

最 終 報 告 書

イソオイゲニルメチルエーテルのマウスを用いた小核試験

試験番号： [REDACTED]

試験期間： [REDACTED]

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



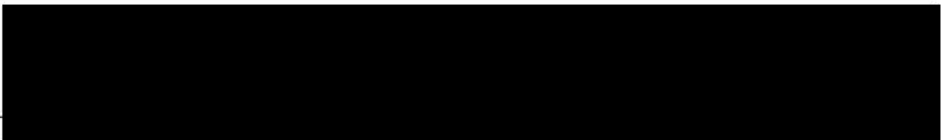
1. GLP 陳述書

試験番号 : 

試験表題 : イソオイゲニルメチルエーテルのマウスを用いた小核試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
(平成 23 年 3 月 31 日：薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、
環保企発第 110331010 号)



試験責任者





2. 目次

1.	GLP 陳述書	2
2.	目次	3
3.	試験実施概要.....	5
3.1	試験番号	5
3.2	試験表題	5
3.3	試験目的	5
3.4	試験委託者	5
3.5	試験受託者	5
3.6	試験実施施設	5
3.7	試験日程	5
3.8	試験責任者	6
3.9	試験担当者	6
3.10	試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	6
3.11	資料保存	6
3.12	試験責任者の記名・押印	6
4.	要約	7
5.	緒言	8
6.	試験材料及び方法	9
6.1	被験物質、媒体及び陽性対照物質	9
6.1.1	被験物質	9
6.1.2	媒体	10
6.1.3	陽性対照物質	10
6.2	投与液の調製	10
6.2.1	陰性対照群投与液（媒体）の調製	10
6.2.2	被験液の調製	10
6.2.2.1	調製方法	10
6.2.2.2	保存方法	11
6.2.2.3	安定性	11
6.2.3	陽性対照群投与液の調製	11
6.3	試験動物種及び系統の選択理由	11
6.4	試験動物	11
6.5	飼育条件	11
6.6	飼料、飲料水、床敷及び環境エンリッチメント中の混入物質	12
6.7	動物の識別及びケージへの表示	12
6.8	群分け	12
6.9	投与経路、投与方法及びそれらの選択理由	13



6.10	投与量及びその設定根拠並びに群構成	13
6.10.1	予備試験.....	13
6.10.2	本試験.....	13
6.11	観察及び検査の方法.....	14
6.11.1	一般状態の観察.....	14
6.11.2	体重測定.....	14
6.11.3	骨髓塗抹標本の作製.....	14
6.11.4	骨髓塗抹標本の観察.....	15
6.11.5	観察結果の算出.....	15
7.	試験結果.....	16
7.1	予備試験.....	16
7.1.1	一般状態.....	16
7.1.2	体重.....	16
7.2	本試験.....	16
7.2.1	一般状態.....	16
7.2.2	体重.....	16
7.2.3	骨髓塗抹標本の観察結果.....	16
8.	考察.....	17
9.	参考文献.....	18

表

Table 1	Clinical signs	19
Table 2	Body weight.....	20
Table 3	Observation of bone marrow smears (About 24 hours after the 2nd administration)	21

付表

Appendix 1-1、1-2	Clinical signs (Preliminary study).....	22
Appendix 2-1、2-2	Body weight (Preliminary study).....	24
Appendix 3	Clinical signs	26
Appendix 4	Body weight.....	27
Appendix 5	Observation of bone marrow smears (About 24 hours after the 2nd administration)	28

信頼性保証書	29
--------------	----



3. 試験実施概要

3.1 試験番号



3.2 試験表題

イソオイゲニルメチルエーテルのマウスを用いた小核試験
(A Micronucleus Test of Isoeugenyl methyl ether in Mice)

3.3 試験目的

マウスの骨髄細胞を用いて、イソオイゲニルメチルエーテルの *in vivo* における染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

3.4 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所



3.5 試験受託者



3.6 試験実施施設



3.7 試験日程

試験開始日 :

被験物質受領日 :

試験責任者への被験物質配布日
:

実験開始日 (予備試験 1 回目の投与日)

予備試験
:

動物入荷日 :

[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]

3.8 試験責任者

[Redacted]

3.9 試験担当者

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

3.10 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

3.11 資料保存

試験計画書原本 (試験計画書変更書を含む)、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。

3.12 試験責任者の記名・押印

[Redacted]

4. 要約

イソオイゲニルメチルエーテルの染色体異常誘発能の有無を検討するため、CrI:CD1(ICR)SPF マウスの骨髄細胞を用いた小核試験を実施した。

イソオイゲニルメチルエーテルの 125、250 及び 500 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 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。


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。

しかし、500 mg/kg/日投与群において、幼若赤血球の出現頻度の平均値が 50%を下回る減少傾向を示していることから、軽度の骨髄細胞の増殖抑制作用を有するものと考えられた。この結果は、標的臓器である骨髄が被験物質に暴露されたことを示唆するものであった。

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べ顕著に増加し、また、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研究所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、マウスの骨髄細胞を用いた本試験において、イソオイゲニルメチルエーテルの染色体異常誘発能は無いと判定した。



5. 緒言

国立医薬品食品衛生研究所からの委託により、イソオイゲニルメチルエーテ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。

GLP


- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
(平成 23 年 3 月 31 日：薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、
環境企発第 110331010 号)

毒性試験ガイドライン

- 「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」
(衛化第 29 号：平成 8 年 3 月 22 日付厚生省生活衛生局長通知)
- 「OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 474」
(OECD：2014 年 9 月 26 日)



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)

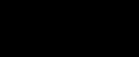
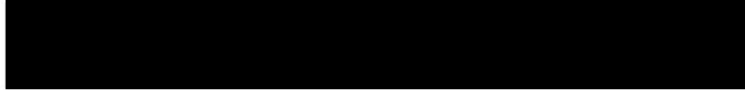
本試験は、試験施設の動物実験委員会の承認を受けて実施した(承認番号：)。

返却 : 動物試験終了後の残量は全て供給者に返却した。

6.1.2 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 : 
保存方法 : 室温
保存場所 : 
選択理由 : コーン油に溶解（希釈）できたことから選択した。

6.1.3 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 : 
力価 : 2 mg/vial
保存方法 : 室温、遮光
保存場所 : 
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。

6.2 投与液の調製

6.2.1 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。

6.2.2 被験液の調製

6.2.2.1 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。
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。

6.2.2.2 保存方法

用時調製とし保存しなかった。

6.2.2.3 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。

6.2.3 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^{注1} 5 mLで溶解した後、2 mLを採取して、生理食塩液^{注2}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]〕

6.3 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。

6.4 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16匹^{注3}、本試験用として雄30匹^{注4}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34.7~37.6 g、雌24.9~29.8 g、本試験が雄33.0~37.4 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3： 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各15匹であったが、実際には雌雄各16匹が納入された。

注4： 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。

6.5 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22~23°C、相対湿度(許容範囲50±20%)が予備試験42~52%、本試験46~56%、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([REDACTED])

([REDACTED])で床敷(ALPHA-dri: Shepherd Specialty Papers, Inc.、ロット番号:[REDACTED])

([REDACTED])を入れたプラスチックケージ(W155×D245×H150 mm: 日本クレア株式会社)に検疫・馴化期間中は2匹^{注5}ずつ、群構成後は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]、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 (Harlan Laboratories, Inc.、ロット番号：[REDACTED])を1週間に1回以上の頻度で与えた。

注5：試験計画書では、検疫・馴化期間中は1ケージ内に2匹ずつ飼育すると記載したが、本試験において Tag No.318 の動物が検疫・馴化6日目にファイティングによる腹部外傷が原因で死亡したため、1ケージについては群構成までの間、一時的に1匹飼いとなった。1匹飼いとなった同居動物 Tag No.317 の動物は、群分けまでに一般状態及び体重に異常はみられていないことから、試験の評価に影響を及ぼすものではないと判断した。

6.6 飼料、飲料水、床敷及び環境エンリッチメント中の混入物質

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 で分析を行い、エンリッチメント中の混入物質に関しては使用したロットについて Harlan Laboratories, Inc. 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。

6.7 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 484~499 (雄)、500~515 (雌)、本試験では 291~320 (雄) の番号が刻印された耳標を入荷時に装着した。また、補助識別(マーキング)を行った。

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。

6.8 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：[REDACTED]、本試験：[REDACTED]）。

6.9 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。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

6.10.1 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。群構成表を表 6-1 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 6-1. 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

6.10.2 本試験

予備試験において、1 群当たり雌雄各 3 匹のマウスを用いて 250、500、1000 及び 2000 mg/kg/日を約 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 1000 及び 2000 mg/kg/日投与群の雌雄各 3 例が死亡した。一般状態では自発運動の減少が

1000 及び 2000 mg/kg/日 投与群の雌雄にみられ、腹臥・横臥が 1000 mg/kg/日 投与群の雄及び 2000 mg/kg/日 投与群の雌雄でみられた。体重では各投与群の雌雄で減少傾向がみられた。

したがって、本試験における投与量は、死亡例がみられず最大耐量と思われる 500 mg/kg/日 を高用量とし、以下公比 2 で除して、250 及び 125 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 6-2 に示す。

表 6-2. 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 ^{a)}
低用量	125	12.5	10	2	雄	5	2011~2015	約 24 時間 ^{a)}
中用量	250	25	10	2	雄	5	3011~3015	約 24 時間 ^{a)}
高用量	500	50	10	2	雄	5	4011~4015	約 24 時間 ^{a)}
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

6.11 観察及び検査の方法

6.11.1 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。

6.11.2 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：9:08~10:12 の間、本試験：8:43~11:54 の間）。

6.11.3 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^{1,2)}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 23G 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：1551840）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（トミー工業株式会社、卓上多本架遠心機 LC-220）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）。

6.11.4 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^{3,4)}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。

6.11.5 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±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⁵⁾（有意水準：片側5%、upper-tailed）並びにCochran Armitageの傾向検定⁶⁾（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⁷⁾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Dunnnettの検定⁸⁾（有意水準：両側1及び5%）を行った。

7. 試験結果

7.1 予備試験

7.1.1 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 1000 及び 2000 mg/kg/日投与群の雌雄各 3 例が死亡した。一般状態では自発運動の減少が 1000 及び 2000 mg/kg/日投与群の雌雄にみられ、腹臥・横臥が 1000 mg/kg/日投与群の雄及び 2000 mg/kg/日投与群の雌雄でみられた。250 及び 500 mg/kg 投与群では異常はみられなかった。

7.1.2 体重

成績を Appendix 2-1 及び 2-2 に示した。

各投与群の雌雄で体重の減少傾向がみられた。

7.2 本試験

7.2.1 一般状態

成績を Table 1 及び Appendix 3 に示した。

自発運動の減少及び呼吸数の減少が 500 mg/kg/日投与群でみられた。その他の投与群では一般状態に異常はみられなかった。

7.2.2 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の体重推移に異常はみられなかった。

7.2.3 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、125 mg/kg/日投与群で $0.12 \pm 0.05\%$ 、250 mg/kg/日投与群で $0.14 \pm 0.08\%$ 、500 mg/kg/日投与群で $0.17 \pm 0.04\%$ であった。これらの値を陰性対照群の $0.15 \pm 0.03\%$ 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が、500 mg/kg/日投与群における PCE 出現頻度の平均値は 46.0%であり、50%を下回った。

なお、陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、陰性対照群と比べ顕著に増加した。更に、陰性対照群及び陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、当研究所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。

8. 考察

イソオイゲニルメチルエーテルの染色体異常誘発能の有無を検討するため、CrI:CD1(ICR)SPF マウスの骨髄細胞を用いた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、イソオイゲニルメチルエーテルの 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 1000 及び 2000 mg/kg/日投与群の雌雄各 3 例が死亡した。これらの動物では自発運動の減少や腹臥・横臥がみられた。また、各投与群の雌雄では体重の減少傾向がみられた。

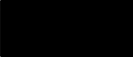
予備試験におけるこれらの結果をもとに、本試験では、最大耐量と推定された 500 mg/kg/日を高用量とし、以下公比 2 で除して、250 及び 125 mg/kg/日の 3 用量を設定し、約 24 時間間隔で 2 回経口投与した。2 回目の投与約 24 時間後に骨髄塗抹標本を作製して観察を行った。また、陰性対照としてコーン油を被験物質投与群と同じ用量及び同じ頻度で投与する群、陽性対照として MMC の 1 mg/kg を腹腔内に 1 回投与する群を設定し、投与後所定の時間に骨髄塗抹標本を作製して観察を行った。1 群当たりの動物数は雄 5 匹とした。

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。しかしながら、500 mg/kg/日投与群における PCE 出現頻度の平均値は 50%を下回ったことから、軽度の骨髄細胞の増殖抑制作用が示唆された。この結果は、標的臓器である骨髄が被験物質に暴露されたことを示唆するものであった。

なお、陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、陰性対照群と比べ顕著に増加し、また、陰性対照群と陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、当研究所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、マウスの骨髄細胞を用いた本試験において、イソオイゲニルメチルエーテルの染色体異常誘発能は無いと判定した。



9. 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 Isoeugenyl methyl ether 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	125	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
Middle	250	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
High	500	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	2	5	5	4	4
		Decrease in spontaneous movement	0	0	3	0	0	1	1
		Bradypnea	0	0	3	0	0	0	1
Positive control ^{a)} (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 Isoeugenyl methyl ether 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	35.2	34.3	33.9
		S.D.	1.4	1.3	1.4
Low	125	N	5	5	5
		Mean	35.3	34.1	33.9
		S.D.	1.6	1.9	2.0
Middle	250	N	5	5	5
		Mean	35.2	34.2	34.5
		S.D.	1.4	1.2	1.2
High	500	N	5	5	5
		Mean	35.3	33.4	33.4
		S.D.	1.6	1.9	3.5
Positive control ^{a)} (Mitomycin C)	1	N	5	5	5
		Mean	35.3	34.9	35.1
		S.D.	1.5	1.8	1.8

Unit : g

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

Table 3

A Micronucleus Test of Isoeugenyl methyl ether 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(%) ^{b)}	No. of PCE in 500 erythrocytes	PCE(%) ^{c)}
Negative control	0	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	6 ± 1	0.15 ± 0.03	275 ± 31	55.1 ± 6.1
		Min. / Max.		0.13 / 0.18		50.2 / 64.8
Low	125	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	5 ± 2	0.12 ± 0.05	276 ± 38	55.2 ± 7.7
		Min. / Max.		0.05 / 0.20		47.8 / 64.0
Middle	250	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	5 ± 3	0.14 ± 0.08	286 ± 32	57.3 ± 6.4
		Min. / Max.		0.03 / 0.23		50.2 / 66.8
High	500	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	7 ± 2	0.17 ± 0.04	230 ± 23	46.0 ± 4.7
		Min. / Max.		0.10 / 0.20		40.2 / 52.6
Positive control ^{a)} (Mitomycin C)	1	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	130 ± 43	3.26 ± 1.06	268 ± 36	53.6 ± 7.3
		Min. / Max.		1.58 / 4.30		45.0 / 65.0

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

No statistically significant difference in any test article administration group from negative control group.

Clinical signs (Preliminary study)

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	2	2	2
			No abnormalities	3	3	2	1	1	1	0
			Decrease in spontaneous movement	0	0	1	1	1	0	0
			Prone/Lateral position	0	0	0	0	0	1	0
			Dead	0	0	0	1	0	0	2
	Highest	2000	Number of animals	3	3	3	3	1	1	1
			No abnormalities	3	3	0	1	1	0	0
			Decrease in spontaneous movement	0	0	1	1	0	1	0
			Prone/Lateral position	0	0	2	1	0	0	0
Dead			0	0	0	2	0	0	1	

Clinical signs (Preliminary study)

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	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	2	2	2
			No abnormalities	3	3	3	2	2	1	0
			Decrease in spontaneous movement	0	0	0	0	0	1	0
			Dead	0	0	0	1	0	0	2
	Highest	2000	Number of animals	3	3	3	3	1	1	1
			No abnormalities	3	3	0	1	1	0	0
			Decrease in spontaneous movement	0	0	2	0	0	0	0
			Prone/Lateral position	0	0	1	0	0	1	0
			Dead	0	0	0	2	0	0	1

Body weight (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	36.2	34.1	34.4		
			1002	35.6	35.4	36.0		
			1003	37.6	35.5	33.1		
			Mean	36.5	35.0	34.5		
			S.D.	1.0	0.8	1.5		
			2001	36.6	35.1	35.0		
	Middle	500	2002	36.8	35.4	34.9		
			2003	34.7	33.6	34.4		
			Mean	36.0	34.7	34.8		
			S.D.	1.2	1.0	0.3		
			High	1000	3001	35.0	32.0	Dead
					3002	37.3	Dead	
	3003	36.5			32.2	Dead		
	Mean	36.3			32.1			
	S.D.	1.2						
	4001	35.0			30.7	Dead		
	Highest	2000	4002	36.4	33.2	Dead		
			4003	37.6	35.5	Dead		
Mean			36.3	33.1				
S.D.			1.3	2.4				

Unit : g

Body weight (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	29.8	29.3	29.8
			1102	25.5	24.5	24.4
			1103	25.8	25.2	25.1
			Mean	27.0	26.3	26.4
			S.D.	2.4	2.6	2.9
	Middle	500	2101	28.3	25.6	23.9
			2102	24.9	24.9	25.8
			2103	26.8	26.6	26.0
			Mean	26.7	25.7	25.2
			S.D.	1.7	0.9	1.2
	High	1000	3101	25.0	23.4	Dead
			3102	26.7	Dead	
			3103	28.4	25.3	Dead
			Mean	26.7	24.4	
			S.D.	1.7		
	Highest	2000	4101	29.5	Dead	
			4102	25.5	24.2	Dead
			4103	26.6	Dead	
			Mean	27.2	24.2	
			S.D.	2.1		

Unit : g

Clinical signs

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	125	2011	-	-	-	-	-	-	-
		2012	-	-	-	-	-	-	-
		2013	-	-	-	-	-	-	-
		2014	-	-	-	-	-	-	-
		2015	-	-	-	-	-	-	-
Middle	250	3011	-	-	-	-	-	-	-
		3012	-	-	-	-	-	-	-
		3013	-	-	-	-	-	-	-
		3014	-	-	-	-	-	-	-
		3015	-	-	-	-	-	-	-
High	500	4011	-	-	AI	-	-	-	-
		4012	-	-	-	-	-	-	-
		4013	-	-	AI	-	-	A	AI
		4014	-	-	AI	-	-	-	-
		4015	-	-	-	-	-	-	-
Positive control ^{a)} (Mitomycin C)	1	5011	-	/	/	-	-	-	-
		5012	-	/	/	-	-	-	-
		5013	-	/	/	-	-	-	-
		5014	-	/	/	-	-	-	-
		5015	-	/	/	-	-	-	-

- : No abnormalities

/ : No observation

A: Decrease in spontaneous movement

I: Bradypnea

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

Body weight

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	36.4	35.5	34.9
		1012	36.5	35.3	35.4
		1013	33.1	32.3	31.8
		1014	35.3	34.1	33.8
		1015	34.7	34.1	33.6
		Mean	35.2	34.3	33.9
		S.D.	1.4	1.3	1.4
Low	125	2011	37.2	36.1	36.4
		2012	34.6	33.1	33.2
		2013	33.1	31.6	31.4
		2014	35.4	33.8	33.2
		2015	36.3	35.9	35.3
		Mean	35.3	34.1	33.9
		S.D.	1.6	1.9	2.0
Middle	250	3011	36.5	35.0	35.5
		3012	36.5	35.7	35.5
		3013	33.0	33.1	33.3
		3014	35.0	33.0	33.2
		3015	35.2	34.4	35.0
		Mean	35.2	34.2	34.5
		S.D.	1.4	1.2	1.2
High	500	4011	37.3	35.3	37.0
		4012	36.1	34.0	34.4
		4013	33.4	30.5	27.8
		4014	34.1	32.4	32.7
		4015	35.4	34.7	35.2
		Mean	35.3	33.4	33.4
		S.D.	1.6	1.9	3.5
Positive control ^{a)} (Mitomycin C)	1	5011	33.7	33.3	34.1
		5012	36.0	36.0	35.8
		5013	37.4	37.2	37.7
		5014	35.5	34.8	35.0
		5015	33.9	33.1	32.9
		Mean	35.3	34.9	35.1
		S.D.	1.5	1.8	1.8

Unit : g

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

Observation of bone marrow smears (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(%) ^{b)}	Mean \pm S.D. (Min / Max)	No. of PCE in 500 erythrocytes	Mean \pm S.D.	PCE(%) ^{c)}	Mean \pm S.D. (Min / Max)
Negative control	0	1011	5	6 \pm 1	0.13	0.15 \pm 0.03	287	275 \pm 31	57.4	55.1 \pm 6.1
		1012	5		0.13	(0.13 / 0.18)	256		51.2	(50.2 / 64.8)
		1013	7		0.18		251		50.2	
		1014	7		0.18		259		51.8	
		1015	6		0.15		324		64.8	
Low	125	2011	4	5 \pm 2	0.10	0.12 \pm 0.05	271	276 \pm 38	54.2	55.2 \pm 7.7
		2012	2		0.05	(0.05 / 0.20)	239		47.8	(47.8 / 64.0)
		2013	5		0.13		310		62.0	
		2014	5		0.13		239		47.8	
		2015	8		0.20		320		64.0	
Middle	250	3011	1	5 \pm 3	0.03	0.14 \pm 0.08	298	286 \pm 32	59.6	57.3 \pm 6.4
		3012	8		0.20	(0.03 / 0.23)	334		66.8	(50.2 / 66.8)
		3013	9		0.23		251		50.2	
		3014	5		0.13		265		53.0	
		3015	4		0.10		284		56.8	
High	500	4011	8	7 \pm 2	0.20	0.17 \pm 0.04	242	230 \pm 23	48.4	46.0 \pm 4.7
		4012	4		0.10	(0.10 / 0.20)	225		45.0	(40.2 / 52.6)
		4013	6		0.15		201		40.2	
		4014	7		0.18		220		44.0	
		4015	8		0.20		263		52.6	
Positive control ^{a)} (Mitomycin C)	1	5011	134	130 \pm 43	3.35	3.26 \pm 1.06	325	268 \pm 36	65.0	53.6 \pm 7.3
		5012	160		4.00	(1.58 / 4.30)	225		45.0	(45.0 / 65.0)
		5013	63		1.58		255		51.0	
		5014	122		3.05		263		52.6	
		5015	172		4.30		272		54.4	

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

信託性保証書 (1/2)

試験番号 : [REDACTED]

試験表題 : イソオイゲニルメチルエーテルのマウスを用いた小核試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
(平成 23 年 3 月 31 日：薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、
環境企発第 110331010 号)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

[REDACTED]

試験における調査

項目	担当者	調査日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
試験計画書	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
試験計画書変更書 (1)			
作業予定表・ コンピュータプロトコール			
調製・保存 (被験物質)			
群分け・投与・一般状態の観察			

信頼性保証書 (2/2)

項目	担当者	調査日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
調製・保存 (陽性対照物質)	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
投与・一般状態の観察 (陽性対照物質)			
骨髓塗抹標本の作製			
骨髓塗抹標本の観察			
試験計画書変更書 (2)			
生データ			
最終報告書草案・表・付表			
最終報告書			

プロセス調査

項目	試験番号	担当者	調査日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
動物入荷	B-7907	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
検疫・馴化	F-0009			
	F-0009			
体重測定	B-7880			