

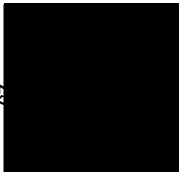
# 最終報告書

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

試験番号 : D851 ( 115-226 )

平成 25 年 3 月 18 日

試験委託者  
厚生労働省

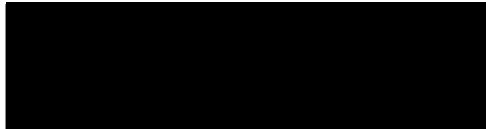
公益財団法人 食  安全性評価センター

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 Thiourea dioxide の遺伝子突然変異試験

試験番号： D851 ( 115-226 )

試験責任者：



平成 25 年 3 月 18 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.....	5
1. 表題.....	6
2. 試験目的.....	6
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.....	6
4. 試験番号.....	6
5. 試験施設.....	7
6. 試験委託者.....	7
7. 試験責任者.....	7
8. 被験物質等管理責任者.....	7
9. 分担責任者.....	7
10. 試験日程.....	7
11. 被験物質.....	8
12. 対照物質.....	10
13. 試験材料および方法.....	11
14. 試験成立条件.....	29
15. 結果.....	29
16. 考察および結論.....	32
17. 参考文献.....	33
18. 試験関係資料の保存.....	34
19. 予見することの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.....	34

Tables

Table 1	Mortality in dose-finding study of thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	35
Table 2	Gross findings in dose-finding study of thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	36
Table 3	Induction of mutation ( <i>gpt</i> assay) in liver of transgenic mice treated with thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	37

Table 4	Induction of mutation ( <i>gpt</i> assay) in bone marrow of transgenic mice treated with thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	38
Table 5	Induction of mutation ( <i>gpt</i> assay) in testis of transgenic mice treated with thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	39
Table 6	Induction of mutation ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> assay) in liver of transgenic mice treated with thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	40
Table 7	Induction of mutation ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> assay) in bone marrow of transgenic mice treated with thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	41
Table 8	Induction of mutation ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> assay) in testis of transgenic mice treated with thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	42
Appendices		
Appendix 1	Body weight in dose-finding study of thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	43
Appendix 2	Clinical observations in dose-finding study of thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	44
Appendix 3	Body weight in the gene mutation assay of thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	45
Appendix 4	Clinical observations in the gene mutation assay of thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	47
Appendix 5	Organ weight in the gene mutation assay of thiourea dioxide [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	54
Appendix 6	Individual gross findings on thiourea dioxide-treated transgenic mice for the gene mutation assay [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	56
	信頼性保証書.....	61

## 要 約

Thiourea dioxide 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。

1000, 300, 100 および 30.0 mg/kg の 4 用量について 1 日 1 回、約 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、1000 mg/kg 群では Day 2 に 3/3 例の死亡が認められた。300 mg/kg 群では Day 7 および 8 に 1/3 例の消瘦が認められ、3/3 例に体重の顕著な減少が認められた。100 mg/kg 群以下の投与群では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、剖検時の肉眼所見において、300 mg/kg 群では 2/3 例に前胃の肥厚が、1/3 例に胸腺の萎縮が認められたが、100 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、最大耐量付近と考えられる 200 mg/kg を高用量とし、公比 2 で除した 100 および 50.0 mg/kg の計 3 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、骨髄および精巣について *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、Thiourea dioxide 投与群の肝臓、骨髄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、骨髄および精巣で *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。また、*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別試験の肝臓を陽性対照として用いて *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、Thiourea dioxide 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 Thiourea dioxide 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 11-0237A).

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 66).

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

D851 ( 115-226 )



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

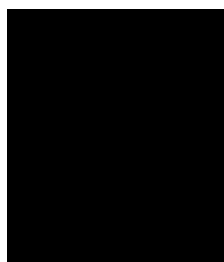
  
公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター  
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582 番地 2  
Tel: 0538-58-1291 Fax: 0538-58-1368  
E-mail: 

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 22 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





11.8. 保存場所

被験物質調製室, 室温保管庫

- 室温保管室 ch. 74

保存期間 : 2012 年 1 月 6 日 ~ 3 月 1 日 ( 受領日 ~ 試験責任者への配布日 )

実測値 : 20.1 ~ 22.3 °C

ネットワーク通信が不通の時間 ( 2012 年 1 月 8 日 ; 11 時 10 分 ) の保存温度は,  
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 )

- スチールロッカー (I) ch. 40

保存期間 : 2012 年 3 月 1 日 ~ 6 月 19 日 ( 試験責任者受領日 ~ 最終使用日 )

実測値 : 20.6 ~ 26.7 °C

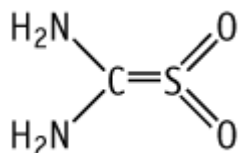
システム不具合発生の時間 ( 2012 年 3 月 10 日 ; 11 時 40 分 ) の保存温度は, バッ  
クアップデータで確認した.

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

11.9. CAS No.

4189-44-0

11.10. 化学構造



11.11. 分子式

CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S

11.12. 分子量

108.12

11.13. 物質の状態

白色の結晶性粉末

11.14. 溶解性

水にやや溶けやすく, エタノールおよびアセトンにほとんど溶けない.

11.15. 安定性

品質保証期間は未開封で購入後 1 年間

**11.16. 取り扱い上の注意**

酸化剤、金属類との接触または混合をさける。

吸入したり、眼、皮膚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。

**11.17. 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. 陰性対照物質**

被験物質液調製に媒体として使用するカルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）を陰性対照物質に選択した。

12.1.1. 対照物質名

カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）

12.1.2. ロット番号

WKK2269

12.1.3. 製造元

████████████████████

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，PIA 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：マウス

TG 試験：マウス (*gpt delta* トランスジェニックマウス)

##### 13.1.2. 系統

用量設定試験：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：24.6~27.2 g, TG 試験：24.7~28.8 g）

##### 13.1.5. 購入動物数

用量設定試験：雄 15 匹

TG 試験：雄 34 匹

##### 13.1.6. 使用動物数

用量設定試験：雄 12 匹

TG 試験：雄 34 匹

##### 13.1.7. 種・系統選択理由

用量設定試験：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), 22.5～23.0°C (TG 試験)]
湿度	55±20%RH [実測値：49.1～53.5%RH (用量設定試験), 44.2～62.8%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(東洋理工)を使用し、金属製網目飼育ケージ(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。

なお、台風の影響により空調機が停止したため、2012年6月19および20日に空気差圧が基準値を下回った(逸脱時間：3, 5および1分)。ただし、逸脱時間帯に飼育室の扉の開閉はなく、空気差圧も0 Pa 以上であったことから、試験の信頼性に影響しないと判断した。

### 13.2.2. 飼料

放射線滅菌固型飼料(CRF-1, Lot No. 110908 または 111109, 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, 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、2012年4月および10月に株式会社 エコプロ・リサーチで行い、2012年2, 3, 5, 6および7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, 第122682-3号および第126014-3号, 細菌検査：第GT12-02号, 第GT12-03号, 第GT12-05号, 第GT12-06号および第GT12-07号)については、上水道水質基準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

搬入後、動物の一般状態および体重の推移を観察し、試験環境に馴化させた。1日1回、7日間（TG試験：9日間）一般状態を観察し、搬入日（用量設定試験：Day -7、TG試験：Day -9）および検疫・馴化期間終了日（Day 1）に体重を測定した。なお、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。

### 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。用量設定試験の群分けにより除外された動物は、余剰動物として扱い、2012年3月9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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> （関東化学）	1.75	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> （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. 91002G, 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, 関東化学)	17.1	g
ダウンス緩衝液	100	mL

フィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{m}$ ) 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] <sup>注1)</sup>	20	mL

注 1) pH 8.0 の EDTA 溶液 (Lot No. 01572B, 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. 405N1130, 関東化学)	100	mL
TE 飽和フェノール (Lot No. 08002D または 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 <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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
調製量	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上記の試薬を添加した. 溶解後, 超純水で調製量に定容した. 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.

マルトース一水和物 (和光純薬工業)	20	g
調製量	100	mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ, スターラーで攪拌しながら上記の試薬を添加した. 溶解後, 超純水で調製量に定容した. 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33.9	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.0	g
NaCl	2.50	g
NH <sub>4</sub> Cl (和光純薬工業)	5.00	g

調製量 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

調製量 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。

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 24.6 g

調製量 100 mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ、スターラーで攪拌しながら MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O を添加した。溶解後、超純水で調製量に定容した。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。

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (和光純薬工業) 1.47 g

調製量 10 mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ、スターラーで攪拌しながら CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O を添加した。溶解後、超純水で調製量に定容した。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

調製量 10 mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ、スターラーで攪拌しながらチアミン塩酸塩を添加した。溶解後、超純水で調製量に定容した。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。



13.7.9. 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
調製量	100	mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ, スターラーで攪拌しながら各試薬を添加した. 溶解後, 超純水で調製量に定容した. フィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{m}$ ) 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 (Cm) 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
調製量	10	mL

クロラムフェニコールに調製量の 8 割程度のエタノール (関東化学) を加え溶解した. 溶解後, エタノールで調製量に定容した. フィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ ) 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, 東京化成工業)	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
バクタアガー (Lot No. 1279022 あるいは 2046914, 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, プレートをストックに入れ, 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.57	g
----------------------------------	------	---

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.82	g
---------------------------------	------	---

調製量	1000	mL
-----	------	----

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ, スターラーで攪拌しながら各試薬を添加した. 溶解後, 超純水で調製量に定容した. 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.  $\lambda$ -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, 冷蔵保存した.

13.7.17.  $\lambda$ -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. 0.5 w/v% CMC (媒体) の調製

媒体には, 「二酸化チオ尿素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」<sup>1)</sup>において媒体として使用された 0.5 w/v% CMC を選択した.

用量設定試験では, CMC 0.5 g を正確に秤量し, 約 80°C に加温した注射用水 (日本薬局方注射用水, 大塚蒸留水, Lot No. 1J85N, 大塚製薬工場) 80 mL に溶解させた. 溶解後冷却し注射用蒸留水を加えて 100 mL に定容した.

TG 試験では, CMC 1.0 g を正確に秤量し, 約 80°C に加温した注射用水 160 mL に溶解させた. 溶解後冷却し注射用蒸留水を加えて 200 mL に定容した.

いずれの場合も, 調製後冷蔵保存し, 2 週間以内に使用した.

13.8.2. 被験物質液の調製

被験物質を 0.5 w/v% CMC に懸濁させた.

用量設定試験では, 2000, 600, 200 および 60 mg を秤量し, それぞれをメノウ乳鉢に入れ, 乳棒ですりつぶした. 0.5 w/v% CMC を少しずつ加えながら乳棒ですり混ぜ,

均一に分散させた。懸濁液をメスシリンダーに移し、メノウ乳鉢および乳棒を 0.5 w/v% CMC 水溶液で洗い、洗液も先のメスシリンダーに入れた。0.5 w/v% CMC を加え、20 mL とすることにより 100, 30.0, 10.0 および 3.00 mg/mL 液を準備した。各調製液を各投与用に気密容器に小分けし、室温保管庫（温度基準 1~30°C, 実測値：20.7~22.2°C）にて保存後、それぞれの投与に用いた。

TG 試験では、700, 350 および 175 mg を秤量し、それぞれをメノウ乳鉢に入れ、乳棒ですりつぶした。0.5 w/v% CMC を少しずつ加えながら乳棒ですり混ぜ、均一に分散させた。懸濁液をメスシリンダーに移し、メノウ乳鉢および乳棒を 0.5 w/v% CMC で洗い、洗液も先のメスシリンダーに入れた。0.5 w/v% CMC を加え、35 mL とすることにより 20.0, 10.0 および 5.00 mg/mL 液を準備した。各調製液を各投与用に気密容器に小分けし、室温保管庫（温度基準 1~30°C, 実測値：22.4~23.4°C）にて保存後、それぞれの投与に用いた。

#### 13.8.3. 被験物質液の安定性

外部機関によって実施された「二酸化チオ尿素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」<sup>1)</sup>において、0.5 w/v% CMC 中の被験物質は、0.1~20 w/v%の濃度範囲で室温、散光下で少なくとも 9 日間安定であることが確認されている。

#### 13.8.4. 残余被験物質液の処分

専用の容器（安全廃棄システム, NALGENE<sup>®</sup>）に廃棄した。

#### 13.8.5. 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。

#### 13.8.6. 残余対照物質液の処分

専用の容器（安全廃棄システム, NALGENE<sup>®</sup>）に廃棄した。

### 13.9. 対照群

#### 13.9.1. 陰性対照群

被験物質液調製に用いる媒体である 0.5 w/v% CMC を使用した。

#### 13.9.2. 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<sup>2)</sup>により 100 mg/kg とし、肝臓、大腿骨および精巣を評価対象とした。*Spi* assay 用に、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine 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<sup>3)</sup>の肝臓を用いた。

### 13.10. 用量設定試験 (予備試験)

#### 13.10.1. 用量

外部機関により実施された試験の情報より, Thiourea dioxide を経口投与したときの LD<sub>50</sub> 値は, マウスで >600 mg/kg, ラットで 1120 mg/kg または 1565 mg/kg であった<sup>4),5)</sup>. また, ラットに 2 週間反復投与した結果, 1000 mg/kg で死亡が認められ, 200 mg/kg では死亡例は認められなかった<sup>1)</sup>. さらに, ラットに 49 日間反復投与した結果, 100 mg/kg において死亡例は認められなかった<sup>1)</sup>. したがって, 1000 mg/kg を最高用量とし, 300, 100 および 30.0 mg/kg の 4 用量を設定した.

#### 13.10.2. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg)	動物数	動物番号
被験物質	30.0	3	1101~1103
	100	3	1201~1203
	300	3	1301~1303
	1000	3	1401~1403

#### 13.10.3. 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, ディスポ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 mL とし, 群分け時の体重から投与液量 (mL) を求めた.

#### 13.10.4. 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. また, 死亡動物については死亡発見時に体重を測定した.

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.

#### 13.10.5. 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.

平成 24 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. 死亡動物については, 発見後直ちに剖検した.

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, 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.

### 13.11. トランスジェニック (TG) 試験<sup>6-8)</sup>

#### 13.11.1. 用量

用量設定試験の結果, 1000 mg/kg 群では Day 2 に 3/3 例の死亡が認められた. 300 mg/kg 群では Day 7 および 8 に 1/3 例の消瘦が認められ, 3/3 例に体重の顕著な減少が認められた. 100 mg/kg 以下の投与群では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, 剖検時の肉眼所見において, 300 mg/kg 群では 2/3 例に前胃の肥厚が, 1/3 例に胸腺の萎縮が認められたが, 100 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, 最大耐量付近と考えられる 200 mg/kg を高用量とし, 公比 2 で除した以下 100 および 50.0 mg/kg の計 3 用量を被験物質群として設定した.

#### 13.11.2. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg)	動物数		動物番号
		投与数	評価数	
陰性対照*	0	6	5	2001~2006
	50.0	6	5	2101~2106
被験物質	100	6	5	2201~2206
	200	10	5	2301~2310
陽性対照**	100	6	5	2401~2406

\* : 0.5% CMC    \*\* : ENU

#### 13.11.3. 投与動物数

評価数 5 匹を確保するため, 6 匹 (200 mg/kg 群については 10 匹) に投与した. 死亡例等が認められなかったことから, 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, 13.11.7.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.

#### 13.11.4. 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 mL とし, 13.11.6.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 mL とし, Day 1 の体重を基に算出した.

13.11.5. 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 -9) 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。

13.11.6. 体重測定および一般状態観察

Day -9 (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 -9 (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。

13.11.7. 器官 (臓器) 摘出、器官重量測定、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、大腿骨および精巣を摘出し、これら器官の肉眼観察を行った。また、用量設定試験において胃 (前胃) に肥厚が認められたため、胃についても摘出および肉眼観察を行った。なお、解剖室の出入り口にはネズミ返しを設置した。また、摘出した肝臓および精巣の重量を、電子天秤 (XS603S、メトラー・トレド) を用いて測定し、記録した。測定単位は g (小数第 2 位まで) とした。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]。

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 ヶ所程度くり抜いた。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 (LN<sub>2</sub>) 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、LN<sub>2</sub> 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、それぞれ別のマイクロチューブに入れ、LN<sub>2</sub> 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、LN<sub>2</sub> 中で凍結させた。

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、内容物を生理食塩液で洗い出した。その後、ビニール袋に入れ、LN<sub>2</sub> 中で凍結させた。

凍結後は、超低温フリーザー (CLN-35CW, 日本フリーザー, 設定値: -80°C, 基準値: -90~-60°C) 中に保存した。なお、胃については、遺伝子突然変異解析の対象としなかった。

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。

#### 13.11.8. 摘出器官の選択理由

肝臓: 本被験物質による影響が知られており、また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知られており、分裂・増殖が盛んな組織であるため。

精巣: 本被験物質による影響が知られており、次世代への影響を確認するため。

胃: 用量設定試験の結果、胃 (前胃) に肥厚が認められたため。

#### 13.11.9. ゲノム DNA の抽出

肝臓および精巣の場合、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、冷却した 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)。

これらの核/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、1~5 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 (100~200 µL) の TE 緩衝液 (ニッポンジーン) を加え、一晚室温に放置し、残渣の DNA



を溶解させた。調製後は、冷蔵にて保存した。

*Spi* assay の陽性対照は、試験番号 D848 において別試験の肝臓から抽出した DNA を用いた。

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。

#### 13.11.10. 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  $\mu$ L およびカナマイシン水溶液 (20 mg/mL) 30  $\mu$ L を添加した。これに凍結保存 (設定値:  $-80^{\circ}\text{C}$ ) しておいた大腸菌 YG6020 株を融解した後、50  $\mu$ L 接種した。37 $^{\circ}\text{C}$ 、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  $\mu$ L を添加し、次いで、先の前培養液 1.5 mL を接種した後、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、回収した菌液の 1/2 量の LB 培養液 (10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む) で再懸濁した (大腸菌懸濁液)。

#### 13.11.11. 試験菌株の準備 (*Spi* assay)

容量 200 mL のバツフル付三角フラスコ 2 本に LB 培養液を 30 mL ずつ添加し、これに凍結保存 (設定値:  $-80^{\circ}\text{C}$ ) しておいた大腸菌 (XL-1 Blue MRA) および大腸菌 [XL-1 Blue MRA (P2)] を融解した後、それぞれ 50  $\mu$ L ずつ接種した。37 $^{\circ}\text{C}$ 、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 2 本に、LB 培養液 100 mL およびマルトース水溶液 (200 mg/mL) 1 mL を添加し、前培養液をそれぞれ 1.5 mL ずつ接種した後、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、回収した菌液の 1/2 量の LB 培養液 (10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む) をそれぞれ添加し、再懸濁した (大腸菌懸濁液)。

Confirmation では、上記の大腸菌 2 菌株に大腸菌 [WL95 (P2)] を加えた 3 菌株について、同様に前培養液を調製した。容量 200 mL のバツフル付三角フラスコ 3 本に、LB 培養液 20 mL およびマルトース水溶液 (200 mg/mL) 0.2 mL を添加し、前培養液をそれぞれ 0.3 mL ずつ接種した後、2~6 時間程度培養を続け、同様に大腸菌懸濁液を調製した。

#### 13.11.12. 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  程度の濃度に調製したゲノム DNA 溶液のおよそ 10  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

#### 13.11.13. 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌し、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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

なお、1 回のパッケージング操作により総コロニー数が 30 万に達した。

#### 13.11.14. パッケージング溶液のプレーティング (Spi<sup>-</sup> 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌し、希釈液とした。希釈液をタイター用チューブ 2 本に 5  $\mu$ 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  $\mu$ 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、 $\lambda$ -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、 $\lambda$ -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トション用プレートとした。タイター用およびセレクトション用プレートは 37°C で一晩 (14~18 時間) 培養した。

総プラーク数が 30 万に達するまで上記のパッケージング操作、または、ゲノム DNA 抽出からパッケージング操作までを繰り返した。

13.11.15. 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、セレクト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。

13.11.16. 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。

13.11.17. 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。

セレクト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。セレクト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  $\mu$ L ずつ分注した。セレクト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 寒天培地、M9 + Cm + 6TG 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。

13.11.18. 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  $\mu$ L ずつ分注した。分注した小試験管に、 $\lambda$ -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  $\lambda$ -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。

セレクト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。セレクト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  $\mu$ L ずつ分注した。セレクト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  $\mu\text{L}$  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  $\lambda$ -trypticase 寒天培地に confirmation 液をそれぞれ 1~2  $\mu\text{L}$  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。

13.11.19. 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。

$$\begin{aligned} \text{総コロニー数} &= \text{タイター用プレートに出現したコロニー数} \times \text{Dilution Factor} \\ \text{総コロニー数} &= \frac{N \times 100 \times 300 (\mu\text{L})}{5 (\mu\text{L})} \\ &= 6000 \times N \end{aligned}$$

13.11.20. 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。

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

13.11.21. 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。

$$\begin{aligned} \text{総プラーク数} &= \text{タイター用プレートに出現したプラーク数} \times \text{Dilution Factor} \\ \text{総プラーク数} &= \frac{N \times 100 \times 300 (\mu\text{L})}{5 (\mu\text{L})} \\ &= 6000 \times N \end{aligned}$$

13.11.22. 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。

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

### 13.12. 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。

### 14. 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した。

### 15. 結果

#### 15.1. 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。

Thiourea dioxide 投与の 1000 mg/kg 群では Day 2 に 3/3 例の死亡が認められた。300 mg/kg 群では、Day 7 および 8 に 1/3 例の消瘦が認められ、3/3 例に体重の顕著な減少が認められた。100 mg/kg 以下の投与群では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、剖検時の肉眼所見において、300 mg/kg 群では 2/3 例に前胃の肥厚が、1/3 例に胸腺の萎縮が認められたが、100 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。

#### 15.2. トランスジェニック試験

##### 15.2.1. 肝臓

##### 15.2.1.1. *gpt* assay

試験結果を Table 3 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  $0.94 \pm 0.33 \times 10^{-6}$  (0.51~ $1.43 \times 10^{-6}$ ) であった。

Thiourea dioxide 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

50.0 mg/kg 群で  $1.22 \pm 0.51 \times 10^{-6}$ 、中用量の 100 mg/kg 群で  $1.17 \pm 0.68 \times 10^{-6}$ 、高用量の 200 mg/kg 群で  $1.34 \pm 0.98 \times 10^{-6}$  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 $\pm$ SD は  $6.32 \pm 1.41 \times 10^{-6}$  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。

#### 15.2.1.2. Spi 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 $\pm$ SD は  $3.61 \pm 2.27 \times 10^{-6}$  ( $0.00 \sim 6.10 \times 10^{-6}$ ) であった。

Thiourea dioxide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値 $\pm$ SD は、低用量の 50.0 mg/kg 群で  $3.46 \pm 2.09 \times 10^{-6}$ 、中用量の 100 mg/kg 群で  $2.09 \pm 3.03 \times 10^{-6}$ 、高用量の 200 mg/kg 群で  $3.72 \pm 4.18 \times 10^{-6}$  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 $\pm$ SD は  $12.65 \pm 3.56 \times 10^{-6}$  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。

#### 15.2.2. 骨髓

##### 15.2.2.1. gpt assay

試験結果を Table 4 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 $\pm$ SD は  $0.82 \pm 0.45 \times 10^{-6}$  ( $0.37 \sim 1.55 \times 10^{-6}$ ) であった。

Thiourea dioxide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値 $\pm$ SD は、低用量の 50.0 mg/kg 群で  $0.65 \pm 0.46 \times 10^{-6}$ 、中用量の 100 mg/kg 群で  $0.85 \pm 0.58 \times 10^{-6}$ 、高用量の 200 mg/kg 群で  $0.88 \pm 0.78 \times 10^{-6}$  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 $\pm$ SD は  $48.20 \pm 6.95 \times 10^{-6}$  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。

##### 15.2.2.2. Spi 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 $\pm$ SD は  $2.10 \pm 2.24 \times 10^{-6}$  ( $0.00 \sim 5.38 \times 10^{-6}$ ) であった。

Thiourea dioxide 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値 $\pm$ SD は、低用量の 50.0 mg/kg 群で  $1.83 \pm 1.26 \times 10^{-6}$ 、中用量の 100 mg/kg 群で  $1.96 \pm 1.51 \times 10^{-6}$ 、高用量の 200 mg/kg 群で  $1.12 \pm 0.72 \times 10^{-6}$  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。

### 15.2.3. 精巢

#### 15.2.3.1. *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  $0.29 \pm 0.22 \times 10^{-6}$  (0.00～ $0.61 \times 10^{-6}$ ) であった。

Thiourea dioxide 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 50.0 mg/kg 群で  $0.31 \pm 0.28 \times 10^{-6}$ 、中用量の 100 mg/kg 群で  $0.15 \pm 0.09 \times 10^{-6}$ 、高用量の 200 mg/kg 群で  $0.26 \pm 0.04 \times 10^{-6}$  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  $1.19 \pm 0.49 \times 10^{-6}$  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。

#### 15.2.3.2. *Spi* 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  $0.88 \pm 1.20 \times 10^{-6}$  (0.00～ $2.98 \times 10^{-6}$ ) であった。

Thiourea dioxide 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 50.0 mg/kg 群で  $0.80 \pm 0.68 \times 10^{-6}$ 、中用量の 100 mg/kg 群で  $0.43 \pm 0.34 \times 10^{-6}$ 、高用量の 200 mg/kg 群で  $0.49 \pm 0.82 \times 10^{-6}$  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。

### 15.2.4. 体重および一般状態観察

試験結果を Appendix 3 および 4 に示す。

いずれの Thiourea dioxide 投与群においても一般状態の変化は観察されなかった。体重の平均値は、200 mg/kg 群においてのみ減少が認められた。

### 15.2.5. 器官重量および器官重量／体重比

試験結果を Appendix 5 に示す。

いずれの Thiourea dioxide 投与群においても、陰性対照群と比較し、明確な器官重量および器官重量／体重比の変化は認められなかった。

### 15.2.6. 解剖時の肉眼所見

試験結果を Appendix 6 に示す。

Thiourea dioxide の 200 mg/kg 群では、2/10 例に前胃の肥厚が認められた。その他の群では特筆すべき変化は認められなかった。

## 16. 考察および結論

Thiourea dioxide の肝臓, 骨髄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性 (レポーター遺伝子: *gpt* および *red* と *gam*) を実施した.

1000, 300, 100 および 30.0 mg/kg の 4 用量について 1 日 1 回, 約 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, 1000 mg/kg 群では Day 2 に 3/3 例の死亡が認められた. 300 mg/kg 群では Day 7 および 8 に 1/3 例の消瘦が認められ, 3/3 例に体重の顕著な減少が認められた. 100 mg/kg 群以下の投与群では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, 剖検時の肉眼所見において, 300 mg/kg 群では 2/3 例に前胃の肥厚が, 1/3 例に胸腺の萎縮が認められたが, 100 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, 最大耐量付近と考えられる 200 mg/kg を高用量とし, 公比 2 で除した 100 および 50.0 mg/kg の計 3 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 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, 骨髄および精巣について *gpt assay* および *Spi* assay により遺伝子突然変異頻度を求めた. 胃については 200 mg/kg 群で 2/10 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. なお, ラットを用いた反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験<sup>1)</sup>においては, 100 mg/kg 群で肝臓および精巣の重量増加と組織学的所見, 腺胃のびらんまたは潰瘍, 骨髄の造血低下等が認められている.

その結果, Thiourea dioxide 投与群の肝臓, 骨髄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.

Thiourea dioxide は, 細菌を用いる復帰突然変異試験<sup>9)</sup>および CHL 細胞を用いる染色体異常試験<sup>10)</sup>において, 代謝活性化系の存在下および非存在下で陽性であるが, 既知変異原物質と比較して変異原性は弱いものと考えられた. 一方, マウスの骨髄を用いる小核試験では, 陰性との報告がある<sup>11)</sup>. 当該 *in vivo* 遺伝子突然変異試験で陰性結果が得られたことに関して, *in vitro* 試験では補われない第 2 相の代謝能により解毒されたかあるいは速やかに排泄されたためと推測した.

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, 骨髄および精巣で *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 で陽性結果が出ることが確認された別試験の肝臓を陽性対照として用いて



Spi<sup>-</sup> 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、Thiourea dioxide 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。

## 17. 参考文献

- 1) ████████ 二酸化チオ尿素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) パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所
- 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) 製品安全データシート No. JW201234, 和光純薬工業株式会社
- 5) ████████ 二酸化チオ尿素のラットを用いる単回経口投与毒性試験, (株) パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所
- 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<sup>-</sup> 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) ████████ 二酸化チオ尿素の細菌を用いる復帰突然変異試験, (財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
- 10) ████████ 二酸化チオ尿素のチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験, (財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
- 11) OECD SIDS. Methanesulfinic acid, aminoimino. CAS No: 1758-73-2.

**18. 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（2 g）
- 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）
- 摘出器官（臓器）
- 最終報告書（原本）
- その他の試験関係資料

**19. 予見することの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**

該当する事態はなかつた。

Table 1. Mortality in dose-finding study of thiourea dioxide  
 [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		
Thiourea dioxide	30.0	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	
	100	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	
	300	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	
1000	1401	Live	Dead								3 / 3	
	1402	Live	Dead									
	1403	Live	Dead									

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

Sex: Male		Group : Thiourea dioxide			
Group	Animal ID-No.	Classification	Experimental day	Organ	Findings and comments
30.0 mg/kg	1101	Sacrificed	8	Normal	
	1102	Sacrificed	8	Normal	
	1103	Sacrificed	8	Normal	
100 mg/kg	1201	Sacrificed	8	Normal	
	1202	Sacrificed	8	Normal	
	1203	Sacrificed	8	Normal	
300 mg/kg	1301	Sacrificed	8	Normal	
	1302	Sacrificed	8	Stomach Thymus	Thick, forestomach Atrophic
	1303	Sacrificed	8	Stomach	Thick, forestomach
1000 mg/kg	1401	Dead	2	Normal	
	1402	Dead	2	Normal	
	1403	Dead	2	Normal	

Table 3. Induction of mutation (*gpt* assay) in liver of transgenic mice treated with thiourea dioxide  
 [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. ( $\times 10^{-6}$ )
0.5% CMC	0	2001	2,877,000	3	1.04	0.94 $\pm$ 0.33
		2002	1,956,000	1	0.51	
		2003	2,793,000	4	1.43	
		2004	2,394,000	2	0.84	
		2005	2,220,000	2	0.90	
Thiourea dioxide	50.0	2101	2,577,000	2	0.78	1.22 $\pm$ 0.51
		2102	3,030,000	4	1.32	
		2103	1,476,000	3	2.03	
		2104	2,550,000	2	0.78	
		2105	2,517,000	3	1.19	
	100	2201	3,618,000	1	0.28	1.17 $\pm$ 0.68
		2202	2,364,000	4	1.69	
		2203	2,301,000	2	0.87	
		2204	1,011,000	2	1.98	
		2205	1,980,000	2	1.01	
	200	2301	921,000	2	2.17	1.34 $\pm$ 0.98
		2302	2,595,000	1	0.39	
		2303	1,917,000	5	2.61	
		2304	1,257,000	1	0.80	
		2305	1,374,000	1	0.73	
ENU	100	2401	1,071,000	7	6.54	6.32 $\pm$ 1.41 * (A)
		2402	2,049,000	13	6.34	
		2403	1,620,000	7	4.32	
		2404	1,800,000	11	6.11	
		2405	1,086,000	9	8.29	

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 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 4. Induction of mutation (*gpt* assay) in bone marrow of transgenic mice treated with thiourea dioxide  
 [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. ( $\times 10^{-6}$ )
0.5% CMC	0	2001	1,935,000	3	1.55	0.82 $\pm$ 0.45
		2002	2,688,000	1	0.37	
		2003	2,598,000	2	0.77	
		2004	1,716,000	1	0.58	
		2005	2,418,000	2	0.83	
Thiourea dioxide	50.0	2101	2,490,000	3	1.20	0.65 $\pm$ 0.46
		2102	2,436,000	1	0.41	
		2103	2,244,000	2	0.89	
		2104	2,706,000	2	0.74	
		2105	2,151,000	0	0.00	
	100	2201	2,559,000	2	0.78	0.85 $\pm$ 0.58
		2202	2,199,000	4	1.82	
		2203	2,772,000	2	0.72	
		2204	2,976,000	2	0.67	
		2205	4,230,000	1	0.24	
	200	2301	3,336,000	1	0.30	0.88 $\pm$ 0.78
		2302	2,652,000	1	0.38	
		2303	1,806,000	4	2.21	
		2304	3,252,000	3	0.92	
		2305	3,351,000	2	0.60	
ENU	100	2401	2,700,000	114	42.22	48.20 $\pm$ 6.95 * (A)
		2402	2,040,000	95	46.57	
		2403	1,815,000	80	44.08	
		2404	2,946,000	142	48.20	
		2405	2,085,000	125	59.95	

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 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 5. Induction of mutation (*gpt* assay) in testis of transgenic mice treated with thiourea dioxide  
 [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. ( $\times 10^{-6}$ )
0.5% CMC	0	2001	4,524,000	1	0.22	0.29 $\pm$ 0.22
		2002	3,234,000	1	0.31	
		2003	3,990,000	0	0.00	
		2004	6,069,000	2	0.33	
		2005	3,294,000	2	0.61	
Thiourea dioxide	50.0	2101	3,861,000	2	0.52	0.31 $\pm$ 0.28
		2102	6,075,000	0	0.00	
		2103	6,741,000	1	0.15	
		2104	4,689,000	1	0.21	
		2105	4,374,000	3	0.69	
	100	2201	4,734,000	1	0.21	0.15 $\pm$ 0.09
		2202	4,527,000	1	0.22	
		2203	5,868,000	0	0.00	
		2204	5,979,000	1	0.17	
		2205	6,174,000	1	0.16	
	200	2301	6,318,000	2	0.32	0.26 $\pm$ 0.04
		2302	7,626,000	2	0.26	
		2303	7,050,000	2	0.28	
		2304	4,767,000	1	0.21	
		2305	4,545,000	1	0.22	
ENU	100	2401	2,418,000	2	0.83	1.19 $\pm$ 0.49 * (S)
		2402	5,601,000	8	1.43	
		2403	6,621,000	5	0.76	
		2404	4,152,000	8	1.93	
		2405	6,030,000	6	1.00	

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 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)

(S): Student t test

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

Table 6. Induction of mutation (Spi<sup>-</sup> assay) in liver of transgenic mice treated with thiourea dioxide  
 [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. ( $\times 10^{-6}$ )
0.5% CMC	0	2001	588,000	2	3.40	3.61 $\pm$ 2.27
		2002	492,000	3	6.10	
		2003	390,000	0	0.00	
		2004	528,000	2	3.79	
		2005	630,000	3	4.76	
Thiourea dioxide	50.0	2101	489,000	1	2.04	3.46 $\pm$ 2.09
		2102	801,000	2	2.50	
		2103	303,000	2	6.60	
		2104	627,000	1	1.59	
		2105	660,000	3	4.55	
	100	2201	459,000	0	0.00	2.09 $\pm$ 3.03
		2202	519,000	2	3.85	
		2203	432,000	0	0.00	
		2204	453,000	3	6.62	
		2205	303,000	0	0.00	
	200	2301	354,000	0	0.00	3.72 $\pm$ 4.18
		2302	306,000	1	3.27	
		2303	390,000	0	0.00	
		2304	501,000	5	9.98	
		2305	561,000	3	5.35	
PhIP #	400 ppm	4-1	5,256,000	79	15.03	12.65 $\pm$ 3.56 * (S)
		4-2	2,103,000	18	8.56	
		4-3	2,439,000	35	14.35	

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 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 7. Induction of mutation (Spi<sup>-</sup> assay) in bone marrow of transgenic mice treated with thiourea dioxide  
 [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. ( $\times 10^{-6}$ )
0.5% CMC	0	2001	657,000	0	0.00	2.10 $\pm$ 2.24
		2002	918,000	0	0.00	
		2003	831,000	2	2.41	
		2004	366,000	1	2.73	
		2005	558,000	3	5.38	
Thiourea dioxide	50.0	2101	954,000	2	2.10	1.83 $\pm$ 1.26
		2102	909,000	1	1.10	
		2103	789,000	3	3.80	
		2104	2,184,000	1	0.46	
		2105	597,000	1	1.68	
	100	2201	1,164,000	2	1.72	1.96 $\pm$ 1.51
		2202	504,000	1	1.98	
		2203	1,086,000	2	1.84	
		2204	471,000	2	4.25	
		2205	4,194,000	0	0.00	
	200	2301	693,000	1	1.44	1.12 $\pm$ 0.72
		2302	900,000	1	1.11	
		2303	507,000	1	1.97	
		2304	1,839,000	2	1.09	
		2305	951,000	0	0.00	

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 10 mL/kg)

Table 8. Induction of mutation (Spi<sup>-</sup> assay) in testis of transgenic mice treated with thiourea dioxide  
 [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. ( $\times 10^{-6}$ )
0.5% CMC	0	2001	2,475,000	1	0.40	0.88 $\pm$ 1.20
		2002	2,655,000	2	0.75	
		2003	2,472,000	0	0.00	
		2004	336,000	1	2.98	
		2005	3,765,000	1	0.27	
Thiourea dioxide	50.0	2101	3,189,000	2	0.63	0.80 $\pm$ 0.68
		2102	6,177,000	0	0.00	
		2103	3,867,000	2	0.52	
		2104	1,107,000	2	1.81	
		2105	3,759,000	4	1.06	
	100	2201	2,679,000	2	0.75	0.43 $\pm$ 0.34
		2202	1,278,000	1	0.78	
		2203	4,509,000	1	0.22	
		2204	2,673,000	0	0.00	
		2205	2,586,000	1	0.39	
	200	2301	726,000	0	0.00	0.49 $\pm$ 0.82
		2302	519,000	1	1.93	
		2303	4,005,000	1	0.25	
		2304	3,711,000	1	0.27	
		2305	3,729,000	0	0.00	

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 10 mL/kg)

Appendix 1. Body weight in dose-finding study of thiourea dioxide  
 [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)				Gain (g)
			Day -7 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8 (Sacrificed)	Dead (Day 2)	
Thiourea dioxide	30.0	1101	23.0	25.1	24.8		-0.3
		1102	22.5	25.6	25.8		0.2
		1103	23.1	25.3	24.8		-0.5
		Mean±S.D.	22.9±0.3	25.3±0.3	25.1±0.6		-0.2±0.4
	100	1201	22.1	25.1	25.1		0.0
		1202	24.6	27.2	26.5		-0.7
		1203	24.4	25.5	26.1		0.6
		Mean±S.D.	23.7±1.4	25.9±1.1	25.9±0.7		0.0±0.7
	300	1301	24.3	26.7	24.1		-2.6
		1302	22.7	25.2	21.2		-4.0
		1303	24.0	25.6	23.1		-2.5
		Mean±S.D.	23.7±0.9	25.8±0.8	22.8±1.5		-3.0±0.8
1000	1401	22.1	24.6		23.6		
	1402	23.0	25.4		23.9		
	1403	24.5	25.8		24.6		
	Mean±S.D.	23.2±1.2	25.3±0.6		24.0±0.5		

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

Appendix 2. Clinical observations in dose-finding study of thiourea dioxide  
 [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	
Thiourea dioxide	30.0	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
	100	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
	300	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	Em	Em
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1000	1401	N	D							
		1402	N	D							
		1403	N	D							

N: Normal, D: Dead, Em: Emaciation

Appendix 3. Body weight in the gene mutation assay of thiourea dioxide  
 [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 -9 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)		
0.5% CMC	0	2001	25.9	26.4	26.4	26.6	26.4	26.7	26.8	0.4	
		2002	24.3	26.0	26.4	26.5	26.8	26.7	27.0	1.0	
		2003	26.3	28.8	27.9	27.3	28.3	27.8	27.7	-1.1	
		2004	24.4	25.1	24.9	25.5	25.3	25.6	25.6	0.5	
		2005	24.5	26.8	27.9	27.7	27.8	27.7	27.2	0.4	
		2006	25.0	26.5	26.6	27.0	27.7	28.1	27.6	1.1	
		Mean±S.D.	25.1±0.8	26.6±1.2	26.7±1.1	26.8±0.8	27.1±1.1	27.1±0.9	27.0±0.8	0.4±0.8	
Thiourea dioxide	50.0	2101	25.5	26.5	26.5	26.7	27.1	26.8	26.5	0.0	
		2102	24.4	25.2	24.9	25.2	26.5	26.0	25.8	0.6	
		2103	25.4	27.2	26.4	27.5	27.8	27.9	28.1	0.9	
		2104	26.4	26.8	26.8	27.0	27.7	27.2	27.6	0.8	
		2105	26.6	28.0	28.2	27.2	26.7	26.4	27.1	-0.9	
		2106	24.9	26.0	26.2	25.7	25.9	25.8	26.6	0.6	
	Mean±S.D.	25.5±0.8	26.6±1.0	26.5±1.1	26.6±0.9	27.0±0.7	26.7±0.8	27.0±0.8	0.3±0.7		
	100	100	2201	26.3	27.5	26.8	26.4	26.4	26.5	27.1	-0.4
			2202	24.0	26.0	25.7	25.7	25.9	24.9	25.7	-0.3
			2203	23.9	25.8	25.9	25.9	26.5	27.0	27.3	1.5
			2204	26.3	26.9	26.6	26.8	27.4	27.1	27.2	0.3
			2205	25.5	26.8	27.1	27.0	27.7	27.5	27.9	1.1
			2206	27.0	28.1	28.6	28.0	28.5	27.8	28.0	-0.1
Mean±S.D.	25.5±1.3	26.9±0.9	26.8±1.0	26.6±0.8	27.1±1.0	26.8±1.0	27.2±0.8	0.4±0.8			
200	200	2301	25.0	25.7	25.3	24.5	23.5	23.3	23.9	-1.8	
		2302	25.0	24.7	24.2	23.9	23.6	23.2	23.9	-0.8	
		2303	24.9	26.8	26.3	25.9	26.1	25.3	26.3	-0.5	
		2304	26.3	26.6	25.5	25.4	25.1	24.9	25.0	-1.6	
		2305	25.2	27.0	26.2	26.0	25.5	24.4	25.5	-1.5	
		2306	24.6	26.9	25.5	25.2	24.2	23.5	24.1	-2.8	
		2307	25.1	26.8	26.5	26.0	26.1	25.1	26.1	-0.7	
		2308	26.2	27.5	27.6	27.5	26.9	26.7	26.3	-1.2	
		2309	25.4	26.0	25.8	25.5	25.3	24.9	25.6	-0.4	
		2310	25.3	28.1	27.1	26.7	26.4	26.1	26.0	-2.1	
Mean±S.D.	25.3±0.5	26.6±1.0	26.0±1.0	25.7±1.0	25.3±1.2	24.7±1.2	25.3±1.0	-1.3±0.8			

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 10 mL/kg)

Gain= Sacrificed-Day 1(Allocated)

## Appendix 3. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Body weight (g)				Gain
			Day -9 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 13 (Sacrificed)		
ENU	100	2401	24.4	27.4	26.8	-0.6	
		2402	24.3	26.7	26.4	-0.3	
		2403	25.9	26.8	27.0	0.2	
		2404	26.3	28.7	27.5	-1.2	
		2405	24.8	27.8	27.1	-0.7	
		2406	25.1	25.3	25.5	0.2	
		Mean±S.D.	25.1±0.8	27.1±1.2	26.7±0.7	-0.4±0.5	

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

Gain= Sacrificed-Day 1 (Allocated)

Appendix 4. Clinical observations in the gene mutation assay of thiourea dioxide  
 [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	
0.5% CMC	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	
Thiourea dioxide	50.0	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	
	100	100	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
	200	200	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
2307			N	N	N	N	N	N	N	
2308			N	N	N	N	N	N	N	
2309			N	N	N	N	N	N	N	
2310			N	N	N	N	N	N	N	

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			1	2	3	4	5	6	7
ENU	100	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

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

N: Normal



## Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment							
			8	9	10	11	12	13	14	
0.5% CMC	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	
Thiourea dioxide	50.0	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	
	100	100	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
	200	200	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
		2307	N	N	N	N	N	N		
		2308	N	N	N	N	N	N		
		2309	N	N	N	N	N	N		
		2310	N	N	N	N	N	N		

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment					
			8	9	10	11	12	13
ENU	100	2401	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N
		2404	N	N	N	N	N	N
		2405	N	N	N	N	N	N
		2406	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 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment							
			15	16	17	18	19	20	21	
0.5% CMC	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	
Thiourea dioxide	50.0	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	
	100	100	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
	200	200	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
		2307	N	N	N	N	N	N		
		2308	N	N	N	N	N	N		
		2309	N	N	N	N	N	N		
		2310	N	N	N	N	N	N		

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment							
			22	23	24	25	26	27	28	
0.5% CMC	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	
Thiourea dioxide	50.0	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	
	100	100	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
	200	200	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
		2307	N	N	N	N	N	N		
		2308	N	N	N	N	N	N		
		2309	N	N	N	N	N	N		
		2310	N	N	N	N	N	N		

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment		
			29	30	31
0.5% CMC	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
Thiourea dioxide	50.0	2101	N	N	N
		2102	N	N	N
		2103	N	N	N
		2104	N	N	N
		2105	N	N	N
		2106	N	N	N
	100	2201	N	N	N
		2202	N	N	N
		2203	N	N	N
		2204	N	N	N
		2205	N	N	N
		2206	N	N	N
	200	2301	N	N	N
		2302	N	N	N
		2303	N	N	N
		2304	N	N	N
		2305	N	N	N
		2306	N	N	N
2307		N	N	N	
2308		N	N	N	
2309		N	N	N	
2310		N	N	N	

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 10 mL/kg)

N: Normal

Appendix 5. Organ weight in the gene mutation assay of thiourea dioxide  
 [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)	Organ weight(g) and organ weight per body weight(%)			
				Liver		Testis	
				(g)	(%)	(g)	(%)
0.5% CMC	0	2001	26.8	1.36	5.07	0.22	0.82
		2002	27.0	1.45	5.37	0.22	0.81
		2003	27.7	1.49	5.38	0.21	0.76
		2004	25.6	1.28	5.00	0.20	0.78
		2005	27.2	1.38	5.07	0.20	0.74
		2006	27.6	1.57	5.69	0.24	0.87
		Mean±S.D.	27.0±0.8	1.42±0.10	5.26±0.27	0.22±0.02	0.80±0.05
Thiourea dioxide	50.0	2101	26.5	1.37	5.17	0.20	0.75
		2102	25.8	1.07	4.15	0.19	0.74
		2103	28.1	1.44	5.12	0.22	0.78
		2104	27.6	1.40	5.07	0.21	0.76
		2105	27.1	1.32	4.87	0.21	0.77
		2106	26.6	1.43	5.38	0.22	0.83
		Mean±S.D.	27.0±0.8	1.34±0.14	4.96±0.43	0.21±0.01	0.77±0.03
	100	2201	27.1	1.54	5.68	0.21	0.77
		2202	25.7	1.53	5.95	0.23	0.89
		2203	27.3	1.43	5.24	0.22	0.81
		2204	27.2	1.46	5.37	0.22	0.81
		2205	27.9	1.42	5.09	0.22	0.79
		2206	28.0	1.48	5.29	0.21	0.75
Mean±S.D.	27.2±0.8	1.48±0.05	5.44±0.32	0.22±0.01	0.80±0.05		

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 10 mL/kg)

## Appendix 5. 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)	(%)
Thiourea dioxide	200	2301	23.9	1.28	5.36	0.22	0.92
		2302	23.9	1.03	4.31	0.17	0.71
		2303	26.3	1.53	5.82	0.20	0.76
		2304	25.0	1.32	5.28	0.20	0.80
		2305	25.5	1.51	5.92	0.22	0.86
		2306	24.1	1.30	5.39	0.21	0.87
		2307	26.1	1.44	5.52	0.22	0.84
		2308	26.3	1.37	5.21	0.22	0.84
		2309	25.6	1.43	5.59	0.21	0.82
		2310	26.0	1.40	5.38	0.21	0.81
		Mean±S.D.	25.3±1.0	1.36±0.14	5.38±0.44	0.21±0.02	0.82±0.06
ENU	100	2401	26.8	1.42	5.30	0.14	0.52
		2402	26.4	1.38	5.23	0.16	0.61
		2403	27.0	1.37	5.07	0.17	0.63
		2404	27.5	1.31	4.76	0.16	0.58
		2405	27.1	1.42	5.24	0.17	0.63
		2406	25.5	1.26	4.94	0.13	0.51
				Mean±S.D.	26.7±0.7	1.36±0.06	5.09±0.21

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

Appendix 6. Individual gross findings on thiourea dioxide-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
0.5% CMC	0	2001	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2002	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2003	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2004	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2005	Liver	-
			Bone marrow	-
Stomach	-			
Testis	-			
2006	Liver	-		
	Bone marrow	-		
	Stomach	-		
	Testis	-		

0.5% CMC: Negative control (0.5 w/v% carboxymethyl cellulose sodium salt aqueous solution, 10 mL/kg)  
 -: No remarkable change



## Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
Thiourea dioxide	50.0	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 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
Thiourea dioxide	100	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 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
Thiourea dioxide	200	2301	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	Thick, forestomach
		2302	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2303	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2304	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2305	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2306	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2307	Stomach	Thick, forestomach
			Testis	-
			Liver	-
		2308	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2309	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2310	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

## Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Organs	Findings
ENU	100	2401	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2402	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2403	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2404	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2405	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2406	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 Thiourea dioxide の遺伝子突然変異試験

試験番号： D851 ( 115-226 )

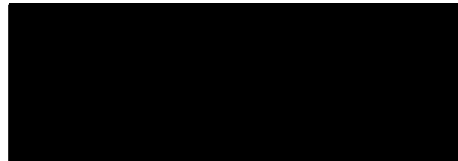
本試験は、新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について（平成23年3月31日薬食発0331第8号，平成23・03・29製局第6号，環保企発第110331010号）に従って実施され、本最終報告書に記載された成績は、試験の生データを正確に反映していることを保証する。

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18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 23 日	平成 24 年 2 月 23 日	
試験計画書の変更書 (#1)	平成 24 年 4 月 23 日	平成 24 年 4 月 23 日	
コンピュータプロトコール	平成 24 年 5 月 21 日	平成 24 年 5 月 21 日	
動物搬入	平成 24 年 5 月 21 日	平成 24 年 5 月 21 日	
被験物質液の調製	平成 24 年 5 月 29 日	平成 24 年 5 月 29 日	
群分けおよび投与開始	平成 24 年 5 月 30 日	平成 24 年 5 月 30 日	
標的器官摘出	平成 24 年 6 月 29 日	平成 24 年 6 月 29 日	
ゲノム DNA の抽出	平成 24 年 9 月 5 日	平成 24 年 9 月 5 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 10 月 2 日	平成 24 年 10 月 2 日	
コロニー計数	平成 24 年 10 月 29 日	平成 24 年 10 月 30 日	
生データおよび最終報告書 草案	平成 24 年 12 月 21, 25, 26 日	平成 24 年 12 月 27 日	
生データおよび最終報告書	平成 25 年 3 月 18 日	平成 25 年 3 月 18 日	