試験番号 G-08-039

最終報告書

トリメチルホスファイトの
マウスを用いる小核試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室　委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523　神奈川県秦野市落合729-5

TEL　0463-82-4751

目次

要約 5

材料と方法 6
1. 被験物質 6
2. 陰性対照物質 6
3. 陽性対照物質 6
4. 使用動物と飼育条件 7
5. 投与検体の調製 7
6. 投与方法 9
7. 試験操作、観察と解析 9
1) 毒性予備試験 9
2) 小核本試験 9

試験成績と考察 12
1. 毒性予備試験 12
2. 小核本試験 13
参考文献 14
Tables 15

要約

トリメチルホスファイトが生体内において染色体異常誘発性を有するか否かを評価するため、ICR 系マウスを用いた強制経口投与による小核試験を実施した。まず、小核本試験で用いる投与量を設定するために毒性予備試験を行い、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 日間連続投与した。その結果、雌の 1000 および 2000 mg/kg/day 投与群でそれぞれ 3 例中 1 例が死亡し、雄の 2000 mg/kg/day で 3 例中 1 例が瀕死状態となった。生存例においても、腹臥位姿勢や振戦といった重篤な症状が全ての投与群で観察された。

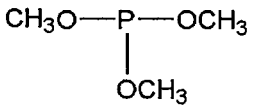
毒性予備試験の結果に基づき、小核本試験では陰性対照群（媒体）、被験物質投与群（250、500 および 1000 mg/kg/day）および陽性対照群（cyclophosphamide monohydrate）の計 5 群を設定し、雄マウスを用いて行った。陰性対照群および被験物質投与群は、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間連続経口投与した。陽性対照群は 50 mg/kg の用量で、単回強制経口投与した。いずれの投与群も、最終投与の約 24 時間後に骨髄塗抹標本を作製して小核の観察を行った。その結果、被験物質投与による小核出現頻度の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群の小核出現頻度は 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。なお、赤血球中に占める幼若赤血球の比率には、陰性対照群とそれ以外の群との間に有意な差は認められなかったことから、被験物質投与による骨髄細胞（赤血球）の増殖抑制作用はないと判断した。

以上の結果から、本試験条件下では、トリメチルホスファイト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もの（陰性）と結論する。

材料と方法

1. 被験物質

トリメチルホスファイト(別名:亜りん酸トリメチル、英名:trimethylphoshorous acid、略称:TPA、CAS 番号:121-45-9、分子式:$C_3H_9O_3P$、分子量:124.08、 純度:99.7%、Appendix 1)は無色透明の液体で 購入し(購入日 2009 年 1 月 23 日)、使用時まで酸化防止のため窒素封入し、室温(実測値:16.2～22.7℃)で保管した。トリメチルホスファイトの構造式を以下に示す。



被験物質の安定性については、投与開始前(2009 年 2 月 10 日)および投与期間終了後(2009 年 3 月 16 日)にフーリエ変換赤外分光光度計(FTIR-8300、島津製作所)を用いて 4000 cm^{-1}～400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、スペクトルに変化がないことを確認した(Appendix 2)。

2. 陰性対照物質

陰性対照物質には、コーン油(製造番号:V7A2710、製造者:ナカライテスク)を用いた。コーン油(購入年月日:2007 年 2 月 1 日、使用期限:2010 年 1 月)は、使用時まで室温保管した。

3. 陽性対照物質

陽性対照物質には、cyclophosphamide monohydrate(略称:CP、CAS 番号:6055-19-2、純度:99.8%、ロット番号:113K1406、製造者:Sigma Chemical)を用いた。CP(購入年月日:2005 年 1 月 18 日、使用期限:購入後 5 年)は、使用時まで冷蔵保管した。

4. 使用動物と飼育条件

日本チャールス・リバー厚木飼育センターから8週齢で購入したICR系マウス[Crlj:CD1(ICR)、SPF]を、入荷日を含む7日間、検疫と馴化を兼ねて飼育した。その間、毎日1回一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。試験には、検疫期間中の体重が順調に増加し、一般状態に異常の認められなかった動物を9週齢で使用した。検疫期間中は油性フェルトペンにより尾に馴化番号を記し、試験番号、性別、馴化番号および入荷日を記載した動物カードを飼育ケージに付けて識別した。各試験に用いた動物の入荷日、匹数および入荷時体重範囲を次表に示す。余剰動物および毒性予備試験に使用した動物は、各試験の動物飼育終了時に炭酸ガスを用いて安楽死させた。

試験	入荷日	入荷動物数(使用数/余剰数)	入荷時体重範囲
毒性予備試験	2009年2月18日	雄15匹(12/3)	33.2～37.2 g
		雌15匹(12/3)	22.3～25.4 g
小核本試験	2009年3月4日	雄30匹(29/1)	30.8～37.6 g

動物は、全飼育期間を通じて、許容温度:21.0～25.0℃、許容湿度:40.0～75.0%、換気設定:約15回／時間、明暗サイクル:12時間(7時～19時)点灯、12時間(19時～7時)消灯に設定された飼育室内(13号室)で、床敷としてペパークリーン(日本エスエルシー)を入れたTPX樹脂製ケージ(143W×293D×148H mm、日本チャールス・リバー)に個別に収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。全飼育期間中における飼育室の温度および湿度の実測値はそれぞれ22.5～23.5℃および48.0～69.0%であり、いずれも許容範囲内であった。また、供給した飼料、飲料水および床敷の分析結果は、いずれもSOPに記載の許容範囲内であることを確認した。

動物の群分けは、検疫終了時の測定体重(平均±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行った。群分け後の動物には、油性フェルトペンにより尾に動物番号を記し、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て飼育ケージに付けて識別した。

5. 投与検体の調製

被験物質は水と激しく反応し、爆発の危険性があるため、媒体はコーン油を用いた。被験物質を秤量し、コーン油(製造番号:V7A2710、製造者:ナカライテスク)を加えて溶解後、メートルグラスを用い、コーン油を加えて全量を合わせて最高濃度の被験物質投与検体を調製し、以下同媒体で段階希釈した。被験物質投与検体は、冷蔵(実測値:3～4℃)、遮光および窒素封入下で保管し、調製後3日以内に使用した。被験物質投与検体の調製濃度を以下に示す。

毒性予備試験: 25、50、100、200 mg/mL

小核本試験: 25、50、100 mg/mL

なお、コーン油を媒体とした約 1 mg/mL および約 16 mg/mL の被験物質調製液については、冷蔵、遮光および窒素封入下で 8 日間安定であることが、秦野研究所で実施した別試験(試験番号 R-98-025、GLP)において確認されている。また、約 15 mg/mL および約 200 mg/mL の被験物質調製液については、冷蔵(実測値:2～4℃)、遮光および窒素封入下における安定性試験を実施した結果、4 日および 8 日間の安定性が確認された(Appendix 3)。

小核本試験に用いた全ての被験物質投与検体については、秦野研究所でガスクロマトグラフ(GC)法を用いて含量測定を実施した。その結果、各投与検体中における被験物質の平均含量は 96.9～98.6%であり、各測定値のばらつきは 98.8～101%であった(Appendix 4)。これらの値は、試験計画書に記載した判定基準の範囲(平均含量:調製濃度の 90.0～110%、各測定値のばらつき:平均値の 90.0%～110%)を満たした。分析法を以下に示す。

調製検体の 0.5 mL を採取し、アセトン(HPLC 用、和光純薬工業)で適宜希釈して試料溶液とした。別に、被験物質 50.63 mg を量り、アセトンに溶解して正確に 25 mL とし、標準原液(2.025 mg/mL)を調製した。この標準原液をアセトンで適宜希釈して標準溶液(101.2、202.5 および 303.7 μg/mL)を調製した。試料溶液および標準溶液各 2 mL に内標準液(以下、IS)* 2 mL を加えて混合し、ガスクロマトグラフ(GC)法により測定した。標準溶液は各 n=3 で測定し、得られる TPA の IS に対するピーク面積比と調製濃度を基に、内標準法により検量線を作成した。試料溶液は各 n=1 で測定し、得られる TPA の IS に対するピーク面積比から、先の検量線を用いて試料溶液中の TPA 濃度を求め、希釈率を乗じて調製検体中の TPA 濃度を算出した。

*内標準溶液:エチルベンゼン(東京化成工業)100.45 mg を量り、アセトンに溶解して正確に 20 mL とした。この溶液 1 mL をとり、アセトンで 100 mL とし、内標準溶液(50.22 μg/mL)とした。

GC システム

ガスクロマトグラフ: GC-17A(島津製作所)
オートインジェクタ: AOC-20i(島津製作所)
データ処理装置: C-R7A(島津製作所)

GC 条件

検出器: 水素炎イオン化検出器
分析カラム: Rtx®-1301(内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 1.5 μm、島津ジーエルシー)
カラム温度: 70℃(1 分間)→3℃/分→100℃
必要に応じて「→25℃/分→230℃(1 分間)」を追加した。
キャリアーガス: ヘリウム
メイクアップガス: ヘリウム(30 kPa)
流量: 75 kPa
水素: 60 kPa
空気: 50 kPa
スプリット/スプリットレス: スプリット
スプリット比: 1:10

試料気化室設定温度: 220℃
検出器部設定温度: 250℃
注入量: 1 μL

陽性対照物質の CP については、秤量後、日局生理食塩液(製造番号:K6F70、大塚製薬工場)に溶解して、5 mg/mL 溶液を調製して使用した。調製は用時に行った。

6. 投与方法

陰性対照物質および被験物質の投与経路は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づき強制経口投与とした。投与は、注射筒およびマウス用胃管を用いて 1 日 1 回、2 日間(24 時間間隔)連続して行った。投与回数は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づいて設定した。陽性対照物質は、注射筒およびマウス用胃管を用いて単回強制経口投与した。投与は、いずれも 14 時～15 時の間に行った。投与容量は 10 mL/kg とし、初回投与の直前に測定した体重に基づいて個別に投与液量を算出した。初回投与時の体重範囲は、毒性予備試験では雄:38.0～40.7 g、雌:24.0～29.6 g、小核本試験では雄:32.2～39.5 g であった。

7. 試験操作、観察と解析

1) 毒性予備試験

①試験群の設定

毒性予備試験においては、雌雄のマウスを用いて 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の被験物質投与群を設け、各群とも雌雄各 3 匹に投与した。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群		投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号	
				雄	雌
TPA	250 mg/kg/day 投与群	10	2	T1～T3	T13～T15
TPA	500 mg/kg/day 投与群	10	2	T4～T6	T16～T18
TPA	1000 mg/kg/day 投与群	10	2	T7～T9	T19～T21
TPA	2000 mg/kg/day 投与群	10	2	T10～T12	T22～T24

②一般状態の観察

動物の生死および一般状態の観察は、各投与の直後、約 3 時間後および 22～24 時間後に行った。

2) 小核本試験

①試験群の設定

毒性予備試験の結果に基づき、雄マウスを用いて 250、500 および 1000 mg/kg/day の被験物質投与

群と、陰性対照群(媒体:10 mL/kg/day)および陽性対照群(CP:50 mg/kg)を加えた5群構成とし、各群5 匹(被験物質投与群は途中死亡による動物数の減少を考慮して各群 6 匹)の動物に投与した。なお、陽性対照物質の CP については、ICR 系雄マウスに 50 mg/kg の用量を単回強制経口投与した場合、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、秦野研究所において確認されている。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号
陰性対照群(コーン油)	10	2	1～5、29*
TPA　250 mg/kg/day 投与群	10	2	6～11
TPA　500 mg/kg/day 投与群	10	2	12～17
TPA　1000 mg/kg/day 投与群	10	2	18～23
陽性対照群(CP 50 mg/kg)	10	1	24～28

*投与過誤により1 匹(動物番号:2)が死亡したため、余剰動物の 1 匹に新たな動物番号を割り当てた。

②一般状態の観察

動物の生死および一般状態の観察は、各投与の直後、約 3 時間後および 22～24 時間後に行った。

③骨髄塗抹標本の作製

骨髄塗抹標本の作製は、Hayashi らの報告 [1)]に従って最終投与の約 24 時間後に行った。なお、被験物質投与群では、各群とも死亡が認められたことから、全ての生存例、すなわち 250 mg/kg/day 投与群は 4 例、500 および 1000 mg/kg/day 投与群は 5 例について標本を作製した。頸椎脱臼法によりマウスを安楽死させ、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:1320265、Invitrogen)で骨髄細胞を遠心管に洗い出し、200×*g*で 5 分間遠心分離した。上清を除いた後、遠心管に残った少量の血清で沈渣を再懸濁させ、骨髄細胞浮遊液を作製した。塗抹標本は各個体につき 3 枚作製し、自然乾燥後、メタノールで 5 分間固定した。各塗抹標本は、フロスト部分に試験番号、動物番号およびスライド番号を記入して識別し、メタノール固定後の塗抹標本には、コード番号表に従って、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貼付してコード化し、標本観察時まで室温で保管した。

④骨髄塗抹標本のアクリジンオレンジ(AO)蛍光染色および標本観察

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 AO 溶液を標本観察の直前に骨髄塗抹標本に数滴滴下してカバーグラスをかけ、510 nm の吸収フィルター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した。骨髄塗抹標本は、各個体について 2 名の観察者により 1 匹あたり 2000 個(1 名あたり 1000 個)の幼若赤血球を観察し、そのうち小核

を有する幼若赤血球の数を記録した。また、骨髄細胞(赤血球)の増殖抑制の指標として、1 匹あたり 1000 個(1 名あたり 500 個)の赤血球を観察して、幼若赤血球の数を記録した。

⑤統計解析

A. 小核出現頻度

陰性対照群と陽性対照群の小核出現頻度(平均値)が、背景データのばらつきの範囲(平均値±3×標準偏差)内にあるか否かを調べた。なお、背景データは、秦野研究所で 2005 年度から 2007 年度に実施した小核試験の陰性対照値および陽性対照値とした。

小核出現頻度については、陰性対照群と各被験物質投与群および陽性対照群の間で、Fisher の正確確率検定法(片側検定)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)]を行い、有意水準は 5%および 1%とした。また、小核出現頻度の用量(対数値)依存性については、Cochran-Armitage の傾向検定[3)](片側検定)を行い、有意水準は 5%および 1%とした。

B. 赤血球中に占める幼若赤血球の比率

赤血球中に占める幼若赤血球の比率については、まず Bartlett 検定[4)]により陽性対照群を除く各群の分散の一様性について検定を行った。その結果、等分散であったことから、Dunnett 検定[5)](両側検定)を用いて陰性対照群と各被験物質投与群との平均値の差の検定を行った。陰性対照群と陽性対照群との比較については、F 検定[4)]により 2 群の分散の一様性について検定を行い、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。Bartlett 検定および F 検定の有意水準は 5%とし、Dunnett 検定および Student の t 検定の有意水準はいずれも 5%および 1%とした。

被験物質が骨髄細胞の増殖へ影響を及ぼすか否かは、幼若赤血球の比率に関する統計解析の結果をもとに、用量反応性および陰性対照群の背景データ等を参考にして判断した。

⑥判定

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

また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0～110%以内であり、かつ、調製直後の測定平均値に対する各保管期間後の測定値の比(含量比)の平均値が 90.0 %以上を示す期間を調製検体の有効期間としたが、調製濃度 15.0 mg/mL の調製後 4 日および 8 日の平均含量が、それぞれ 88.4%および 87.6%となり、試験計画書から逸脱した。これは、調製後 0 日の平均含量が低値(94.7 %)であったことが原因と考えられ、調製濃度 15.0 mg/mL の調製後 0 日に対する調製後 4 日および 8 日の平均含量比は、いずれも 90.0%以上であり、同時に実施した調製濃度 200 mg/mL については、安定性の判断基準をすべて満たしていることから、調製検体約 15 および約 200 mg/mL は、冷蔵遮光および窒素封入下で 8 日間安定であり、試験の信頼性に影響を及ぼさないと判断した。

小核本試験で使用予定の動物数は雄 28 匹であったが、陰性対照群の 1 匹(動物番号:2)が、初回投与直後に、投与過誤により死亡した。そのため、SOP に従って、余剰動物の 1 匹(馴化番号:22)に新たな動物番号「29」を割り当て、投与を実施した。新たに投与した動物(動物番号:29)の投与直前の体重(33.9 g)は、死亡した動物(動物番号:2)の体重(39.0 g)より低値であったが、群平均体重に群間の差は認められなかったことから、余剰動物の使用は、試験成績の評価において、信頼性に影響しないと判断した。

小核本試験の被験物質投与群は各群 6 匹に投与し、各群とも動物番号が若い 5 例についてのみ標本作製を行うとしたが、250 mg/kg/day 投与群では投与後に 2 例が死亡したことから、4 例についてのみ標本作製を行った。同群の 4 例については、いずれも 1 匹あたり 2000 個の幼若赤血球が観察され、統計解析に十分なデータが得られたことから、この逸脱は、試験成績の評価において、信頼性に影響を及ぼすものではないと判断した。

試験成績と考察

1. 毒性予備試験

毒性予備試験における一般状態と死亡率を Table 1 に示す。1000 および 2000 mg/kg/day 投与群の雌 1 例が 2 回投与後に死亡した。また、2000 mg/kg/day 投与群の雄 1 例は、2 回投与の 22～24 時間後に腹臥位姿勢、立毛、体表温低下および流涙が観察され、瀕死状態であった。各群の生存例においても、腹臥位姿勢や振戦といった重篤な症状が 250 mg/kg/day 投与群の雌 1 例、500 mg/kg/day 投与群の雄全例と雌 1 例、1000 mg/kg/day 投与群の雄全例と雌 1 例および 2000 mg/kg/day 投与群の残りの雄 2 例と雌 1 例に観察された。

以上の結果から、雄の最大耐量は 1000 mg/kg/day、雌の最大耐量は 500 mg/kg/day と判断されるが、一般状態の変化に明らかな性差は認められなかったこと、また、本被験物質のラットを用いる単回経口投与毒性試験および 28 日間反復経口投与毒性試験[6)]で一般状態に明らかな性差は認められていないことから、感受性に性差はないと判断し、小核本試験では雄を用い、1000 mg/kg/day を高用量に設定して実施することとした。なお、毒性予備試験では、250 mg/kg/day 以上のすべての投与群で重篤な症状が観察され、当該用量では小核本試験の投与期間中に投与動物が死亡する可能性があることから、小核

本試験では各群 6 匹に投与した。

2. 小核本試験

小核本試験における一般状態と死亡率を Table 2 に示す。陰性対照群の 1 例が初回投与直後に投与過誤により死亡した他、250 mg/kg/day 投与群の 2 例、500 および 1000 mg/kg/day 投与群の 1 例が 2 回投与後に死亡した。生存例においても、腹臥位姿勢、振戦、体表温低下といった重篤な症状が 250 mg/kg/day 投与群の 4 例、500 および 1000 mg/kg/day 投与群の 2 例に観察された。本被験物質の体内動態に関する情報が入手できなかったことから、死亡数および毒性症状に用量相関性がみられなかった理由については明らかではないが、毒性予備試験においても同様の変化が観察されていることから、被検物質投与に起因した変化と推察される。なお、陽性対照群では一般状態の変化は観察されなかった。

小核出現頻度および赤血球中に占める幼若赤血球の比率を Table 3 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、いずれも秦野研究所の背景データ(Appendix 5)のばらつきの範囲(平均値±3×標準偏差)内であった。

被験物質投与群の小核出現頻度は、いずれの用量においても陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、用量に依存して有意に増加する傾向もみられなかった。一方、CPを投与した陽性対照群では、1%水準で有意な小核出現頻度の増加が確認され、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、陰性対照群とそれ以外の群との間に有意な差は認められず、被験物質の投与による骨髄細胞(赤血球)の増殖抑制作用はないと判断した。

本被験物質に関しては、復帰突然変異試験では陰性、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では陽性の結果が報告されている[7]が、今回行った試験条件下では、被験物質投与による小核誘発性は認められなかった。なお、類似化合物のリン酸ジブチル(CAS 番号:107-66-4)に関しては、復帰突然変異試験およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性[8]、リン酸トリメチル(CAS 番号:512-56-1)に関してもチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性[9]の結果が報告されている。

以上の結果から、本試験条件下では、トリメチルホスファイト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もの(陰性)と結論する。

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)

6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:化学物質毒性試験報告 Vol.7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.445-461 (1999)

7) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:化学物質毒性試験報告 Vol.7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.462-469 (1999)

8) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:化学物質毒性試験報告 Vol.2, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.71-78 (1995)

9) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:化学物質毒性試験報告 Vol.3, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.301-303 (1996)

Table 1 General condition and mortality in CD1(ICR) mice after double oral administrations of Trimethylphoshorous acid in the preliminary toxicity test

Sex	Dose (mg/kg/day)	Number of mice administered	General condition	Number of mice: Hours after the 1st administration 0	3	22-24	Hours after the 2nd administration 0	3	22-24	Mortality
Male	250	3	No abnormality	3	3	3	0	3	3	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	0	0	0	3	0	0	
	500	3	No abnormality	0	2	0	0	1	0	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	3	1	3	2	0	0	
			Piloerection	0	0	3	3	2	3	
			Eyelid closure	0	0	3	3	2	0	
			Crouching position	0	0	0	1	0	3	
			Prone position	0	0	0	0	2	0	
			Tremor	0	0	0	0	0	2	
	1000	3	Decrease in locomotor activity	3	3	0	0	0	1	0 / 3
			Crouching position	0	0	3	3	1	2	
			Piloerection	0	0	3	3	3	3	
			Eyelid closure	0	0	3	3	3	0	
			Prone position	0	0	0	0	2	0	
			Tremor	0	0	0	0	1	2	
	2000	3	Decrease in locomotor activity	2	0	0	0	0	2	0 / 3
			Salivation	2	0	0	0	0	0	
			Crouching position	2	3	3	1	0	0	
			Piloerection	0	3	3	3	3	3	
			Eyelid closure	0	3	3	3	3	0	
			Prone position	0	0	0	2	3	1	
			Subnormal temperature	0	0	0	0	0	1	
			Lacrimation	0	0	0	0	0	1	
Female	250	3	No abnormality	3	3	1	1	1	1	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	0	0	2	2	2	1	
			Piloerection	0	0	2	2	2	2	
			Eyelid closure	0	0	0	0	2	2	
			Prone position	0	0	0	0	0	1	
	500	3	No abnormality	1	2	2	0	0	0	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	2	1	1	2	0	1	
			Crouching position	0	0	0	1	3	1	
			Piloerection	0	0	0	0	3	2	
			Eyelid closure	0	0	0	0	3	2	
			Prone position	0	0	0	0	0	1	
	1000	3	No abnormality	0	0	1	0	1	1	1 / 3
			Decrease in locomotor activity	3	3	1	1	1	0	
			Crouching position	0	0	1	2	0	1	
			Piloerection	0	0	1	2	1	1	
			Eyelid closure	0	0	1	2	0	1	
			Tremor	0	0	0	0	0	1	
			Death	0	0	0	0	1	0	
	2000	3	Decrease in locomotor activity	1	0	1	0	1	1	1 / 3
			Salivation	1	0	0	0	0	0	
			Crouching position	3	3	2	1	0	1	
			Piloerection	0	3	3	3	1	1	
			Eyelid closure	0	3	2	3	0	1	
			Tremor	0	0	2	2	0	1	
			Lacrimation	0	0	1	1	0	0	
			Prone position	0	0	0	2	2	0	
			Decreased respiration	0	0	0	0	2	0	
			Death	0	0	0	0	0	1	

Table 2 General condition and mortality in male CD1(ICR) mice after double oral administrations of Trimethylphoshorous acid in the micronucleus test

Dose	Number of mice administered	General condition	Number of mice: Hours after the 1st administration 0	3	22-24	Hours after the 2nd administration 0	3	22-24	Mortality
Negative control Corn oil 10 mL/kg/day	6	No abnormality	5	5	5	5	5	5	1 / 6
		Death (Dosing error)	1	0	0	0	0	0	
TPA 250 mg/kg/day	6	No abnormality	6	2	5	0	0	0	2 / 6
		Decrease in locomotor activity	0	4	1	6	0	1	
		Crouching position	0	0	0	0	1	1	
		Piloerection	0	0	1	2	6	4	
		Eyelid closure	0	0	0	0	6	3	
		Prone position	0	0	0	0	5	2	
		Tremor	0	0	0	0	0	2	
		Subnormal temperature	0	0	0	0	5	3	
		Lacrimation	0	0	0	0	2	1	
		Death	0	0	0	0	0	2	
TPA 500 mg/kg/day	6	No abnormality	1	0	4	0	0	0	1 / 6
		Decrease in locomotor activity	5	6	2	5	2	3	
		Crouching position	0	0	0	0	3	2	
		Piloerection	0	0	1	4	5	5	
		Eyelid closure	0	0	0	1	2	2	
		Prone position	0	0	0	1	0	0	
		Tremor	0	0	0	0	0	2	
		Subnormal temperature	0	0	0	0	0	2	
		Lacrimation	0	0	0	0	0	1	
		Death	0	0	0	0	1	0	
TPA 1000 mg/kg/day	6	No abnormality	0	0	4	0	0	1	1 / 6
		Decrease in locomotor activity	6	3	2	0	4	3	
		Crouching position	0	3	0	4	1	1	
		Piloerection	0	6	1	6	4	4	
		Eyelid closure	0	0	0	3	0	1	
		Prone position	0	0	0	2	1	0	
		Tremor	0	0	0	0	0	1	
		Subnormal temperature	0	0	0	0	1	1	
		Death	0	0	0	0	0	1	
Positive control CP 50 mg/kg	5	No abnormality	5	5	5	-	-	-	0 / 5

CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)

Table 3 Results of micronucleus test in male CD1(ICR) mice after double oral administrations of Trimethylphoshorous acid

Group	Animal No.	% of MNPCEs[a]	% of PCEs in ERYs[b]
Negative control Corn oil 10 mL/kg/day	1	0.10	52.2
	2	**Dosing error**	
	3	0.00	34.9
	4	0.00	54.2
	5	0.05	54.1
	29	0.10	55.3
	Total	5 / 10000	2507 / 5000
	Mean ± S.D.	0.05 ± 0.05	50.1 ± 8.6
	Min. - Max.	0.00 - 0.10	34.9 - 55.3
TPA 250 mg/kg/day	6	0.15	38.1
	7	**Death**	
	8	0.20	54.7
	9	0.05	56.6
	10	0.20	47.7
	11	**Death**	
	Total	12 / 8000	1971 / 4000
	Mean ± S.D.	0.15 ± 0.07	49.3 ± 8.4
	Min. - Max.	0.05 - 0.20	38.1 - 56.6
TPA 500 mg/kg/day	12	**Death**	
	13	0.10	43.9
	14	0.25	43.6
	15	0.05	35.2
	16	0.10	60.1
	17	0.05	52.4
	Total	11 / 10000	2352 / 5000
	Mean ± S.D.	0.11 ± 0.08	47.0 ± 9.5
	Min. - Max.	0.05 - 0.25	35.2 - 60.1
TPA 1000 mg/kg/day	18	0.10	46.8
	19	0.10	48.9
	20	**Death**	
	21	0.05	56.1
	22	0.20	48.2
	23	0.05	47.8
	Total	10 / 10000	2478 / 5000
	Mean ± S.D.	0.10 ± 0.06	49.6 ± 3.7
	Min. - Max.	0.05 - 0.20	46.8 - 56.1
Positive control CP 50 mg/kg	24	1.60	49.4
	25	2.70	48.9
	26	2.25	37.4
	27	1.80	59.0
	28	2.35	51.6
	Total	214 / 10000 **	2463 / 5000
	Mean ± S.D.	2.14 ± 0.44	49.3 ± 7.8
	Min. - Max.	1.60 - 2.70	37.4 - 59.0

a, % of micronucleated polychromatic erythrocytes in polychromatic erythrocytes observed
b, % of polychromatic erythrocytes in erythrocytes observed
CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)
**, Significantly higher than the negative control at 1% level.