M-1255

最 終 報 告 書

試験名：C.I.フルオレセントブライトナー271 のマウスを用いた小核試験

試験番号：M-1255

試験施設
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

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
3. 試験実施概要 6
3.1 試験計画書 6
3.2 試験目的 6
3.3 試験委託者 6
3.4 試験受託者 6
3.5 試験実施施設 6

4. 要約 9
5. 緒言 10
6. 試験材料及び方法 11
6.1 被験物質、媒体及び陽性対照物質 11
6.1.1 被験物質 11
6.1.2 媒体 12
6.1.3 陽性対照物質 12
6.2 被験物質及び陽性対照物質の調製 12
6.2.1 被験液の調製 12
6.2.1.1 調製方法 12
6.2.1.2 保存方法 12
6.2.1.3 安定性 12
6.2.1.4 被験液の濃度確認 13
6.2.2 陽性対照物質の調製 14
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 15
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
7.1.3 骨髄塗抹標本の観察結果 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

表

Table 1	Clinical signs
Table 2	Body weight
Table 3	Observation of bone marrow smears (About 24 hours after administration)

3. 試験実施概要

3.1 試験計画書

試験番号 : M-1255
試験表題 : C.I.フルオレセントブライトナー271 のマウスを用いた小核試験

3.2 試験目的

マウス骨髄細胞を用いて、C.I.フルオレセントブライトナー271 の染色体異常誘発性の有無を明らかにした。なお、本試験は株式会社ボゾリサーチセンター動物実験委員会の承認を受けている。

3.3 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

3.4 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
(旧住所)
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

3.5 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

4. 要約

C.I.フルオレセントブライトナー271 の染色体異常誘発能の有無を検討するため、Crlj:CD1(ICR)系(SPF)マウスを用いた小核試験を実施した。

C.I.フルオレセントブライトナー271 の 500、1000 及び 2000 mg/kg を経口投与し、投与後約 24 時間に骨髄塗抹標本を作製した。また、陰性対照として注射用水、陽性対照としてマイトマイシンＣの 1 mg/kg を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は示さず、用量依存的な増加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、統計学的に有意な減少を示さなかったことから、骨髄細胞の増殖抑制作用は有さないと判断された。

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（当施設）の背景データの Mean±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、C.I.フルオレセントブライトナー271 は本試験条件下で Crlj:CD1(ICR)系(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。

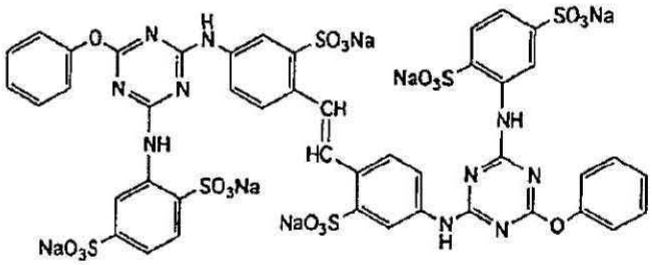
5. 緒言

本試験は、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、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した。なお、試験は以下の基準を遵守して行った。

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

名称	:	C.I.フルオレセントブライトナー271 C.I.Fluorescent brightner 271 ヘキサナトリウム=2,2'-{2,2'-ジスルホナトスチルベン-4,4'-ジイルビス[イミノ(6-フェノキシ-1,3,5-トリアジン-4,2-ジイル)イミノ]}ビス(ベンゼン-1,4-ジスルホナート) 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene)imino(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis, hexasodium salt
CAS 番号	:	41267-43-0
構造式及び示性式	:	 $C_{44}H_{28}N_{10}Na_6O_{20}S_6$
分子量	:	1347.08
ロット番号	:	
純度	:	88.7%
性状	:	淡黄色結晶
副成分及び不純分組成	:	NaCl 0.32%、水 6.3%、Na_2SO_4 0.01%、不明 2.56%
安定性	:	動物試験終了後に被験物質を製造業者で分析し安定であることを確認した（添付資料 2）。
保存方法	:	室温（実測値：16~25°C）、遮光、気密
保存場所	:	御殿場研究所　被験物質保存室及び第 1 研究棟　被験物質調製室

動物試験終了後の残量はすべて製造業者に返却した。

6.1.2 媒体

名称	:	注射用水
規格	:	日本薬局方
メーカー	:	株式会社大塚製薬工場
ロット番号	:	6F74（予備試験、本試験）
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	:	本被験物質は水に可溶であるため、注射用水を選択した。

6.1.3 陽性対照物質

名称	:	マイトマイシンC（以下、MMCと略す。）
ロット番号	:	473AEJ
規格	:	日抗基注射用
力価	:	2 mg/vial
メーカー	:	協和醗酵工業株式会社
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「毒性試験法ガイドライン」に従って選択した。

6.2 被験物質及び陽性対照物質の調製

6.2.1 被験液の調製

6.2.1.1 調製方法

各濃度ごとに被験物質（純度を補正し求めた必要量、換算係数 1.127）を秤取し、注射用水を加え溶解させて所定量にメスアップした。なお、被験液の残液は吸水性のよいペーパータオルに吸収させて焼却処分した。

6.2.1.2 保存方法

用時調製とし、保存しなかった。

6.2.1.3 安定性

本被験物質の1及び200 mg/mL溶液（媒体：注射用水）は、室温で24時間の安定性が確認されている（株式会社ボゾリサーチセンター：試験番号：A-1986）（添付資料3）。

6.2.1.4 被験液の濃度確認

本試験に使用した各濃度の被験液より各 10 mL 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 101.0~103.0 %で表示値±5%以内であり問題はなかった（添付資料 4）。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

以下の表に従い、測定試料を n=1 で採取し、注射用水を用いて希釈して測定実測試料を調製した。

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)	
200	0.5	100	0.5	50	20000
100	0.5	50	0.5	50	10000
50	0.5	25	0.5	50	5000

2) 測定条件

(1) 吸光光度法測定条件

測定波長 : 350 nm
対照試料 : 注射用水
セル : 1 cm 石英セル

(2) システム適合性

測定開始時に標準試料溶液の吸光度を 3 回連続測定し、吸光度の再現性を確認した。
評価基準：吸光度の相対標準偏差が 5%以下。

3) 測定試料中 C.I.フルオレセントブライトナー271 濃度の算出

標準試料溶液の吸光度を 3 回、測定実測試料の吸光度をそれぞれ 1 回ずつ測定し、以下の式により被験液中の C.I.フルオレセントブライトナー271 濃度を求めた。

$$\text{被験液中 C.I.フルオレセントブライトナー271 濃度 (mg/mL)} = \frac{Qt}{Qs} \times A \times F \times \frac{1}{1000}$$

Qt : 測定実測試料の C.I.フルオレセントブライトナー271 の吸光度
Qs : 標準試料溶液の C.I.フルオレセントブライトナー271 の平均吸光度
A : 標準試料溶液中の C.I.フルオレセントブライトナー271 濃度 (μg/mL)
F : 希釈率

6.2.2 陽性対照物質の調製

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

[注1]： 日本薬局方（株式会社大塚製薬工場、ロット番号：6F74）
[注2]： 日本薬局方（株式会社大塚製薬工場、ロット番号：6L70）

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〔Crlj: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 48 匹[注3]、本試験用として雄 42 匹[注4]を入手した。動物の入荷日を 1 日と数え、予備試験、本試験とも 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の観察を 1 日 1 回実施し、その結果をもとに異常のない動物（予備試験は雌雄各 36 匹、本試験は雄 30 匹）を選択し、8 週齢で試験に供した。試験系から除外された動物数は、予備試験が雌雄各 12 匹、本試験は雄 12 匹であった。

[注3]： 試験計画書に従い注文匹数は雌雄各 46 匹であったが、実際には雌雄各 48 匹が納入された。
[注4]： 試験計画書に従い注文匹数は雄 40 匹であったが、実際には雄 42 匹が納入された。

6.5 飼育条件

動物は温度（予備試験 22~23°C、本試験 23~24°C）、相対湿度（予備試験 46~61 %、本試験 46~57 %）、換気回数 1 時間当たり 10~15 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 110 号室、本試験 109 号室）で、床敷（ホワイトフレーク：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（W 155 × D 245 × H 150mm：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：061208（予備試験、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について分析したデータを、床敷は 2007 年 2 月に分析したデータを財団法人日本食品分析センター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東芝機械環境センター株式会社に定期的（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 403~498、本試験では 499~540 の番号が刻印された耳標を入荷時に装着した。

動物番号　：　群分け後は群ごとに 1 から始まる番号をつけた。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。本試験の場合、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。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、耳標番号及び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、異常がみられなかった個体を使用した。群分け当日（投与日）の体重により層別化し、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。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 32.6~37.6 g、雌 24.6~29.4 g、本試験が雄 32.3~35.5 g であった。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る）により行った。また、投与日における動物の週齢は 8 週齢であった。群分け後の余剰動物は、予備試験及び本試験とも動物試験終了日にエーテル深麻酔下で安楽死させた。

6.9　投与経路、投与方法及びそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口とした。投与容量は 10 mL/kg 体重とし、マウスにフレキシブル胃ゾンデを用いて 1 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。陰性対照群には媒体を同様に投与した。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 10 mL/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

予備試験における最高用量を毒性試験法ガイドラインで定める最高用量である 2000 mg/kg とし、以下公比 2 で除し、1000、500、250 mg/kg を設定した。骨髄採取時間は投与後約 24、48 及び 72 時間とし、該当する各 3 匹より、大腿骨骨髄細胞を採取し塗抹標本を作製後観察した。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)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	骨髄採取時間					
					投与後約 24 時間群		投与後約 48 時間群		投与後約 72 時間群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号	動物数	動物番号
低用量	250	25	10	雄 雌	3 3	101~103 111~113	3 3	104~106 114~116	3 3	107~109 117~119
中用量	500	50	10	雄 雌	3 3	201~203 211~213	3 3	204~206 214~216	3 3	207~209 217~219
高用量	1000	100	10	雄 雌	3 3	301~303 311~313	3 3	304~306 314~316	3 3	307~309 317~319
最高用量	2000	200	10	雄 雌	3 3	401~403 411~413	3 3	404~406 414~416	3 3	407~409 417~419

6.10.2 本試験

被験物質の投与量及び骨髄採取時期は以下のように決定した。

投与量は予備試験において、250、500、1000 及び 2000 mg/kg を単回投与した結果、投与後 3 日目に 2000 mg/kg 投与群の雌雄で軽度の体重の減少がみられたが、一般状態の変化、幼若赤血球数の減少及び死亡例等の毒性徴候はみられなかった。

したがって、予備試験における最高用量である 2000 mg/kg を本試験における高用量とし、以下公比 2 で除して、1000 及び 500 mg/kg 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 群当たりの動物数は 6 匹とした。

骨髄採取時期は、いずれの採取時間においても、各投与群で明白な小核誘発頻度の上昇が認められなかったため、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 1 mg/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)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号	骨髄採取時間 (投与後)
陰性対照群	0	0	10	雄	6	1001~1006	約 24 時間
低用量群	500	50	10	雄	6	2001~2006	約 24 時間
中用量群	1000	100	10	雄	6	3001~3006	約 24 時間
高用量群	2000	200	10	雄	6	4001~4006	約 24 時間
陽性対照群	1※	0.1※	10	雄	6	5001~5006	約 24 時間

※MMC の投与量及び濃度を示す。

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、各群の投与前、投与直後、投与後約 2 時間、また、投与翌日から骨髄採取終了日までは 1 日 1 回、体外表、栄養状態、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

6.11.2 体重測定

予備試験では、投与日と投与翌日から骨髄採取終了日まで、9:16~10:26 に測定した。
本試験では、投与日と投与翌日の骨髄採取日まで、9:14~11:33 に測定した。

6.11.3 骨髄塗抹標本の作製

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該当する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た。その後 1 mLディスポーザブル注射筒と 23G注射針を用いて、約 0.1~0.2 mLの牛胎児血清〔GIBCO BRL、ロット番号：1299355、1333207（予備試験）、1333207（本試験）〕で骨髄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髄細胞と牛胎児血清を混和して細胞をほぐし、1000 rpm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：EWQ0288（予備試験）、DPH1692（本試験）〕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。

6.11.4 骨髄塗抹標本の観察

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 1 枚を選択した。骨髄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 40 μg/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骨髄塗抹標本を載せた。波長 490 nm付近の励起光、観察用フィルターとして 515 nm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：オリンパス光学工業株式会社 BX40、ユニバーサル落射蛍光装置：オリンパス株式会社 BX-FLA）を用いて、総合倍率 600 倍で観察した。1 個体当たり全赤血球 200 個中の幼若赤血球（以下、PCEと略す）と正染性赤血球を計数し、同時にPCE 2000 個中の小核を有する幼若赤血球数（以下、MNPCEと略す）を計数した。

6.11.5 観察結果の判定

結果は以下についてまとめた。

1 個体について、2000 個の PCE に対する MNPCE 数とその出現頻度（%）、全赤血球 200 個中の PCE 数とその出現頻度（%）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算出した。

本試験では更に、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の出現率が当研究所（当施設）の背景データのMean±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]（片側、p≦0.05）並びにCochran Armitageの傾向検定[6]（両側、p≦0.05、0.01）を行った。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F検定[7]で等分散性（片側、p<0.05）を調べ、分散が等しかったためStudent のt検定（両側、p<0.05、0.01）7)を行った。

また、陽性対照群については、MNPCE の出現頻度（%）を陰性対照群と比較し、2項分布に基づく Kastenbaum&Bowman の検定（片側、p≦0.05）を行った。更に PCE の出現頻度についても、陰性対照群との間で F 検定で等分散性（片側、p<0.05）を調べ、分散が等しかったため Student の t 検定（両側、p<0.05、0.01）を行った。

7. 試験結果

7.1 予備試験

C.I.フルオレセントブライトナー271 の 250、500、1000 及び 2000 mg/kg を投与した。

7.1.1 一般状態

結果を Appendix 1-1 及び 1-2 に示した。

各被験物質投与群において、一般状態に変化は認められなかった。

7.1.2 体重

結果を Appendix 2-1 及び 2-2 に示した。

投与後 3 日目に 2000 mg/kg 投与群の雌雄で軽度の体重の減少がみられた

7.1.3 骨髄塗抹標本の観察結果

結果を Appendix 3-1~3-6 に示した。

投与後約 24、48 及び 72 時間に骨髄を採取し観察した結果、各被験物質投与群では MNPCE の出現頻度は、いずれの採取時間においても用量に依存した増加を示さなかった。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 PCE の出現頻度は、いずれの採取時間においても用量に依存した減少を示さなかった。

7.2 本試験

C.I.フルオレセントブライトナー271 の 500、1000 及び 2000 mg/kg、陰性対照として注射用水、陽性対照として MMC の 1 mg/kg を投与した。

7.2.1 一般状態

個体別の結果を Appendix 4 に、総括を Table 1 にそれぞれ示した。

陰性対照群、各被験物質投与群及び陽性対照群において、一般状態に変化は認められなかった。

7.2.2 体重

個体別の結果を Appendix 5 に、総括を Table 2 にそれぞれ示した。

陰性対照群、各被験物質投与群及び陽性対照群において、体重に変化は認められなかった。

7.2.3 骨髄塗抹標本の観察結果

個体別の結果を Appendix 6 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 500 mg/kg 投与群で 0.08±0.07 %、1000 mg/kg 投与群で 0.09±0.07 %、2000 mg/kg 投与群で 0.09±0.05 %を示した。これらの値

を陰性対照群の 0.10±0.05 %と比較した結果、いずれの投与群も統計学的に有意（$p \leqq 0.05$）な増加は示さず、用量依存的（$p \leqq 0.05$、0.01）な増加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統計学的に有意（$p < 0.05$、0.01）な減少を示さなかった。

なお、陽性対照群における MNPCE の出現頻度は、陰性対照群と比べて統計学的に有意（$p \leqq 0.05$）な増加を示したが、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統計学的に有意（$p < 0.05$、0.01）な減少を示さなかった。更に、陰性対照群及び陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、当研究所（当施設）の背景データの Mean±3S.D.の範囲内にあった。

8. 考察

C.I.フルオレセントブライトナー271 の染色体異常誘発能の有無を検討するため、Crlj:CD1(ICR)系(SPF)マウスを用いた小核試験を実施した。

投与量及び骨髄細胞の採取時期を決定するための予備試験では、雌雄マウスに 250、500、1000 及び 2000 mg/kg を単回投与した結果、投与後 3 日目に 2000 mg/kg 投与群の雌雄で軽度の体重の減少がみられたが、一般状態の変化、幼若赤血球数の減少及び死亡例等の毒性徴候はみられなかった。

したがって本試験では予備試験の最高用量に設定した 2000 mg/kg を高用量として 1000 及び 500 mg/kg を投与し、その約 24 時間後に骨髄の採取を行った。

その結果、骨髄細胞の増殖抑制及び MNPCE の出現頻度において、各被験物質投与群ともに陰性対照群に比べて有意な差は認められず、予備試験結果の再現性が確認された。

更に、陽性対照群における MNPCE の出現頻度は、陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加を示した。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（当施設）の背景データの Mean±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、C.I.フルオレセントブライトナー271 は本試験条件下で Crlj:CD1(ICR)系(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、C.I.フルオレセントブライトナー271 は、復帰突然変異試験で陰性、染色体異常試験では非常に弱い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[8,9]。

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) G. W. Snedecor, W. G. Cochran, "Statistical methods," 7, Iowa State University Press, 1980.
8) 嶋田佐和子　他：化学物質毒性試験報告書, 13, 419(2006).
9) 嶋田佐和子　他：化学物質毒性試験報告書, 13, 424(2006).

Table 1 A micronucleus test of C.I.Fluorescent brightner 271 in mice

Clinical signs

Group	Dose (mg/kg)		Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	1 day after administration
Negative control	0	Number of animals	6	6	6	6
		No abnormalities	6	6	6	6
Low	500	Number of animals	6	6	6	6
		No abnormalities	6	6	6	6
Middle	1000	Number of animals	6	6	6	6
		No abnormalities	6	6	6	6
High	2000	Number of animals	6	6	6	6
		No abnormalities	6	6	6	6
Positive control (Mitomycin C)	1	Number of animals	6	6	6	6
		No abnormalities	6	6	6	6

Table 2

A micronucleus test of C.I.Fluorescent brightner 271 in mice

Body weight

Group	Dose (mg/kg)		Day of administration	1 day after administration
Negative control	0	N	6	6
		Mean	33.6	33.8
		S.D.	1.1	1.1
Low	500	N	6	6
		Mean	33.6	33.6
		S.D.	0.9	1.0
Middle	1000	N	6	6
		Mean	33.6	33.9
		S.D.	1.0	1.1
High	2000	N	6	6
		Mean	33.6	33.6
		S.D.	0.9	1.1
Positive control (Mitomycin C)	1	N	6	6
		Mean	33.6	32.7
		S.D.	0.9	1.0

Unit : g

Table 3 A micronucleus test of C.I.Fluorescent brightner 271 in mice

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

Group	Dose (mg/kg)		No. of MNPCE in 2000 PCE	MNPCE(%)[a]	No. of PCE in 200 erythrocytes	PCE(%)[b]
Negative control	0	N	6	6	6	6
		Mean±S.D.	2 ± 1	0.10 ± 0.05	120 ± 3	59.8 ± 1.6
		Min./Max.		0.05 / 0.20		57.5 / 61.5
Low	500	N	6	6	6	6
		Mean±S.D.	2 ± 1	0.08 ± 0.07	118 ± 3	59.0 ± 1.6
		Min./Max.		0.00 / 0.20		57.5 / 61.5
Middle	1000	N	6	6	6	6
		Mean±S.D.	2 ± 1	0.09 ± 0.07	117 ± 4	58.3 ± 1.9
		Min./Max.		0.05 / 0.20		55.0 / 60.0
High	2000	N	6	6	6	6
		Mean±S.D.	2 ± 1	0.09 ± 0.05	118 ± 5	58.8 ± 2.5
		Min./Max.		0.05 / 0.15		54.0 / 61.0
Positive control (Mitomycin C)	1	N	6	6	6	6
		Mean±S.D.	28 ± 9	1.38 ± 0.46[c]	116 ± 2	58.1 ± 1.2
		Min./Max.		0.85 / 1.95		56.0 / 59.5

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

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

c): Statistically significant increase from the negative control value (Kastenbaum & Bowman's statistical table, $P \leq 0.05$)