

最終報告書

トランスジェニックマウスを用いる *N*-phenylmaleimide の遺伝子突然変異試験

試験番号 : D850 (115-225)

平成25年3月28日

試験委託者
厚生労働省

公益財団法人 食料衛生安全評価センター

試験責任者の署名および日付

表 題： トランスジェニックマウスを用いる *N*-phenylmaleimide の遺伝子突然変異試験

試験番号： D850 (115-225)

試験責任者：



平成 25 年 3 月 28 日

公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

要 約.....	6
1. 表題.....	7
2. 試験目的.....	7
3. 遵守した GLP と動物実験関連規則，遺伝子組換え生物等関連規則および 準拠したガイドライン.....	7
4. 試験番号.....	7
5. 試験施設.....	7
6. 試験委託者.....	8
7. 試験責任者.....	8
8. 被験物質等管理責任者.....	8
9. 分担責任者.....	8
10. 試験日程.....	8
11. 被験物質.....	9
12. 対照物質.....	11
13. 試験材料および方法.....	12
14. 試験方法.....	22
15. 試験成立条件.....	31
16. 結果.....	31
17. 考察および結論.....	34
18. 参考文献.....	36
19. 試験関係資料の保存.....	37
20. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および 試験計画書に従わなかったこと.....	37

Tables

Table 1	Mortality in dose-finding study of <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	38
Table 2	Gross findings in dose-finding study of <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	39
Table 3	Mortality in dose-finding study of <i>N</i> -phenylmaleimide (Additional test) [Male mice dosed once a day, for 1 or 2 days (Oral administration, a day after final administration)].....	40

Table 4	Gross findings in dose-finding study of <i>N</i> -phenylmaleimide (Additional test) [Male mice dosed once a day, for 1 or 2 days (Oral administration, a day after final administration)].....	41
Table 5	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in liver of transgenic mice treated with <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	42
Table 6	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in bone marrow of transgenic mice treated with <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	43
Table 7	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in stomach of transgenic mice treated with <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	44
Table 8	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in testis of transgenic mice treated with <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	45
Table 9	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in liver of transgenic mice treated with <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	46
Table 10	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in bone marrow of transgenic mice treated with <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	47
Table 11	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in stomach of transgenic mice treated with <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	48
Table 12	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in testis of transgenic mice treated with <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	49
Appendices		
Appendix 1	Body weight in dose-finding study of <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	50
Appendix 2	Clinical observations in dose-finding study of <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	51

Appendix 3	Body weight in dose-finding study of <i>N</i> -phenylmaleimide (Additional test) [Male mice dosed once a day, for 1 or 2 days (Oral administration, a day after final administration)]	52
Appendix 4	Clinical observations in dose-finding study of <i>N</i> -phenylmaleimide (Additional test) [Male mice dosed once a day, for 1 or 2 days (Oral administration, a day after final administration)]	53
Appendix 5	Body weight in the gene mutation assay of <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	54
Appendix 6	Clinical observations in the gene mutation assay of <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	56
Appendix 7	Organ weight in the gene mutation assay of <i>N</i> -phenylmaleimide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	63
Appendix 8	Individual gross findings on <i>N</i> -phenylmaleimide-treated transgenic mice for the gene mutation assay [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	75
	信頼性保証書	71

要 約

N-phenylmaleimide の変異原性について、トランスジェニックマウス (*gpt delta*) を用いて肝臓、骨髄、胃 (腺胃) および精巣における遺伝子突然変異誘発性 (レポーター遺伝子 : *gpt* および *red/gam*) を検討した。

マウス経口投与による LD₅₀ が 78 mg/kg との情報に基づき、80.0, 20.0, 5.00 および 1.25 mg/kg の 4 用量について 1 日 1 回、24 時間間隔で 7 日間連続強制経口投与を実施した用量設定試験の結果、いずれの群でも死亡が認められず一般状態の変化および体重の顕著な減少も認められなかった。用量を増加した 600, 360, 216 および 130 mg/kg の 4 用量を用いて追加試験を実施した。その結果、初回投与後 3 日目までに全群の全例が死亡した。以上の結果から、最大耐量付近と考えられる 60.0 mg/kg を最高用量とし、公比 2 で除した以下 30.0, 15.0 および 7.50 mg/kg の計 4 用量を被験物質群として設定した。

被験物質をトランスジェニックマウスに 28 日間反復強制経口投与し、最終投与後 3 日の肝臓、骨髄、胃 (腺胃) および精巣において *gpt* assay および *Spi*⁻ assay により遺伝子突然変異頻度を求めた。

その結果、*N*-phenylmaleimide 投与群の肝臓、骨髄、胃 (腺胃) および精巣のいずれにおいても、*gpt* assay および *Spi*⁻ assay による遺伝子突然変異頻度に、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められなかった。

陽性対照のエチルニトロソウレア (ENU) 腹腔内投与群 (100 mg/kg) では、肝臓、骨髄および胃 (腺胃) で *gpt* assay による遺伝子突然変異頻度が上昇しており、遺伝子突然変異頻度は陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加を示した。

Spi⁻ assay が適切に行われたか否かを確認するため、*Spi*⁻ assay で陽性であることが確認された 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP) を投与した別試験の肝臓を陽性対照群の肝臓として用いて *Spi*⁻ assay を実施した結果、遺伝子突然変異頻度は陰性対照群に比べて統計学的に有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められた。したがって、当該試験はいずれも適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、当該試験条件下において、*N*-phenylmaleimide はトランスジェニックマウスに対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの (陰性) と判定された。

1. 表題

トランスジェニックマウスを用いる *N*-phenylmaleimide の遺伝子突然変異試験

2. 試験目的

被験物質による標的器官での遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検討する (レポーター遺伝子: *gpt* および *red/gam*).

3. 遵守したGLPと動物実験関連規則, 遺伝子組換え生物等関連規則および準拠したガイドライン

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について (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) 動物実験関連規則

動物の飼育および動物の取り扱いについては, 「動物の愛護及び管理に関する法律」, 「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」 および当該施設の「動物実験に関する指針」を遵守し, 動物を適正に使用した (安評センター動物実験倫理委員会承認番号 11-0241A).

遺伝子組換え生物等関連規則

遺伝子組換え生物等の取り扱いについては, 「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」 および当該施設の「遺伝子組換え生物等の使用等に関する安全管理規程」を遵守し, 遺伝子組換え生物等を適正に使用した (安評センター組換え DNA 実験安全委員会承認番号 67).

ガイドライン等

- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 488 (28 July 2011: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)
- Environmental Health Criteria 233 (United Nations WHO 2006; Transgenic Animal Mutagenicity Assays)

4. 試験番号

D850 (115-225)


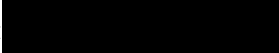
5. 試験施設

公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582 番地 2
Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1293

6. 試験委託者

厚生労働省
医薬食品局審査管理課
化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目2番2号
Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

7. 試験責任者



公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582 番地 2
Tel: 0538-58-3572 Fax: 0538-58-1368
E-mail: 

8. 被験物質等管理責任者



9. 分担責任者

変異原性実験：
検疫：
被験物質液調製：
飼育管理：
病理学検査：



10. 試験日程

試験開始日：	平成 24 年 2 月 24 日
実験開始日：	平成 24 年 3 月 5 日
【用量設定試験】	
動物入荷日：	平成 24 年 2 月 27 日
被験物質液調製日：	平成 24 年 3 月 5 日
投与開始日 (Day 1)：	平成 24 年 3 月 5 日
投与終了日 (Day 7)：	平成 24 年 3 月 11 日
動物観察終了日 (Day 8)：	平成 24 年 3 月 12 日
【用量設定試験一追試験】	
動物入荷日：	平成 24 年 4 月 9 日
被験物質液調製日：	平成 24 年 4 月 16 日

11.7. 保存条件

遮光, 気密, 室温 (基準値 : 1~30°C)

11.8. 保存場所

被験物質調製室, 室温保管庫

- スーパードライ SD-121-02 ch. 40

保存期間 : 2011 年 12 月 22 日 ~ 2012 年 1 月 6 日 (購入時 ~ 保管場所に移動日)

実測値 : 21.3 ~ 22.8°C

- 室温保管室 ch. 74

保存期間 : 2012 年 1 月 6 日 ~ 2 月 28 日 (受領 (保管場所移動) 日 ~ 試験責任者への配布日)

実測値 : 20.1 ~ 22.3°C

サーバー更新により, 2012 年 1 月 8 日 ; 11 時 10 分の保存温度が収集できなかったが, その間の温度はバックアップデータで確認した.

実測値 : 20.5 ~ 21.5°C (2012 年 1 月 6 日 ~ 10 日)

- スーパードライ SD-121-02 ch. 40

保存期間 : 2012 年 2 月 28 日 ~ 5 月 30 日 (試験責任者受領日 ~ 最終使用日)

実測値 : 20.6 ~ 26.7°C

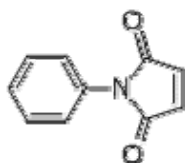
システム不具合発生から解消までの間 (2012 年 3 月 10 日 ; 11 時 40 分) の保存温度は, バックアップデータで確認した.

実測値 : 23.1 ~ 24.1°C (2012 年 3 月 9 日 ~ 12 日)

11.9. CAS No.

941-69-5

11.10. 化学構造



11.11. 分子式

C₁₀H₇NO₂

11.12. 分子量

173.17

11.13. 物質の状態

黄色の結晶

11.14. 融点／沸点

融点：89.8°C

11.15. 溶解性

水に溶けにくい。アセトンに溶けやすく、エタノールにやや溶けやすい。

11.16. 安定性

光により変質する。

11.17. 取り扱い上の注意

強酸化剤との接触を避ける。

吸入したり、眼、皮膚、粘膜および衣類に触れないように適切な保護具（マスク、手袋、保護眼鏡等）を着用する。

11.18. 残余被験物質の処理

実験終了後、残余被験物質の一部（2 g）を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りを専用の容器（安全廃棄システム、NALGENE®）に廃棄した。

12. 対照物質

12.1. 陰性対照（溶媒）

被験物質液調製に媒体として使用するトウモロコシ油を陰性対照物質に選択した。

12.1.1. 物質名

トウモロコシ油

12.1.2. ロット番号

V1R7200

12.1.3. 製造元

ナカライテスク株式会社

12.1.4. 保存条件

室温

12.1.5. 保存場所

被験物質調製室

12.2. 陽性対照

ガイドラインで推奨されている，下記の物質を陽性対照物質に選択した．

12.2.1. 対照物質名

エチルニトロソウレア (ENU)

12.2.2. ロット番号

4-RFS-48-2

12.2.3. 製造元

Toronto Research Chemicals Inc.

12.2.4. 保存条件

冷凍 (基準値 : -30~-5°C)

12.2.5. 保存場所

被験物質調製室, 冷凍保管庫

13. 試験材料および方法

TG 試験で使用する動物が *gpt delta* トランスジェニックマウスであることから, P1A レベルの拡散防止処置とした.

13.1. 試験動物

13.1.1. 種

用量設定試験および同一追試験 : マウス

TG 試験 : マウス (トランスジェニックマウス)

13.1.2. 系統

用量設定試験および同一追試験 : C57BL/6JJmsSlc

TG 試験 : C57BL/6JJmsSlc-Tg (*gpt delta*)

13.1.3. 生産場

日本エスエルシー株式会社

13.1.4. 週齢および体重

購入時 : 9 週齢

群分け時 : 10 週齢 (体重 ; 用量設定試験 : 23.0~25.9 g, 同一追試験 : 23.7~26.1 g, TG 試験 : 25.3~29.2 g)

13.1.5. 購入動物数

用量設定試験：雄 15 匹

用量設定試験（追試験）：雄 15 匹

TG 試験：雄 40 匹

13.1.6. 使用動物数

用量設定試験：雄 12 匹

用量設定試験（追試験）：雄 12 匹

TG 試験：雄 36 匹

13.1.7. 種・系統選択理由

用量設定試験および同一追試験：TG 試験の親動物である本系統のマウスを選択した。

TG 試験：遺伝子導入マウスとして広く利用されており，入手のし易さ等を考慮して本系統のトランスジェニックマウスを選択した。

13.2. 飼育管理

13.2.1. 飼育環境

バリアシステムの 7-110 号飼育室 (W 6.4 × D 10.3 × H 2.6 m) で動物を飼育し，環境調節の基準値は，次のとおりとした。なお，*gpt delta* トランスジェニックマウスの飼育期間中，出入り口にネズミ返しを設置した。

温度	23±3°C [実測値：22.8～23.0°C (用量設定試験)， 22.8～23.0°C (用量設定試験 [追試験])，22.8～23.0°C (TG 試験)]
湿度	55±20%RH [実測値：49.1～53.5%RH (用量設定試験)， 48.1～53.2%RH (用量設定試験 [追試験])，44.2～56.1%RH (TG 試験)]
換気回数	12 回以上/h
空気差圧	外気+30Pa 以上 (扉閉鎖時)
照明	12 時間 (午前 7 時点灯，午後 7 時消灯)

水洗式飼育機 (東京理工) を使用し，金属飼育ケージ (W 10.0 × D 19.6 × H 13.0 cm) に動物を 1 匹ずつ収容した。飼育ケージは隔週 1 回，給餌器は週 1 回の頻度で交換した。

13.2.2. 飼料

放射線滅菌固型飼料 (CRF-1, Lot No. 110908 [用量設定試験]，Lot No. 111109 [用量設定試験 (追試験) および TG 試験] オリエンタル酵母工業) を自由に摂取させた。飼料中の汚染物質に関する分析成績書 (No. AR-11-JP-002270-01, No. AR-11-JP-003254-01) を製造元から入手し，その値が日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることを確認した。なお，餌の補給は，給餌器の交換と同時に行った。

13.2.3. 給水

水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた。水道法に基づく水質検査を 2011 年 10 月および 2012 年 4 月に株式会社 エコプロ・リサーチで行い、2012 年 2, 3, 5 および 6 月に安評センターで細菌検査（一般細菌および大腸菌検査）を実施した。検査結果（水質検査：第 113689-3 号および第 122682-3 号，細菌検査：第 GT12-02 号，第 GT12-03 号，第 GT12-05 号および第 GT12-06 号）については，上水道水質基準（平成 15 年 5 月 30 日厚生労働省令第 101 号）の基準値内であることおよび細菌が検出されていないことを確認した。

13.3. 検疫・馴化

動物入荷時に，動物の一般状態および体重の推移を観察し，搬入後試験環境に馴化させた。1 日 1 回，8 日間一般状態を観察し，搬入日（Day -7）および検疫・馴化期間終了日（Day 1）に体重を測定した。なお，用量設定試験においては一般状態および体重推移より試験に用いることが不適切と判断された動物は，観察されなかった。用量設定試験—追試験では 1 例（仮動物番号：M021）に外傷がみられたことから，試験から除外した。TG 試験では動物の体重が低値を示した 4 匹（仮動物番号：M033, M037, M041, M054）については群分けから除外した。

13.4. 群分け

群分けは，Day 1 に測定した体重を基に，LATOX-F/V5（FFC）システムを用いて行った。用量設定試験および同一追試験の群分けにより除外された動物は，余剰動物として扱い，群分け終了後（2012 年 3 月 9 日または 2012 年 4 月 18 日）に炭酸ガスにより安楽死させた。

13.5. 個体識別

動物入荷時に通し番号（仮動物番号）を割り当て，検疫・馴化期間中は個体別飼育ケージに仮動物番号カードを付け，油性インクで動物の尾部に仮動物番号を記入し個体の識別を行った。さらに，TG 試験の場合は検疫・馴化期間中に，動物の耳介に仮動物番号を入墨した。

群分け後は，試験番号，飼育室番号，試験群，仮動物番号および個体識別番号を明記した個体識別カード（ID カード）を飼育ケージに付して識別した。

13.6. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

13.6.1. ダウンス緩衝液

以下の割合で調製した.

Na ₂ HPO ₄ (関東化学)	1.75	g
KH ₂ PO ₄ (関東化学)	0.25	g
NaCl (関東化学)	8	g
KCl (関東化学)	0.2	g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0] (Lot No. 01572B, ニッポンジーン)	20	mL
超純水	1000	mL

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 8.0 に調整後, オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌し, 室温 (基準値: 1~30°C) で保存した.

13.6.2. RNase 含有ダウンス緩衝液

以下の割合で調製した.

ダウンス緩衝液	100	mL
RNase 溶液 (10 mg/mL, Lot No. 90002C, ニッポンジーン)	2.0	mL

用時調製した.

13.6.3. 0.5 mol/L ショ糖溶液

以下の割合で調製した.

ショ糖 (M.W. = 342.30)	17.1	g
ダウンス緩衝液	100	mL

フィルター (孔径 0.2 µm) ろ過除菌後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.6.4. 組織破碎用緩衝液

以下の割合で調製した.

ダウンス緩衝液	45	mL
0.5 mol/L ショ糖溶液	45	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]	10	mL
RNase 溶液 (10 mg/mL)	2	mL

用時調製した.

13.6.5. 10 w/v% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液

以下の割合で調製した.

SDS (Lot No. STL8668, 和光純薬工業)	10	g
遺伝子工学用滅菌水 (Lot No. 02712B, ニッポンジーン)	100	mL

フィルター (孔径 0.2 µm) ろ過除菌後, 室温 (基準値: 1~30°C) 保存した.

13.6.6. プロテナーゼ K 溶液

以下の割合で調製した.

プロテナーゼ K (Lot No. LAM2357, 和光純薬工業)	200	mg
遺伝子工学用滅菌水	60	mL
10 w/v% SDS 溶液	20	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 7.5] 注 ¹⁾	20	mL

注 1) pH 8.0 の EDTA 溶液 (Lot No. 01440J, ニッポンジーン) を 1 mol/L の塩酸で pH 7.5 に調整した後に使用した.

用時調製した.

13.6.7. フェノール/クロロホルム (Ph/Cl) 混液

以下の割合で調製した.

クロロホルム (Lot No. 404N1128, 関東化学)	100	mL
TE 飽和フェノール (Lot No. 07972B, ニッポンジーン)	100	mL

用時調製した.

13.7. 培地および培養液等の調製

13.7.1. LB 培養液

以下の割合で調製した.

Bacto tryptone (Lot No. 1285257, BD Diagnostic)	10	g
Bacto yeast extract (Lot No. 1105209, BD Diagnostic)	5	g
NaCl	5	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.
3 ヶ月以内に使用した.

13.7.2. SM 緩衝液

以下の割合で調製した.

NaCl	5.84	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (関東化学)	2.03	g
1 mol/L Tris-HCl [pH 7.5] (Lot No. 00691C, ニッポンジーン)	50.0	mL
ゼラチン末 (Lot No. 912W2043, 関東化学)	100	mg
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温 (基準値: 1~30°C) で保存した.

13.7.3. 200 mg/mL マルトース水溶液

以下の割合で調製した.

マルトース (和光純薬工業)	20	g
超純水	100	mL

フィルター (孔径 0.2 μm) をろ過除菌後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.7.4. 5 × M9 salt

以下の割合で調製した.

Na_2HPO_4	33.9	g
KH_2PO_4	15.0	g
NaCl	2.50	g
NH_4Cl (和光純薬工業)	5.00	g
超純水	1000	mL

ビーカーに超純水を適量入れ, スターラーで攪拌しながら, 各試薬を少量ずつ添加した. 溶解後, 超純水を用いて定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.7.5. 50 w/v%グリセロール

以下の割合で調製した.

グリセリン (1.260 g/mL, 和光純薬工業)	39.7	mL
超純水	100	mL

ビーカーに超純水を適量入れ, スターラーで攪拌しながら少しずつグリセリンを添加した. 溶解後, 超純水を用いて定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.7.6. 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液

以下の割合で調製した.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24.6	g
超純水	100	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) 滅菌後, 室温 (基準値: 1~30°C) 保存した.

13.7.7. 1 mol/L 塩化カルシウム水溶液

以下の割合で調製した.

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業)	1.47	g
超純水	10	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) 滅菌後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.7.8. 1 w/v%チアミン水溶液

以下の割合で調製した.

チアミン塩酸塩 (Lot No. WER5857, 和光純薬工業)	0.1	g
超純水	10	mL

フィルター (孔径 0.2 μm) ろ過除菌後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.7.9. 10 mg/mL アミノ酸水溶液

以下の割合で調製した.

L(-)-プロリン (Lot No. PEE2878, 和光純薬工業)	1	g
L-ロイシン (Lot No. CDJ4982, 和光純薬工業)	1	g
L(+)-イソロイシン (Lot No. ALH4672, 和光純薬工業)	1	g
超純水	100	mL

ビーカーに超純水を適量入れ, スターラーで攪拌しながら, 各試薬を少量ずつ添加した. フィルター (孔径 0.2 μm) ろ過除菌後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.7.10. 20 mg/mL カナマイシン水溶液

以下の割合で調製した.

カナマイシン硫酸塩 (Lot No. LAR4778, 和光純薬工業)	20	mg
注射用水	1	mL

フィルター (孔径 0.2 μm) ろ過除菌後, 冷凍保存した.

13.7.11. 25 mg/mL クロラムフェニコール溶液

以下の割合で調製した.

クロラムフェニコール (Lot No. LAJ6910, 和光純薬工業)	250	mg
エタノール (関東化学)	10	mL

フィルター (孔径 0.2 μm) ろ過除菌後, 冷凍保存した.

13.7.12. 25 mg/mL 6-チオグアニン溶液 (6-TG 溶液)

以下の割合で調製した.

6-チオグアニン (Lot No. AEHGH, 東京化成)	25	mg
DMSO (和光純薬工業)	1	mL

アルミホイルを巻いて遮光し, 1 時間程度室温に放置した. 用時調製した.

13.7.13. ソフトアガー

以下の割合で調製した.

NaCl	6	g
バクトアガー (Lot No. 1279022, BD Diagnostic)	6	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 使用時までウォーターバスを用いて, 50°C に保温した.

6-TG ソフトアガーの場合は, さらに 25 mg/mL 6-TG 溶液 (用時調製) を使用直前に 1 mL 添加した.

13.7.14. M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地

以下の割合で調製した.

バクトアガー	15	g
超純水	800	mL

上記の試薬を秤量し, 所定量の超純水を添加後, スターラーバーを入れてオートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した. スターラーの上に 50°C の湯煎を置き, オートクレーブが終了したアガーを保温した.

5 × M9 salt	200	mL
50 w/v%グリセロール	20	mL
1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液	2	mL
1 mol/L 塩化カルシウム水溶液	0.1	mL
1 w/v%チアミン水溶液	0.5	mL
10 mg/mL アミノ酸水溶液	4	mL
25 mg/mL クロラムフェニコール溶液	1	mL
25 mg/mL 6TG 溶液 (M9 + Cm + 6TG 寒天培地のみ)	1	mL

アガーの温度が下がったら, スターラーを用いて攪拌しながら, 上記の試薬を添加した. シャーレ (直径 90 mm) に寒天培地 25 mL を添加し, 寒天培地が固化した後, プレートをラックに入れ, 上からアルミホイルを掛けることで遮光し, 室温で保存した.

13.7.15. 1/15 mol/L Na-K 緩衝液

以下の割合で調製した.

Na ₂ HPO ₄	7.57	g
KH ₂ PO ₄	1.82	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温 (基準値: 1~30°C) で保存し

た.

13.7.16. λ -trypticase 寒天培地

以下の割合で調製した.

BBL trypticase peptone (Lot No. 1362705, BD Diagnostic)	10	g
NaCl	5	g
バクトアガー	10	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温で約 60°C まで冷却し, 1 mol/L MgSO_4 10 mL を添加した (最終濃度 10 mmol/L). シャーレ (直径 90 mm) に本寒天培地 25 mL を添加し, 寒天培地が固化した後にプレートをラックに入れ, 4°C で保存した.

13.7.17. λ -trypticase トップアガー

以下の割合で調製した.

BBL trypticase peptone	1	g
NaCl	0.5	g
バクトアガー	0.6	g
超純水	100	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温で約 60°C まで冷却し, 1 mol/L MgSO_4 1 mL を添加した (最終濃度 10 mmol/L). 使用時までウォーターバスを用いて 50°C の条件で保温した.

13.8. 被験物質液等

13.8.1. 被験物質液の調製

被験物質をトウモロコシ油に懸濁させた.

用量設定試験では, 240, 60.0, 15.0 および 3.75 mg を正確に秤量し, メスフラスコに投入し, 少量のトウモロコシ油を添加したが, 分散状態が良好ではなかった. したがって, メスフラスコ内の内容物をメノウ製乳鉢に移し, 乳棒を用いて良く混合した. 混合液を再度メスフラスコに移した後, 乳鉢に残った被験物質を少量のトウモロコシ油で洗い, メスフラスコに移した. トウモロコシ油を加え, 30 mL とすることにより 8.00, 2.00, 0.50 および 0.125 mg/mL 溶液を準備した. 各調製液について, 各投与用に気密容器に小分けし, アルミホイルで遮光した. 各調製液は室温保管庫 (温度基準 1~30°C) にて保存し, それぞれの投与 (計 7 回) に用いた.

用量設定試験 (追試験) では, 1800, 1080, 648 および 390 mg を正確に秤量し, それぞれメノウ製乳鉢に入れ, 少量のトウモロコシ油を添加し, 乳棒を用いて良く混合した. 混合液をメスフラスコに移した後, 乳鉢に残った被験物質を少量のトウモロコシ油

で洗い、メスフラスコに移した。さらにトウモロコシ油を加え、30 mL とすることにより 60.0, 36.0, 21.6 および 13.0 mg/mL 溶液を準備した。各調製液について、各投与用に気密容器に小分けし (計 7 回分)、アルミホイルで遮光した。各調製液は室温保管庫 (温度基準 1~30°C) にて保存し、それぞれの投与 (計 2 回) に用いた。

TG 試験では、180, 90.0, 45.0 および 22.5 mg を正確に秤量し、それぞれメノウ製乳鉢に入れ、少量のトウモロコシ油を添加し、乳棒を用いて良く混合した。混合液をメスフラスコに移した後、乳鉢に残った被験物質を少量のトウモロコシ油で洗い、メスフラスコに移した。さらにトウモロコシ油を加え、30 mL とすることにより 6.00, 3.00, 1.50 および 0.75 mg/mL 溶液を準備した。各調製液について、各投与用に気密容器に小分けし、アルミホイルで遮光した。各調製液は室温保管庫 (温度基準 1~30°C) にて保存し、それぞれの投与 (計 7 回) に用いた。週 1 回、調製を実施した。

各調製液は室温保管庫 (温度基準 1~30°C, 実測値は下表参照) にて保存し、それぞれの投与に用いた。

試験	温度 (実測値)
用量設定試験	20.7~22.2°C (バックアップ実測値 : 19.6~21.9°C)
用量設定試験 (追試験)	21.6~22.2°C
TG 試験	21.0~23.1°C

13.8.2. 被験物質液の安定性

外部機関によって実施された「N-フェニルマレイミドのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験」¹⁾において、トウモロコシ油中の被験物質は、室温、遮光条件下において 7 日間安定であることが確認されている。

13.8.3. 残余被験物質液の処分

専用の容器 (安全廃棄システム, NALGENE[®]) に廃棄した。

13.8.4. 陽性対照物質液の調製

ENU 50 mg を量り、目盛り付試験管に移した後、1/15 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6) を加えて 5 mL に定容し、10 mg/mL 液を準備した。陽性対照物質液は、用時調製した。

13.8.5. 残余対照物質液の処分

専用の容器 (安全廃棄システム, NALGENE[®]) に廃棄した。

14. 試験方法

14.1. 対照群

14.1.1. 陰性対照群

被験物質液調製に用いる媒体であるトウモロコシ油を使用した。

14.1.2. 陽性対照群

gpt assay 用に、ガイドラインで推奨されている ENU を選択した。用量は文献²⁾により 100 mg/kg とし、すべての臓器を評価対照とした。Spi assay 用に、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP) が 400 ppm の用量で混餌投与され、陽性結果がでることが確認された別試験³⁾の肝臓を用いた。

14.2. 用量設定試験 (予備試験)

14.2.1. 用量

製品安全データシート (MSDS) によると、マウスの急性毒性試験 (経口) での LD₅₀ は 78 mg/kg である (RTECS)⁴⁾。

外部機関により実施された試験の情報より、*N*-フェニルマレイミドをラットに単回経口投与したときの LD₅₀ 値は、雄で 153 mg/kg、雌で 188 mg/kg であった⁵⁾。また、「*N*-フェニルマレイミドのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験」¹⁾においては、20 mg/kg 投与群の雌において3例が死亡した。さらにラットを用いた2週間反復経口投与試験において、25 および 50 mg/kg 群で 1/5 例が、100 mg/kg 群で 4/5 例の死亡が観察された¹⁾。

以上の試験結果から用量設定試験では 80.0 mg/kg を最高用量とし、以下 20.0, 5.00 および 1.25 mg/kg の4用量を設定した。

14.2.2. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg)	動物数	動物番号
被験物質	1.25	3	1101~1103
	5.00	3	1201~1203
	20.0	3	1301~1303
	80.0	3	1401~1403

14.2.3. 投与方法および投与回数

被験物質の投与経路は経口とし、ディスパーザブルシリンジとテフロン製ゾンデを用いて1日1回、約24時間間隔で7日間連続強制投与した。投与容量は体重100 g 当たり 1.0 mL とし、群分け時の体重から投与液量 (mL) を求めた。

14.2.4. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時, 検疫期間終了時(群分け時)および最終投与後1日に電子天秤(PG6002-S, メトラー・トレド)を用いて体重を測定した.

初回投与日から最終投与後1日まで1日1回以上, 動物の一般状態を観察した後, 各用量の最終投与後1日での死亡率を求めた.

14.2.5. 病理学的検査

病理学的検査では, 肉眼観察のみを実施した.

2012年3月12日に全生存動物を, イソフルラン麻酔下で放血により安楽死させた後, 剖検した.

剖検では, 全例の体表, 自然開孔部を観察し, 腹腔, 胸腔, 骨盤腔および頭蓋腔等の器官・組織を始めとする全身の諸器官・組織を肉眼観察した. すべての肉眼的異常について, 部位, 大きさ, 色調等を記録した. 解剖後の屍体は速やかに処理した.

14.3. 用量設定試験 (予備試験—追試験)

14.3.1. 用量

用量設定試験においては最高用量の 80.0 mg/kg 投与群においても死亡例は認められず, 顕著な一般状態の変化も観察されなかった. したがって, 600 mg/kg を最高用量とし, 以下 360, 216 および 130 mg/kg の 4 用量を用量設定試験 (追試験) の用量に設定した.

14.3.2. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg)	動物数	動物番号
被験物質	130	3	1501~1503
	216	3	1601~1603
	360	3	1701~1703
	600	3	1801~1803

14.3.3. 投与方法および投与回数

14.2.3.に記載の方法に準じた. ただし, Day 3 までにすべての群の動物が死亡した.

14.3.4. 体重測定および一般状態観察

14.2.4.に記載の方法に準じた.

ただし, 死亡動物については死亡発見時に体重を測定した.

14.3.5. 病理学的検査

14.2.5.に記載の方法に準じた.

14.4. トランスジェニック (TG) 試験⁶⁻⁹⁾

14.4.1. 用量

用量設定試験の結果 1.25, 5.00, 20.0 および 80.0 mg/kg 群のいずれにおいても死亡例は認められなかったが, 剖検時の肉眼所見において 80.0 mg/kg 群では 3 例全例に前胃の肥厚が観察された. 追試験の結果, 130~600 mg/kg の全例が死亡した. また, いずれの動物とも体重の減少傾向がみられていた. 以上の結果ならびに本試験での投与期間が 28 日であることを考慮し, 60.0 mg/kg を最高用量とし, 公比 2 で除した以下 30.0, 15.0 および 7.50 mg/kg の計 4 用量を被験物質群として設定した.

14.4.2. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg)	動物数		動物番号
		投与匹数	評価匹数	
陰性対照*	0	6	5	2001~2006
被験物質	7.50	6	5	2101~2106
	15.0	6	5	2201~2206
	30.0	6	5	2301~2306
	60.0	6	5	2401~2406
	陽性対照**	100	6	5

* : トウモロコシ油 ** : ENU

14.4.3. 投与動物数

各群とも評価数 5 匹を確保するため, 6 匹に投与した. 死亡例等が認められなかったことから, 被験物質投与群については, 5 匹以上評価が可能となる上位 3 用量について遺伝子突然変異解析を実施した. 残りの 1 群 (7.50 mg/kg 群) については, ゲノム DNA の抽出を行わなかった. 各群, 動物番号の小さい順に 5 匹を評価に使用した. 評価に使用しない動物については, 14.4.7. に記載する各器官 (臓器) を摘出した後に凍結保存し, ゲノム DNA の抽出は行わなかった.

14.4.4. 投与方法および投与回数

被験物質の投与経路は経口とし, ディスポーザブルシリンジおよびテフロン製胃ゾンデを用いて, 1 日 1 回, 28 日間連続強制投与した. 被験物質液の投与液量 (mL) は, 体重 100 g 当たり 1.0 mL とし, 14.4.6. の項で測定した最新の体重から求めた.

陽性対照物質の投与は, 腹腔内投与とし, 25G 注射針を装着したディスポーザブルシリンジを用いて 1 日 1 回, 2 日間腹腔内投与した. 投与液量は, 体重 100 g 当たり 1.0 mL

とし、Day 1 の体重を基に算出した。

14.4.5. 投与期間および発現期間

投与開始日を Day 1 と定め、搬入日 (Day -7) から群分け日 (Day 1) までを検疫・馴化期間、Day 1 から Day 28 までを投与期間、Day 29 から Day 31 までを発現期間とするとともに、Day 1~7 を Week 1、Day 8~14 を Week 2、Day 15~21 を Week 3、Day 22~28 を Week 4 とした。最終投与後 3 日 (Day 31) に器官を摘出した。陽性対照群については、Day 2 および 3 に投与し、投与後 10 日 (Day 13) に器官を摘出した。

なお、発現期間は、OECD Guideline for the Testing of Chemicals 488 に準じて設定した。

14.4.6. 体重測定および一般状態観察

Day -7 (動物搬入時)、1 (群分け日 [投与開始日])、8、15、22、29 および 31 (器官摘出直前) に、電子天秤 (PG6002-S、メトラー・トレド) を用いて体重を測定した。陽性対照群については、Day -7 (動物搬入時)、1 (群分け日) および 13 (器官摘出直前) に電子天秤を用いて体重を測定した。

器官摘出まで、1 日 1 回以上、動物の一般状態を観察した。

14.4.7. 器官 (組織) 摘出、肉眼観察および保存

炭酸ガスを用いて安楽死させた動物から、肝臓、大腿骨、胃および精巣を摘出し、これら器官の肉眼観察を行った。摘出した器官 (肝臓および精巣) についての重量を、電子天秤 (XS603S、メトラー・トレド) を用いて測定し、記録した。なお、解剖室の出入り口にはネズミ返しを設置した。

器官重量/体重比 (相対重量) を、剖検日の体重および器官重量から算出した [(器官重量 / 剖検日の体重) × 100]。なお、肝臓および精巣の測定単位は g (小数第 2 位まで) とした。

各器官の摘出・保存は、以下の方法に従った。

肝臓： 左葉の外側辺縁を生検トレパン (BP-50F、貝印) を用いて 4 ヶ所くり抜いた。

くり抜いた肝臓は、それぞれ別のマイクロチューブに入れ、液体窒素 (LN₂) 中で凍結させた。残った左葉およびその他の葉は、ビニール袋に入れ、LN₂ を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。

大腿骨： 左右の大腿骨を摘出した後、チューブに入れ、LN₂ で凍結させた。

胃： 噴門部は食道、幽門部は十二指腸を含めた形で摘出し、大弯側を切開した後、内容を生理食塩液で洗い出した。その後、粘膜を観察した上で前胃と腺胃に分割した。腺胃については保存袋に入れ、LN₂ 中で凍結させた。

精巣： 左右の精巣を摘出した後、それぞれ別のマイクロチューブに入れ、液体窒素 (LN₂) 中で凍結させた。

凍結後は、超低温フリーザー (CLN-35CW あるいは MDF-U71V, 三洋電機, 設定値 :
-80°C, 基準値 : -90~-60°C) 中に保存した。

すべての摘出器官 (臓器) は、最終報告書作成後まで保存される。その後の保存に
ついては、試験委託者と安評センターで協議し、別途定める。

14.4.8. 摘出器官の選択理由

肝臓： 本被験物質による影響が示唆され、主要な代謝器官であり、被験物質が比較的
高濃度で存在すると考えられるため。

大腿骨： 本被験物質による影響が示唆され、造血器官であるため。

胃： 本被験物質による影響が示唆され、経口投与では初期に被験物質と接触する器
官であるため。

精巣： 本被験物質による影響が示唆され、次世代への影響を確認するため。

14.4.9. ゲノム DNA の抽出

ダウンス型ホモジナイザーに組織破碎用緩衝液 (RNase を含む) 3 mL を分注し、氷
中で冷却した。次いで、凍結組織片を入れ、ペッスルを用いてホモジナイズした。

あらかじめ 0.5 mol/L ショ糖溶液 3 mL を入れて氷冷した 15 mL 容の遠心管に上記の
組織破碎液を静かに重層し、遠心機 (LC-122, トミー精工) を用いて 3000 r/min (1710
G) で 10 分間遠心した。上清をスポイト等で除去し、冷却してある RNase 含有ダウ
ンス緩衝液 3 mL を加え、よく懸濁した (核/細胞懸濁液)。骨髄の場合は、適量の RNase
含有ダウンス緩衝液を用いて大腿骨から骨髄を洗い出し、ペッスルを用いてホモジナイ
ズした (核/細胞懸濁液)。

この核/細胞懸濁液にプロテナーゼ K 溶液 3 mL を加えて静かに転倒混和し、2.5 時
間程度 (懸濁液が透明になるまで) 50°C の条件で保温し、消化させた。等量 (約 6 mL)
の Ph/Cl 混液を加え、数回転倒混和し、10 分間ローテーターを用いて回転混和後、遠心
機 (LC-122) を用いて 2500 r/min (1190 G) で 10 分間遠心した。上層 (水相) をトラン
スファーピペットで静かに回収し、新たな 15 mL 容の遠心管に移した。本操作を 2 回繰
り返した。ただし、加える Ph/Cl 混液の量は回収した水相と等量とした。回収した水相
と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混液 (容量比 24 : 1) を加え、数回転倒
混和し、10 分間ローテーターを用いて回転混和後、2500 r/min (1190 G) で 10 分間遠心
した。水相を回収し、新しい 50 mL 容の遠心管に移した。遠心管にエタノールを徐々に
加え、ゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA を 70%エタノールの入ったマ
イクロチューブに移し、およそ 10 分間浸した。次いで、遠心機 (MX-160) を用いて
13000 r/min (13240 G) で 10 分間遠心した。上清をマイクロピペットで可能な限り除い
た後、チューブを室温に放置することにより残ったエタノールを蒸散させた。適量
(100 µL) の TE 緩衝液 (ニッポンジーン) を加え、一晩室温に放置し、残渣の DNA を

溶解させた。調製後は、冷蔵にて保存した。

Spiⁱ assay で陽性結果がでることが確認された別試験の肝臓についても DNA 抽出を実施し、Spiⁱ assay についてのみ実施した。

すべての DNA 溶液は、最終報告書作成後 3 ヶ月以内に処分する。

14.4.10. 試験菌株の準備 (gpt assay)

容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに LB 培養液 30 mL, マルトース水溶液 (200 mg/mL) 300 μ L およびカナマイシン水溶液 (20 mg/mL) 30 μ L を添加した。これに凍結保存 (設定値: -80°C) しておいた大腸菌 YG6020 株を融解した後, 50 μ L 接種した。37°C, 120 回/分の振盪条件で一晩 (14~18 時間) 培養し, 前培養液とした。

容量 500 mL のバツフル付三角フラスコに, LB 培養液 100 mL, マルトース水溶液 (200 mg/mL) 1 mL およびカナマイシン水溶液 (20 mg/mL) 100 μ L を添加し, 次いで, 先の前培養液 1.5 mL を殖菌した後, 同様に 2~6 時間程度培養を続けた。培養終了後, 培養液 160 mL を 10 分間遠心分離 (2000 r/min) した。上清を捨て, 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 80 mL で再懸濁した (大腸菌懸濁液)。

14.4.11. 試験菌株の準備 (Spiⁱ assay)

容量 200 mL のバツフル付三角フラスコ 3 本に LB 培養液を 30 mL ずつ添加した。これに凍結保存 (設定値: -80°C) しておいた大腸菌 (XL-1 Blue MRA), 大腸菌 [XL-1 Blue MRA (P2)] および大腸菌 [WL95 (P2)] * を融解した後, それぞれ 50 μ L ずつ接種した。37°C, 120 回/分の振盪条件で一晩 (14~18 時間) 培養し, 前培養液とした。

容量 500 mL または 200 mL のバツフル付三角フラスコ 3 本に, LB 培養液 100 あるいは 20 mL, マルトース水溶液 (200 mg/mL) 1 あるいは 0.2 mL をそれぞれ添加し, 次いで, 先の前培養液を 1.5 あるいは 0.3 mL ずつ殖菌した後, 同様に 2~6 時間程度培養を続けた。培養終了後, 培養液を 10 分間遠心分離 (2000 r/min) した。上清を捨て, 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を 50 mL ずつ添加し, 再懸濁した (大腸菌懸濁液)。

Confirmation 用の試験菌株の準備は, 使用量に合わせて, 適宜, 準備量を変更した。

* : Spiⁱ変異体候補ブランクの confirmation の際に使用

14.4.12. ゲノム DNA のパッケージング (gpt, Spi- assay 共通)

Transpack (Stratagene) 製品添付の Instruction Manual に従ってパッケージングを実施した。Transpack のチューブ (RED) を解凍した。100~600 μ g/mL 程度の濃度に調製したゲノム DNA 溶液のおよそ 10 μ L をチューブ (RED) に加え, ピペッティングにより混合した後, 30°C の条件で 90 分間インキュベートした。次いで, チューブ (BLUE) を解凍し, その 10 μ L をチューブ (RED) に加え, 同様に混合した。さらに, 30°C の条件で 90 分間インキュベートを続けた。インキュベート終了後, 各チューブ内の合計

液量が 300 μ L になるように SM 緩衝液を加え、十分に攪拌した(パッケージング溶液).
パッケージング溶液は使用時まで、水中にて保存した.

14.4.13. パッケージング溶液のプレーティング (*gpt* assay)

大腸菌懸濁液 (YG6020 株) を、総プラーク算出用 (タイター用) 小試験管 2 本および突然変異算出用 (セレクション用) 小試験管 5 本に 200 μ L ずつ分注しておいた. 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を希釈用チューブに 495 μ L ずつ分注した. 希釈用チューブにパッケージング溶液 5 μ L を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した. これを希釈液とした. 希釈液をタイター用小試験管 2 本に 5 μ L ずつ添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した. パッケージング溶液をセレクション用小試験管 5 本に約 60 μ L ずつ添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した (5 本目のセレクション用小試験管には残っているパッケージング溶液全量を添加した). タイター用小試験管およびセレクション用小試験管を 37°C で 20 分程度静置した. 静置後、37°C、120 回/分の振盪条件で 30 分間培養した. タイター用小試験管に、トップアガー 2.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、M9+Cm 寒天培地に全量を重層した. これをタイター用プレートとした. セレクション用小試験管に 6TG トップアガー 2.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、M9+Cm+6TG 寒天培地に全量を重層した. これをセレクション用プレートとした. タイター用プレートは 37°C の条件で 2~3 日間、セレクション用プレートは 37°C の条件で 5 日間培養した.

14.4.14. パッケージング溶液のプレーティング (*Spi* assay)

大腸菌懸濁液 (XL-1 Blue MRA) を、総プラーク算出用 (タイター用) 小試験管 2 本に 200 μ L ずつ分注しておいた. 大腸菌懸濁液 [XL-1 Blue MRA (P2)] を、突然変異算出用 (セレクション用) 小試験管 2 本に 200 μ L ずつ分注しておいた. 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を希釈用チューブに 495 μ L ずつ分注した. 希釈用チューブにパッケージング溶液 5 μ L を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した. これを希釈液とした. 希釈液をタイター用チューブ 2 本に 5 μ L ずつ添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した. パッケージング溶液をセレクション用チューブ 2 本に約 150 μ L ずつ添加し、ボルテックスミキサーでゆるやかに攪拌した (2 本目のセレクション用チューブには残っているパッケージング溶液全量を添加した). タイター用チューブおよびセレクション用チューブを 37°C で 20 分程度静置した. タイター用チューブおよびセレクション用チューブに、 λ -trypticase トップアガー 2.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、 λ -trypticase 寒天培地に全量を重層した. これをタイター用プレートおよびセレクション用プレートとした. タイター用およびセレクション用プレートは 37°C で一晚 (14~18 時間) 培養した.

14.4.15. コロニーの計数 (*gpt* assay)

培養終了後、コロニー数を用手法にて計数した。ただし、セレクション用プレートのコロニーは、培養開始5日目で6TGの析出により、コロニーの識別が困難になるため、3および4日目の時点で候補コロニーを確認した。

14.4.16. プラークの計数 (*Spi* assay)

培養終了後、プラーク数を用手法にて計数した。

14.4.17. コロニーの confirmation (*gpt* assay)

すべての *gpt* 変異体候補コロニーについて、confirmation を実施した。

未使用の M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地に方眼紙を貼り付けた。

セレクション用プレートのコロニーに、ストリーク箇所の通し番号をつけた。セレクション用プレートのコロニー数と同数の滅菌済みマイクロチューブを準備した。準備したマイクロチューブに 1/15 mol/L Na-K buffer を 50 μ L ずつ分注した。セレクション用プレートのコロニーを滅菌済み爪楊枝の先で軽く触れた。爪楊枝の先を 1/15 mol/L Na-K buffer でよく洗った。爪楊枝を M9 + Cm + 6TG 寒天培地、M9 + Cm 寒天培地の順にストリークした。37°C の条件で 2~3 日間培養した。M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地の両方に、生育が認められたコロニーを変異コロニーとした。変異コロニーの値は、confirmation 後の値を用いた。

14.4.18. プラークの confirmation (*Spi* assay)

すべての *Spi* 変異体候補プラークについて WL95 (P2) 株を含めた confirmation を実施した。

大腸菌 XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2) および WL95 (P2) を小試験管に 200 μ L ずつ分注した。分注した小試験管に、 λ -trypticase トップアガーを 2.5 mL ずつ加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、未使用の λ -trypticase 寒天培地に全量を重層した。重層後、プレートを約 1 時間乾燥させた。乾燥後、重層したプレートに方眼紙を貼り付けた。

セレクション用プレートのプラークに、スポット箇所の通し番号をつけた。セレクション用プレートのプラーク数と同数の滅菌済みマイクロチューブを準備した。準備したマイクロチューブに SM 緩衝液を 60 μ L ずつ分注した。セレクション用プレートのプラークをパスツールピペットあるいは広口チップを用いて寒天ごとくり抜いた。SM 緩衝液 60 μ L を分注したマイクロチューブにくり抜いた寒天を入れた。これを confirmation 液とした。大腸菌 XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2) および WL95 (P2) を重層した λ -trypticase 寒天培地に confirmation 液をそれぞれ 1~2 μ L ずつスポットした。37°C の条件で一晩 (14~18 時間) 培養した。大腸菌 XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2) および WL95 (P2) の 3 つのプレート上でプラークを形成したものを変異プラークとし

た. 変異プラークの値は, confirmation 後の値を用いた.

14.4.19. 総コロニー数の算出 (gpt assay)

タイター用プレートに出現したコロニー数 (N) を計数し, 下記の式を用いて総コロニー数を求めた.

総コロニー数 = タイター用プレートに出現したコロニー数 × Dilution Factor

$$\begin{aligned} \text{総コロニー数} &= \frac{N \times 100 \times 300 (\mu\text{L})}{5 (\mu\text{L})} \\ &= 6000 \times N \end{aligned}$$

14.4.20. 突然変異頻度 (Mutant Frequency) の算出 (gpt assay)

突然変異頻度は, セレクション用プレートのコロニー総数 (Confirmation 後の値) を総コロニー数で除して, 当該組織での突然変異頻度を求めた.

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{セレクション用プレートのコロニー総数 (Confirmation 後の値)}}{\text{総コロニー数}}$$

14.4.21. 総プラーク数の算出 (Spi assay)

タイター用プレートに出現したプラーク数 (N) を計数し, 下記の式を用いて総プラーク数を求めた.

総プラーク数 = タイター用プレートに出現したプラーク数 × Dilution Factor

$$\begin{aligned} \text{総プラーク数} &= \frac{N \times 100 \times 300 (\mu\text{L})}{5 (\mu\text{L})} \\ &= 6000 \times N \end{aligned}$$

14.4.22. 突然変異頻度 (Mutant Frequency) の算出 (Spi assay)

突然変異頻度は, セレクション用プレートのプラーク総数 (Confirmation 後の値) を総プラーク数で除して, 当該組織での突然変異頻度を求めた.

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{セレクション用プレートのプラーク総数 (Confirmation 後の値)}}{\text{総プラーク数}}$$

14.5. 結果の解析

陽性対照群を除く各被験物質投与群の突然変異頻度は, 最初に Bartlett の等分散検定を実施した. 等分散の場合は, Dunnett の多重比較検定で対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した. Bartlett の等分散検定で不等分散 (有意差が認められた) の場合は, Steel の検定で対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した.

陰性対照群と陽性対照群での突然変異頻度の比較は, 最初に F 検定を実施し, 有意差

が認められない場合には、Student の t 検定を実施した。F 検定で有意差が認められた場合は、Aspin-Welch の t 検定を実施した。

各検定の有意水準は両側 5%とした。

陰性対照群と比較し、被験物質群の突然変異頻度において統計学的な有意差が認められた場合に、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

15. 試験成立条件

陽性対照群の肝臓における突然変異頻度において、陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が認められた場合に、試験は成立したと判断する。有意な増加が認められなかった場合は、試験の妥当性を評価し、その結果、試験が成立しないと判断した場合は、再試験を実施する。

なお、陽性対照群の肝臓における突然変異頻度において、陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が認められたので、試験は成立したと判断した。

16. 結果

16.1. 用量設定試験

結果を Table 1 および 2 ならびに Appendix 1 および 2 に示す。

N-phenylmaleimide 投与の最高用量の 80.0 mg/kg 群においても全例 (3/3) が生存していた。

いずれの投与群とも毒性兆候を示す一般状態の変化は認められず、体重の顕著な減少も認められなかった。

また、剖検時の肉眼所見では、80.0 mg/kg 群において 3 例全例に前胃の肥厚が観察された。

16.2. 用量設定試験 (追試験)

結果を Table 3 および 4 ならびに Appendix 3 および 4 に示す。

N-phenylmaleimide 投与の 600 あるいは 360 mg/kg 群については投与後に自発運動低下、呼吸不整等が観察され、いずれも Day 2 までに全例が死亡した。216 mg/kg 投与群は Day 2 に、130 mg/kg 群は Day 3 に全例が死亡した。各群とも体重の減少傾向が観察された。また、いずれも死後発見であったが、剖検時には腺胃の赤色班等が散見された。

16.3. 遺伝子突然変異試験

16.3.1. 肝臓

16.3.1.1. *gpt* assay

試験結果を Table 5 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $2.32 \pm 1.06 \times 10^{-6}$ ($1.57 \sim 4.12 \times 10^{-6}$) であった.

N-phenylmaleimide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 15.0 mg/kg 群で $1.72 \pm 1.08 \times 10^{-6}$, 中用量の 30.0 mg/kg 群で $1.48 \pm 1.15 \times 10^{-6}$, 高用量の 60.0 mg/kg 群で $0.80 \pm 0.44 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $9.75 \pm 4.32 \times 10^{-6}$ と増加を示し, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた.

16.3.1.2. *Spi* assay

試験結果を Table 9 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $4.16 \pm 2.56 \times 10^{-6}$ ($0.00 \sim 6.63 \times 10^{-6}$) であった.

N-phenylmaleimide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 15.0 mg/kg 群で $4.11 \pm 0.78 \times 10^{-6}$, 中用量の 30.0 mg/kg 群で $2.74 \pm 0.81 \times 10^{-6}$, 高用量の 60.0 mg/kg 群で $2.87 \pm 2.64 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照サンプルにおける各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $13.76 \pm 2.57 \times 10^{-6}$ と増加を示し, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた.

16.3.2. 骨髄

16.3.2.1. *gpt* assay

試験結果を Table 6 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $0.98 \pm 0.92 \times 10^{-6}$ ($0.35 \sim 2.47 \times 10^{-6}$) であった.

N-phenylmaleimide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 15.0 mg/kg 群で $0.75 \pm 0.30 \times 10^{-6}$, 30.0 mg/kg 群で $0.67 \pm 0.24 \times 10^{-6}$, 60.0 mg/kg 群で $1.29 \pm 1.75 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $19.08 \pm 5.70 \times 10^{-6}$ と増加を示し, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた.

16.3.2.2. Spi assay

試験結果を Table 10 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $2.86 \pm 2.51 \times 10^{-6}$ ($0.79 \sim 6.21 \times 10^{-6}$) であった.

N-phenylmaleimide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 15.0 mg/kg 群で $1.13 \pm 0.68 \times 10^{-6}$, 30.0 mg/kg 群で $2.14 \pm 1.37 \times 10^{-6}$, 60.0 mg/kg 群で $1.35 \pm 1.01 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

16.3.3. 胃 (腺胃)

16.3.3.1. *gpt* assay

試験結果を Table 7 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $1.75 \pm 0.88 \times 10^{-6}$ ($0.91 \sim 2.97 \times 10^{-6}$) であった.

N-phenylmaleimide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 15.0 mg/kg 群で $1.16 \pm 0.52 \times 10^{-6}$, 30.0 mg/kg 群で $1.12 \pm 0.48 \times 10^{-6}$, 60.0 mg/kg 群で $1.27 \pm 0.61 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $20.33 \pm 3.26 \times 10^{-6}$ と増加を示し, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた.

16.3.3.2. Spi assay

試験結果を Table 11 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $1.20 \pm 1.14 \times 10^{-6}$ ($0.00 \sim 2.38 \times 10^{-6}$) であった.

N-phenylmaleimide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 15.0 mg/kg 群で $1.31 \pm 0.76 \times 10^{-6}$, 30.0 mg/kg 群で $2.28 \pm 1.28 \times 10^{-6}$, 60.0 mg/kg 群で $1.69 \pm 0.61 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

16.3.4. 精巢

16.3.4.1. *gpt* assay

試験結果を Table 8 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $0.60 \pm 0.20 \times 10^{-6}$ ($0.37 \sim 0.83 \times 10^{-6}$) であった.

N-phenylmaleimide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 15.0 mg/kg 群で $0.53 \pm 0.25 \times 10^{-6}$, 30.0 mg/kg 群で $0.44 \pm 0.22 \times 10^{-6}$, 60.0 mg/kg 群で $0.46 \pm 0.36 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $1.42 \pm 0.96 \times 10^{-6}$ であり,

陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく、同程度であった。

16.3.4.2. Spi assay

試験結果を Table 12 に示す。

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $2.72 \pm 1.01 \times 10^{-6}$ ($1.66 \sim 4.26 \times 10^{-6}$) であった。

N-phenylmaleimide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は、15.0 mg/kg 群で $1.47 \pm 0.70 \times 10^{-6}$ 、30.0 mg/kg 群で $1.45 \pm 0.99 \times 10^{-6}$ 、60.0 mg/kg 群で $1.59 \pm 0.44 \times 10^{-6}$ であり、陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく、同程度であった。

16.3.5. 体重および一般状態観察

試験結果を Appendix 5 および 6 に示す。

N-phenylmaleimide 投与群では、明確な体重減少および一般状態の変化は観察されなかった。

16.3.6. 器官重量および器官重量/体重比

試験結果を Appendix 7 に示す。

いずれの *N*-phenylmaleimide 投与群においても、陰性対照群と比較し肝臓および精巣の器官重量および器官重量/体重比については明確な変化は認められなかった。

16.3.7. 解剖時の肉眼所見

試験結果を Appendix 8 に示す。

N-phenylmaleimide の 60.0 mg/kg 群では、6 例全例に前胃の肥厚が認められた。同群の肝臓、大腿骨および精巣ならびに他の群では特筆すべき変化は認められなかった。

17. 考察および結論

N-phenylmaleimide の肝臓、骨髄、胃（腺胃：以下胃）および精巣における遺伝子突然変異誘発性を検討するため、トランスジェニックマウス (*gpt delta*) を用いた遺伝子突然変異誘発試験（レポーター遺伝子：*gpt* および *red/gam*）を実施した。

マウス経口投与による LD₅₀ が 78 mg/kg との情報を基に、80.0, 20.0, 5.00 および 1.25 mg/kg の 4 用量について 1 日 1 回、24 時間間隔で 7 日間連続強制経口投与を実施した用量設定試験の結果、いずれの群でも死亡が認められず一般状態の変化および体重の顕著な減少も認められなかった。また、剖検時の肉眼所見においては最高用量の 80.0 mg/kg 群で 3 例全例に前胃の肥厚が観察されたが、20.0 mg/kg 以下の投与群では特筆すべき変化は認められなかった。したがって、用量を増加した 600, 360, 216 および 130 mg/kg の 4 用量を用いて追加試験を実施した。その結果、初回投与後 3 日までに全群の全例が死亡した。以上の結果から、本試験（TG 試験）では最大耐量付近と考えら

れる 60.0 mg/kg を最高用量とし、公比 2 で除した以下 30.0, 15.0 および 7.50 mg/kg の計 4 用量を被験物質群として設定した。

トランスジェニック試験では 1 日 1 回、28 日間強制経口投与し、3 日間の遺伝子突然変異発現期間をおいた後、各器官を摘出し、肝臓、骨髄、胃および精巣について *gpt* assay および *Sp1* assay により遺伝子突然変異頻度を求めた。胃については 60.0 mg/kg 群で 6 例全例に前胃の肥厚が認められたが、当試験施設では通常腺胃を解析に用いていることおよび、委託者からの指定臓器ではなかったことから、遺伝子突然変異の解析を実施しなかった。

その結果、*N*-phenylmaleimide 投与群の肝臓、骨髄、胃および精巣のいずれにおいても、*gpt* assay および *Sp1* assay による遺伝子突然変異頻度に、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められなかった。

N-phenylmaleimide は、プレート法の場合、復帰突然変異試験で陰性との報告⁹⁾があるが、プレインキュベーション法では陽性結果が得られている¹⁰⁾。さらに、染色体異常試験においても細胞の増殖が抑制される濃度で陽性と判定されている¹¹⁾。しかしながら、これらの試験ではラット肝 S9 を添加した代謝活性化法では明確な陰性を示したことから、本物質は直接変異原であることが示唆された。一方、*gpt delta* マウスでは本物質が直接的に、かつ大量に暴露される胃（腺胃）ならびに代謝器官である肝臓、その他の臓器（器官）においても突然変異の誘発は認められていないことから、遺伝毒性に関しては生体で特段の懸念はないものと考えられた。

陽性対照物質のエチルニトロソウレア（ENU）腹腔内投与群（100 mg/kg）は、肝臓、骨髄および胃で *gpt* assay による遺伝子突然変異頻度が上昇しており、遺伝子突然変異頻度は陰性対照と比較して統計学的に有意（ $p \leq 0.05$ ）な増加を示した。

Sp1 assay で陽性結果が出ることを確認された 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP) を投与した別試験の肝臓を陽性対照群の肝臓として用いて *Sp1* assay を実施した結果、遺伝子突然変異頻度は明確な高値を示し、陰性対照群に比べて統計学的に有意な増加（ $p \leq 0.05$ ）が認められた。したがって、試験成立条件を満たしたことから、当該試験が適切な条件下でなされたと判断された。

以上の結果から、当該試験条件下において、*N*-phenylmaleimide はトランスジェニックマウスに対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの（陰性）と判定された。

18. 参考文献

- 1) ████████ *N*-フェニルマレイミドのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験, (株) 日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
- 2) 能美健彦: 変異原性試験で何がわかるか: 21世紀の展望, *Environ. Mutagen Res.*, 24 (2002) 75-80.
- 3) K. Masumura, K. Matsui, M. Yamada, M. Horiguchi, K. Ishida, M. Watanabe, O. Ueda, H. Suzuki, Y. Kanke, K.R. Tindall, K. Wakabayashi, T. Sofuni and T. Nohmi, Mutagenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) in the new gpt delta transgenic mouse. *Cancer Letters* 143 (1999) 241-244.
- 4) ████████ *N*-フェニルマレイミドのラットを用いる単回経口投与毒性, (株) 日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
- 5) T. Suzuki, S. Itoh, M. Nakajima, N. Hachiya and T. Hara, Target organ and time-course in the Mutagenicity of five carcinogens in MutaTM Mouse: a summary report of the second collaborative study of the transgenic mouse mutation assay by JEMS/MMS. *Mutation Research* 444 (1999) 259-268.
- 6) T. Nohmi, M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni, A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spⁱ and 6-thioguanine selections, *Environmental Molecular Mutagenesis* 28 (1996) 465-470.
- 7) T. Nohmi, T. Suzuki and K. Masumura, Recent advance in the protocols of transgenic mouse mutation assays, *Mutation Research* 455 (2000) 191-215.
- 8) V. Thybaud, S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima, In vivo transgenic mutation assays. *Mutation Research* 540 (2003) 141-151.
- 9) 大八化学社内データ (生活科学研究所にて試験実施) (1985)
- 10) ████████ 1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの細菌を用いる復帰突然変異試験, (財) 食品農医薬品安全性評価センター (2000)
- 11) ████████ 1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験, (財) 食品農医薬品安全性評価センター (2000)

19. 試験関係資料の保存

当該試験の下記資料は、安評センター資料保存施設にて最終報告書作成後 10 年間保存される。その後の保存については、試験委託者と安評センターで協議し、別途定める。

- 試験計画書（原本）
- 被験物質（2g）
- 被験物質に関する資料（使用記録、調製記録、その他）
- 生データ（投与記録、体重測定記録、症状観察記録、ゲノム DNA 抽出記録、突然変異頻度測定結果、その他）
- 最終報告書（原本）
- その他の試験関係資料

20. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかつたこと

- 1) 用量設定試験—追試験の群分け時に、誤って用量設定試験と同一の動物番号を登録してしまった。しかし、動物番号読み替え表を作成し、適切な処置を講じたことから、当該事象が試験の信頼性に及ぼす影響はないと判断した。

Table 1. Mortality in dose-finding study of *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment								Mortality	
			1	2	3	4	5	6	7	8		
<i>N</i> -phenylmaleimide	1.25	1101	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1102	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1103	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	5.00	1201	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1202	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1203	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	20.0	1301	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1302	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1303	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
80.0	1401	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3	
	1402	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live		
	1403	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live		

Table 2. Gross findings in dose-finding study of *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Group	Animal ID-No.	Classification	Experimental day	Organ	Findings and comments
1.25 mg/kg	1101	Sacrificed	8	Normal	
	1102	Sacrificed	8	Normal	
	1103	Sacrificed	8	Normal	
5.00 mg/kg	1201	Sacrificed	8	Normal	
	1202	Sacrificed	8	Normal	
	1203	Sacrificed	8	Normal	
20.0 mg/kg	1301	Sacrificed	8	Normal	
	1302	Sacrificed	8	Normal	
	1303	Sacrificed	8	Normal	
80.0 mg/kg	1401	Sacrificed	8	Stomach	Thick, forestomach
	1402	Sacrificed	8	Stomach	Thick, forestomach
	1403	Sacrificed	8	Stomach	Thick, forestomach

Table 3. Mortality in dose-finding study of *N*-phenylmaleimide (Additional study)
 [Male mice dosed once a day, for 1 or 2 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment			Mortality
			1	2	3	
<i>N</i> -phenylmaleimide	130	1501	Live	Live	Dead	3 / 3
		1502	Live	Live	Dead	
		1503	Live	Live	Dead	
	216	1601	Live	Dead		3 / 3
		1602	Live	Dead		
		1603	Live	Dead		
	360	1701	Live	Dead		3 / 3
		1702	Dead			
		1703	Live	Dead		
	600	1801	Dead			3 / 3
		1802	Dead			
		1803	Dead			

Table 4. Gross findings in dose-finding study of *N*-phenylmaleimide (Additional study)
 [Male mice dosed once a day, for 1 or 2 days (Oral administration, a day after final administration)]

Group	Animal ID-No.	Classification	Experimental day	Organ	Findings and comments
130 mg/kg	1501	Dead	3	[Autolysis (slight)] Stomach Small intestine	Red, contents Red, duodenum, jejunum, contents
	1502	Dead	3	[Autolysis (slight)] Liver Stomach Small intestine	Herniation, single, 10×8×4 mm Red patch, a few, mucosa, 10×4 mm Red, duodenum, jejunum, contents
	1503	Dead	3	[Autolysis (slight)] Stomach	Red patch, multiple, mucosa, diameter, 1.5 mm
216 mg/kg	1601	Dead	2	[Autolysis (slight)] Normal	
	1602	Dead	2	[Autolysis (slight)] Stomach	Red patch, a few, glandular stomach mucosa, diameter, 2 mm
	1603	Dead	2	[Autolysis (slight)] Stomach	Red patch, single, glandular stomach mucosa, diameter, 1.5 mm
360 mg/kg	1701	Dead	2	[Autolysis (slight)] Normal	
	1702	Dead	1	Stomach	Red, glandular stomach mucosa
	1703	Dead	2	[Autolysis (slight)] Stomach	Red patch, multiple, glandular stomach mucosa, diameter, less than 1 mm
600 mg/kg	1801	Dead	1	Stomach	Red, glandular stomach mucosa
	1802	Dead	1	Liver Stomach	Brown nodule, single, 4×3×2 mm Red, glandular stomach mucosa
	1803	Dead	1	Stomach	Red, glandular stomach mucosa

Table 5. Induction of mutation (*gpt* assay) in liver of transgenic mice treated with *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)	
Corn oil	0	2001	1,215,000	5	4.12	2.32 \pm 1.06	
		2002	1,290,000	3	2.33		
		2003	1,263,000	2	1.58		
		2004	2,553,000	4	1.57		
		2005	999,000	2	2.00		
<i>N</i> -phenylmaleimide	15.0	2201	1,194,000	2	1.68	1.72 \pm 1.08	
		2202	1,593,000	2	1.26		
		2203	2,520,000	3	1.19		
		2204	1,116,000	4	3.58		
		2205	3,372,000	3	0.89		
	30.0	2301	2,490,000	3	1.20	1.48 \pm 1.15	
		2302	3,222,000	2	0.62		
		2303	3,060,000	1	0.33		
		2304	1,908,000	4	2.10		
		2305	1,269,000	4	3.15		
	60.0	2401	2,739,000	1	0.37	0.80 \pm 0.44	
		2402	1,938,000	2	1.03		
		2403	2,511,000	2	0.80		
		2404	1,419,000	2	1.41		
		2405	2,427,000	1	0.41		
ENU	100	2501	1,938,000	30	15.48	9.75 \pm 4.32	* (A)
		2502	3,357,000	18	5.36		
		2503	1,071,000	11	10.27		
		2504	1,422,000	8	5.63		
		2505	1,581,000	19	12.02		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

(A): Aspin-Welch t test

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

Table 6. Induction of mutation (*gpt* assay) in bone marrow of transgenic mice treated with *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)	
Corn oil	0	2001	1,617,000	4	2.47	0.98 \pm 0.92	
		2002	2,619,000	1	0.38		
		2003	2,847,000	1	0.35		
		2004	2,385,000	1	0.42		
		2005	3,183,000	4	1.26		
<i>N</i> -phenylmaleimide	15.0	2201	3,447,000	2	0.58	0.75 \pm 0.30	
		2202	2,415,000	1	0.41		
		2203	2,985,000	2	0.67		
		2204	2,139,000	2	0.94		
		2205	2,595,000	3	1.16		
	30.0	2301	2,385,000	2	0.84	0.67 \pm 0.24	
		2302	3,117,000	2	0.64		
		2303	2,058,000	2	0.97		
		2304	2,682,000	1	0.37		
		2305	1,962,000	1	0.51		
60.0	2401	2,817,000	2	0.71	1.29 \pm 1.75		
	2402	2,046,000	9	4.40			
	2403	3,909,000	2	0.51			
	2404	2,544,000	1	0.39			
	2405	2,409,000	1	0.42			
ENU	100	2501	1,806,000	35	19.38	19.08 \pm 5.70	* (A)
		2502	2,916,000	77	26.41		
		2503	1,785,000	34	19.05		
		2504	2,589,000	27	10.43		
		2505	2,781,000	56	20.14		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

(A): Aspin-Welch t test

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

Table 7. Induction of mutation (*gpt* assay) in stomach of transgenic mice treated with *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)	
Corn oil	0	2001	1,347,000	4	2.97	1.75 \pm 0.88	
		2002	2,691,000	4	1.49		
		2003	2,190,000	2	0.91		
		2004	855,000	2	2.34		
		2005	1,941,000	2	1.03		
<i>N</i> -phenylmaleimide	15.0	2201	1,938,000	1	0.52	1.16 \pm 0.52	
		2202	3,003,000	2	0.67		
		2203	2,715,000	4	1.47		
		2204	1,833,000	3	1.64		
		2205	2,007,000	3	1.49		
	30.0	2301	2,010,000	3	1.49	1.12 \pm 0.48	
		2302	1,737,000	1	0.58		
		2303	1,557,000	2	1.28		
		2304	2,484,000	4	1.61		
		2305	1,545,000	1	0.65		
	60.0	2401	2,367,000	1	0.42	1.27 \pm 0.61	
		2402	2,811,000	3	1.07		
		2403	3,249,000	4	1.23		
		2404	972,000	2	2.06		
		2405	1,281,000	2	1.56		
ENU	100	2501	1,641,000	33	20.11	20.33 \pm 3.26	* (A)
		2502	1,539,000	40	25.99		
		2503	651,000	12	18.43		
		2504	1,722,000	31	18.00		
		2505	1,569,000	30	19.12		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

(A): Aspin-Welch t test

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

Table 8. Induction of mutation (*gpt* assay) in testis of transgenic mice treated with *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	2,436,000	1	0.41	0.60 \pm 0.20
		2002	2,721,000	1	0.37	
		2003	3,606,000	3	0.83	
		2004	4,095,000	3	0.73	
		2005	2,967,000	2	0.67	
<i>N</i> -phenylmaleimide	15.0	2201	4,854,000	3	0.62	0.53 \pm 0.25
		2202	3,771,000	1	0.27	
		2203	3,735,000	3	0.80	
		2204	2,901,000	2	0.69	
		2205	4,020,000	1	0.25	
	30.0	2301	2,868,000	2	0.70	0.44 \pm 0.22
		2302	3,369,000	1	0.30	
		2303	3,801,000	1	0.26	
		2304	3,447,000	1	0.29	
		2305	3,024,000	2	0.66	
	60.0	2401	3,423,000	0	0.00	0.46 \pm 0.36
		2402	3,063,000	3	0.98	
		2403	3,537,000	2	0.57	
		2404	2,703,000	1	0.37	
		2405	2,727,000	1	0.37	
ENU	100	2501	2,883,000	6	2.08	1.42 \pm 0.96
		2502	2,439,000	3	1.23	
		2503	1,857,000	5	2.69	
		2504	2,922,000	1	0.34	
		2505	2,664,000	2	0.75	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

Table 9. Induction of mutation (Spi⁻ assay) in liver of transgenic mice treated with *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)	
Corn oil	0	2001	519,000	3	5.78	4.16 \pm 2.56	
		2002	384,000	0	0.00		
		2003	513,000	2	3.90		
		2004	603,000	4	6.63		
		2005	447,000	2	4.47		
<i>N</i> -phenylmaleimide	15.0	2201	849,000	3	3.53	4.11 \pm 0.78	
		2202	495,000	2	4.04		
		2203	753,000	4	5.31		
		2204	300,000	1	3.33		
		2205	690,000	3	4.35		
	30.0	2301	648,000	2	3.09	2.74 \pm 0.81	
		2302	402,000	1	2.49		
		2303	753,000	2	2.66		
		2304	615,000	1	1.63		
		2305	522,000	2	3.83		
	60.0	2401	717,000	0	0.00	2.87 \pm 2.64	
		2402	684,000	1	1.46		
		2403	564,000	1	1.77		
		2404	435,000	2	4.60		
		2405	765,000	5	6.54		
PhIP#	400 ppm	4-1	3,981,000	65	16.33	13.76 \pm 2.57	*(S)
		4-2	2,835,000	39	13.76		
		4-3	4,110,000	46	11.19		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

PhIP: Positive control (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, dietary administration)

#: The samples stored for other experiment were used in this study.

(S): Student t test

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

Table 10. Induction of mutation(Spi⁻ assay) in bone marrow of transgenic mice treated with *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	483,000	3	6.21	2.86 \pm 2.51
		2002	3,624,000	3	0.83	
		2003	1,263,000	1	0.79	
		2004	1,245,000	2	1.61	
		2005	825,000	4	4.85	
<i>N</i> -phenylmaleimide	15.0	2201	2,316,000	1	0.43	1.13 \pm 0.68
		2202	1,038,000	2	1.93	
		2203	1,149,000	1	0.87	
		2204	1,572,000	1	0.64	
		2205	567,000	1	1.76	
	30.0	2301	489,000	2	4.09	2.14 \pm 1.37
		2302	651,000	2	3.07	
		2303	960,000	1	1.04	
		2304	3,996,000	5	1.25	
		2305	798,000	1	1.25	
60.0	2401	747,000	2	2.68	1.35 \pm 1.01	
	2402	390,000	0	0.00		
	2403	3,639,000	7	1.92		
	2404	951,000	1	1.05		
	2405	921,000	1	1.09		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Table 11. Induction of mutation(Spi⁻ assay) in stomach of transgenic mice treated with *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	1,101,000	0	0.00	1.20 \pm 1.14
		2002	930,000	2	2.15	
		2003	684,000	1	1.46	
		2004	321,000	0	0.00	
		2005	840,000	2	2.38	
<i>N</i> -phenylmaleimide	15.0	2201	651,000	1	1.54	1.31 \pm 0.76
		2202	708,000	0	0.00	
		2203	621,000	1	1.61	
		2204	702,000	1	1.42	
		2205	507,000	1	1.97	
	30.0	2301	1,053,000	2	1.90	2.28 \pm 1.28
		2302	732,000	1	1.37	
		2303	663,000	3	4.52	
		2304	1,989,000	4	2.01	
		2305	627,000	1	1.59	
60.0	2401	2,091,000	2	0.96	1.69 \pm 0.61	
	2402	2,574,000	3	1.17		
	2403	1,662,000	3	1.81		
	2404	468,000	1	2.14		
	2405	420,000	1	2.38		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Table 12. Induction of mutation(Spi⁻ assay) in testis of transgenic mice treated with *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	705,000	3	4.26	2.72 \pm 1.01
		2002	987,000	3	3.04	
		2003	984,000	2	2.03	
		2004	1,140,000	3	2.63	
		2005	1,206,000	2	1.66	
<i>N</i> -phenylmaleimide	15.0	2201	2,883,000	3	1.04	1.47 \pm 0.70
		2202	1,611,000	1	0.62	
		2203	897,000	2	2.23	
		2204	1,512,000	2	1.32	
		2205	936,000	2	2.14	
	30.0	2301	957,000	3	3.13	1.45 \pm 0.99
		2302	1,176,000	1	0.85	
		2303	843,000	1	1.19	
		2304	1,359,000	2	1.47	
		2305	1,647,000	1	0.61	
60.0	2401	3,351,000	6	1.79	1.59 \pm 0.44	
	2402	708,000	1	1.41		
	2403	1,782,000	4	2.24		
	2404	687,000	1	1.46		
	2405	936,000	1	1.07		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Appendix 1. Body weight in dose-finding study of *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)			
			Day -7 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8 (Sacrificed)	Gain (g)
<i>N</i> -phenylmaleimide	1.25	1101	23.0	25.4	24.7	-0.7
		1102	22.2	24.3	24.0	-0.3
		1103	24.0	25.1	25.5	0.4
		Mean±S.D.	23.1±0.9	24.9±0.6	24.7±0.8	-0.2±0.6
	5.00	1201	22.0	24.1	23.6	-0.5
		1202	23.2	25.6	24.9	-0.7
		1203	22.3	24.9	24.5	-0.4
		Mean±S.D.	22.5±0.6	24.9±0.8	24.3±0.7	-0.5±0.2
	20.0	1301	20.9	23.0	22.7	-0.3
		1302	21.9	25.3	24.9	-0.4
		1303	23.2	25.8	25.4	-0.4
		Mean±S.D.	22.0±1.2	24.7±1.5	24.3±1.4	-0.4±0.1
80.0	1401	23.7	25.9	25.3	-0.6	
	1402	23.1	25.2	24.8	-0.4	
	1403	21.1	23.6	24.1	0.5	
	Mean±S.D.	22.6±1.4	24.9±1.2	24.7±0.6	-0.2±0.6	

Gain= Day 8 (Sacrificed) - Day 1 (Allocated)

Appendix 2. Clinical observations in dose-finding study of *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>N</i> -phenylmaleimide	1.25	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	5.00	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	20.0	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	80.0	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Normal

Appendix 3. Body weight in dose-finding study of *N*-phenylmaleimide (Additional study)
 [Male mice dosed once a day, for 1 or 2 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)					Gain (g)
			Day -7 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 1 (Dead)	Day 2 (Dead)	Day 3 (Dead)	
<i>N</i> -phenylmaleimide	130	1501	24.2	26.0			24.7	-1.3
		1502	23.7	25.6			23.6	-2.0
		1503	22.5	24.0			21.8	-2.2
		Mean±S.D.	23.5±0.9	25.2±1.1			23.4±1.5	-1.8±0.5
	216	1601	23.6	26.1		24.9		-1.2
		1602	22.4	24.4		23.7		-0.7
		1603	20.9	23.7		22.4		-1.3
		Mean±S.D.	22.3±1.4	24.7±1.2		23.7±1.3		-1.1±0.3
	360	1701	22.3	25.6		24.8		-0.8
		1702	22.8	25.6	24.8			-0.8
		1703	21.4	23.9		22.5		-1.4
		Mean±S.D.	22.2±0.7	25.0±1.0				-1.0±0.3
600	1801	21.4	24.2	23.7			-0.5	
	1802	21.5	23.9	23.1			-0.8	
	1803	23.7	25.9	25.3			-0.6	
	Mean±S.D.	22.2±1.3	24.7±1.1	24.0±1.1			-0.6±0.2	

Gain= Day 1 to 3(Dead)-Day 1(Allocated)

Appendix 4. Clinical observations in dose-finding study of *N*-phenylmaleimide (Additional study)
 [Male mice dosed once a day, for 1 or 2 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment				
			1		2		3
			1st*	2nd**	1st#	2nd##	
<i>N</i> -phenylmaleimide	130	1501	N		N	N	Dead
		1502	N		N	N	Dead
		1503	N		N	DL	Dead
	216	1601	N		Dead		
		1602	N		Dead		
		1603	N		Dead		
	360	1701	P		Dead		
		1702	DL, I	Dead			
		1703	P		Dead		
	600	1801	DL, I	Dead			
		1802	DL, I	Dead			
		1803	DL, I	Dead			

N: Normal DL: Decrease in locomotor activity I: Irregular respiration P: Ptosis (binocular)

*: About 1 hour after the administration

**: About 2 hours after the administration

#: Just before the administration

##: About 1 hour after the administration

Appendix 5. Body weight in the gene mutation assay of *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg,p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)							Gain
			Day -7 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)	
Corn oil	0	2001	27.3	28.0	27.4	28.0	27.7	28.8	29.1	1.1
		2002	25.5	25.3	24.7	25.2	25.7	24.9	26.4	1.1
		2003	26.8	27.3	27.0	27.4	27.2	26.6	27.9	0.6
		2004	25.1	25.7	25.2	25.6	25.6	26.1	26.4	0.7
		2005	26.4	26.0	25.1	25.2	25.4	26.3	26.7	0.7
		2006	27.2	26.8	26.9	27.8	27.9	28.0	28.3	1.5
		Mean±S.D.	26.4±0.9	26.5±1.0	26.1±1.2	26.5±1.3	26.6±1.1	26.8±1.4	27.5±1.1	1.0±0.3
<i>N</i> -phenylmaleimide	7.50	2101	25.1	25.4	25.1	25.2	24.8	25.4	25.6	0.2
		2102	25.5	26.5	25.3	26.4	27.3	27.6	28.0	1.5
		2103	26.0	26.0	24.7	25.5	25.8	26.8	27.1	1.1
		2104	25.9	26.3	25.6	25.7	25.5	26.3	26.2	-0.1
		2105	28.1	28.0	27.7	28.4	27.6	28.0	28.9	0.9
		2106	26.5	27.6	27.1	27.4	27.2	28.2	28.2	0.6
	Mean±S.D.	26.2±1.1	26.6±1.0	25.9±1.2	26.4±1.2	26.4±1.2	27.1±1.1	27.3±1.3	0.7±0.6	
	15.0	2201	26.4	27.5	26.3	26.9	27.6	27.9	28.1	0.6
		2202	25.0	26.3	25.2	27.1	26.7	28.1	28.2	1.9
		2203	25.0	25.5	24.7	25.2	26.0	26.6	26.8	1.3
		2204	26.3	28.6	26.4	27.4	27.1	27.8	28.6	0.0
		2205	25.3	25.7	25.4	26.7	27.2	27.3	27.2	1.5
		2206	26.1	26.5	25.4	26.5	27.1	27.5	27.2	0.7
	Mean±S.D.	25.7±0.7	26.7±1.2	25.6±0.7	26.6±0.8	27.0±0.5	27.5±0.5	27.7±0.7	1.0±0.7	
	30.0	2301	26.0	26.3	25.0	26.0	26.5	26.9	27.7	1.4
		2302	25.5	25.9	26.3	26.5	26.6	26.7	26.6	0.7
		2303	26.4	27.2	27.0	28.6	29.4	28.8	28.8	1.6
		2304	25.9	26.4	24.9	25.7	26.4	26.0	25.9	-0.5
2305		26.5	29.2	28.4	28.2	28.1	28.5	29.0	-0.2	
2306		25.3	25.6	26.1	26.6	27.0	26.4	27.2	1.6	
Mean±S.D.	25.9±0.5	26.8±1.3	26.3±1.3	26.9±1.2	27.3±1.2	27.2±1.2	27.5±1.2	0.8±0.9		
60.0	2401	24.7	25.4	24.1	24.7	25.5	25.8	25.6	0.2	
	2402	25.8	26.5	26.7	25.8	26.7	26.6	26.4	-0.1	
	2403	26.4	26.2	26.5	26.4	26.5	26.5	26.7	0.5	
	2404	25.7	27.5	28.4	29.2	29.1	29.4	29.2	1.7	
	2405	25.1	25.9	24.4	25.8	26.4	25.8	25.9	0.0	
	2406	27.3	28.1	26.2	27.3	28.3	28.8	28.4	0.3	
Mean±S.D.	25.8±0.9	26.6±1.0	26.1±1.6	26.5±1.6	27.1±1.3	27.2±1.6	27.0±1.4	0.4±0.7		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Gain= Day 31(Sacrificed)-Day 1(Allocated)

Appendix 5. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Body weight (g)			Gain
			Day -7 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 13 (Sacrificed)	
ENU	100	2501	25.8	25.5	26.0	0.5
		2502	25.7	26.9	25.6	-1.3
		2503	27.2	27.6	27.8	0.2
		2504	25.7	26.0	24.8	-1.2
		2505	25.3	25.8	24.6	-1.2
		2506	28.0	28.4	27.3	-1.1
		Mean±S.D.	26.3±1.1	26.7±1.1	26.0±1.3	-0.7±0.8

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

Gain= Day 13 (Sacrificed)-Day 1 (Allocated)

Appendix 6. Clinical observations in the gene mutation assay of *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			1	2	3	4	5	6	7
Corn oil	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
<i>N</i> -phenylmaleimide	7.50	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	15.0	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	30.0	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2304	N	N	N	N	N	N	N
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N
60.0	2401	N	N	N	N	N	N	N	
	2402	N	N	N	N	N	N	N	
	2403	N	N	N	N	N	N	N	
	2404	N	N	N	N	N	N	N	
	2405	N	N	N	N	N	N	N	
	2406	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment							
			1	2	3	4	5	6	7	
ENU	100	2501	N	N	N	N	N	N	N	N
		2502	N	N	N	N	N	N	N	N
		2503	N	N	N	N	N	N	N	N
		2504	N	N	N	N	N	N	N	N
		2505	N	N	N	N	N	N	N	N
		2506	N	N	N	N	N	N	N	N

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

N: Normal

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			8	9	10	11	12	13	14
Corn oil	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
<i>N</i> -phenylmaleimide	7.50	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	15.0	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	30.0	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2304	N	N	N	N	N	N	N
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N
60.0	2401	N	N	N	N	N	N	N	
	2402	N	N	N	N	N	N	N	
	2403	N	N	N	N	N	N	N	
	2404	N	N	N	N	N	N	N	
	2405	N	N	N	N	N	N	N	
	2406	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment					
			8	9	10	11	12	13
ENU	100	2501	N	N	N	N	N	N
		2502	N	N	N	N	N	N
		2503	N	N	N	N	N	N
		2504	N	N	N	N	N	N
		2505	N	N	N	N	N	N
		2506	N	N	N	N	N	N

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

N: Normal

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			15	16	17	18	19	20	21
Corn oil	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
N-phenylmaleimide	7.50	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	15.0	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	30.0	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2304	N	N	N	N	N	N	N
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N
60.0	2401	N	N	N	N	N	N	N	
	2402	N	N	N	N	N	N	N	
	2403	N	N	N	N	N	N	N	
	2404	N	N	N	N	N	N	N	
	2405	N	N	N	N	N	N	N	
	2406	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			22	23	24	25	26	27	28
Corn oil	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
<i>N</i> -phenylmaleimide	7.50	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	15.0	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	30.0	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2304	N	N	N	N	N	N	N
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N
60.0	2401	N	N	N	N	N	N	N	
	2402	N	N	N	N	N	N	N	
	2403	N	N	N	N	N	N	N	
	2404	N	N	N	N	N	N	N	
	2405	N	N	N	N	N	N	N	
	2406	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment		
			29	30	31
Corn oil	0	2001	N	N	N
		2002	N	N	N
		2003	N	N	N
		2004	N	N	N
		2005	N	N	N
		2006	N	N	N
<i>N</i> -phenylmaleimide	7.50	2101	N	N	N
		2102	N	N	N
		2103	N	N	N
		2104	N	N	N
		2105	N	N	N
		2106	N	N	N
	15.0	2201	N	N	N
		2202	N	N	N
		2203	N	N	N
		2204	N	N	N
		2205	N	N	N
		2206	N	N	N
	30.0	2301	N	N	N
		2302	N	N	N
		2303	N	N	N
		2304	N	N	N
		2305	N	N	N
		2306	N	N	N
60.0	2401	N	N	N	
	2402	N	N	N	
	2403	N	N	N	
	2404	N	N	N	
	2405	N	N	N	
	2406	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal

Appendix 7. Organ weight in the gene mutation assay of *N*-phenylmaleimide
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Organ weight (g) and organ weight per body weight (%)

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)	Liver		Testis	
				(g)	(%)	(g)	(%)
Corn oil	0	2001	29.1	1.10	3.78	0.22	0.76
		2002	26.4	1.41	5.34	0.20	0.76
		2003	27.9	1.39	4.98	0.23	0.82
		2004	26.4	1.28	4.85	0.19	0.72
		2005	26.7	1.03	3.86	0.18	0.67
		2006	28.3	1.44	5.09	0.23	0.81
		Mean±S.D.	27.5±1.1	1.28±0.17	4.65±0.66	0.21±0.02	0.76±0.06
<i>N</i> -phenylmaleimide	7.50	2101	25.6	1.29	5.04	0.20	0.78
		2102	28.0	1.46	5.21	0.22	0.79
		2103	27.1	1.35	4.98	0.19	0.70
		2104	26.2	1.28	4.89	0.20	0.76
		2105	28.9	1.40	4.84	0.19	0.66
		2106	28.2	1.34	4.75	0.22	0.78
		Mean±S.D.	27.3±1.3	1.35±0.07	4.95±0.16	0.20±0.01	0.75±0.05
	15.0	2201	28.1	1.46	5.20	0.20	0.71
		2202	28.2	1.42	5.04	0.23	0.82
		2203	26.8	1.39	5.19	0.21	0.78
		2204	28.6	1.40	4.90	0.23	0.80
		2205	27.2	1.35	4.96	0.20	0.74
		2206	27.2	1.38	5.07	0.21	0.77
Mean±S.D.	27.7±0.7	1.40±0.04	5.06±0.12	0.21±0.01	0.77±0.04		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Appendix 7. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)	Organ weight(g) and organ weight per body weight(%)			
				Liver		Testis	
				(g)	(%)	(g)	(%)
N-phenylmaleimide	30.0	2301	27.7	1.36	4.91	0.22	0.79
		2302	26.6	1.32	4.96	0.20	0.75
		2303	28.8	1.18	4.10	0.22	0.76
		2304	25.9	1.29	4.98	0.21	0.81
		2305	29.0	1.34	4.62	0.21	0.72
		2306	27.2	1.35	4.96	0.21	0.77
		Mean±S.D.	27.5±1.2	1.31±0.07	4.76±0.35	0.21±0.01	0.77±0.03
	60.0	2401	25.6	1.28	5.00	0.22	0.86
		2402	26.4	1.35	5.11	0.20	0.76
		2403	26.7	1.22	4.57	0.21	0.79
		2404	29.2	1.47	5.03	0.22	0.75
		2405	25.9	1.19	4.59	0.21	0.81
		2406	28.4	1.33	4.68	0.21	0.74
	Mean±S.D.	27.0±1.4	1.31±0.1	4.83±0.24	0.21±0.01	0.79±0.05	
ENU	100	2501	26.0	1.39	5.35	0.16	0.62
		2502	25.6	1.23	4.80	0.17	0.66
		2503	27.8	1.52	5.47	0.16	0.58
		2504	24.8	1.31	5.28	0.15	0.60
		2505	24.6	1.20	4.88	0.16	0.65
		2506	27.3	1.34	4.91	0.16	0.59
	Mean±S.D.	26.0±1.3	1.33±0.12	5.12±0.28	0.16±0.01	0.62±0.03	

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

Appendix 8. Individual gross findings on *N*-phenylmaleimide-treated transgenic mice for the gene mutation assay
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
Corn oil	0	2001	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2002	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2003	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2004	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2005	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2006	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

-: No remarkable change

Appendix 8. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
N-phenylmaleimide	7.50	2101	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2102	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2103	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2104	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2105	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2106	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

Appendix 8. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
N-phenylmaleimide	15.0	2201	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2202	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2203	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2204	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2205	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2206	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

Appendix 8. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
N-phenylmaleimide	30.0	2301	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2302	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2303	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2304	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2305	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2306	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

Appendix 8. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
N-phenylmaleimide	60.0	2401	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	Thick, forestomach
		2402	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2403	Stomach	Thick, forestomach
			Testis	-
			Liver	-
		2404	Bone marrow	-
			Stomach	Thick, forestomach
			Testis	-
2405	Liver	-		
	Bone marrow	-		
	Stomach	Thick, forestomach		
2406	Testis	-		
	Liver	-		
	Bone marrow	-		
			Stomach	Thick, forestomach
			Testis	-

∴ No remarkable change

Appendix 8. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Organs	Findings
ENU	100	2501	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2502	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2503	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2504	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
2505	Liver	-		
	Bone marrow	-		
	Stomach	-		
2506	Testis	-		
	Liver	-		
	Bone marrow	-		
			Stomach	-
			Testis	-

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

-: No remarkable change

信 頼 性 保 証 書

表 題： トランスジェニックマウスを用いる *N*-phenylmaleimide の遺伝子突然変異試験

試験番号： D850 (115-225)

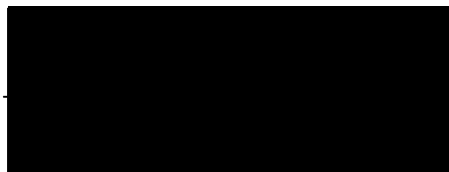
本試験は、新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について（平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 8 号，平成 23・03・29 製局第 6 号，環企発第 110331010 号）に従って実施され，本最終報告書に記載された成績は，試験の生データを正確に反映していることを保証する。

なお，本試験の信頼性保証部門による調査記録を次頁に示す。

平成 25 年 3 月 28 日

所属： 公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
信頼性保証部門責任者

氏名：



調査記録

調査項目	調査実施日	試験責任者および 運営管理者への報告日	調査 担当者
試験計画書	平成 24 年 2 月 27 日	平成 24 年 2 月 27 日	
試験計画書の変更書 (#1)	平成 24 年 3 月 6 日	平成 24 年 3 月 6 日	
試験計画書の変更書 (#2)	平成 24 年 3 月 23 日	平成 24 年 3 月 23 日	
試験計画書の変更書 (#3)	平成 24 年 4 月 16 日	平成 24 年 4 月 16 日	
試験計画書の変更書 (#4)	平成 24 年 4 月 27 日	平成 24 年 4 月 27 日	
動物搬入	平成 24 年 5 月 2 日	平成 24 年 5 月 7 日	
コンピュータプロトコール	平成 24 年 5 月 7 日	平成 24 年 5 月 7 日	
被験物質液の調製, 群分け および投与開始	平成 24 年 5 月 9 日	平成 24 年 5 月 9 日	
標的器官摘出	平成 24 年 6 月 8 日	平成 24 年 6 月 8 日	
ゲノム DNA の抽出	平成 24 年 7 月 17 日	平成 24 年 7 月 17 日	
ゲノム DNA のパッケージ ングおよびプレーティング	平成 24 年 8 月 28 日	平成 24 年 8 月 28 日	
プラークの計数	平成 24 年 8 月 29 日	平成 24 年 8 月 29 日	
生データおよび最終報告書 草案	平成 24 年 12 月 7, 10, 11 日	平成 24 年 12 月 11 日	
試験計画書の変更書 (#5)	平成 24 年 12 月 28 日	平成 24 年 12 月 28 日	
生データおよび最終報告書	平成 25 年 3 月 28 日	平成 25 年 3 月 28 日	