

M-1456

最終報告書

試験名：p-ジブロモベンゼンのマウスを用いた小核試験

試験番号：M-1456

試験期間：2010年12月8日-2011年3月28日

試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

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 1-2-2

試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

2. 目次

2. 目次3

4. 要約 8

5. 緒言 9

6. 試験材料及び方法 10

6.1 被験物質、媒体及び陽性対照物質 10

6.1.1 被験物質 10

6.1.2 媒体 11

6.1.3 陽性対照物質 11

6.2 媒体、投与液及び陽性対照物質の調製 11

6.2.1 媒体の調製 11

6.2.1.1 調製方法 11

6.2.1.2 保存方法 11

6.2.2 投与液の調製 11

6.2.2.1 調製方法 11

6.2.2.2 保存方法 12

6.2.2.3 安定性 12

6.2.2.4 被験液の濃度確認 12

6.2.3 陽性対照物質の調製 13

6.3 試験動物種及び系統の選択理由 14

6.4 試験動物 14

6.5 飼育条件 14

6.6 飼料、飲料水及び床敷中の混入物質 14

6.7 動物の識別及びケージへの表示 14

6.8	群分け	15
6.9	投与経路、投与方法及びそれらの選択理由	15
6.10	投与量及びその設定根拠並びに群構成	15
6.10.1	予備試験	15
6.10.2	本試験	16
6.11	観察及び検査の方法	16
6.11.1	一般状態の観察	16
6.11.2	体重測定	17
6.11.3	骨髄塗抹標本の作製	17
6.11.4	骨髄塗抹標本の観察	17
6.11.5	観察結果の判定	17
7.	試験結果	19
7.1	予備試験	19
7.1.1	一般状態	19
7.1.2	体重	19
7.2	本試験	19
7.2.1	一般状態	19
7.2.2	体重	19
7.2.3	骨髄塗抹標本の観察結果	19
8.	考察	21
9.	参考文献	22

M-1456

表

Table 1

Clinical signs

Table 2

Body weight

Table 3

Observation of bone marrow smears

(About 24 hours after the 2nd administration)

4. 要約

p-ジブロモベンゼンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、CrIj:CD1(ICR)SPFマウスを用いた小核試験を実施した。

p-ジブロモベンゼンの250、500及び1000mg/kg/日を約24時間間隔で2回経口投与し、2回目投与後約24時間に骨髓塗抹標本作製した。また、陰性対照としてゴマ油を被験物質投与群と同じ頻度で投与し、陽性対照としてマイトマイシンCの1mg/kgを1回投与する群を設定した。

その結果、各被験物質投与群の小核を有する幼若赤血球の出現頻度は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示さず、用量依存的な変化も認められなかった。

また、各被験物質投与群における全赤血球200個中に占める幼若赤血球の出現頻度は、陰性対照群と比較して、250mg/kg/日投与群で統計学的に有意な減少を示し、さらに500及び1000mg/kg/日投与群においても減少傾向を示したことから、本被験物質が骨髓細胞の増殖抑制作用を有すると判断された。

なお、陰性対照群と陽性対照群の小核を有する幼若赤血球の出現頻度は、当研究所における各々の背景データの平均値 \pm 3S.D.の範囲内であったことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、*p*-ジブロモベンゼンは本試験条件下でCrIj:CD1(ICR)SPFマウスの骨髓において、染色体異常誘発能は無いと判定した。

M-1456

5. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室からの委託により、*p*-ジブ
ロモベンゼンの安全性評価の一環として、マウスを用いた小核試験を実施したので、
その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準じて行
った。

M-1456

6. 試験材料及び方法

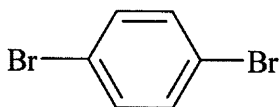
6.1 被験物質、媒体及び陽性対照物質

6.1.1 被験物質

被験物質である *p*-ジブロモベンゼンは
に使用した被験物質のロット番号、性状等は次の通りである。

入手した。当試験

名称	:	<i>p</i> -ジブロモベンゼン
英名	:	<i>p</i> -Dibromobenzene
別名	:	1,4-ジブロモベンゼン
CAS 番号	:	106-37-6
官報公示整理番号	:	(3)-52
構造式及び示性式	:	



		$C_6H_4Br_2$
分子量	:	235.90
常温における性状	:	白色~わずかにうすい黄色結晶
臭い	:	キシレン臭
沸点	:	219°C
蒸気圧	:	7.7Pa/25°C
蒸気密度 (空気=1.0)	:	8.1
溶解性	:	易溶; エーテル、アセトン 可溶; メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、 クロロホルム、二硫化炭素 不溶; 水 (20 mg/L 25°C)
オクタノール/水分配係数	:	3.79
純度 (GC)	:	99.5%
不純物	:	不明
融点	:	88.8°C
入手量	:	50g
保存方法	:	密栓、冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内(許容値:1~10°C、 実測値:3~6°C)に保存した〕
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室、第1研究棟被験物質

- 調製室及び生化学部標準物質保存場所
- 安定性 : 動物試験終了後、試験受託者で被験物質の安定性を確認し、動物試験期間中、安定であることが確認された（添付資料1）。
- 使用後の処理 : 動物試験終了後の残量はすべて廃棄した。

6.1.2 媒体

- 名称 : ゴマ油
- 規格 : 和光一級
- メーカー : 和光純薬工業株式会社
- ロット番号 : KWE1533
- 保存方法 : 室温
- 保存場所 : 御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室
- 選択理由 : 被験物質はゴマ油に溶解することから選択した。

6.1.3 陽性対照物質

- 名称 : マイトマイシンC（以下MMCと記す。）
- メーカー : 協和発酵キリン株式会社
- ロット番号 : 547AIJ
- 力価 : 2mg/vial
- 保存方法 : 室温、遮光
- 保存場所 : 御殿場研究所 第1研究棟発癌性物質室温保存庫
- 選択理由 : MMCは小核試験に広く用いられ、背景データが豊富であり「毒性試験ガイドライン」に従って選択した。

6.2 媒体、投与液及び陽性対照物質の調製

6.2.1 媒体の調製

6.2.1.1 調製方法

ゴマ油をそのまま用いた。

6.2.1.2 保存方法

本試験において被験物質を秤取する前に、1日必要量分ずつを褐色ガラス瓶に分注し、冷所（冷蔵庫内、許容値：1~10°C、実測値：4~5°C）に保存した。

6.2.2 投与液の調製

6.2.2.1 調製方法

各濃度ごとに被験物質を秤取し、ゴマ油を加えて溶解し、所定量にメスアップした。また、予備試験における100及び200mg/kg濃度液、本試験における100mg/kg濃度液

については溶解し難かったため、メスアップ前に超音波照射を行った。

6.2.2.2 保存方法

1日必要量分ずつを褐色ガラス瓶に分注し、冷所〔冷蔵庫内、許容値：1~10°C、実測値：4~5°C（予備試験）、4~5°C（本試験）〕に保存し、調製後最大7日以内に使用した。また、予備試験における200mg/kg濃度液については、投与前に投与液中に被験物質の析出が認められたため超音波照射を行った。

6.2.2.3 安定性

ゴマ油を媒体とする本被験物質の0.8~100mg/mL濃度液は冷所遮光下（4°C）で少なくとも7日間は安定である*。また、本被験物質の0.8~200mg/mL濃度液（媒体：ゴマ油）について、褐色ガラス瓶に入れ冷所（冷蔵庫内、許容値：1~10°C）で7日間、その後室温で24時間安定であることが株式会社ボゾリサーチセンターで確認されている（株式会社ボゾリサーチセンター 試験番号：A-2349、添付資料2）。

*：伊藤義彦ら：1,4-ジブロモベンゼンのラットを用いた経口投与による28日間反復投与毒性試験, 化学物質毒性試験報告, vol.2 pp.353-370 (1994)。

6.2.2.4 被験液の濃度確認

本試験の投与に使用した各濃度の被験液より各10mL採取し、濃度を確認した結果、各濃度の表示値に対する濃度の割合は104.2~105.0%で表示値を100として±10%以内であり問題はなかった（添付資料3）。分析方法の概略は次の通りである。

分析方法の概略

1) 測定実測試料の調製

各測定試料を以下の表に従ってn=1で採取し、溶媒を加えて希釈をして測定実測試料を用時調製した。

測定試料 (mg/mL)	1次希釈		2次希釈		希釈率
	採取量 (mL)	定容量 (mL)	採取量 (mL)	定容量 (mL)	
25	1	50	1	10	500
50	1	100	1	10	1000
100	0.5	100	1	10	2000

溶媒：エタノール

2) HPLC 測定条件

カラム : L-column (5 μ m, 4.6mm i.d. × 150mm, 一般財団法人化学物質評価研究機構)

カラム恒温槽設定温度

: 40°C

HPLC 移動相 : アセトニトリル/精製水 (7/3、v/v)

流速 : 1.0 mL/min

検出 : UV (測定波長 254nm)

試料注入量 : 20μL

オートサンプラー設定温度

: 10°C

注入順序 :

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液
2	各 1	測定実測試料

標準溶液及び測定実測試料の測定は、注入後 24 時間以内を実施した。なお、バリデーション試験で、オートサンプラー内における 24 時間保存後の安定性が確認されている。

3) システム適合性

測定開始時に標準溶液を 3 回連続注入し、*p*-ジブロモベンゼンの保持時間及びピーク面積の再現性を確認した。

判定基準 : 保持時間及びピーク面積の相対標準偏差が 5%以下。

4) 測定試料中 *p*-ジブロモベンゼン濃度の算出

システム適合性で 3 回注入された標準溶液の *p*-ジブロモベンゼンのピーク面積の平均値 (Qs) を求めた。別に測定実測試料を 1 回注入して *p*-ジブロモベンゼンのピーク面積 (Qt) を求め、以下の式により被験液中の *p*-ジブロモベンゼン濃度を求めた。

$$\text{被験液中 } p\text{-ジブロモベンゼン濃度 (mg/mL)} = \frac{Q_t}{Q_s} \times A \times F \times \frac{1}{1000}$$

Qt : 測定実測試料の *p*-ジブロモベンゼンのピーク面積

Qs : 標準溶液の *p*-ジブロモベンゼンの平均ピーク面積

A : 標準溶液中の *p*-ジブロモベンゼン濃度 (μg/mL)

F : 希釈率

6.2.3 陽性対照物質の調製

用時に、MMC の 0.1mg/mL 水溶液を調製した。すなわち、MMC (2mg/vial) 1 瓶を注射用水^{注1} 5mL で溶解した後、2mL を採取して、生理食塩液^{注2} を 6mL 加えて 8mL とした。

注 1 : 日本薬局方〔(株)大塚製薬工場、ロット番号: 0A97〕

注 2 : 日本薬局方〔(株)大塚製薬工場、ロット番号: 0G95〕

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

マウスは小核試験に広く用いられており、この試験に使用される系統のマウスは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物

ICR系SPFマウス〔CrIj:CD1(ICR)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター〕を7週齢で、予備試験用として雌雄各18匹^{注3}、本試験用として雄30匹^{注4}を購入し、予備試験、本試験とも入荷日を1日と数え、8日間検疫・馴化飼育した。検疫・馴化飼育期間中には体重測定（入荷日、検疫終了日及び群分け日）及び体外表、栄養状態、行動などの一般状態を1日1回観察し、その結果をもとに異常のない動物（予備試験：雌雄各15匹、本試験：雄25匹）を選択し、8週齢で試験に供した。使用した動物の投与日における体重範囲は、予備試験が雄31.6~37.2g、雌24.8~29.7g、本試験が雄30.9~35.6gであった。試験から投与日に除外された動物数は、予備試験が雌雄各3匹、本試験が雄5匹であった。

注3：試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各17匹であったが、実際には雌雄各18匹が納入された。

注4：試験計画書に従い、注文匹数は雄29匹であったが、実際には雄30匹が納入された。

6.5 飼育条件

動物は温度（許容範囲 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ ）が予備試験 $21\sim 23^{\circ}\text{C}$ 、本試験 $21\sim 23^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度（許容範囲 $50\pm 20\%$ ）が予備試験 $49\sim 57\%$ 、本試験 $46\sim 60\%$ 、換気回数1時間当たり $10\sim 15$ 回、照明1日12時間（07:00~19:00）の飼育室（飼育室番号：予備試験504号室、本試験101号室）で床敷（ホワイトフレック：日本チャールス・リバー株式会社）を入れたプラスチックケージ（W155×D245×H150mm：日本クレア株式会社）に1匹ずつ収容し、固形飼料CRF-1〔オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：100706（予備試験）、100907（本試験）〕及び飲料水（御殿場市営水道水：給水瓶使用）を自由に摂取させ飼育した。

6.6 飼料、飲料水及び床敷中の混入物質

飼料、飲料水及び床敷中の混入物質については、飼料は使用したロットごとに分析したデータを、床敷は試験期間を保証するデータをEurofins Scientific Analyticsからそれぞれ入手し、飲料水については、水道法に準拠した水質の分析を芝浦セムテック株式会社に定期的（年4回）に依頼し、試験期間を保証するデータを入手し、それぞれ異常のないことを確認して、その写しを保存した。

6.7 動物の識別及びケージへの表示

小動物用耳標 ： 予備試験では553~588、本試験では831~860の番号が刻印された耳標を入荷時に装着した。

動物番号 : 予備試験では、100の位は群、10の位は性（雄は0番、雌は1番）、1の位は個体番号とした。本試験では、投与量ごと（陰性対照群、低、中、高用量群及び陽性対照群の順）に4桁の番号をつけた。1000の位は群、100の位は性（雄は0番）、10と1の位は個体番号とした。予備試験、本試験とも個体番号は1から始まる番号をつけた。各飼育ケージに用量（群）ごとに色分けしたケージラベルを付け、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号及び耳標番号を表示した。更に予備試験では動物試験終了日、本試験では骨髄採取日を明記した。

6.8 群分け

動物は、検疫・馴化期間中に、体重及び一般状態に異常がみられなかった個体を使用した。群分け当日（1回目投与日）の体重を基に、各群の平均体重ができるだけ均等になるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ（ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割り当てた）により行い、動物配置図を作成した。また、群分け後の余剰動物は1回目の投与日に試験から除外し、予備試験及び本試験とも炭酸ガス吸引により安楽死させた。

6.9 投与経路、投与方法及びそれらの選択理由

投与経路は、毒性試験に一般的に用いられる経口投与とした。投与容量は10mL/kg体重とし、マウスにフレキシブル胃ゾンデを用いて、約24時間間隔で2回投与した。

個体ごとの投与液量は投与日の体重を基準に算出した。また、陰性対照群にはゴマ油を同様に投与した。陽性対照群にはマウス骨髄細胞に小核の誘発が報告されているMMCを25Gの注射針を用いて腹腔内に1回投与した。投与容量は10mL/kg体重とした。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

6.10.1 予備試験

予備試験の投与量は125、250、500、1000及び2000mg/kg/日の5用量を設定し、5群構成とした。また、2回目投与後の約24時間後の生存動物についてはイソフルラン麻酔下で開腹し、腹大動静脈を切断し安楽死させた。群構成表を表1.に示す。

表 1. 予備試験群構成表

群	投与量 (mg/kg/日)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与回数	性	動物数	動物番号
最低用量	125	12.5	10	2	雄 雌	3 3	101~103 111~113
低用量	250	25	10	2	雄 雌	3 3	201~203 211~213
中用量	500	50	10	2	雄 雌	3 3	301~303 311~313
高用量	1000	100	10	2	雄 雌	3 3	401~403 411~413
最高用量	2000	200	10	2	雄 雌	3 3	501~503 511~513

6.10.2 本試験

予備試験において、雌雄マウスに 125、250、500、1000 及び 2000mg/kg/日を約 24 時間間隔で 2 回経口投与した結果、2 回目投与翌日までに、2000mg/kg/日投与群の雌雄各 1 例の死亡が確認された。一般状態では、2000mg/kg/日投与群の雌雄で腹臥・横臥がみられた。体重では、2000mg/kg/日投与群で減少傾向を示す動物がみられた。

したがって、本試験における投与量は、死亡例がみられず最大耐量と思われる 1000mg/kg/日を高用量とし、以下公比 2 で除して、500 及び 250mg/kg/日の 3 用量を設定した。これに媒体を投与する陰性対照群及び MMC を投与する陽性対照群を加え、計 5 群とした。1 群当りの動物数は 5 匹とした。

骨髄採取時期は、2 回目投与後約 24 時間とした。また、毒性発現に明らかな性差が見られなかったため、雄のみで実施することとした。

なお、MMC の投与量は小核の誘発が報告されている 1mg/kg とし、投与後約 24 時間に骨髄を採取した。群構成表を表 2. に示す。

表 2. 本試験群構成表

群	投与量 (mg/kg/日)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与回数	性	動物数	動物番号	骨髄採取時間 (投与後)
陰性対照	0	0	10	2	雄	5	1001~1005	約 24 時間 ^{a)}
低用量	250	25	10	2	雄	5	2001~2005	約 24 時間 ^{a)}
中用量	500	50	10	2	雄	5	3001~3005	約 24 時間 ^{a)}
高用量	1000	100	10	2	雄	5	4001~4005	約 24 時間 ^{a)}
陽性対照	1**	0.1**	10	1	雄	5	5001~5005	約 24 時間

** : MMC の投与量及び濃度を示す。a) : 2 回目の投与時間から起算

6.11 観察及び検査の方法

6.11.1 一般状態の観察

予備試験及び本試験とも、投与日は投与前、投与直後、投与後約 2 時間、また、そ

の他の日は1日1回、一般状態（体外表、栄養状態、行動及び排泄物など）の観察を実施した。

6.11.2 体重測定

予備試験では、1回目投与日から2回目投与翌日まで1日1回測定した(9:45~10:08)。本試験では、1回目投与日から2回目投与翌日まで（陽性対照群については投与前日にも測定）1日1回測定した（8:59~10:39）。

6.11.3 骨髓塗抹標本の作製

小核の観察のための標本を、Schmidの方法^{1,2)}に従って作製した。すなわち、投与後所定の時間に無作為に選び出したマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、両側の大腿骨を摘出し両端を切断した。その後1mL ディスポーザブル注射筒と23G注射針を用いて、約0.1~0.2mLの牛胎児血清（GIBCO BRL、ロット番号：672248）で骨髓細胞を遠心管に洗い出した。次に、この注射筒及び注射針を用いて骨髓細胞と牛胎児血清を混和して細胞をほぐし、1000rpmで5分間遠心分離（トミー工業株式会社、卓上多本架遠心機LC-220）し、上清を捨て、沈殿物をミキサーでよく混和し、スライドグラスに塗抹した（塗抹標本は1匹につき左右大腿骨から各1枚を作製）。塗抹した標本は風乾させ、メタノール（和光純薬工業株式会社、ロット番号：EPN5568）で3分間固定した後、再び風乾した。なお、標本の作製に際しては、動物番号と試料番号の対照表を作成し、標本には試験番号、ステージ、試料番号、試験の種類及び作製日を明記したラベルを付けた（盲検法）。

6.11.4 骨髓塗抹標本の観察

観察は盲検法で行うため試料番号をもとに、塗抹状態の良好なスライドグラス1枚を選択した。骨髓塗抹標本のアクリジンオレンジ蛍光染色及び観察は、Hayashiらの方法^{3,4)}に従った。予め40µg/mLアクリジンオレンジ水溶液を少量滴下したカバーグラスにスライドグラスを載せた。波長490nm付近の励起光、観察用フィルターとして515nm以上の波長を透過するものを備えた蛍光顕微鏡（システム生物顕微鏡BX40：オリンパス株式会社、ユニバーサル落射蛍光装置BX-FLA：オリンパス株式会社）を用いて、総合倍率600倍で観察した。

観察終了後の標本は廃棄した。また、観察に用いなかった標本は、全ての標本観察終了後廃棄した。

6.11.5 観察結果の判定

1個体について、全赤血球200個中の幼若赤血球（以下、PCEと記す）数及び正染色赤血球数と2000個のPCEに対する小核を有する幼若赤血球（以下、MNPCEと記す）数を計数し、それぞれの出現頻度（%）を求めた。

また、群ごとにMNPCE数とその出現頻度（%）、PCE数とその出現頻度（%）に

ついて平均値と標準偏差を算出し、各出現頻度 (%) については最大値と最小値も記録した。

小核の出現頻度に対する有意性の判定は、陰性対照群と陽性対照群の MNPCE の出現頻度 (%) が当研究所の背景データの平均値 $\pm 3S.D.$ 内であることを確認した後、陰性対照群と被験物質投与群とを比較し、2 項分布に基づく Kastenbaum&Bowman の検定⁵⁾ (有意水準：片側 5%) 並びに Cochran Armitage の傾向検定⁶⁾ (有意水準：両側 1 及び 5%) を行った。更に PCE の出現頻度については、陰性対照群と各被験物質投与群との間で Bartlett の検定⁷⁾ を行い等分散性 (有意水準：両側 1%) を調べ、分散が均一でなかったため Steel の検定⁸⁾ (有意水準：両側 1 及び 5%) を行った。

7. 試験結果

7.1 予備試験

p-ジブロモベンゼンの 125、250、500、1000 及び 2000mg/kg/日を投与した。

7.1.1 一般状態

結果を Appendix 1-1、1-2 に示した。

一般状態では、2000mg/kg/日投与群の雌雄で腹臥・横臥がみられた。また、2 回目投与翌日までに、2000mg/kg/日投与群の雌雄各 1 例の死亡が確認された。

7.1.2 体重

結果を Appendix 2-1、2-2 に示した。

体重では、2000mg/kg/日投与群で減少傾向を示す動物がみられた。

7.2 本試験

p-ジブロモベンゼンの 250、500 及び 1000mg/kg/日、陰性対照としてゴマ油、陽性対照として MMC の 1mg/kg を投与した。

7.2.1 一般状態

個体別の結果を Appendix 3 に、総括を Table 1 にそれぞれ示した。

各被験物質投与群において、一般状態の変化はみられなかった。陰性対照群及び陽性対照群にも一般状態に変化はみられなかった。

7.2.2 体重

個体別の結果を Appendix 4 に、総括を Table 2 にそれぞれ示した。

陰性対照群と比較して、1000mg/kg/日投与群で減少傾向を示す動物がみられた。陽性対照群については、体重推移に異常はみられなかった。

7.2.3 骨髓塗抹標本の観察結果

個体別の結果を Appendix 5 に、総括を Table 3 にそれぞれ示した。

被験物質投与群では MNPCE の出現頻度が 250mg/kg/日投与群で $0.09 \pm 0.05\%$ 、500mg/kg/日投与群で $0.18 \pm 0.08\%$ 、1000mg/kg/日投与群で $0.12 \pm 0.03\%$ を示した。これらの値を陰性対照群の $0.15 \pm 0.04\%$ と比較した結果、いずれの被験物質投与群も統計学的に有意な増加は示さず、用量依存的な変化も認められなかった。

また、各被験物質投与群の全赤血球 200 個中に占める PCE の出現頻度は、陰性対照群と比較して、250mg/kg/日投与群において統計学的に有意 ($p < 0.05$) な減少を示した。

なお、陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、陰性対照群と比べ顕著に増加した。さらに、陰性対照群及び陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、当研究所における各々の

M-1456

背景データの平均値 $\pm 3S.D.$ の範囲内であった。

8. 考察

p-ジブロモベンゼンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、Crlj:CD1(ICR)SPF マウスを用いた小核試験を実施した。

投与量を決定するための予備試験では、マウスに125、250、500、1000及び2000mg/kg/日を約24時間間隔で2回経口投与した結果、2回目投与翌日までに、2000mg/kg/日投与群の雌雄各1例の死亡が確認された。一般状態では、2000mg/kg/日投与群の雌雄で腹臥・横臥がみられた。体重では、2000mg/kg/日投与群で減少傾向を示す動物がみられた。

この結果をもとに、本試験では予備試験において死亡例のみられなかった1000mg/kg/日を高用量とし、以下公比2で除して500及び250mg/kg/日を約24時間間隔で2回経口投与し、2回目投与後約24時間に骨髄の採取を行った。また、陰性対照としてゴマ油を被験物質投与群と同じ頻度で投与し、陽性対照としてマイトマイシンCの1mg/kgを1回投与する群を設定した。

その結果、MNPCEの出現頻度において、各被験物質投与群は陰性対照群に比べて統計学的に有意な増加は認められず、用量依存的な変化も認められなかった。

また、各被験物質投与群の全赤血球200個中に占めるPCEの出現頻度は、陰性対照群と比較して、250mg/kg/日投与群において統計学的に有意な減少を示した。この変化は投与量に相関するものではなかったが、500及び1000mg/kg/日投与群においても陰性対照群と比べ減少傾向を示していることから、本被験物質が骨髄細胞の増殖抑制作用を有すると判断された。この結果は、標的臓器が被験物質に暴露されたことを示唆するものであった。

なお、陰性対照群と陽性対照群のMNPCEの出現頻度は、当研究所における各々の背景データの平均値 \pm 3S.D.の範囲内であったことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、*p*-ジブロモベンゼンは本試験条件下でCrlj:CD1(ICR)SPFマウスの骨髄において、染色体異常誘発能は無いと判定した。

なお、*p*-ジブロモベンゼンは、復帰突然変異試験で陰性、染色体異常試験では染色体の構造異常が誘発され、陽性の結果が得られている^{9,10)}。

9. 参考文献

- 1) W. Schmid, Mutation Res. 31, 9-15 (1975).
- 2) W. Schmid, "Chemical Mutagens," Vol. 4, ed. by A. Hollaender, Plenum Press, N.Y., London, 1976, pp.76-78.
- 3) M. Hayashi, T. Sofuni, M. Jr. Ishidate, Mutat. Res., 120, 241(1983).
- 4) 林 真, "小核試験," サイエンティスト社, 東京, 1991, pp.44-55.
- 5) M.A.Kastenbaum and K.O.Bowman, Mutation Res. 9, 527-549 (1970).
- 6) 吉村 功 編, "毒性・薬効データの統計解析," サイエンティスト社, 東京, 1987, pp. 67-69.
- 7) Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. 8th ed. Ames: Iowa State University Press (1989).
- 8) Steel RGD. A multiple comparison rank sum test: Treatments versus control. Biometrics 1959; 15: 560-72
- 9) 化学物質毒性試験報告書, 2, 363(1995).
- 10) 化学物質毒性試験報告書, 2, 367(1995).

Table 1

A micronucleus test of *p*-Dibromobenzene in mice

Clinical signs

Group	Dose (mg/kg/day)		1st administration			2nd administration			1 day after the 2nd administration
			Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	
Negative control	0	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
Low	250	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
Middle	500	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
High	1000	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
Positive control ^{a)} (Mitomycin C)	1	Number of animals	5	-	-	5	5	5	5
		No abnormalities	5	-	-	5	5	5	5

- : No observation

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

Table 2

A micronucleus test of *p*-Dibromobenzene in mice

Body weight

Group	Dose (mg/kg/day)		1st administration	2nd administration	1 day after the 2nd administration
Negative control	0	N	5	5	5
		Mean	32.9	32.6	32.3
		S.D.	1.6	1.3	1.8
Low	250	N	5	5	5
		Mean	32.9	33.1	32.9
		S.D.	1.5	1.8	1.5
Middle	500	N	5	5	5
		Mean	32.6	32.3	32.4
		S.D.	1.3	1.9	2.1
High	1000	N	5	5	5
		Mean	33.1	31.4	29.8
		S.D.	1.6	2.6	3.3
Positive control ^{a)} (MitomycinC)	1	N	5	5	5
		Mean	32.8	33.0	32.9
		S.D.	1.5	1.7	1.2

Unit : g

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

Table 3

A micronucleus test of *p*-Dibromobenzene in mice

Observation of bone marrow smears (About 24 hours after the 2nd administration)

Group	Dose (mg/kg/day)		No. of MNPCE in 2000 PCE	MNPCE(%) ^{b)}	No. of PCE in 200 erythrocytes	PCE(%) ^{c)}
Negative control	0	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	3 ± 1	0.15 ± 0.04	108 ± 4	54.1 ± 2.1
		Min. / Max.		0.10 / 0.20		51.0 / 56.5
Low	250	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	2 ± 1	0.09 ± 0.05	97 ± 8	48.6 ± 3.8 ^{d)}
		Min. / Max.		0.05 / 0.15		42.0 / 52.0
Middle	500	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	4 ± 2	0.18 ± 0.08	102 ± 3	50.9 ± 1.3
		Min. / Max.		0.10 / 0.25		49.0 / 52.5
High	1000	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	2 ± 1	0.12 ± 0.03	98 ± 16	49.2 ± 8.0
		Min. / Max.		0.10 / 0.15		36.5 / 55.5
Positive control ^{a)} (Mitomycin C)	1	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	63 ± 17	3.14 ± 0.85	97 ± 9	48.4 ± 4.7
		Min. / Max.		1.95 / 4.15		41.5 / 54.0

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

b): Proportion(%) of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) per 2000 polychromatic erythrocytes (PCE)

c): Proportion(%) of polychromatic erythrocytes (PCE, including MNPCE) per 200 erythrocytes

d): Statistically significant difference from the negative control value (Steel's test, $P < 0.05$)

No significant difference between the negative control group and any treated group (Kastenbaum & Bowman's statistical table and Cochran-Armitage test)