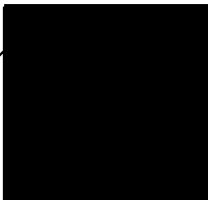


受付番号	837-10-T-6686
試験番号	K11-0259

最 終 報 告 書

(4-ヒドロキシフェニル)(2,3,4-トリヒドロキシフェニル)メタノンの
マウス小核試験

2011 年 3 月

一般財団法人  評価研究機構

本文書は正本を正確に転写したものです。
一般財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所
2011 年 3 月 22 日
試験責任者 

陳 述 書

一般財団法人化学物質評価研究機構
日田事業所

試験委託者 厚生労働省

試験の表題 (4-ヒドロキシフェニル)(2,3,4-トリヒドロキシフェニル)メタノンの
マウス小核試験

試験番号 K11-0259

上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

- a) 「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」(薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号 平成 15 年 11 月 21 日、最終改正: 平成 20 年 7 月 4 日) に規定する「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」
- b) “OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring No.1, OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)” ENV/MC/CHEM (98) 17

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

2011 年 3 月 22 日

試験責任者



目 次

	頁
1. 表 題	4
2. 試験委託者	4
3. 試験施設	4
4. 試験目的	4
5. 試験法	4
6. GLP 基準	4
7. 試験日程	4
8. 試験関係者	5
9. 試資料の保管	5
10. 最終報告書作成者の承認	5
11. 要 約	6
12. 試験材料	7
12.1 被験物質	7
12.2 対照物質	8
12.3 使用動物	9
12.4 飼育環境	9
13. 試験方法	10
13.1 被験物質液及び陽性対照物質溶液の調製	10
13.2 試験の手順	12
14. 試験の成立条件	14
15. 統計学的方法	15
16. 確認試験	15
17. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	15
18. 試験成績	15
18.1 小核試験	15
19. 試験施設の背景データ	16
20. 考察	16
21. 結論	17
22. 参考文献	17
表 1 小核試験に用いた被験物質液の均一性及び濃度確認結果	18
表 2 小核試験における一般状態	19
表 3 小核試験における体重	20
表 4 小核試験における標本観察結果	21
添付資料 1 被験物質の保管条件下での安定性確認結果	22
添付資料 2 マウスを用いた小核試験の背景データ	23

1. 表 題

(4-ヒドロキシフェニル)(2,3,4-トリヒドロキシフェニル)メタノンのマウス小核試験

2. 試験委託者

名 称 厚生労働省

住 所 〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所

住 所 〒877-0061 大分県日田市石井町 3 丁目 822 番地

4. 試験目的

マウスを用いて、被験物質の小核誘発能の有無を骨髓細胞で検討する。

5. 試験法

a) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号 平成 15 年 11 月 21 日、最終改正: 平成 18 年 11 月 20 日) に定める「げっ歯類を用いる小核試験」

b) “OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test” (Adopted: July 21, 1997)

6. GLP 基準

a) 「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」(薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号 平成 15 年 11 月 21 日、最終改正: 平成 20 年 7 月 4 日) に規定する「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」

b) “OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring No.1, OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997) ” ENV/MC/CHEM (98)

17

7. 試験日程

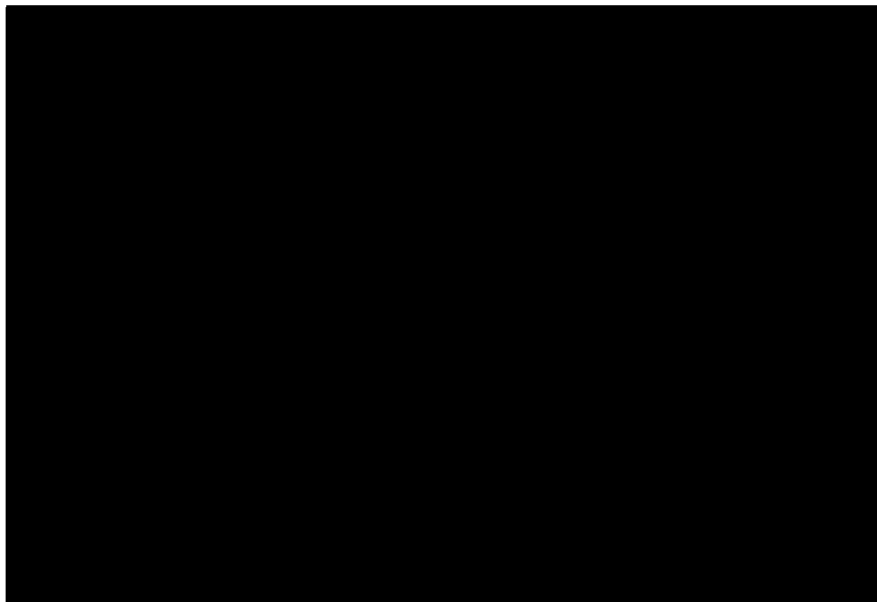
試験開始日	2010 年 12 月 22 日
動物入荷日	2011 年 1 月 11 日
投与開始日	2011 年 1 月 18 日
標本作製日	2011 年 1 月 20 日
観察終了日	2011 年 2 月 14 日
試験終了日	2011 年 3 月 22 日

8. 試験関係者

試験責任者:



試験担当者:



9. 試験資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、契約書、その他の記録及び標本は当試験施設に保管する。

保管期間は試験終了後 10 年間とする。ただし保管中に品質が著しく変化する標本などの保管期間は、その品質が評価に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

10. 最終報告書作成者の承認

試験責任者:

2011 年 3 月 22 日



11. 要 約

7 週齢の雄 Crlj: CD1 (ICR) マウスを用いた 24 時間間隔の 2 回連続強制経口投与により、(4-ヒドロキシフェニル)(2,3,4-トリヒドロキシフェニル)メタノンの小核誘発能の有無を検討した。

小核試験は、雄のみを使用し、2000 mg/kg/day を最高に、公比 2 で希釈した 1000、500、250 及び 125 mg/kg/day の 5 用量を設定した。対照群には、陰性対照群及び陽性対照群を設定し、陰性対照群には媒体（コーン油）を 10 mL/kg で 2 回連続の強制経口投与を行った。陽性対照群にはマイトマイシン C を 2 mg/kg/day で単回腹腔内投与を行った。

標本作製時期とした 2 回目投与 24 時間後においても最高用量の 2000 mg/kg/day までの被験物質のすべての用量で死亡はみられなかったため、設定した上位 3 用量を被験物質の標本観察用量とし、骨髓細胞の小核を有する多染性赤血球の出現頻度 (MNPCE/PCE) を調べた。

標本観察の結果、標本観察した被験物質のすべての用量群で、陰性対照群と比較し統計学的な有意差はみられなかったため、被験物質投与により MNPCE/PCE は増加しないものと判断した。

陰性対照での MNPCE/PCE は、当試験施設の背景データの範囲内であった。一方、マイトマイシン C を投与した陽性対照の MNPCE/PCE は、陰性対照と比較して統計学的に有意に増加したが (8.70%)、管理範囲 (3.46~8.12%) を超えた。しかし、管理範囲の上限を上回ったものであり、その差も 0.58%とわずかであったこと、また、各個体の MNPCE/PCE には大きく突出した値はみられなかったことから、小核誘発能の評価を目的とする検出感度には問題はなかったと判断した。よって、試験に用いた動物の感受性に問題はなく、試験操作の誤りもなかったと判断されることから、試験は適正に実施されたと評価した。

以上の結果から、(4-ヒドロキシフェニル)(2,3,4-トリヒドロキシフェニル)メタノンは、本試験条件下では小核を誘発しないものと判断した。

12. 試験材料

12.1 被験物質

a) 名称等

名 称 (4-ヒドロキシフェニル)(2,3,4-トリヒドロキシフェニル)
メタノン

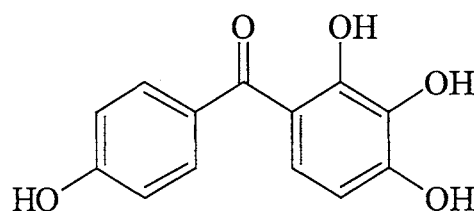
別 名 2,3,4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン

CAS 番号 31127-54-5

官報公示整理番号 4-1531

b) 構造式等

構造式



分子式 $C_{13}H_{10}O_5$

分子量 246.22

c) 純度等

被験物質純度 99.9%

不純物 不明 0.1%

供給者

ロット番号 EPF0296

d) 物理化学的性状（平成 17 年 11 月既存化学物質点検（分解・蓄積）結果資料）

蒸気圧 3.35×10^{-4} Pa 以下 (80°C)

対水溶解度 126 mg/L (20°C、フラスコ法)

1-オクタノール／水分配係数

$\log P_{ow} = 0.9$ (pH2、HPLC 法)

融 点 220.3-221.5°C

沸 点 313.5°C (270°C 付近で褐色から黒色に変化した)

常温における性状 黄色の粉末（試験施設にて確認）

媒体に対する溶解度等

媒 体	溶解度	媒体中の安定性
ジメチルスルホキシド	250 mg/mL 以上 ^{*1}	安定 ^{*1}
アセトン	1.005 mg/mL 以上（目視） ^{*2}	不明
メタノール	10 mg/mL 以上	不明

*1: 試験委託者提供の染色体異常試験の情報（ボゾリサーチセンター、試験番号: M-1198）

*2: 試験施設にて確認

e) 保管条件

気密容器に入れ、被験物質保管室のキャビネット 1 及び 5 で室温（実測温度: 17.6～20.8℃（許容範囲: 10～30℃））保管した。

f) 保管条件下での安定性

試験施設にて、実験開始前と実験終了後に赤外吸収スペクトル（IR）測定を行い、測定されたスペクトルに変化がなかったため、保管条件下で被験物質は安定であったと判断した（添付資料 1）。

1) 使用機器

赤外分光光度計: FT-720（堀場製作所）

2) 測定条件

波数: 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1}

3) 前処理法

臭化カリウム錠剤法

g) 取扱い上の注意

手袋、マスク、帽子、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入をさけた。

12.2 対照物質

12.2.1 陰性対照物質（媒体）

a) 名称

コーン油

b) 製造元、ロット番号及びグレード

製造元

ロット番号

PER3898

グレード

生化学用

c) 保管条件

準備室 2 の試薬棚で室温保管した。

12.2.2 陽性対照物質

a) 名称等

名 称	製造元	ロット番号	外 観	純 度	グレード
MMC ^{†1}	協和発酵キリン	547AIJ	青紫色粉末	99.2%	注射用

†1: マイトマイシン C

b) 選択理由

試験法に記載のガイドラインに陽性対照物質として記載され、当試験施設においても、背景データを保有しているため。

c) 保管条件

被験物質保管室のキャビネット 2 及び 5 で室温（実測温度: 17.6～21.6℃（許容範囲: 10～30℃））保管した。

d) 取扱い上の注意

手袋、マスク、帽子、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入をさけた。

12.3 使用動物

小核の観察が容易なこと及び背景データが豊富なことから、一般に小核試験に用いられているマウスを選択した。6週齢の雄46匹のCrj: CD1 (ICR) SPFマウス（日本チャールス・リバー、日野飼育センター）を購入し、いずれも6日間の検疫を含む7日間の馴化を行った。

検疫後、順調に発育した一般状態の良好な動物を体重層別無作為抽出法により、1群6匹で7群に群分けし、群分け1日後に投与に用いた。なお、試験に使用しなかった余り動物は、本試験系から除外した後、エーテル麻酔下にて頸椎脱臼して安楽死させた。

a) 識別方法

1) 動物

入荷時に、入荷動物番号を任意に割り付けた。番号順に各ケージ5匹を収容し、動物番号46は1匹で収容した。各ケージの入荷動物番号の小さい4匹について、尾部に油性インクでマーキング（5はマーキング無し）して識別した。

群分け後に新たな動物番号を割り付け、各群の動物番号の小さい順に、1～6のマーキングを背部被毛に施し、各ケージ3匹（2ケージ/用量）を収容した。マーキングには、水性インク（アニマルカラーインク NRC-706、日本ラビット）を用い、用量ごとに色を変えた。

2) ケージ

群分け前は、試験番号、性別、入荷動物番号、ケージ番号、入荷日、入荷時週齢、動物種、系統及び試験責任者を明記したラベルを付け、群分け後は、試験番号、ケージ番号、群、用量、動物番号、動物種、系統、性別、飼育期間（群分け日～飼育終了日）及び試験責任者を明記したラベルを付けて、識別した。

b) 使用動物の投与開始時週齢、使用動物数及び初回投与時体重

7週齢 雄42匹、初回投与時体重 29.6～34.4 g、平均: 31.9 g

12.4 飼育環境

動物は、検疫・馴化期間中を含む全飼育期間を通して、温度21～25℃（実測値: 22.8～24.1℃）、相対湿度40～70%（実測値: 52.1～61.5%）、換気回数10～15回/時間、明暗サイクル12時間間隔（7時点灯～19時消灯）に設定したバリアーシステム飼育室内（検疫室2及び飼育室7）で、床敷（サンフレイク、ロット番号101102、日本チャールス・リバー）を入れたポリカーボネイト製平床ケージ（225 W×338 D×140 H mm）で飼育した。

飼料は固型飼料（MF、ロット番号100903、オリエンタル酵母工業）を、飲料水は日田市上水道水（塩素添加水）を給水びんにてそれぞれ自由に摂取させた。飼料、床敷及び飼育用器材は、オートクレーブ滅菌（121℃で30分間）したものを使用し、ラック、ケージ、ケージ蓋、床敷及び給水びんは、検疫終了時に交換した。

飼料及び床敷はEurofins社で実施した分析データを製造元から入手し、その項目が米国環境保護庁有害物質規制法の「飼料及び媒体の汚染物質限度」（1979）を参考にして試験施設で定めた基準値内であることを確認したロットを使用した。また、飲料水の混入物については、

年に2回、厚生労働省の水質基準に関する省令（厚生労働省令第101号、第135号、第174号）に準拠した水質検査を年2回の頻度で実施し、動物入荷前に入手した最新の検査結果が、同省令の基準を満たしていることを確認した。

検疫・馴化期間中及び試験期間中ともにこれらの飼育環境要因に、試験の結果に影響を及ぼすと考えられる変動は認められなかった。

13. 試験方法

13.1 被験物質液及び陽性対照物質溶液の調製

13.1.1 被験物質液の調製

a) 使用媒体

コーン油

b) 媒体の選択理由

2,3,4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンの急性毒性試験（ボゾリサーチセンター、試験番号: B-5518）において媒体として使用され、また、同試験において、コーン油で調製した0.1及び200 mg/mLの被験物質液の安定性が確認されているため、コーン油を媒体に選択した。

c) 調製法

被験物質を8.00 g秤量した後、メノウ乳鉢で細粉化し、コーン油を加え攪拌（チューブミキサー）して懸濁させ、200 mg/mLの被験物質液を調製した。200 mg/mLの被験物質液をマグネチックスターラーで攪拌しながら分取し、コーン油で次表のとおり希釈して、100、50.0、25.0及び12.5 mg/mLの被験物質液を調製した。調製は安全キャビネット内にて行った。

被験物質液 (mg/mL)	希釈法			調製される 被験物質液濃度 (mg/mL)
	採取量 (mL)	媒体添加量 (mL)	調製量 (mL)	
200	20	20	40	100
100	20	20	40	50.0
50.0	20	20	40	25.0
25.0	10	10	20	12.5

d) 調製時期及び保管

各濃度の被験物質液を等分し、気密容器に入れ、被験物質調製室の保冷库7で冷所（実測温度: 4～7°C（許容範囲: 1～10°C））保管した。安定性が確認されている期間内に使用し、投与前に室温に取り出した後、投与に用いた。

13.1.2 被験物質液の安定性の確認

試験委託者提供の急性毒性試験の情報（ボゾリサーチセンター、試験番号: B-5518）より、遮光容器で冷所に8日間保管後、引き続き室温24時間での0.1及び200 mg/mLの被験物質液の安定性が確認されているため、被験物質液の安定性は確認しなかった。

13.1.3 被験物質液の均一性及び濃度確認

使用する被験物質液の最高濃度である200 mg/mLの被験物質液について、調製直後

の被験物質液の均一性及び濃度を確認した。

被験物質液の上、中及び下層より一部を採取して分析試料を調製し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて被験物質濃度を測定した。被験物質液の上、中及び下層の測定した被験物質濃度の変動係数（CV）が 5%以内であることを確認した。また、測定した各被験物質濃度が設定値に対し 100±10%以内であることを確認した。結果を表 1 に示す。

$$CV(\%) = \frac{\text{各層間の測定濃度の標準偏差}}{\text{測定濃度の平均値}} \times 100$$

a) 分析試料の調製方法

被験物質液の調製直後に、マグネチックスターラーで攪拌しながら上、中及び下層より各 n=1 で 0.25 mL を採取した。アセトンを用いて次表に示すとおり希釈し、50.0 µg/mL の分析試料を調製した。各分析試料を HPLC で 1 回測定し、被験物質濃度を算出した。

被験物質液 (mg/mL)	第一希釈		第二希釈		希釈倍率
	採取量 (mL)	定容量 (mL)	採取量 (mL)	定容量 (mL)	
200	0.25	25	0.5	20	4000

b) 分析試料の分析方法

当試験施設において非 GLP 下で実施した分析法バリデーションの結果、特異性及び直線性（標準溶液濃度: 25.1、50.1 及び 100 µg/mL）の項目について判断基準を満たしていることを確認した。これに基づき分析法を決定した。

1) 標準溶液の調製

被験物質 0.02000 g を 20 mL 容メスフラスコに精密に秤量した。アセトンを適量加え溶解させた後、アセトンで定容して、1000.0 µg/mL 標準原液を調製した（n=1）。標準原液をアセトンで以下のとおり希釈し、25.0、50.0 及び 100 µg/mL 標準溶液を調製した（各濃度 n=1）。

標準原液 (µg/mL)	希釈法		調製される 標準溶液濃度 (µg/mL)
	採取量 (mL)	定容量 (mL)	
1000.0	2	20	100
1000.0	1	20	50.0
1000.0	0.5	20	25.0

2) HPLC 測定条件

(1) 使用機器（HPLC9）

インターフェース: D-7000IF（日立製作所）
 ポンプ: L-7100（日立製作所）
 オートサンプラー: L-7200（日立製作所）
 UV-VIS 検出器: L-7405（日立製作所）

カラムオープン: L-7300 (日立製作所)
 データ処理装置: D-7000 HPLC System manager (日立製作所)

(2) 測定条件

カラム: L-column ODS (4.6 mm I.D. × 150 mm、
 化学物質評価研究機構)
 カラム温度: 40°C (カラムオープン設定温度)
 移動相: 0.1 v/v%りん酸水溶液/アセトニトリル = 70/30 (v/v)
 流量: 1 mL/min
 測定波長: 310 nm
 注入量: 10 µL
 洗浄液: アセトン

3) データ処理

(1) 検出値

ピーク面積を検出値とした。

(2) 定量分析法

分析法バリデーションで、横軸に被験物質濃度 (µg/mL)、縦軸に被験物質の検出値とした検量線を作成した結果、良好な直線性が得られたため、分析試料の定量分析は 25.0、50.0 及び 100 µg/mL の標準溶液を用いた 3 点検量で行った。

(3) 被験物質液中の被験物質濃度の算出

3 点検量で求めた一次式 $y = ax + b$ と希釈倍率を乗じた次式により、被験物質液中の被験物質濃度 (C: mg/mL) を算出し、有効数字 3 桁で表示した。

$$C = \frac{(y - b) \times D}{a \times 1000}$$

y は検出値、D は各分析試料の希釈倍率を示す。

13.1.4 陽性対照物質溶液の調製

a) 調製法

MMC 2 mg 入り瓶に、注射用水 (大塚製薬工場) を加えて溶解させ、注射用水で全量を 10 mL として 0.2 mg/mL の溶液を調製した。なお、陽性対照物質溶液は安全キャビネット内にて取り扱った。

b) 調製時期及び保管

用時に調製し 4 時間以内に使用した。使用まで室温で保管した。

c) 安定性及び濃度確認

陽性対照群における小核を有する幼若赤血球の出現頻度から、陽性対照物質溶液が適切に調製され、かつ、安定であったことが確認できるため、安定性及び濃度確認は実施しなかった。

13.2 試験の手順

試験委託者提供の急性毒性試験の情報 (ボゾリサーチセンター、試験番号: B-5518) より、LD₅₀ 値 (ラット) が 2000 mg/kg を上回り、一般状態、体重測定において何ら異常が認めら

れず、性差はないことが予想されたことから、雄のみを使用し、最高用量は 2000 mg/kg/day とした。

13.2.1 群構成

a) 被験物質群

試験委託者提供の急性毒性試験の情報（ボゾリサーチセンター、試験番号: B5518）より、LD₅₀ 値（ラット）が 2000 mg/kg を上回ることから、ガイドラインに連続投与での毒性がない場合の上限とされている 2000 mg/kg/day を最高に、公比 2 で希釈した 1000、500、250 及び 125 mg/kg/day の 5 用量を設定し、各用量につき 6 匹を用いた。標本作製時に生存したすべての動物について標本作製したが、評価には、標本作製時に 5 匹以上の動物が確保された上位 3 用量である 500、1000 及び 2000 mg/kg/day を使用し、各用量の動物番号の小さい 5 匹を使用した。

b) 陰性対照群及び陽性対照群

陰性対照群として媒体を 10 mL/kg で投与する群を設置した。陽性対照群として試験施設の背景データに基づき、MMC を 2 mg/kg/day で投与する群を設定した。各対照群とも 6 匹を用いた。標本作製時に生存したすべての動物について標本作製したが、評価には生存動物の内の動物番号の小さい 5 匹を使用した。

c) 群構成

試験群	投与用量 (mg/kg/day)	動物数	動物番号
被験物質	0	6	101 – 106
	125	6	107 – 112
	250	6	113 – 118
	500	6	119 – 124
	1000	6	125 – 130
	2000	6	131 – 136
陽性対照 (MMC)	2	6	137 – 142

13.2.2 投与経路、投与容量及び投与回数

a) 被験物質群

小核試験において一般的に実施されている強制経口投与とし、24 時間間隔で 2 日間連続投与した。投与には、1 mL 容ディスポーザブルシリンジ（テルモ）とディスポーザブルマウス胃ゾンデ（フチガミ器械）を用い、被験物質液をマグネチックスターラーで攪拌しながら採取し、投与当日の体重を基に 10 mL/kg で投与した。

b) 陰性対照群

媒体を投与当日の体重を基に 10 mL/kg で被験物質群と同様の方法で強制経口投与した。

c) 陽性対照群

被験物質の投与 2 日目に、1 mL 容ディスポーザブルシリンジ（テルモ）とディスポーザブル注射針（テルモ）を用い、投与当日の体重を基に 10 mL/kg で単回腹腔内投与した。

13.2.3 一般状態観察、体重測定、瀕死動物及び死亡動物の処置

a) 一般状態観察

各投与後 1 時間までは頻繁に観察した。初回及び 2 回目投与後のいずれにおいても、投与 1 時間後までに毒性症状がみられなかったため、投与後の観察は 1 時間までとした。さらに、各投与の 1 日後に観察した。ただし、陽性対照群においては、被験物質投与 1 日目には一般状態観察を実施しなかった。

b) 体重測定

初回投与前、2 回目投与前及び 2 回目投与 1 日後の計 3 回、電子天秤（ザルトリウス）を用いて測定した。ただし、陽性対照群においては、投与 1 日目には体重測定を実施しなかった。

c) 瀕死動物及び死亡動物の処置

瀕死動物及び死亡動物はみられなかった。

13.2.4 標本作製

a) 作製時期

2 回目投与 24 時間後（陽性対照は、単回投与 24 時間後）

b) 方法

動物を頸椎脱臼により安楽死させた後、大腿骨を摘出し、非働化した牛胎仔血清約 0.8 mL で骨髓細胞を遠沈管に洗い出した。1000 rpm で 5 分間遠心分離し、集めた細胞の沈渣をスライドグラス上に塗抹した。風乾させた後、メタノールで固定した。3 vol% ギムザ溶液（ゼーレンゼン緩衝液、pH6.8 で調製）で染色した後、0.004 w/v% クエン酸溶液で分染した。標本作製時に生存したすべての動物について、1 個体につき 2 枚の標本作製した。

13.2.5 標本観察

陰性対照群及び陽性対照群並びに被験物質群の 3 用量の標本を観察した。被験物質の観察用量は、標本作製時に 5 匹以上が生存した上位 3 用量である 500、1000 及び 2000 mg/kg/day とした。いずれの群においても、動物番号の小さい順に 5 匹の標本のみ観察した。

観察する標本には、ランダムに発生させたスライド番号を付し、生物顕微鏡（×1000）にてブラインド法により観察した。

a) 小核の出現頻度

1 個体につき、2000 個（1 標本当たり 1000 個）の多染性赤血球（polychromatic erythrocyte: PCE）を観察し、小核を有する多染性赤血球（micronucleated polychromatic erythrocyte: MNPCE）の出現頻度（MNPCE/PCE）を求めた。

b) 骨髓細胞の増殖抑制

1 個体につき 200 個（1 標本当たり 100 個）の全赤血球（total erythrocyte: TE）を観察し、PCE の占める割合（PCE/TE）を求めた。

14. 試験の成立条件

陰性対照群及び陽性対照群の MNPCE/PCE の平均値が、いずれも当試験施設での最新 20

実験の背景データの範囲内（陰性対照: $\text{mean} \pm 3 \text{ S.D.}$ 、陽性対照: $\text{mean} \pm 2 \text{ S.D.}$ ）にあることを試験の成立条件とした。

15. 統計学的方法

a) MNPCE/PCE の判定

被験物質の各投与用量群及び陽性対照群の MNPCE/PCE について、陰性対照群との間で条件付二項検定（Kastenbaum and Bowman）により、上側 5% 及び 1% 水準での有意差検定を行った。被験物質の投与用量群で有意差がみられた場合には、Cochran-Armitage の傾向検定により用量依存性があるかを検定することになっていたが、有意差がみられなかったため、傾向検定は行わなかった。被験物質の投与用量群での MNPCE/PCE が、陰性対照群と比べ有意に増加し、かつ、その増加に用量依存性がみられた場合を陽性とした。

b) PCE/TE の判定

被験物質の各投与用量群及び陽性対照群の PCE/TE を、陰性対照群と F 検定により 2 群の分散の一様性を検定した結果、すべての被験物質群及び陽性対照群で等分散であったため Student の t 検定を実施した。F 検定は 20%、Student の t 検定は両側 5% 及び 1% とした。

16. 確認試験

被験物質の各用量群での MNPCE/PCE が陰性対照群と比較し有意に増加しなかったため、確認試験は実施しなかった。

17. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

マイトマイシン C を投与した陽性対照群の MNPCE/PCE は、陰性対照群と比較して統計学的に有意に増加したが（8.70%）、管理範囲（3.46～8.12%）を超えたことで試験の成立条件を満たさなかった。しかし、管理範囲の上限を上回ったものであり、その差も 0.58% とわずかであったこと、また、各個体の MNPCE/PCE には大きく突出した値はみられなかったことから、小核誘発能の評価を目的とする検出感度には問題はなかったと判断した。よって、試験に用いた動物の感受性に問題はなく、試験操作の誤りもなかったと判断されることから、試験は適正に実施されたと評価し、試験成績の信頼性に影響を及ぼさないと判断した。

その他の試験計画書からの逸脱を含む当該要因はなかった。

18. 試験成績

18.1 小核試験

a) 一般状態

試験結果を表 2 に示す。

陰性対照群、陽性対照群及びすべての被験物質用量群で 2 回目投与 1 日後までに一般状態の変化及び死亡はみられなかった。

b) 体重

試験結果を表 3 に示す。

陰性対照群と比較し、すべての被験物質用量群及び陽性対照群で、2 回目投与 1 日後までに明確な体重減少はみられなかった。

c) MNPCE/PCE 及び PCE/TE

試験結果を表 4 に示す。

陰性対照群及び陽性対照群での MNPCE/PCE の平均値は、それぞれ 0.07 及び 8.70% であった。被験物質の 500、1000 及び 2000 mg/kg/day 群では、それぞれ 0.08、0.13 及び 0.03%を示し、陰性対照群と比較してすべての被験物質用量群で統計学的な有意差はみられなかった。陽性対照群では、1%水準で有意な増加がみられた。

一方、PCE/TE の平均値は、陰性対照群及び陽性対照群で、それぞれ 46.7 及び 49.3% であった。被験物質の 500、1000 及び 2000 mg/kg/day 群で、57.6、50.0 及び 53.5%であった。陰性対照群と比較して、500 mg/kg/day では両側 5%水準で統計学的な有意差がみられたが、1000 及び 2000 mg/kg/day 及び陽性対照群では統計学的な有意差はみられなかった。

19. 試験施設の背景データ

試験施設における最新 20 実験の背景データでは、陰性対照の MNPCE/PCE は $0.10 \pm 0.032\%$ (mean $\pm$ S.D.)、陽性対照では $5.79 \pm 1.164\%$ (mean $\pm$ S.D.) であることから、以下の範囲を適正值とした (添付資料 2)。

陰性対照群: 0.00~0.20% (mean $\pm$ 3 S.D.)、陽性対照群: 3.46~8.12% (mean $\pm$ 2 S.D.)

20. 考察

陰性対照での MNPCE/PCE は、当試験施設の背景データの範囲内であった。一方、マイトマイシン C を投与した陽性対照群の MNPCE/PCE は、陰性対照群と比較して統計学的に有意に増加したが (8.70%)、管理範囲 (3.46~8.12%) を超えた。しかし、管理範囲の上限を上回ったものであり、その差も 0.58%とわずかであったこと、また、各個体の MNPCE/PCE には大きく突出した値はみられなかったことから、小核誘発能の評価を目的とする検出感度には問題はなかったと判断した。よって、試験に用いた動物の感受性に問題はなく、試験操作の誤りもなかったと判断されることから、試験は適正に実施されたと評価した。

被験物質の 500、1000 及び 2000 mg/kg/day 群のいずれにおいても、MNPCE/PCE は、陰性対照群と比較して統計学的な有意差はみられず、被験物質投与により MNPCE/PCE は増加しないものと判断した。

また、全赤血球に対する多染性赤血球の占める割合 (PCE/TE) は、被験物質の 500 mg/kg/day 群では両側 5%水準で統計学的な有意差がみられたが、陰性対照群と比較して高値であるために生じた有意差であった。また、被験物質の 1000 及び 2000 mg/kg/day 群では統計学的な有意差がみられなかったことから、被験物質による PCE/TE の減少を指標とした骨髓細胞の被験物質暴露を証明できなかった。しかし、ガイドラインに連続投与での毒性がない場合の上限とされている 2000 mg/kg/day までの用量を設定していることから、本試験の結果により小核誘発能を適切に評価できると判断した。

21. 結論

(4-ヒドロキシフェニル)(2,3,4-トリヒドロキシフェニル)メタノンは、本試験条件下では小核を誘発しないものと判断された。

22. 参考文献

1. 林 真、小核試験 増補版、サイエンティスト社、(1999)
2. Heddle, J. A. et al., The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.* 123, 61-118 (1983)
3. Kastenbaum, M. A. and Bowman, K. O., Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527-549 (1970)
4. Schmid, W., The micronucleus test for cytogenetic analysis. In : Hollaender, A. Ed., *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol.4, Plenum, New York, 31-53 (1976)

表 1 小核試験に用いた被験物質液の均一性及び濃度確認結果

設定濃度 (mg/mL)	採取	測定濃度 (mg/mL)	R.N. (%)	CV (%)
200	上層	194	97.0	0.6
	中層	192	96.0	
	下層	194	97.0	

R.N.: 設定濃度に対する相対比

CV: 各層間の変動係数

表2 小核試験における一般状態

使用動物: 7週齢・雄CrIj: CD1 (ICR)マウス

投与回数: 24時間間隔で2回連続投与(陽性対照は単回投与)

投与経路: 強制経口投与(陽性対照は腹腔内投与)

投与容量: 10 mL/kg

試験群	投与用量 (mg/kg/day)	動物 番号	初回投与	2回目投与		
			1時間後まで	投与前	1時間後まで	1日後
陰性対照 [コーン油]	0	101	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		102	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		103	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		104	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		105	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		106	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
被験物質 [(4-ヒドロキシ フェニル) (2,3,4-トリヒドロ キシフェニル) メタノン]	125	107	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		108	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		109	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		110	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		111	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		112	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	250	113	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		114	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		115	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		116	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		117	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		118	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	500	119	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		120	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		121	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		122	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		123	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		124	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	1000	125	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		126	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		127	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		128	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		129	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		130	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
	2000	131	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		132	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		133	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		134	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		135	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
		136	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
陽性対照 [MMC]	2	137		異常なし	異常なし	異常なし
		138		異常なし	異常なし	異常なし
		139		異常なし	異常なし	異常なし
		140		異常なし	異常なし	異常なし
		141		異常なし	異常なし	異常なし
		142		異常なし	異常なし	異常なし

MMC: マイトマイシンC

表3 小核試験における体重

使用動物: 7週齢・雄Crlj: CD1 (ICR)マウス

投与回数: 24時間間隔で2回連続投与(陽性対照は単回投与)

投与経路: 強制経口投与(陽性対照は腹腔内投与)

投与容量: 10 mL/kg

試験群	投与用量 (mg/kg/day)	動物 番号	体 重 (g)		
			初回投与日	2回目投与日	2回目投与1日後
陰性対照 [コーン油]	0	101	32.2	32.4	33.0
		102	30.7	31.3	31.8
		103	30.8	30.9	30.8
		104	33.4	33.7	34.1
		105	32.5	32.2	32.3
		106	32.8	32.6	32.7
	平均値±標準偏差		32.1 ± 1.09	32.2 ± 0.99	32.5 ± 1.12
被験物質 [(4-ヒドロキシフェニル) (2,3,4-トリヒドロキシ フェニル)メタン]	125	107	31.4	32.3	32.3
		108	29.6	29.0	28.9
		109	30.4	30.2	30.4
		110	31.2	31.7	31.5
		111	33.4	33.8	35.1
		112	34.4	34.5	34.9
	平均値±標準偏差		31.7 ± 1.82	31.9 ± 2.09	32.2 ± 2.46
	250	113	33.5	33.4	34.0
		114	32.7	32.7	32.9
		115	31.7	32.5	32.8
		116	31.6	31.3	32.2
		117	33.9	34.3	34.5
		118	30.4	30.4	29.4
	平均値±標準偏差		32.3 ± 1.31	32.4 ± 1.41	32.6 ± 1.79
	500	119	32.6	32.6	32.6
		120	30.3	30.5	31.1
		121	31.3	32.3	32.0
		122	31.2	31.5	31.8
		123	31.0	31.5	31.5
		124	33.1	33.5	34.0
	平均値±標準偏差		31.6 ± 1.05	32.0 ± 1.04	32.2 ± 1.03
	1000	125	30.2	30.8	31.8
		126	32.6	32.5	33.9
		127	31.7	31.9	32.1
		128	32.2	30.4	31.1
		129	29.7	29.3	29.5
		130	32.3	33.1	34.1
	平均値±標準偏差		31.5 ± 1.21	31.3 ± 1.42	32.1 ± 1.74
	2000	131	33.6	33.4	33.8
		132	30.0	31.0	31.5
		133	31.8	32.4	33.5
		134	31.9	32.1	32.8
		135	32.7	32.3	32.8
		136	31.6	33.5	33.2
	平均値±標準偏差		31.9 ± 1.20	32.5 ± 0.92	32.9 ± 0.80
陽性対照 [MMC]	2	137		34.0	35.8
		138		31.5	31.9
		139		33.8	34.4
		140		30.8	30.9
		141		29.6	30.3
		142		33.5	33.8
	平均値±標準偏差			32.2 ± 1.83	32.9 ± 2.15

MMC: マイトマイシンC

表 4 小核試験における標本観察結果

使用動物: 7週齢・雄 Crlj: CD1 (ICR)マウス

投与回数: 24時間間隔で2回連続投与(陽性対照は単回投与)

投与経路: 強制経口投与(陽性対照は腹腔内投与)

投与容量: 10 mL/kg

試験群	投与用量 (mg/kg/day)	最終投与後の 標本作製時間 (hours)	動物 番号	全赤血球中の多染性 赤血球の割合 ^{a)} (%)	小核を有する多染性赤 血球の出現頻度 ^{b)} (%)
陰性対照 [コーン油]	0	24	101	37.5	0.10
			102	55.0	0.15
			103	38.5	0.05
			104	52.5	0.00
			105	50.0	0.05
		平均±標準偏差		46.7 ± 8.14	0.07 ± 0.057
		最大値／最小値		55.0 / 37.5	0.15 / 0.00
被験物質 [(4-ヒドロキシフェニル) (2,3,4-トリヒドロキシ フェニル)メタン]	500	24	119	60.0	0.05
			120	56.0	0.10
			121	54.0	0.10
			122	66.0	0.00
			123	52.0	0.15
		平均±標準偏差		57.6 ± 5.55 #	0.08 ± 0.057
		最大値／最小値		66.0 / 52.0	0.15 / 0.00
	1000	24	125	53.0	0.15
			126	61.0	0.20
			127	50.0	0.10
			128	35.5	0.05
			129	50.5	0.15
		平均±標準偏差		50.0 ± 9.23	0.13 ± 0.057
	最大値／最小値		61.0 / 35.5	0.20 / 0.05	
2000	24	131	47.0	0.00	
		132	60.0	0.10	
		133	49.5	0.05	
		134	60.5	0.00	
		135	50.5	0.00	
平均±標準偏差		53.5 ± 6.29	0.03 ± 0.045		
最大値／最小値		60.5 / 47.0	0.10 / 0.00		
陽性対照 [MMC]	2	24	137	53.0	11.15
			138	65.0	9.75
			139	42.5	7.35
			140	48.5	7.30
			141	37.5	7.95
		平均±標準偏差		49.3 ± 10.56	8.70 ± 1.692 **
		最大値／最小値		65.0 / 37.5	11.15 / 7.30

MMC: マイトマイシンC

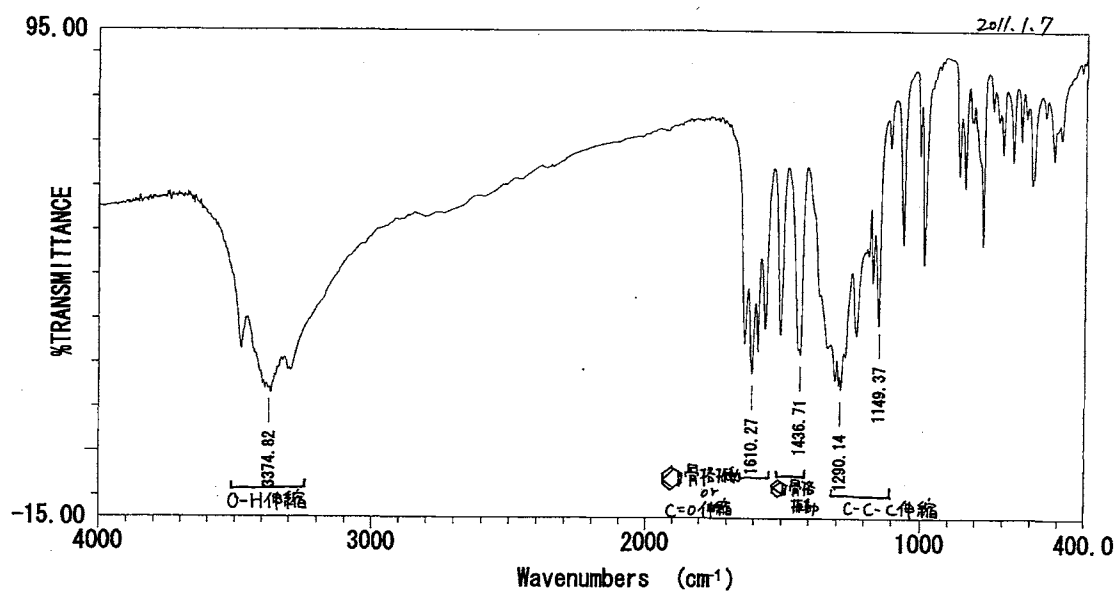
a) 赤血球200個/動物を観察

b) 多染性赤血球2000個/動物を観察

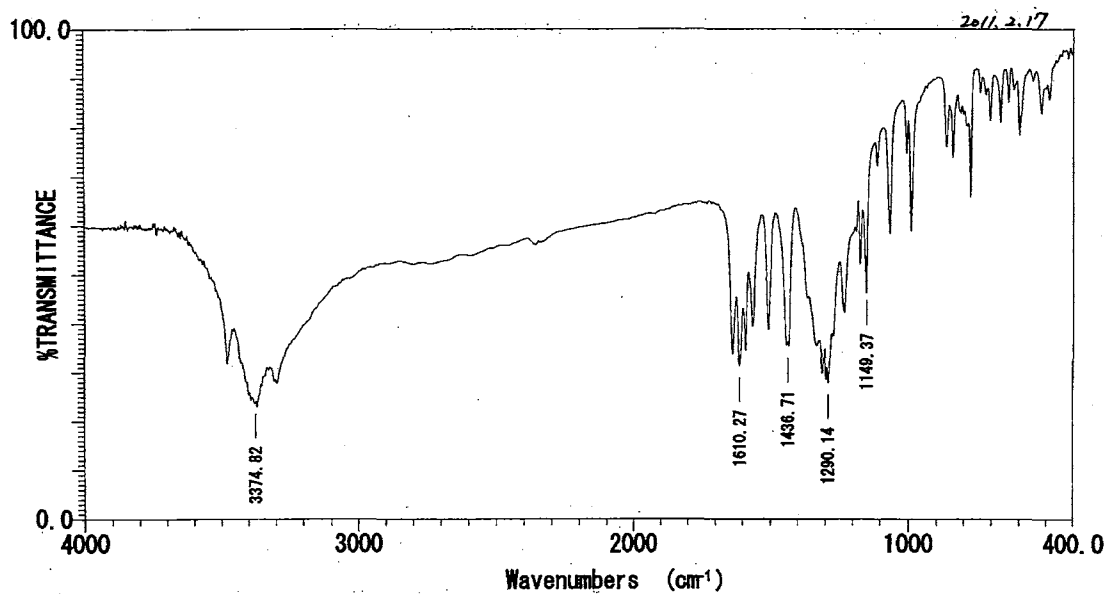
: 陰性対照との間に有意差(P<0.05)がみられた (Studentのt検定)

** : 陰性対照との間に有意差(P≤0.01)がみられた (条件付二項検定 (Kastenbaum and Bowman))

添付資料 1 被験物質の保管条件下での安定性確認結果



実験開始前の IR スペクトル



実験終了後の IR スペクトル

実験開始前の被験物質の赤外吸収スペクトル (IR スペクトル) において、被験物質の構造に由来する、主要な吸収が認められた。また、実験開始前及び実験終了後において測定した IR スペクトルに変化が認められなかったため、被験物質は保管条件下において実験期間中安定であったと判断された。

添付資料2 マウスを用いた小核試験の背景データ

対照の種類	全赤血球中の 多染性赤血球の割合	小核を有する多染性赤血球の出現頻度		実験数
	mean $\pm$ S.D.(%)	mean $\pm$ S.D.(%)	range(%)	
陰性対照	50.7 $\pm$ 4.76	0.10 $\pm$ 0.032	0.00 - 0.20 (mean $\pm$ 3 S.D.)	20
陽性対照	43.1 $\pm$ 4.21	5.79 $\pm$ 1.164	3.46 - 8.12 (mean $\pm$ 2 S.D.)	20

(当試験施設で実施した最新の20実験(2008年1月30日～2009年8月25日)の背景データ)

陽性対照は、MMCを2 mg/kg/dayで腹腔内に単回投与したもの

信頼性保証書

一般財団法人化学物質評価研究機構
日田事業所

試験委託者：厚生労働省

試験の表題：(4-ヒドロキシフェニル)(2,3,4-トリヒドロキシフェニル)メタノンの
マウス小核試験

試験番号：K11-0259

当試験は一般財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所の信頼性保証部門が監査又は査察を実施しており、監査又は査察を行った日付、試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下のとおりである。

監査又は査察対象	監査又は査察実施日	監査又は査察結果報告日
試験計画書	2011年1月5日	2011年1月5日
赤外吸収スペクトル測定	2011年1月7日	2011年1月7日
動物入荷	2011年1月11日	2011年1月11日
検疫・馴化	2011年1月11日	2011年1月11日
体重測定	2011年1月11日	2011年1月11日
被験物質の調製	2011年1月13日	2011年1月13日
調製液の均一性・濃度確認試験	2011年1月13日	2011年1月13日
群分け及び動物の識別	2011年1月17日	2011年1月17日
投与、一般状態観察	2011年1月18日	2011年1月18日
陽性対照物質の調製	2011年1月19日	2011年1月19日
解剖及び標本作製	2011年1月20日	2011年1月20日
染色	2011年1月24日	2011年1月24日
標本観察	2011年2月9日	2011年2月9日
記録類及び最終報告書草案	2011年2月24日	2011年2月24日
記録類及び最終報告書草案再査察	2011年2月25日	2011年2月25日
最終報告書草案(2回目)	2011年3月22日	2011年3月22日
最終報告書	2011年3月22日	2011年3月22日

本報告書には、試験で使用した方法、手順が正確に記載されており報告結果は試験の生データを正確に反映している。

2011年3月22日

信頼性保証責任者

