



ジフェニルクレジルフォスフェートの
マウスを用いる
小核試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所

【目 次】

要 約	1
緒 言	2
実験材料	3
1. 実験動物および飼育条件	3
2. 被験物質	3
毒性予備試験（投与量の決定）	4
1. 方 法	4
2. 結 果	4
小核予備試験（標本作製時期の決定）	5
1. 方 法	5
2. 結 果	6
小核本試験	6
1. 方 法	6
2. 結果および考察	8
結 論	9
特記事項	9
文 献	10
Tables 1～5	

【要 約】

被験物質ジフェニルクレジルフォスフェート（DCP）の生体内における細胞遺伝学的影響を評価するために、Crj:BDF₁雄および雌マウスを用い、強制経口投与による小核試験を実施した。毒性予備試験および小核予備試験を行い、投与量および標本作製時期を設定した後、小核本試験を実施し、陰性の結果を得た。

毒性予備試験を行った結果、DCPの雄および雌マウスにおける最大耐量は、それぞれ1500 mg/kg および 1250 mg/kg であった。

小核予備試験において、DCPの 1250 mg/kg を雄マウスに投与し、投与後24、48および72時間に骨髓の塗抹標本作製した。小核出現頻度（小核を有する幼若赤血球の比率）は、24時間群と他の群との間に明瞭な差は認められなかった。また、赤血球中に占める幼若赤血球の比率を指標とした骨髓細胞の増殖抑制も認められなかった。これらの結果から、雄雌ともに小核本試験での最高用量を 1250 mg/kg とし、標本作製時期を投与後24時間に決定した。

DCPの 312.5、625 および 1250 mg/kg を雄および雌マウスにそれぞれ投与し、投与後24時間目に標本作製した。小核出現頻度は、被験物質のいずれの投与群においても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、用量依存性も認められなかった。また、全赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、DCPのいずれの投与群においても、溶媒対照群との間に有意差は認められなかった。

以上の結果から、DCPは、本試験条件下で Crj:BDF₁ 雄および雌マウスの骨髓細胞において、染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示さないと結論した。

【緒 言】

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、ジフェニルクレジルフォスフェートの生体内における細胞遺伝学的影響を調べるために、雄および雌マウスを用いて骨髄細胞における小核試験を実施した。まず、小核本試験に用いる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、次に小核本試験における標本作製時期を決定するために小核予備試験を行い、それらの結果に基づいて小核本試験を行った。

本試験は「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）および「OECD 毒性試験ガイドライン：474」に準拠し、「化学物質 GLP 基準」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

【実験材料】

1. 実験動物および飼育条件

実験には、日本チャールス・リバー(株) (CRJ) から購入した8週齢の Crj:BDF₁ (C57BL/6 と DBA/2 の近交系間 F₁) 雄および雌マウスを、1週間以上予備飼育した後、異常の認められなかった動物を9週齢で試験に供した。入荷日とその匹数は以下の通りである。

試験	入荷日	入荷匹数
毒性予備試験	1994年11月21日	雄雌各36匹
小核予備試験	1994年11月25日	雄 31匹
小核本試験	1995年1月11日	雄雌各31匹

動物は、床敷としてホワイト・フレーク® (CRJ) を入れた TPX 樹脂製ケージ (143×293×148 mm, CRJ) に1匹ずつ収容し、飼育室 (設定温度: 23±1℃、設定湿度: 55±5%、換気回数: 約15回/時間、明暗サイクル: 午前7時点灯、午後7時消灯) で、マウス繁殖用固型飼料 (NMF、オリエンタル酵母工業(株)) と水道水を自由に摂取させて飼育した。動物の群分けは自由群分け (無作為抽出) により行った。個体識別はフェルトペンによりマウスの尾に群と個体番号を記し、ケージには群ごとに色の異なるカードに、試験系識別番号、群および個体番号を記載して個体識別の補助とした。

なお、投与経路および投与回数は「OECD 毒性試験ガイドライン: 474」に準拠し、単回強制経口投与とした。

2. 被験物質

名 称 : ジフェニルクレジルフォスフェート (CAS. No. 26444-49-5)
英名 (略称) : Diphenyl cresyl phosphate (DCP)
製 造 元 :
ロット番号 :
物理化学的性質 : 性状; 無色透明の液体
分子量; 340.32
分子式; C₁₉H₁₇O₄P
保 管 条 件 : 冷暗所 (冷蔵) 保存
購 入 先 :

【毒性予備試験（投与量の決定）】

1. 方法

1) 実験群の設定

小核試験に用いるジフェニルクレジルフォスフェート（DCP）の投与量を決定するため、雄雌ともに各群5匹ずつからなる7群を設け、公差を250 mg/kg とすることにより、投与量をそれぞれ、500、750、1000、1250、1500、1750 および 2000 mg/kg とした。

2) 検体の調製および投与方法

検体の投与容量はマウスの体重 kg 当たり 10 ml とした。投与検体はDCPの所要量を正確に採取し、局方オリブ油（東豊薬品㈱、ロット番号：39L）に溶解して最高用量の原液を調製した。それ以下の用量については、最高用量の調製液を上記の溶媒で希釈して所定の濃度に調製した。また、投与検体はすべて用時調製とした。

投与は強制経口投与とした。投与日は、雄雌ともに1994年11月28日に行った。投与時の体重範囲は雄で23～28 g、雌で18～22 gであった。

3) 死亡率および一般状態の観察

投与当日を0日として4日間にわたり毎日一般状態を観察し、死亡の有無を調べた（1994年11月28日～12月1日）。

2. 結果

投与6時間後、1250 mg/kg 以上の投与群において自発運動の低下が認められた。死亡例は、雄については1750 mg/kg および 2000 mg/kg 群で、それぞれ2匹認められ、雌では2000 mg/kg 群ですべて死亡し、1750 mg/kg 群で3匹、1500 mg/kg 群で2匹の死亡が確認された（Table 1、2）。したがって、DCPの強制経口投与によるCrj:BDF₁雄および雌マウスの最大耐量は、本実験条件下で、雄では1500 mg/kg、雌では1250 mg/kg であると判断し、小核予備試験に用いるDCPの投与用量は、1250 mg/kg と決定した。

【小核予備試験（標本作製時期の決定）】

1. 方法

1) 実験群の設定

雄マウスに、DCPの 1250 mg/kg および死亡が認められた場合の予備群として 1000 mg/kg を投与し、本試験における適切な標本作製時期を決定するために、雄マウス各 5 匹ずつからなる 6 群（24時間群、48時間群、72時間群）を設けた。

2) 検体の調製と投与方法

検体の調製と投与方法は毒性予備試験の場合と同様に行った。雄マウスへの投与は、1994年12月5日に行った。投与時の体重範囲は、24～28 gであった。

3) 標本の作製

小核の観察のための骨髓標本は、Schmid の方法^{1, 2)}に従って作製した。すなわち、投与後所定の時間に頸椎脱臼法によりマウスを致死させて左右の大腿骨を摘出した。その両骨端を切断して、骨髓細胞を 0.6 ml のウシ胎児血清（Hazleton、ロット番号：12103343）で洗い出し、遠沈管に集め、1000 rpm で5分間遠心分離して、上清を除いた。沈渣をピペティング後、細胞浮遊液の一部をスライドグラス上に塗抹（各個体につき3枚の標本）し、それぞれの骨髓標本に試験系識別番号および暗番号を記し、室温で一晩自然乾燥させた。乾燥した骨髓標本は5分間メタノールで固定し、標本観察時まで室温保存した。

4) 骨髓標本のアクリジンオレンジ（A.O.）蛍光染色および小核の観察

骨髓標本のアクリジンオレンジ（A.O.）蛍光染色および小核の観察は、林らの方法^{3, 4)}に従って行った。0.04 mg/ml の A.O. 溶液を上記のメタノールで固定済の骨髓標本上に数滴滴下し、カバーグラスをかけ、カバーグラス上から濾紙で余分な溶液を十分吸い取り、蛍光顕微鏡下で観察した。

骨髓標本はそれぞれの個体について、2名の観察者によりブラインド法で観察した。1個体あたり2000個の幼若赤血球（polychromatic erythrocytes）を観察し、その中の小核を

有するものの数を記録した。また赤血球を1個体あたり500個観察し、そのなかの幼若赤血球の比率を調べて、骨髄細胞の増殖抑制の指標とした。

2. 結果

1250 mg/kg 群において、死亡例が認められなかったため、標本観察は 1250 mg/kg 群についてのみ行った。

結果は Table 3 に示した。小核出現頻度に関しては、24時間群と他の群との間に明瞭な差は認められなかった。また、この用量では、幼若赤血球の比率を指標とした骨髄細胞の増殖抑制も認められなかった。以上の結果から、小核本試験における標本作製時期を、投与後24時間に決定した。また、DCPの1250 mg/kg 投与により、骨髄細胞の増殖抑制(10%以下)も認められなかったことより、小核本試験に用いるDCPの最高用量を雄雌ともに1250 mg/kg と決定した。

【小核本試験】

1. 方法

1) 実験群の設定

毒性予備試験および小核予備試験の結果に基づき、小核本試験に用いる最高用量を雄雌ともに1250 mg/kg とし、これをもとに公比2で減じ、中用量を625 mg/kg、低用量を312.5 mg/kg と設定した。また、標本作製時期を投与後24時間に設定し、各群5匹ずつからなる5群を以下のように設けた。

i) 溶媒対照群(局方オリーブ油)

ii) DCP 312.5 mg/kg 群

iii) DCP 625 mg/kg 群

iv) DCP 1250 mg/kg 群

v) 陽性対照群(cyclophosphamide, CPA : 50 mg/kg) *

* 当研究室で、本用量のCPAの強制経口投与により小核が有意に誘発されることが認められている。

2) 検体の調製および投与方法

投与検体の調製および投与方法は毒性予備試験の場合と同様に行った。また、陽性対照物質（C P A, Sigma Chemical Co.、ロット番号：73H0846）は、局方生理食塩液（株大塚製薬工場、製造番号：K3B88）に溶解して所定の濃度に調製し、10 ml/kg の容量を単回強制経口投与した。投与は、雄雌ともに1995年1月23日に行い、投与時体重範囲は、雄で24～28 g、雌で19～22 gであった。

秦野研究所において、312.5 mg/kg 群および 1250 mg/kg の投与検体について室温遮光条件下で調製後4時間までのD C Pの局方オリブ油中での安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値（0時間）の平均値に対して、95.2 および 104%であった。これらの値は、当研究所で規定している基準内（4時間後における平均含量が初期値の90.0%以上）であった（Appendix 1）。

また、同検体について、含量測定試験を行った。その結果、調製後の濃度は、いずれも当研究所で規定している基準内（溶媒での平均含量が添加量の90.0～110%）であった（Appendix 2）。

以上の結果から、D C Pは局方オリブ油中では安定であり、また調製検体中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

3) 標本の作製方法および小核の観察

標本の作製および小核の観察は、小核予備試験の場合と同様に行った。ただし標本の作製時期は小核予備試験の結果に基づき、雄雌ともに投与後24時間（1995年1月24日）とした。

4) 有意差検定

それぞれの小核出現頻度について、Fisher の正確確率検定法⁵⁾により、溶媒対照群と、各検体投与群および陽性対照群との間で5%水準で有意差検定を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して、Bonferroni の補正⁶⁾を行った。更に、小核出現頻度の用量（対数值）依存性について Cochran-Armitage の傾向検定⁷⁾を5%水準で行った。また、赤血球中に占める幼若赤血球の比率について、それぞれ溶媒対照群と、各検体投与群および陽性対照群との間で、t検定を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して、

Bonferroni の補正を行った。

2. 結果および考察

雄および雌の小核本試験の結果をそれぞれ Table 4 および 5 に示す。雄雌ともに溶媒対照群と陽性対照群の小核出現頻度は、それぞれの過去 5 年間の背景データのばらつきの範囲内（平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差）であった。Fisher の正確確率検定法（Bonferroni の補正）による有意差検定の結果、小核出現頻度は D C P のいずれの投与群においても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。さらに、Cochran-Armitage の傾向検定の結果においても、D C P の用量に依存した有意な増加傾向は認められなかった。一方、C P A を 50 mg/kg 投与した陽性対照群での小核出現頻度は、5 % 水準で有意な増加がみられた。D C P はチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性の結果が得られているが、本試験においては、最大耐量においても陰性の結果が得られた。これらの結果が異なった理由については不明である。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、D C P のいずれの投与群においても溶媒対照群との間に有意差は認められなかった。

【結 論】

以上の結果から、本試験条件下では被験物質DCPは、骨髄細胞において、染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示さず、また骨髄細胞の増殖抑制作用も示さないと結論した。

【特 記 事 項】

全試験期間を通して、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱は認められなかった。

【文 献】

- 1) Schmid, W. : The micronucleus test. Mutation Res. 31 : 9-15 (1975)
- 2) Schmid, W. : The micronucleus test for cytogenetic analysis. in
"Chemical Mutagens" vol. 4., Hollaender, A. ed., Plenum Press, New York,
London (1976), pp. 76-78.
- 3) Hayashi, M., Sofuni T., Ishidate M., Jr. : An application of acridine
orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Res. 120 :
241-247 (1983)
- 4) 林 真 : 「小核試験」, サイエニティスト社, 東京 (1991), pp. 44-55.
- 5) 吉村 功 編 : 「毒性・薬効データの統計解析」, サイエニティスト社, 東京
(1987), pp. 76-78.
- 6) 吉村 功、大橋靖雄 責任編集 : 「毒性試験講座14、毒性試験データの統計解析」
地人書館, 東京 (1992), pp. 18-222
- 7) 吉村 功 編 : 「毒性・薬効データの統計解析」, サイエニティスト社, 東京
(1987), pp. 67-69.

Table 1. Mortality of BDF₁ male mice after single administration of diphenyl cresyl phosphate by gavage

Dose (mg/kg)	Number of mice injected	Number of mice died			Mortality	
		0	1	2		3
500	5	0	0	0	0	0 / 5
750	5	0	0	0	0	0 / 5
1000	5	0	0	0	0	0 / 5
1250	5	0	0	0	0	0 / 5
1500	5	0	0	0	0	0 / 5
1750	5	0	0	2	0	2 / 5
2000	5	0	2	0	0	2 / 5

Table 2. Mortality of BDF₁ female mice after single administration of diphenyl cresyl phosphate by gavage

Dose (mg/kg)	Number of mice injected	Number of mice died			Mortality
		0	1	2	
500	5	0	0	0	0 / 5
750	5	0	0	0	0 / 5
1000	5	0	0	0	0 / 5
1250	5	0	0	0	0 / 5
1500	5	0	1	1	2 / 5
1750	5	0	2	1	3 / 5
2000	5	0	4	1	5 / 5

Table 3. Results of preliminary micronucleus test in BDF₁ male mice after single administration of diphenyl cresyl phosphate by gavage (1250 mg/kg)

Time after administration	Animal No.	a		b	
		MNPCE	PCE	PCE	ERY
24h	1	6	2000	265	500
	2	3	2000	262	500
	3	9	2000	277	500
	4	5	2000	272	500
	5	6	2000	261	500
	Total	29	10000	1337	2500
	% (Mean±S.D.)	(0.29 ± 0.11)	(53.5 ± 1.4)		
48h	6	4	2000	260	500
	7	5	2000	245	500
	8	7	2000	258	500
	9	5	2000	250	500
	10	6	2000	270	500
	Total	27	10000	1283	2500
	% (Mean±S.D.)	(0.27 ± 0.06)	(51.3 ± 1.9)		
72h	11	5	2000	293	500
	12	6	2000	260	500
	13	5	2000	264	500
	14	7	2000	261	500
	15	4	2000	293	500
	Total	27	10000	1371	2500
	% (Mean±S.D.)	(0.27 ± 0.06)	(54.8 ± 3.4)		

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes / total number of erythrocytes observed

Table 4. Results of micronucleus test in BDF₁ male mice after single administration of diphenyl cresyl phosphate by gavage

Group		Animal No.	a		b	
			MNPCE / PCE	PCE / ERY		
Solvent control	10 ml/kg	1	3 / 2000	299 / 500		
		2	4 / 2000	309 / 500		
		3	4 / 2000	290 / 500		
		4	1 / 2000	290 / 500		
		5	3 / 2000	266 / 500		
		Total	15 / 10000	1454 / 2500		
		%(Mean±S.D.)	(0.15 ± 0.06)	(58.2 ± 3.2)		
DCP 312.5 mg/kg		6	4 / 2000	288 / 500		
		7	2 / 2000	297 / 500		
		8	7 / 2000	299 / 500		
		9	4 / 2000	294 / 500		
		10	4 / 2000	266 / 500		
		Total	21 / 10000	1444 / 2500		
		%(Mean±S.D.)	(0.21 ± 0.09)	(57.8 ± 2.7)		
DCP 625 mg/kg		11	3 / 2000	284 / 500		
		12	5 / 2000	302 / 500		
		13	2 / 2000	276 / 500		
		14	1 / 2000	295 / 500		
		15	5 / 2000	269 / 500		
		Total	16 / 10000	1426 / 2500		
		%(Mean±S.D.)	(0.16 ± 0.09)	(57.0 ± 2.7)		
DCP 1250 mg/kg		16	4 / 2000	305 / 500		
		17	3 / 2000	315 / 500		
		18	6 / 2000	266 / 500		
		19	7 / 2000	221 / 500		
		20	2 / 2000	230 / 500		
		Total	22 / 10000	1337 / 2500		
		%(Mean±S.D.)	(0.22 ± 0.10)	(53.5 ± 8.5)		
Positive control	CPA 50 mg/kg	21	69 / 2000	285 / 500		
		22	59 / 2000	252 / 500		
		23	17 / 2000	272 / 500		
		24	27 / 2000	273 / 500		
		25	41 / 2000	241 / 500		
		Total	213 / 10000	1323 / 2500		
		%(Mean±S.D.)	(2.13 ± 1.08)***	(52.9 ± 3.5)		

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes / total number of erythrocytes observed

DCP: Diphenyl cresyl phosphate (purity was not confirmed)

CPA : Cyclophosphamide

***: Data significantly different from the solvent control at 0.1 % level

Table 5. Results of micronucleus test in BDF₁ female mice after single administration of diphenyl cresyl phosphate by gavage

Group	Animal No.	a		b	
		MNPCE / PCE	PCE / ERY		
Solvent control Olive oil 10 ml/kg	51	1 / 2000	300 / 500		
	52	4 / 2000	297 / 500		
	53	2 / 2000	300 / 500		
	54	3 / 2000	298 / 500		
	55	5 / 2000	311 / 500		
	Total	15 / 10000	1506 / 2500		
	%(Mean±S.D.)	(0.15 ± 0.08)	(60.2 ± 1.1)		
DCP 312.5 mg/kg	56	4 / 2000	282 / 500		
	57	3 / 2000	294 / 500		
	58	6 / 2000	284 / 500		
	59	5 / 2000	301 / 500		
	60	3 / 2000	313 / 500		
	Total	21 / 10000	1474 / 2500		
	%(Mean±S.D.)	(0.21 ± 0.07)	(59.0 ± 2.6)		
DCP 625 mg/kg	61	3 / 2000	298 / 500		
	62	3 / 2000	302 / 500		
	63	3 / 2000	296 / 500		
	64	5 / 2000	298 / 500		
	65	7 / 2000	323 / 500		
	Total	21 / 10000	1517 / 2500		
	%(Mean±S.D.)	(0.21 ± 0.09)	(60.7 ± 2.2)		
DCP 1250 mg/kg	66	6 / 2000	294 / 500		
	67	7 / 2000	312 / 500		
	68	5 / 2000	278 / 500		
	69	5 / 2000	323 / 500		
	70	4 / 2000	297 / 500		
	Total	27 / 10000	1504 / 2500		
	%(Mean±S.D.)	(0.27 ± 0.06)	(60.2 ± 3.5)		
Positive control CPA 50 mg/kg	71	45 / 2000	288 / 500		
	72	53 / 2000	260 / 500		
	73	52 / 2000	296 / 500		
	74	47 / 2000	299 / 500		
	75	62 / 2000	291 / 500		
	Total	259 / 10000	1434 / 2500		
	%(Mean±S.D.)	(2.59 ± 0.33)***	(57.4 ± 3.1)		

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes / total number of erythrocytes observed

DCP: Diphenyl cresyl phosphate (purity was not confirmed)

CPA : Cyclophosphamide

***: Data significantly different from the solvent control at 0.1 % level