 28.9~32.4 g

8) 検疫並びに馴化期間

- (1) 入荷日を含む 7 日間、検疫と馴化を兼ねて飼育した。毎日 1 回、一般状態を観察した。
- (2) 入荷日および検疫終了日に体重を測定した。
- (3) 一般状態観察および体重測定は、安全性試験システムを使用した。

9) 投与時週齢

雄: 9 週齢、雌: 9 週齢

10) 群数および動物数

(毒性予備試験) 雄: 4 群 (3 匹/群、計 12 匹)、雌: 4 群 (3 匹/群、計 12 匹)
(小核本試験) 雄: 5 群 (5 匹/群、計 25 匹)

11) 群分け法

- (1) 検疫終了時の測定体重 (平均 \pm 20%以内の動物を用いた) をもとに、体重別層化無作為抽出法により安全性試験システムを用いて群分けを行った。
- (2) 群分けした動物には、一連の動物番号を割り当てた。

12) 投与時体重

(毒性予備試験) 雄 33.0~37.1 g (平均値: 34.9 g)、雌 25.8~28.0 g (平均値: 27.1 g)
(小核本試験) 雄 32.3~37.2 g (平均値: 35.2 g)

13) 標識法—動物

(1) 入荷から群分け前

油性フェルトペン (赤) により尾に馴化番号 (数字) を記した (下表参照)。

試験	馴化番号 ^{a)}	
	雄	雌
毒性予備試験	♂1～♂15 (1001～1015)	♀1～♀15 (5001～5015)
小核本試験	16～45 (1016～1045)	-

a) () 内は、安全性試験システムにおいて用いた識別 No.。

(2) 群分け後

使用動物: 油性フェルトペン (青) により尾に動物番号を記した。

余剰動物: 油性フェルトペン (赤) により尾に馴化番号 (数字) を記した。

14) 標識法—飼育ケージ

(1) 入荷から群分け前

試験番号、馴化番号、性および入荷日を記入した動物カードを飼育ケージに掛けた。

(2) 群分け後

使用動物: 群ごとに色の異なる動物カードに、試験番号、性、群 (投与量) および動物番号を記入し、飼育ケージに掛けた。

余剰動物: 群分け前で使用した動物カードに“余剰”と記入し、飼育ケージに掛けた。

15) 余剰動物の処置

群分けより除外した 6 匹 (毒性予備試験) および 5 匹 (小核本試験) の動物は、他の目的に使用予定が無かったため、動物飼育終了日 (毒性予備試験: [REDACTED]、小核本試験: [REDACTED]) にセボフルランによる吸入麻酔後、頸椎脱臼法により安楽死させた。

5.5 飼育環境

1) 飼育室の環境条件

(1) 室番号

[REDACTED] (検疫期間を含む)

(2) 許容温湿度

温度: 21.0～25.0°C、湿度: 40.0～75.0%

(3) 換気設定

約 15 回/時間

(4) 明暗サイクル

12 時間 (7 時～19 時) 点灯、12 時間 (19 時～7 時) 消灯

(5) ケージの種類

TPX 樹脂製ケージ (143W×293D×148H mm)

(6) 飼育密度

1 匹/ケージ (全飼育期間)

(7) ケージ交換頻度

1 回/週

(8) 床敷の種類

ペーパークリーン (日本エスエルシー)

(9) 混入物に対する確認

試験に支障をきたすような異常は認められなかった。

2) 飼料

(1) 種類

固型 CE-2

(2) 販売業者

日本クレア

- (3) 給餌方法
自由摂取
- (4) 混入物に対する確認
試験に支障をきたすような異常は認められなかった。

3) 飲料水

- (1) 種類
水道水 ()
- (2) 給水方法
ノズルによる自動給水
- (3) 飲料水の分析結果
試験に支障をきたすような異常は認められなかった。

5.6 試験液の調製

1) 被験物質調製液

- (1) 媒体選択の理由
「*p*-サイメンのラットを用いる 90 日間反復経口投与毒性試験 (試験番号: 医薬品 GLP)」において、トウモロコシ油を用いて調製された被験物質調製液 (1 および 300 mg/mL) は、室温、遮光条件下で 8 日間の安定性が確認された。したがって、媒体としてトウモロコシ油を用いた。
 - (2) 調製法
 - a) 被験物質を秤量した。
 - b) 媒体を加えて被験物質を溶解し、最高濃度の被験物質調製液を用時調製した。
 - c) 最高濃度の被験物質調製液を媒体で段階希釈し、所定濃度の被験物質調製液を用時調製した。被験物質調製液の調製濃度を以下に示す。
毒性予備試験: 25、50、100 および 200 mg/mL
小核本試験: 25、50 および 100 mg/mL
 - (3) 保管条件
被験物質調製液は用時調製のため保管しなかった。
- 2) 陽性対照物質調製液
CP を所定量秤量し、日局生理食塩液 (製造番号: 光製薬) に溶解して、5 mg/mL 溶液を用時調製した。

5.7 投与方法

- 1) 投与経路
強制経口投与
- 2) 投与経路選択理由
OECD TG 474 に拠った。
- 3) 投与方法
プラスチック製注射筒およびマウス用胃管を用いて強制経口投与
- 4) 投与方法選択理由
通常用いられている方法である。
- 5) 投与液量
初回投与の直前に測定した体重をもとに、安全性試験システムを用いて個体別の投与液量を算出した。
- 6) 投与回数
媒体および被験物質調製液: 2 回投与 (24±1 時間間隔)
陽性対照物質調製液: 単回投与
- 7) 投与回数選択理由
OECD TG 474 に拠った。

8) 投与時刻

毒性予備試験: 14:43～15:10

小核本試験: 14:36～15:14

5.8 試験操作・観察

5.8.1 毒性予備試験

1) 試験群

以下の4群を設けた。

投与物質	投与用量 (mg/kg/day)	投与容量 (mL/kg/day)	投与 回数	動物番号 ^{b)}	
				雄	雌
<i>p</i> -サイメン	250	10	2	101～103 (M01001～ M01003)	113～115 (F01001～ F01003)
<i>p</i> -サイメン	500	10	2	104～106 (M02001～ M02003)	116～118 (F02001～ F02003)
<i>p</i> -サイメン	1000	10	2	107～109 (M03001～ M03003)	119～121 (F03001～ F03003)
<i>p</i> -サイメン	2000	10	2	110～112 (M04001～ M04003)	122～124 (F04001～ F04003)

b) () 内は、安全性試験システムにおいて用いた動物 No.。

2) 最高投与用量設定理由

OECD TG 474 に拠った。

3) 動物数

雌雄とも3匹/群

4) 一般状態の観察

初回投与の直前、各投与の直後、2～5時間後および18～24時間後に生死および一般状態を観察した。

最終観察終了後、生存例については、セボフルランによる吸入麻酔後、頸椎脱臼法により安楽死させた。

5) 体重測定

群分け後の全ての動物（余剰動物は除く）について、初回投与の直前に体重を測定した。

投与を行った全ての動物（死亡例は除く）について、最終観察後に体重を測定した。

6) 最大耐量

観察期間中に死亡例が認められなかった最高投与量を最大耐量とし、小核本試験における最高投与量とした。

5.8.2 小核本試験

1) 試験群

毒性予備試験の結果に基づき、下記の5群を設け、雄マウスを用いて実施した。

なお、陽性対照物質のCPは、50 mg/kgの単回強制経口投与で、投与後24時間に小核を有する幼若赤血球の出現頻度が有意に増加することが、当試験施設において確認されている（資料1）。

投与群	投与用量 (mg/kg/day)	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号 ^{c)}
陰性対照群 [媒体 (トウモロコシ油)]	0	10	2	1~5 (M05001~M05005)
p-サイメン投与群 (低用量)	250	10	2	6~10 (M06001~M06005)
p-サイメン投与群 (中用量)	500	10	2	11~15 (M07001~M07005)
p-サイメン投与群 (高用量)	1000	10	2	16~20 (M08001~M08005)
陽性対照群 (CP: 5 mg/mL 溶液)	50	10	1	21~25 (M09001~M09005)

c) () 内は、安全性試験システムにおいて用いた動物 No.。

2) 動物数

5 匹/群

3) 一般状態の観察

投与前日 (陽性対照群のみ)、初回投与の直前、各投与の直後、2~5 時間後および 18~24 時間後に生死および一般状態を観察した。

4) 体重測定

群分け後の全ての動物 (余剰動物は除く) について、初回投与の直前に体重を測定した。

投与を行った全ての動物について、解剖のための動物搬出の直前に体重を測定した。

5) 標本作製

- (1) 投与を行った全ての動物について、骨髓塗抹標本の作製¹⁾を行った。
- (2) 最終投与の 18~24 時間後、セボフルランによる吸入麻酔した後、頸椎脱臼法によりマウスを安楽死させた。
- (3) 両側の大腿骨を摘出した後、その両端を切断して 0.6 mL のウシ胎児血清 (ロット番号: [REDACTED], Life Technologies) で骨髓細胞を遠心管に洗い出した。
- (4) 卓上遠心機 (LC-230 型、トミー精工) を用いて遠心 [200×g、5 分間、室温 (1~30°C)] して上清を除いた後、沈渣をピペッティングして骨髓細胞浮遊液を作製した。
- (5) 骨髓細胞浮遊液から塗抹標本を各個体につき 3 枚作製した。塗抹標本には、試験番号、動物番号およびスライド番号を記載した。
- (6) 自然乾燥後、メタノールで 5 分間固定した。
- (7) コード番号表に従い、試験番号、コード番号およびスライド番号を記したラベルを塗抹標本に貼付してコード化し、標本観察時まで室温で保管した。

6) 標本観察

- (1) 標本観察の直前にゼーレンゼンの 1/15 mol/L リン酸緩衝液に溶解した 40 µg/mL のアクリジンオレンジ (AO) 溶液を骨髓塗抹標本に数滴滴下してカバーグラスをかけ、吸収フィルター (510 nm) が装着されたブルー励起の蛍光顕微鏡下で、100 倍の対物レンズと 10 倍の接眼レンズを用いて観察を行った。
- (2) 骨髓細胞の増殖抑制の指標として、1 匹あたり、2 名の観察者により 1000 個 (1 名あたり 500 個) の赤血球を観察し、観察した赤血球中における幼若赤血球 (PCE) の数を記録した。
- (3) 1 匹あたり、2 名の観察者により 4000 個 (1 名あたり 2000 個) の幼若赤血球 (PCE) を観察し、そのうち、小核を有するもの (MNPCE) の数を記録した。
- (4) 標本観察終了 (実験終了) 後、作製した全ての塗抹標本は廃棄処分した。

7) トキシコキネティクス

「p-サイメンのラットを用いる 90 日間反復経口投与毒性試験 (試験番号: [REDACTED] 医薬品 GLP)」において、被験物質の強制経口投与により、全身毒性が雌雄ともに認められたことから、当該試験において骨髓曝露の評価のための採血および化学分析は実施しなかった。

5.9 結果の表示

- 1) 群ごとの一般状態の変化と死亡率
- 2) 個体ごとの小核を有する幼若赤血球の出現頻度 (%)
- 3) 個体ごとの全赤血球に対する幼若赤血球の割合 (%)
- 4) 群ごとの小核を有する幼若赤血球の出現頻度 (%、平均値)
- 5) 群ごとの全赤血球に対する幼若赤血球の割合 (%、平均値)

5.10 データの統計処理

ビジュアルデータ解析ソフト Pharmaco Basic (ver. 16、ヒューマンライフ) を用い、以下の統計解析を行った。

1) 小核出現頻度

- (1) 次式を用いて算出した。

$$\text{小核出現頻度 (\%)} = \frac{\text{小核を有する幼若赤血球数}}{\text{観察した幼若赤血球数}} \times 100$$

- (2) 陰性対照群と陽性対照群の小核出現頻度 (平均値) が、当試験施設の背景データのばらつきの範囲 (平均値 \pm 3 \times 標準偏差) 内にあるか否かを調べた。なお、からまで当試験施設で実施した小核試験の陰性対照値および陽性対照値を背景データとした (資料 1)。
- (3) 陰性対照群と各被験物質投与群との間で、Fisher の正確確率検定法 [片側 (上側) 検定] を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して Bonferroni の補正²⁾を行った。検定の有意水準は 5%および 1%とした。
- (4) 陰性対照群と陽性対照群との間で、Fisher の正確確率検定法 [片側 (上側) 検定] を行った。検定の有意水準は 5%および 1%とした。
- (5) 小核出現頻度の用量依存性 (増加) を調べるため、Cochran-Armitage の傾向検定³⁾ [片側 (上側) 検定] を行った。検定の有意水準は 5%および 1%とした。

2) 幼若赤血球 (PCE) の比率

- (1) 次式を用いて算出した。

$$\text{幼若赤血球 (PCE) の比率 (\%)} = \frac{\text{観察した幼若赤血球数}}{\text{観察した全赤血球数}} \times 100$$

- (2) 陰性対照群と被験物質投与群との間で Bartlett 検定⁴⁾を行った。その結果、等分散であったことから、Dunnett 検定⁵⁾ (両側検定、パラメトリック) を行った。Bartlett 検定の有意水準は 5%とした。Dunnett 検定の有意水準は 5%および 1%とした。
- (3) 陰性対照群と陽性対照群との間で、F 検定⁴⁾ (両側検定) を行った。その結果、等分散であったことから、Student の *t* 検定⁴⁾ (両側検定) を行った。F 検定の有意水準は 5%とした。Student の *t* 検定の有意水準は 5%および 1%とした。
- (4) 統計解析の結果をもとに、陰性対照群の背景データ等を参考にして、被験物質の骨髄細胞の増殖への影響を調べた。

5.11 判定

被験物質が骨髄細胞において、小核を誘発する事により、染色体異常誘発作用を示すか否かの判定は、統計処理の結果をもとに、用量反応性、陰性対照群の背景データおよび骨髄細胞増殖への影響等を参考にして総合的に行った。

6. 試験成績と考察

6.1 毒性予備試験

一般状態および死亡率を表 1 に示す。雌雄ともに 2000 mg/kg/day において全例の死亡が認められた。また、雌雄ともに 250、500 および 1000 mg/kg/day においては、一般状態の変化および死亡は認められなかった。体重測定の結果を表 2 に示す。雄の 1000 mg/kg/day 投与群および雌の 500 mg/kg/day 投与群においては、投与後の平均体重の増加は認められなかった。また、雄の 250

および 500 mg/kg/day 投与群および雌の 250 および 1000 mg/kg/day 投与群においては、投与後の平均体重にわずかな増加が認められた。以上の結果から、雌雄ともに、最大耐量は 1000 mg/kg/day であった。

6.2 小核本試験

一般状態および死亡率を表 3 に示す。いずれの投与群においても、一般状態の変化および死亡は認められなかった。体重測定の結果を表 4 に示す。陰性対照群および、すべての被験物質投与群においては、投与後の平均体重にわずかな増加が認められた。また、陽性対照群においては、投与後の平均体重にわずかな減少が認められた。

小核を有する幼若赤血球の出現頻度および赤血球中に占める幼若赤血球の比率を表 5 に示す。陰性対照群および陽性対照群の小核出現頻度 (平均値) は、いずれも当試験施設の背景データ (資料 1) のばらつきの範囲 (平均値 \pm 3 \times 標準偏差) 内であった。

被験物質の小核出現頻度は、陰性対照群との間に統計学的な有意差は認められず、傾向検定においても統計学的な有意差は認められなかった。一方、陽性対照群の小核出現頻度は 1%水準で有意な増加が認められ、本試験系の妥当性が確認された。赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、250 mg/kg/day 投与群においては高値 (67.1%) が、陽性対照群においては低値 (47.7%) が認められた。ただし、被験物質投与群と陰性対照群との間および陽性対照物質投与群と陰性対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。また、250 mg/kg/day 投与群における赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、陰性対照群に関する当試験施設の背景データ (資料 1) のばらつきの範囲 (平均値 \pm 3 \times 標準偏差) 内であった。従って、被験物質あるいは陽性対照物質の投与による、骨髓細胞の増殖への明らかな影響はないと判断した。

以上の結果から、本試験条件下では、*p*-サイメンは、マウス骨髓細胞において染色体異常誘発作用を示さない (陰性) と結論した。

7. 参考文献

- 1) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T.: In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.* 312: 293-304 (1994)
- 2) Margolin, B. H., Resnick, M. A., Rimpo, J. Y., Archer, P., Galloway, S. M., Bloom, A. D., Zeiger, E.: Statistical analyses for in vitro cytogenetic assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ. Mutagen.* 8: 183-204 (1986)
- 3) Margolin, B. H., Risko, K. J.: In "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" Ashby, J. et al. eds., Cambridge Univ. Press (1988), vol.1. pp. 29-42
- 4) Snedecor, G. W., Cochran, W. G.: In "Statistical Methods" 7th ed., Iowa State University Press, Iowa (1980)
- 5) Dunnett, C. W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121 (1955)

表 1 p-サイメンを2回強制経口投与したCD1(ICR)マウスの一般状態と死亡率 (毒性予備試験)

性	群	観察された一般状態								死亡率	
		第1回目投与				第2回目投与					
		投与直前	投与直後	2-5時間後	18-24時間後	投与直後	2-5時間後	18-24時間後	18-24時間後		
雄	p-サイメシ投与群 250 mg/kg/day 10 mL/kg/day	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
	p-サイメシ投与群 500 mg/kg/day 10 mL/kg/day	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
	p-サイメシ投与群 1000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
	p-サイメシ投与群 2000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	N	N	N	N	N	N	N	N	N	3 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	3 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	3 / 3
雌	p-サイメシ投与群 250 mg/kg/day 10 mL/kg/day	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
	p-サイメシ投与群 500 mg/kg/day 10 mL/kg/day	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
	p-サイメシ投与群 1000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 3
	p-サイメシ投与群 2000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	N	N	N	N	N	N	N	N	N	3 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	3 / 3
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	3 / 3

N, 一般状態の変化なし

a, 歩行の異常 (よろめき歩行); b, 自発運動の低下; c, 死亡

表 2 *p*-サイメンを2回強制経口投与した CD1(ICR) マウスの測定体重 (毒性予備試験)

性	群	動物番号	体重 (g)		
			初回投与直前	最終観察後	変化量
雄	<i>p</i> -サイメン 投与群	101	37.1	37.7	0.6
		102	33.0	34.0	1.0
	250 mg/kg/day 10 mL/kg/day	103	34.9	35.4	0.5
		平均	35.0	35.7	0.7
		標準偏差	2.1	1.9	0.3
	<i>p</i> -サイメン 投与群	104	35.4	36.2	0.8
		105	34.1	34.5	0.4
	500 mg/kg/day 10 mL/kg/day	106	34.9	34.7	-0.2
		平均	34.8	35.1	0.3
		標準偏差	0.7	0.9	0.5
	<i>p</i> -サイメン 投与群	107	35.6	35.4	-0.2
		108	33.3	33.0	-0.3
	1000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	109	35.5	36.1	0.6
		平均	34.8	34.8	0.0
		標準偏差	1.3	1.6	0.5
	<i>p</i> -サイメン 投与群	110	33.3	-	-
		111	36.0	-	-
	2000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	112	35.3	-	-
		平均	34.9	-	-
		標準偏差	1.4	-	-
	<i>p</i> -サイメン 投与群	113	27.0	27.3	0.3
		114	27.2	27.7	0.5
	250 mg/kg/day 10 mL/kg/day	115	26.8	27.3	0.5
		平均	27.0	27.4	0.4
	標準偏差	0.2	0.2	0.1	
<i>p</i> -サイメン 投与群	116	28.0	27.5	-0.5	
	117	27.2	26.9	-0.3	
500 mg/kg/day 10 mL/kg/day	118	26.9	26.4	-0.5	
	平均	27.4	26.9	-0.4	
	標準偏差	0.6	0.6	0.1	
<i>p</i> -サイメン 投与群	119	27.2	27.5	0.3	
	120	27.3	28.2	0.9	
1000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	121	27.4	28.5	1.1	
	平均	27.3	28.1	0.8	
	標準偏差	0.1	0.5	0.4	
<i>p</i> -サイメン 投与群	122	25.8	-	-	
	123	27.5	-	-	
2000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	124	26.4	-	-	
	平均	26.6	-	-	
	標準偏差	0.9	-	-	

-: 死亡したため体重測定を行わなかった。

表 3 p-サイメンを2回強制経口投与したCDI(ICR)雄マウスの一般状態と死亡率 (小核本試験)

投与群	動物番号	観察された動物数										死亡率	
		第1回投与					第2回投与						
		投与前日	投与直前	投与直後	投与後 2-5時間	投与後 18-24時間	投与直後	投与後 2-5時間	投与後 18-24時間	投与後 18-24時間	投与後 18-24時間		
陰性対照群 [媒体 (トウモロコシ油)] 10 mL/kg/day	1	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	3	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 5
	4	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	5	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
p-サイメシ投与群 (低用量) 250 mg/kg/day 10 mL/kg/day	6	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	7	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	8	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 5
	9	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	10	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
p-サイメシ投与群 (中用量) 500 mg/kg/day 10 mL/kg/day	11	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	12	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	13	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 5
	14	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	15	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
p-サイメシ投与群 (高用量) 1000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	16	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	17	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	18	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 5
	19	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	20	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
陽性対照群 (CP 50 mg/kg) 10 mL/kg	21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 5
	24	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

CP, Cyclophosphamide monohydrate (単回強制経口投与)

N, 一般状態の変化なし
, 実施せず

表 4 *p*-サイメンを2回強制経口投与した CD1(ICR) 雄マウスの測定体重 (小核本試験)

群	動物番号	体重 (g)		
		初回投与直前	搬出直前	変化量
陰性対照群 [媒体 (トウモロコシ油)] 10 mL/kg/day	1	34.5	34.9	0.4
	2	35.2	35.6	0.4
	3	36.1	37.3	1.2
	4	36.0	36.0	0.0
	5	34.4	35.2	0.8
	平均	35.2	35.8	0.6
	標準偏差	0.8	0.9	0.5
<i>p</i> -サイメン投与群 (低用量) 250 mg/kg/day 10 mL/kg/day	6	35.3	36.2	0.9
	7	34.7	34.1	-0.6
	8	36.2	37.3	1.1
	9	34.5	35.1	0.6
	10	35.5	36.4	0.9
	平均	35.2	35.8	0.6
	標準偏差	0.7	1.2	0.7
<i>p</i> -サイメン投与群 (中用量) 500 mg/kg/day 10 mL/kg/day	11	37.2	37.2	0.0
	12	35.2	35.7	0.5
	13	35.1	36.6	1.5
	14	35.4	34.9	-0.5
	15	34.1	35.1	1.0
	平均	35.4	35.9	0.5
	標準偏差	1.1	1.0	0.8
<i>p</i> -サイメン投与群 (高用量) 1000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	16	35.5	36.2	0.7
	17	34.5	35.8	1.3
	18	33.2	33.0	-0.2
	19	36.2	36.1	-0.1
	20	35.9	36.1	0.2
	平均	35.1	35.4	0.4
	標準偏差	1.2	1.4	0.6
陽性対照群 (CP 50 mg/kg) 10 mL/kg	21	36.1	35.0	-1.1
	22	36.1	35.6	-0.5
	23	35.9	35.6	-0.3
	24	32.3	33.1	0.8
	25	35.4	34.7	-0.7
	平均	35.2	34.8	-0.4
	標準偏差	1.6	1.0	0.7

CP, Cyclophosphamide monohydrate (単回強制経口投与)

表 5 *p*-サイメンを2回強制経口投与した CD1(ICR) 雄マウスの小核本試験

投与群	動物番号	小核出現頻度 (%) ^a	幼若赤血球比率 (%) ^b
陰性対照群 [媒体 (トウモロコシ油)] 10 mL/kg/day	1	0.10	49.6
	2	0.20	56.8
	3	0.13	60.8
	4	0.18	57.3
	5	0.10	54.8
	観察細胞数	28 / 20000	2793 / 5000
平均値±標準偏差	0.14 ± 0.05	55.9 ± 4.1	
最小値 - 最大値	0.10 - 0.20	49.6 - 60.8	
<i>p</i> -サイメン投与群 (低用量) 250 mg/kg/day 10 mL/kg/day	6	0.10	67.6
	7	0.30	68.1
	8	0.20	63.3
	9	0.25	67.7
	10	0.20	69.0
	観察細胞数	42 / 20000	3357 / 5000
平均値±標準偏差	0.21 ± 0.07	67.1 ± 2.2	
最小値 - 最大値	0.10 - 0.30	63.3 - 69.0	
<i>p</i> -サイメン投与群 (中用量) 500 mg/kg/day 10 mL/kg/day	11	0.18	56.1
	12	0.13	62.0
	13	0.15	42.5
	14	0.13	54.3
	15	0.20	63.7
	観察細胞数	31 / 20000	2786 / 5000
平均値±標準偏差	0.16 ± 0.03	55.7 ± 8.4	
最小値 - 最大値	0.13 - 0.20	42.5 - 63.7	
<i>p</i> -サイメン投与群 (高用量) 1000 mg/kg/day 10 mL/kg/day	16	0.08	65.1
	17	0.23	50.0
	18	0.10	35.0
	19	0.23	59.6
	20	0.23	56.0
	観察細胞数	34 / 20000	2657 / 5000
平均値±標準偏差	0.17 ± 0.08	53.1 ± 11.5	
最小値 - 最大値	0.08 - 0.23	35.0 - 65.1	
陽性対照群 (CP 50 mg/kg) 10 mL/kg	21	2.53	39.9
	22	3.23	51.6
	23	2.20	57.2
	24	2.33	43.2
	25	3.40	46.5
	観察細胞数	547 / 20000 **	2384 / 5000
平均値±標準偏差	2.74 ± 0.54	47.7 ± 6.9	
最小値 - 最大値	2.20 - 3.40	39.9 - 57.2	

CP, Cyclophosphamide monohydrate (単回強制経口投与)

a, 幼若赤血球中に占める小核を有する幼若赤血球の比率 (%)

b, 骨髓赤血球中に占める幼若赤血球の比率 (%)

**, 陰性対照群と比較して1%水準で有意な増加 (Fisherの正確確率検定)

資料 1 における CDI(ICR) 雄マウスを用いた小核試験の背景データ

試験群	標本作製時期 (時間)	試験数	動物数/群	小核出現頻度 (%)	幼若赤血球比率 (%)
陰性対照群 (媒体)	24	26	5	0.13 ± 0.04 ^a (0.07 - 0.22) ^b	52.3 ± 6.2 ^a (40.1 - 67.3) ^b
陽性対照群 (CP 50 mg/kg)	24	27	5	2.36 ± 0.26 ^a (1.85 - 2.91) ^b	47.0 ± 7.0 ^a (34.8 - 61.6) ^b

a, 各試験における平均値の平均±標準偏差

b, 範囲 (最小値-最大値)

CP, Cyclophosphamide monohydrate