

最終報告書

4-(1-メチルエテニル)フェノールのラット小核試験

(試験番号：B070404)

株式会社三菱化学安全科学研究所

2. 目次	
1. 陳述書	2
2. 目次	3
3. 試験実施概要	6
3.1 表題	6
3.2 試験番号	6
3.3 目的	6
3.4 適用ガイドライン	6
3.5 適用 GLP	6
3.6 試験委託者	6
3.7 試験受託者	6
3.8 試験施設	6
3.9 試験責任者	7
3.10 分担責任者	7
3.11 試験従事者	7
3.12 試験日程	7
3.13 保存	8
3.14 保存する資料	8
3.15 動物の使用および福祉	8
4. 試験責任者署名	9
5. 要約	10
6. 材料および方法	11
6.1 被験物質	11
6.1.1 名称	11
6.1.2 CAS 番号	11
6.1.3 ロット番号	11
6.1.4 純度	11
6.1.5 保存条件	11
6.1.6 保管場所	11
6.1.7 提供者（製造元）	11
6.1.8 安定性の確認	11
6.1.9 取扱上の注意	11
6.1.10 残余被験物質の処理	12
6.2 対照物質	12
6.2.1 陰性対照物質（媒体）	12
6.2.2 陽性対照物質	12
6.3 試験動物	13
6.3.1 動物種	13

6.8.1	小核をもつ多染性赤血球の出現頻度	21
6.8.2	全赤血球中の多染性赤血球の割合	21
6.8.3	動物体重	21
6.9	試験結果の評価	21
6.10	コンピュータシステムの使用	22
7.	結果および考察	23
7.1	体重	23
7.2	一般状態	23
7.3	小核をもつ多染性赤血球の出現頻度および多染性赤血球の割合	23
8.	結論	25
9.	参考文献	26
10.	特記事項	27
10.1	予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある 事態	27
10.2	試験計画書に従わなかったこと	27
Tables		
Table 1	Body weight	28
Table 2	Clinical signs	30
Table 3	Results of micronucleus test	32
Appendices		
Appendix 1	Body weight (Quarantine period)	34
Appendix 2	Historical control data of rat micronucleus test in the testing facility	36
信頼性保証証明書		37

5. 要約

雌雄ラット [CrI:CD(SD), 投与時 7 週齢] を用いて, ラット骨髓細胞における 4-(1-メチルエテニル)フェノールの小核誘発性の有無を検討した.

雌雄共に 1 群 5 匹の動物に, 被験物質を 60, 200, 600 および 2000 mg/kg の用量で 2 回 (24 時間間隔) 強制経口投与した. 陰性対照物質 (0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム [CMC-Na] 水溶液) および陽性対照物質 (cyclophosphamide monohydrate, CP) についても同様の方法で投与した.

雌雄共に, 2000 mg/kg/day 群において死亡例が認められたため, 陰性対照群, 被験物質投与群の 60, 200, 600 mg/kg/day 群, そして陽性対照群の全動物について, 小核をもつ PCE (MNPCE) の出現頻度を求めた.

その結果, 雌雄共に, 被験物質群では陰性対照群と比較して, いずれの群でも MNPCE 数の有意な増加はみられなかった.

陰性対照群における MNPCE 出現頻度および PCE の割合の平均値は, いずれも試験施設の背景値の範囲内であり, また, 陽性対照群では有意で明らかな小核の誘発がみられた. 従って, 本試験は適切に実施されたと判断した.

以上の結果から, 被験物質の 4-(1-メチルエテニル)フェノールは本試験条件下において小核試験陰性と判定され, ラット骨髓細胞における染色体異常誘発性を有さないものと結論した.

6. 材料および方法

6.1 被験物質

6.1.1 名称

4-(1-メチルエテニル)フェノール [別名：*p*-イソプロペニルフェノール]

6.1.2 CAS 番号

4286-23-1

6.1.3 ロット番号

6.1.4 純度

99 %以上

6.1.5 保存条件

冷凍（-20℃）（許容範囲：-40～-15℃，受領日から実験終了後安定性確認日までの実測値：-24.4～-17.8℃），遮光，気密

6.1.6 保管場所

被験物質保管場所（69）

6.1.7 提供者（製造元）

三井化学株式会社

6.1.8 安定性の確認

試験施設において，投与前後に赤外吸収スペクトル（IR）法で赤外吸収スペクトルを測定し，被験物質の特性に変化がないことを確認した。

測定機器：島津フーリエ変換赤外分光光度計（FTIR-8300，株式会社島津製作所）

方法：

- (1) KBr 粉末をメノウ乳鉢で粉砕した。
- (2) 錠剤成型器（QP-1）でバックグラウンド用錠剤を作製した。
- (3) (1)の KBr 粉末 1 g と被験物質 5 mg をメノウ乳鉢で粉砕・混合した。
- (4) (2)と同様に錠剤を作製した。
- (5) (2)，(4)について，分光光度計にセットし，順に IR スペクトルを測定した。

6.1.9 取扱上の注意

皮膚および眼への接触，ならびに吸入を避けるため，保護具（ゴム手袋，眼鏡，マスク）を着用した。

6.1.10 残余被験物質の処理

被験物質の残余は実験終了後に廃棄した。

6.2 対照物質

6.2.1 陰性対照物質（媒体）

6.2.1.1 名称

0.5 w/v%CMC-Na 水溶液

[以下, 0.5 %CMC-Na]

(CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム)

6.2.1.2 製造元

CMC-Na：和光純薬工業株式会社

局方注射用水：（株）大塚製薬工場

6.2.1.3 ロット番号

CMC-Na：SDL2940

局方注射用水：7E91

6.2.1.4 保管条件

CMC-Na：室温（許容範囲：10～30℃，入手日から最終使用日までの実測値：16.5～29.0℃）

局方注射用水：室温（許容範囲：10～30℃，入手日から最終使用日までの実測値：19.4～24.6℃）

6.2.1.5 使用期限

CMC-Na：2011年6月9日

局方注射用水：2012年5月

6.2.2 陽性対照物質

6.2.2.1 名称

Cyclophosphamide monohydrate（略称：CP）

6.2.2.2 製造元

Sigma-Aldrich Corporation

6.2.2.3 ロット番号

036K1225

6.2.2.4 純度

99.5%

6.2.2.5 保管条件

冷蔵（許容範囲 1～10℃，入手日から最終使用日までの実測値：2.1～7.3℃）

6.2.2.6 使用期限

2009 年 3 月

6.2.2.7 陽性対照物質の選択理由

小核試験において広く使用され，適用ガイドラインにおいて例示，推奨されているため。

6.3 試験動物

6.3.1 動物種

ラット

6.3.2 動物種選択理由

小核試験に広く使用され，小核誘発性の評価に適した動物種であることが報告されている[1]。試験施設における背景データも豊富であり，また，多数の個体の入手が可能であるため。

6.3.3 系統

CrI:CD(SD)

6.3.4 系統選択理由

ラットを用いた小核試験に広く使用され，小核誘発性の評価に適した系統であることが報告されている[2]。試験施設における背景データも豊富であり，また，多数の個体の入手が可能であるため。

6.3.5 微生物制御レベル

SPF 動物

6.3.6 購入先

日本チャールス・リバー株式会社 筑波生産所

6.3.7 入荷時週齢

6 週齢

6.3.8 入荷動物数

雄 35 匹，雌 35 匹

6.3.9 検疫・馴化

検疫期間（動物入荷～検疫終了）は5日間とした。この間、全例について一般状態を1日1回観察し、健康状態が良好であることを確認するとともに、動物入荷日（2007年11月14日）および検疫終了日（2007年11月19日）に体重を測定し、体重増加に異常のないことを確認した。

検疫期間には動物の馴化も行い、検疫終了から投与開始直前までさらに馴化を継続した。その間、動物の一般状態を1日1回観察して異常がみられない動物を試験に使用した。

6.3.10 群分け

群分け時（2007年11月19日）に測定した体重をもとに、体重層別化無作為抽出法により、各群の平均体重がほぼ均一になるように、群分けした。

6.3.11 投与開始時週齢

7週齢

6.3.12 投与開始時週齢選択理由

小核誘発性の評価に適切な感度を持つ週齢であることが報告されており[3]、適用ガイドラインでも若い成熟げっ歯類の使用が推奨されている。試験施設における背景データも豊富であり、また、多数の個体の入手が可能であるため。

6.3.13 投与開始時体重

投与開始時（2007年11月20日）における全試験動物の体重範囲は雄 256～279 g、雌 180～215 g であり、平均体重（雄 266.9 g、雌 198.5 g） $\pm 20\%$ 以内（雄 213.5～320.3 g、雌 158.8～238.2 g）であった。

6.3.14 動物の識別

動物入荷時には群分け前の動物番号（検疫番号；雄：19001～19035、雌：59001～59035）の下1～2桁の数字を、群分け時には新たに群分け後の動物番号の下3桁の数字を油性ペンで尾にマーキングして個体識別した。ケージには検疫期間中（群分け前）は試験番号、ケージ番号、検疫番号、性、動物種および系統を記載したラベルを、また、群分け以降は試験番号、群分け後の動物番号、群名、用量、性、動物種および系統を記載したラベルを付けた。

6.3.15 余剰動物の処分法

試験に用いなかった余剰動物および標本作製に用いなかった生存動物は標本作製日（2007年11月22日）に、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール[®]、大日本住友製薬株式会社、ロット番号：48864Z721）麻酔下で開腹し、腹大動脈を切断、放血して安楽死させた。

6.4 動物飼育

6.4.1 飼育室

検疫期間は 6124 室，検疫終了から標本作製日までは 6125 室を使用した。

6.4.2 飼育環境

6.4.2.1 温度

許容範囲 19.0～25.0℃（実測値：21.6～23.4℃）

6.4.2.2 相対湿度

許容範囲 35.0～75.0%（実測値：50.0～63.3%）

6.4.2.3 換気

10～30 回/時，オールフレッシュエアー供給

6.4.2.4 照明時間

12 時間/日（7：00～19：00 点灯）

6.4.3 飼育器材

6.4.3.1 ケージ

オートクレーブ滅菌したポリカーボネート製ケージ，TR-PC-200（265W×426D×200H mm，トキワ科学器械株式会社）を使用し，群分け時に交換した。

6.4.3.2 給餌器

オートクレーブ滅菌したステンレス製固型飼料用給餌器（トキワ科学器械株式会社）を使用し，群分け時に交換した。

6.4.3.3 給水瓶

オートクレーブ滅菌したポリカーボネート製給水瓶（700 mL，トキワ科学器械株式会社）を使用し，群分け時に交換した。

6.4.3.4 架台

ベンザルコニウム系特殊洗剤（マイクロカット[®]，エコラボ株式会社）希釈液で消毒したスチール製架台（トキワ科学器械株式会社）を使用し，群分け時に交換した。

6.4.4 床敷

6.4.4.1 種類

オートクレーブ滅菌した実験動物用床敷（ベータチップ[®]，日本チャールス・リバー株式会社）の上に，オートクレーブ滅菌したステンレス製スノコ（トキワ科学器械株式会社）を敷き，ケージ交換時に交換した。

6.4.4.2 汚染物質の確認

財団法人日本食品分析センターで定期的実施した分析結果を日本チャールス・リバー株式会社より入手し、残留農薬等の汚染物質濃度が試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

6.4.5 飼料

6.4.5.1 種類

実験動物用固型飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株式会社, ロット番号: 070911)

6.4.5.2 給餌法

自由摂取とし、群分け時に給餌器ごと 1 回交換し、その他 2007 年 11 月 16 日に 1 回追加を行った。

6.4.5.3 汚染物質の確認

財団法人日本食品分析センターで実施した分析結果をオリエンタル酵母工業株式会社より入手し、使用したロットの残留農薬等の汚染物質濃度が試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

6.4.6 飲用水

6.4.6.1 種類

5 μ m フィルターろ過後、紫外線照射した水道水。

6.4.6.2 給水法

自由摂取とし、群分け時に給水瓶ごと交換し、その他 2007 年 11 月 16 日に 1 回水交換を行った。

6.4.6.3 分析

株式会社ダイヤ分析センターで水質検査を定期的実施し、得られた分析値 (2007 年 2 月 28 日および 8 月 28 日採水) が試験施設の標準操作手順書の基準に適合することを確認した。

6.4.7 収容匹数

群分け前、群分け後ともに 1 ケージあたり 5 匹とした。

6.5 被験物質投与液の調製

用時 (各投与日毎の) 調製とし、紫外線をカットした照明下で実施した。

- (1) 下表の通り被験物質を秤量し、メノウ乳鉢に移した。
- (2) 乳鉢内で十分に磨砕後、媒体を少量ずつ加え混合し、均一な懸濁液とした。
- (3) 懸濁液を媒体で共洗いしながら定容器に移した。

- (4) 所定濃度になるように媒体でメスアップした。
 (5) よく攪拌した後、褐色容器に移した。

濃度 (mg/mL)	被験物質秤量値 (g)	定容量 (mL)
6	0.36	60
20	1.20	60
60	3.60	60
200	12.0	60

6.6 対照物質の調製

6.6.1 陰性対照物質（媒体）

- (1) CMC-Na を 5 g 秤量した。
 (2) 約 800 mL の局方注射用水（株式会社大塚製薬工場）を攪拌しながら、CMC-Na を少しずつ加え溶解させた。
 (3) 局方注射用水で 1000 mL にメスアップした。
 (4) 冷蔵（許容範囲：1～10℃，調剤から最終使用までの実測値：3.8～5.7℃）保管し，調製後 3 日以内に使用した。

6.6.2 陽性対照物質の調製

紫外線をカットした照明下で調製した。

- (1) CP を 300 mg 秤量した。
 (2) 日本薬局方注射用水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号：7E91）を加え 150 mL とし，超音波処理により溶解した（2 mg/mL 溶液）。
 (3) 投与回毎に小分けし，冷蔵（許容範囲：1～10℃，調剤から最終使用までの実測値：3.8～5.7℃），遮光下で保管した。
 (4) 投与時は 30 分以上室温に放置した後に使用した。また，投与液は調剤後 3 日以内に使用した。

6.7 小核試験

6.7.1 投与

6.7.1.1 経路

強制経口投与とした。

6.7.1.2 経路選択理由

小核試験に広く用いられ，小核誘発性の評価に適した投与経路であることが報告されている[4]。また，適用ガイドラインにおいて例示されているため。

6.7.1.3 投与回数

2 回投与（24 時間間隔）とした。

6.7.1.4 投与回数選択理由

1 回の標本作製で小核誘発のピークを確実に捕らえるための投与回数として適しており[5]，適用ガイドラインで認められているため。

6.7.1.5 投与量およびその設定理由ならびに投与液量

用量設定試験（試験番号 B070418）は 100, 200, 400, 800 mg/kg/day の 4 用量（雌雄；n=3）を設定し，本試験と同様の投与条件にて実施した。この結果、雌雄ともに最高用量である 800 mg/kg/day 群でも死亡例がみられなかったことから，本試験での最高用量は雌雄共に 2000 mg/kg/day とした。公比 2 で用量設定すると 2 番目の用量（1000 mg/kg/day）も用量設定試験で実施していない未知の用量となり，上位 2 用量で多数の動物が死亡し試験不成立となる可能性も否定できなかったため，雌雄共に公比をガイドラインで認められる最大の $\sqrt{10}$ として 2000 mg/kg/day 以下 600, 200, 60 mg/kg/day の計 4 用量を設定した。

また，媒体（0.5%CMC-Na）のみを投与する陰性対照群および小核を誘発する CP 20 mg/kg/day を投与する陽性対照群を設定した。

1 回の投与液量は，いずれの処理群も体重 1 kg あたり 10 mL とし，各投与直前に測定した体重に基づいて算出した。

6.7.1.6 投与方法

ディスポーザブル注射筒にラット用胃ゾンデを装着したものをを用いて投与した。また，被験物質投与液についてはマグネチックスターラーで攪拌し，均一な懸濁液を投与した。

6.7.1.7 投与方法選択理由

ラットの強制経口投与に通常用いられているため。

6.7.2 動物数

1 群あたり 5 匹とした。

6.7.3 群構成

雄

処 理 群	投与量 (mg/kg/day)	投与 回数	投与 経路	標本作製 時期	動物数	動物番号
陰性対照群 (0.5%CMC-Na)	0	2	p.o.	最終 投与後 24 時間	5	10101～10105
被験物質群 (4-(1-メチルエテニ ル)フェノール)	60	2	p.o.		5	10201～10205
	200	2	p.o.		5	10301～10305
	600	2	p.o.		5	10401～10405
	2000	2	p.o.		5	10501～10505
陽性対照群 (CP)	20	2	p.o.		5	10601～10605

雌

処 理 群	投与量 (mg/kg/day)	投与 回数	投与 経路	標本作製 時期	動物数	動物番号
陰性対照群 (0.5%CMC-Na)	0	2	p.o.	最終 投与後 24 時間	5	50101～50105
被験物質群 (4-(1-メチルエテニ ル)フェノール)	60	2	p.o.		5	50201～50205
	200	2	p.o.		5	50301～50305
	600	2	p.o.		5	50401～50405
	2000	2	p.o.		5	50501～50505
陽性対照群 (CP)	20	2	p.o.		5	50601～50605

6.7.4 体重測定

各投与日の投与直前および標本作製前に体重測定を行った。死亡動物は発見時に測定を行った。

6.7.5 一般状態観察

一般状態の観察は、各投与前（初回投与前の観察は最終馴化の観察と兼ねた）、各投与終了から 1 時間、各投与終了の 3 時間後および標本作製前に実施した。

6.7.6 標本作製時期

最終投与後 24 時間とした。

6.7.7 標本作製時期設定理由

複数回投与の骨髓を用いた小核試験において、小核誘発のピークを確実に捕らえ

るための標本作成時期として適しており[5], 適用ガイドラインで認められているため。

6.7.8 標本作製

標本作製は、評価に用いる動物（6.7.9 項）について実施した。

- (1) ラットをペントバルビタールナトリウム（ネンブタール[®]、大日本住友製薬株式会社、ロット番号：48864Z721、腹腔内投与）麻酔下で開腹し、腹大動脈を切断、放血して安楽死させた後、大腿骨を摘出し、その両骨端を切断した。
- (2) 約 0.5 mL の 10%中性緩衝ホルマリンで骨髓細胞を洗出し、細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液にさらに 10%中性緩衝ホルマリンを 0.5 mL 加えて、5 分間静置してから上清を分取した。
- (3) 分取した上清に 10%中性緩衝ホルマリンを 1 mL 加え、1000 rpm（約 170×g）で 5 分間遠心分離した後、上清を捨てた。
- (4) 沈渣と少量残った 10%中性緩衝ホルマリンとを混合し、均一な骨髓細胞懸濁液を作り、室温で保存した。
- (5) 骨髓細胞懸濁液を観察直前に同量の 0.05 w/v%アクリジン・オレンジ溶液で染色し、スライドガラスに伸展した。

6.7.9 評価に用いる動物

陰性対照群、陽性対照群については生存した全動物について評価した。被験物質群については、雌雄とも 2000 mg/kg 群で各 1 例の死亡が認められたため、全例生存した 3 用量（60, 200, 600 mg/kg）を選択し、その全動物について評価した。

6.7.10 標本の観察

標本は B 励起の蛍光顕微鏡を用いてブラインド法により観察した。観察は個体毎に全赤血球〔多染性赤血球（PCE）および正染性赤血球（NCE）〕1000 個における PCE の割合を調べると共に、PCE 2000 個中の小核をもつ PCE（MNPCE）数を数えた（2 領域、合計 2000 個）。細胞の識別は Hayashi ら[6]の方法に従い、PCE は赤血球の細胞質が赤色蛍光色のもの、NCE は赤血球の細胞質が蛍光を発しないものとしてそれぞれを区別した。また、赤血球の細胞質中に黄緑色の蛍光を放つ小体を小核とした。

6.8 統計処理

MNPCE の出現数、PCE の割合および動物体重について統計処理を実施した。以下に記載した検定方法について、有意水準が 5%と 1%の両者が記載されているものは、先ず 5%の有意水準で検定を実施した。有意差がみられない場合には 1%の有意水準による検定は実施しなかった。

6.8.1 小核をもつ多染性赤血球の出現頻度

Kastenbaum と Bowman の統計学的方法[7]を用いて、被験物質群および陽性対照群の MNPCE の出現数（合計値）について、陰性対照群と比較した（有意水準：上側 5%および上側 1%）。

6.8.2 全赤血球中の多染性赤血球の割合

- (1) 全赤血球中の PCE の割合について、安全性試験システム（MiTOX, 三井造船システム技研株式会社）を使用して、検定を行った。
- (2) Bartlett 検定により、陽性対照群を除いた各群間の等分散性を検定した（有意水準：5%）。
- (3) Bartlett 検定の結果、全て等分散であったため、それぞれ Williams 検定により陰性対照群と各被験物質群との間の検定を行った（有意水準：両側 5%）。
- (4) Williams 検定で有意でない場合、Dunnett 検定を用いて陰性対照群と各被験物質群との平均値の差の検定を行った（有意水準：両側 5%）。
- (5) 陽性対照群については、F 検定により陰性対照群との間の等分散性の検定を行った（有意水準：5%）。
- (6) F 検定の結果、全て等分散であったため、それぞれ Student の *t*-検定により平均値の差の検定を行った（有意水準：両側 5%および 1%）。

6.8.3 動物体重

- (1) 各投与日の投与開始直前および標本作製前に測定した動物の体重について、安全性試験システム（MiTOX, 三井造船システム技研株式会社）を使用して、検定を行った。
- (2) Bartlett 検定により、陽性対照群を除いた各群間の等分散性を検定した（有意水準：5%）。
- (3) Bartlett 検定の結果、全て等分散であったため、それぞれ Williams 検定により陰性対照群と各被験物質群との間の検定を行った（有意水準：両側 5%）。
- (4) Williams 検定で有意でない場合、Dunnett 検定を用いて陰性対照群と各被験物質群との平均値の差の検定を行った（有意水準：両側 5%）。
- (5) 陽性対照群については、F 検定により陰性対照群との間の等分散性の検定を行った（有意水準：5%）。
- (6) F 検定の結果、全て等分散であったため、それぞれ Student の *t*-検定により平均値の差の検定を行った（有意水準：両側 5%および 1%）。

6.9 試験結果の評価

MNPCE の有意な増加が認められ、その増加に用量反応性が認められた場合を陽性と判定した。

6.10 コンピュータシステムの使用

以下に示すデータの収集, 集計, 算出および解析には安全性試験システム (MiTOX, 三井造船システム技研株式会社) を使用した。当該システムのコンピュータプロトコールにはデータ収集範囲, データ収集の日程 (初回投与日を第 1 日とする) 等を登録した。コンピュータシステムのプロトコール番号として B070404_ (アンダーバーは空白) を用いた。

生データの収集およびデータの集計：一般状態, 体重

データの集計：群分け, 投与液量算出, 全赤血球中の多染性赤血球の割合

7. 結果および考察

7.1 体重 (Table 1)

雌雄共に、陰性対照群では、試験期間を通じて順調な体重増加が認められた。被験物質投与群では雌雄共に 600 mg/kg/day 群の標本作製前体重および 2000 mg/kg/day 群の 2 回目投与直前体重と標本作製前体重において、陰性対照群と比較して統計学的に有意な ($p \leq 0.05$) 低値が認められた。その他、雌雄共に 600 mg/kg/day 群において 2 回目投与直前体重が前日より減少していた。また、陽性対照群では雌雄共に陰性対照群と比較して統計学的に有意な差はみられなかったが、雌では 2 回目投与直前の体重が前日より減少していた。

7.2 一般状態 (Table 2)

雌雄共に 60, 200, 600 mg/kg/day 群では一般状態の異常はみられなかった。

雄の 2000 mg/kg/day 群では初回投与後 1 時間までに 2 例で軽度な自発運動の低下が認められた。この 2 例では初回投与 3 時間後にも軽度な自発運動の低下が認められた他、流涎がみられたが、いずれの所見も 2 回目投与前には回復していた。しかしながら、この内 1 例は 2 回目投与後 1 時間までに重度な自発運動の低下、呼吸緩徐、側臥位を示し、死亡した。

雌の 2000 mg/kg/day 群では初回投与後 1 時間までに 3 例で軽度な自発運動の低下が認められ、2 回目投与前まで継続した。この内 2 例では軽度な自発運動の低下は標本作製前の観察まで継続してみられたが、1 例は 2 回目投与後 1 時間までに重度な自発運動の低下、呼吸緩徐、腹臥位を示し、2 回目投与 3 時間後にも重度な自発運動の低下、腹臥位を示し、標本作製前の観察時点で死亡していた。1 回目の投与では一般状態に変化のみられなかった 2 例についても、2 回目投与後 1 時間までに軽度な自発運動の低下が認められ、この所見は標本作製前の観察まで継続した。

7.3 小核をもつ多染性赤血球の出現頻度および多染性赤血球の割合 (Table 3) (雄)

10000 個 (2000 個×5 匹/群) の PCE 中の MNPCE 出現数は、陰性対照群で 10 個 (出現頻度: $0.10 \pm 0.06\%$)、被験物質群では 60, 200 および 600 mg/kg/day 群でそれぞれ 14, 10 および 3 個 (出現頻度はそれぞれ 0.14 ± 0.05 , 0.10 ± 0.05 および $0.03 \pm 0.04\%$) であり、陰性対照群と比較していずれも有意な増加はみられなかった。

赤血球中の PCE の割合は、被験物質の 60, 200 および 600 mg/kg/day 群でそれぞれ $49.9 \pm 10.1\%$, $55.0 \pm 5.6\%$, $48.7 \pm 7.0\%$ であり、陰性対照群 ($52.5 \pm 3.8\%$) と比較していずれも有意差はみられず、被験物質投与による造血系への影響はないものと判断した。

一方、陽性対照群では MNPCE 出現数は 484 個（出現頻度： $4.84 \pm 1.66\%$ ）であり、MNPCE 出現数が陰性対照群と比較して有意な（ $p \leq 0.01$ ）高値を示した。このとき、赤血球中の PCE の割合は $20.6 \pm 3.5\%$ であり、陰性対照群に対して有意な（ $p \leq 0.01$ ）低値を示した。

陰性対照群の MNPCE 出現頻度および PCE の割合の平均値は、いずれも試験施設の背景値の範囲（Appendix 2-1, MNPCE 出現頻度：Mean $\pm$ 3SD= $0.13 \pm 0.21\%$, PCE の割合：Mean $\pm$ 3SD= $53.2 \pm 9.0\%$, 動物数 296 例）内であったこと、陽性対照群の MNPCE 出現数が陰性対照群と比較して有意な（ $p \leq 0.01$ ）高値を示したことから、本試験は適切に実施されたものと判断した。

〈雌〉

10000 個（2000 個 $\times$ 5 匹／群）の PCE 中の MNPCE 出現数は、陰性対照群で 13 個（出現頻度 $0.13 \pm 0.08\%$ ）、被験物質群では 60, 200 および 600 mg/kg/day 群でそれぞれ 15, 8 および 15 個（出現頻度はそれぞれ 0.15 ± 0.09 , 0.08 ± 0.07 および $0.15 \pm 0.12\%$ ）であり、陰性対照群と比較していずれも有意な増加はみられなかった。

赤血球中の PCE の割合は、被験物質の 60, 200 および 600 mg/kg/day 群でそれぞれ $53.3 \pm 2.5\%$, $54.7 \pm 4.1\%$, $46.0 \pm 5.9\%$ であり、60 および 200 mg/kg/day 群は陰性対照群（ $52.1 \pm 3.9\%$ ）と比較していずれも有意差はみられなかったが、600 mg/kg/day 群では有意な（ $p \leq 0.05$ ）低値を示した。しかしながらこの値は試験施設の背景値の範囲内（Appendix 2-2, PCE の割合：PCE の割合：Mean $\pm$ 3SD= $51.4 \pm 9.9\%$, 動物数 50 例）であることから被験物質投与による造血系への影響はないものと判断した。

一方、陽性対照群では MNPCE 出現数は 326 個（出現頻度 $3.26 \pm 0.44\%$ ）であり、MNPCE 出現数が陰性対照群と比較して有意な（ $p \leq 0.01$ ）高値を示した。このとき、赤血球中の PCE の割合は $23.5 \pm 4.1\%$ であり、陰性対照群に対して有意な（ $p \leq 0.01$ ）低値を示した。

陰性対照群の MNPCE 出現頻度および PCE の割合の平均値は、いずれも試験施設の背景値の範囲（Appendix 2-2, MNPCE 出現頻度：Mean $\pm$ 3SD= $0.13 \pm 0.21\%$, PCE の割合：Mean $\pm$ 3SD= $51.4 \pm 9.9\%$, 動物数 50 例）内であったこと、陽性対照群の MNPCE 出現数が陰性対照群と比較して有意な（ $p \leq 0.01$ ）高値を示したことから、本試験は適切に実施されたものと判断した。

以上、雌雄の試験結果から、被験物質の 4-(1-メチルエテニル)フェノールは、本試験条件下でラット小核試験陰性と判定された。

8. 結論

被験物質の 4-(1-メチルエテニル)フェノールは、本試験条件下で小核試験陰性と判定され、ラット骨髄細胞における染色体異常誘発性を有さないものと結論した。

9. 参考文献

- [1] Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo and M. Hayashi (1998) Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS, *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 84-100.
- [2] Hamada, S., K-I. Yamasaki, S. Nakanishi, T. Omori, T. Serikawa and M. Hayashi (2001) Evaluation of the general suitability of the rat for the micronucleus assay: the effect of cyclophosphamide in 14 strains, *Mutat. Res.*, 495, 127-134.
- [3] Hamada, S., K. Nakajima, T. Serikawa, M. Hayashi (2003) The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay, *Mutagenesis* 18(3), 273-275.
- [4] Hayashi, M., S. Sutou, H. Shimada, S. Sato, Y. F. Sasaki and A. Wakata (1989) Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test: The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS, *Mutat. Res.*, 223, 329-344.
- [5] Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, The Mammalian Mutagenesis Study Group of The Environmental Mutagen Society, Japan (CSGMT/JEMS·MMS) (1990) Single versus multiple dosing in the micronucleus test: the summary of the fourth collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS, *Mutat. Res.*, 234, 205-222.
- [6] Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1983) An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 120, 241-247.
- [7] Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.*, 9, 527-549.

10. 特記事項

10.1 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態
なし

10.2 試験計画書に従わなかったこと
なし

Table I-1 Body weight (Male)

Treatment group	Dose level (mg/kg/day) Frequency Route	Animal number	Body weight (g)		
			Just before the first dosing	Just before the second dosing	Before preparation of specimens
Negative control (0.5% CMC-Na)	0	10101	259	266	281
		10102	269	277	289
	Twice ¹ p.o.	10103	257	265	275
		10104	273	279	293
		10105	275	286	299
		Mean±SD	266.6 ± 8.2	274.6 ± 9.0	287.4 ± 9.5
Test substance [4-(1-methylethenyl) phenol]	60	10201	267	277	289
		10202	257	267	273
	Twice ¹ p.o.	10203	263	269	279
		10204	271	284	298
		10205	266	279	294
		Mean±SD	264.8 ± 5.2	275.2 ± 7.1	286.6 ± 10.4
	200	10301	256	266	280
		10302	264	268	267
	Twice ¹ p.o.	10303	267	275	283
		10304	268	278	287
		10305	277	282	292
		Mean±SD	266.4 ± 7.6	273.8 ± 6.7	281.8 ± 9.4
	600	10401	256	255	256
		10402	264	270	276
	Twice ¹ p.o.	10403	270	257	263
		10404	275	283	286
		10405	271	260	260
		Mean±SD	267.2 ± 7.4	265.0 ± 11.6	268.2 ± 12.5*
	2000	10501	262	238	221
		10502	271	247	236
	Twice ¹ p.o.	10503	273	247	230
		10504	263	256	252
		10505	268	247	NA ²
		Mean±SD	267.4 ± 4.8	247.0 ± 6.4*	234.8 ± 13.0*
Positive control (CP)	20	10601	262	262	270
		10602	269	269	282
	Twice ¹ p.o.	10603	274	270	277
		10604	279	283	293
		10605	261	263	273
		Mean±SD	269.0 ± 7.7	269.4 ± 8.4	279.0 ± 9.0

CMC-Na: Carboxymethylcellulose sodium salt, CP: Cyclophosphamide monohydrate

NA: Not Applicable

1. In a 24 hr-interval

2. Body weights of animals (10505) at a find of dead were 248g.

*: Significantly decrease compared to the negative control ($p \leq 0.05$) by Williams' test.

Table 1-2 Body weight (Female)

Treatment group	Dose level (mg/kg/day) Frequency Route	Animal number	Body weight (g)		
			Just before the first dosing	Just before the second dosing	Before preparation of specimens
Negative control (0.5% CMC-Na)	0	50101	201	208	208
		50102	200	198	210
	Twice ¹ p.o.	50103	209	215	216
		50104	195	196	200
		50105	194	192	200
		Mean±SD	199.8 ± 6.0	201.8 ± 9.4	206.8 ± 6.9
Test substance [4-(1-methylethenyl) phenol]	60	50201	195	198	200
		50202	196	193	201
	Twice ¹ p.o.	50203	189	186	193
		50204	208	213	218
		50205	209	214	216
		Mean±SD	199.4 ± 8.7	200.8 ± 12.4	205.6 ± 10.9
	200	50301	181	180	186
		50302	199	206	206
	Twice ¹ p.o.	50303	190	197	201
		50304	204	200	209
		50305	211	213	213
		Mean±SD	197.0 ± 11.8	199.2 ± 12.4	203.0 ± 10.5
	600	50401	192	185	187
		50402	215	211	210
	Twice ¹ p.o.	50403	195	185	181
		50404	194	187	181
		50405	207	194	192
		Mean±SD	200.6 ± 10.0	192.4 ± 11.0	190.2 ± 12.0*
	2000	50501	190	173	157
		50502	202	186	176
	Twice ¹ p.o.	50503	195	174	NA ²
		50504	203	187	181
		50505	180	164	150
		Mean±SD	194.0 ± 9.5	176.8 ± 9.7*	166.0 ± 14.9*
Positive control (CP)	20	50601	209	203	215
		50602	204	198	201
	Twice ¹ p.o.	50603	205	197	207
		50604	186	182	192
		50605	197	197	206
		Mean±SD	200.2 ± 9.0	195.4 ± 7.9	204.2 ± 8.5

CMC-Na: Carboxymethylcellulose sodium salt, CP: Cyclophosphamide monohydrate

NA: Not Applicable

1. In a 24 hr-interval

2. Body weights of animals (50503) at a find of dead were 170g.

*: Significantly decrease compared to the negative control ($p \leq 0.05$) by Williams' test.

Table 2-1 Clinical signs (Male)

Treatment group	Dose level (mg/kg/day)	Animal number	Clinical signs						Before preparation of specimens
			First dosing			Second dosing			
			Before	0-1 hr after	3 hr after	Before	0-1 hr after	3 hr after	
Negative control (0.5% CMC-Na)	0	10101	-	-	-	-	-	-	-
		10102	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10103	-	-	-	-	-	-	-
		10104	-	-	-	-	-	-	-
		10105	-	-	-	-	-	-	-
Test substance [4-(1-methylethenyl) phenol]	60	10201	-	-	-	-	-	-	-
		10202	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10203	-	-	-	-	-	-	-
		10204	-	-	-	-	-	-	-
		10205	-	-	-	-	-	-	-
	200	10301	-	-	-	-	-	-	-
		10302	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10303	-	-	-	-	-	-	-
		10304	-	-	-	-	-	-	-
		10305	-	-	-	-	-	-	-
	600	10401	-	-	-	-	-	-	-
		10402	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10403	-	-	-	-	-	-	-
		10404	-	-	-	-	-	-	-
		10405	-	-	-	-	-	-	-
	2000	10501	-	-	-	-	-	-	-
		10502	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10503	-	D(+)	D(+),S(+)	-	-	-	-
		10504	-	-	-	-	-	-	-
		10505	-	D(+)	D(+),S(+)	-	De,L,D(++),B	NA	NA
Positive control (CP)	20	10601	-	-	-	-	-	-	-
		10602	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10603	-	-	-	-	-	-	-
		10604	-	-	-	-	-	-	-
		10605	-	-	-	-	-	-	-

CMC-Na: Carboxymethylcellulose sodium salt, CP: Cyclophosphamide monohydrate

-: No abnormality, De: Death, L: Lateral position, D: Decrease in locomotor activity, B: Bradypnea, S: Salivation,

NA: Not Applicable, Grade: +: Slight, +++: Severe

1. In a 24 hr-interval

Table 2-2 Clinical signs (Female)

Table 2.2 Clinical signs (Female)									
Treatment group	Dose level (mg/kg/day)	Animal number	Clinical signs						Before preparation of specimens
			First dosing			Second dosing			
			Before	0-1 hr after	3 hr after	Before	0-1 hr after	3 hr after	
Negative control (0.5% CMC-Na)	0	50101	-	-	-	-	-	-	-
		50102	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50103	-	-	-	-	-	-	-
		50104	-	-	-	-	-	-	-
		50105	-	-	-	-	-	-	-
Test substance [4-(1-methylethenyl) phenol]	60	50201	-	-	-	-	-	-	-
		50202	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50203	-	-	-	-	-	-	-
		50204	-	-	-	-	-	-	-
		50205	-	-	-	-	-	-	-
	200	50301	-	-	-	-	-	-	-
		50302	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50303	-	-	-	-	-	-	-
		50304	-	-	-	-	-	-	-
		50305	-	-	-	-	-	-	-
	600	50401	-	-	-	-	-	-	-
		50402	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50403	-	-	-	-	-	-	-
		50404	-	-	-	-	-	-	-
		50405	-	-	-	-	-	-	-
	2000	50501	-	-	-	-	D(+)	D(+)	D(+)
		50502	-	D(+)	D(+)	D(+)	D(+)	D(+)	D(+)
	Twice ¹ p.o.	50503	-	D(+)	D(+)	D(+)	P,D(+++),B	P,D(+++)	De
		50504	-	-	-	-	D(+)	D(+)	D(+)
		50505	-	D(+)	D(+)	D(+)	D(+)	D(+)	D(+)
Positive control (CP)	20	50601	-	-	-	-	-	-	-
		50602	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50603	-	-	-	-	-	-	-
		50604	-	-	-	-	-	-	-
		50605	-	-	-	-	-	-	-

CMC-Na: Carboxymethylcellulose sodium salt, CP: Cyclophosphamide monohydrate

-: No abnormality, De: Death, P: Prone position, D: Decrease in locomotor activity, B: Bradypnea,

NA: Not Applicable, Grade: +: Slight, +++: Severe

1. In a 24 hr-interval

Table 3-1 Results of micronucleus test (Male)

Treatment group	Dose level (mg/kg/day) Frequency Route	Animal number	MNPCEs			PCEs ratio among total erythrocytes	
			Number of PCEs scored	Number	Incidence (%)	Number of erythrocytes scored	PCEs/ (PCEs+NCEs) (%)
Negative control (0.5% CMC-Na)	0	10101	2000	2	0.10	1000	54.4
		10102	2000	4	0.20	1000	57.1
	Twice ¹ p.o.	10103	2000	2	0.10	1000	54.0
		10104	2000	1	0.05	1000	48.3
		10105	2000	1	0.05	1000	48.9
	Total /Mean±SD		10000	10	0.10 ± 0.06	52.5 ± 3.8	
Test substance (4-(1-methylethenyl) phenol)	60	10201	2000	3	0.15	1000	59.0
		10202	2000	4	0.20	1000	51.0
	Twice ¹ p.o.	10203	2000	3	0.15	1000	53.8
		10204	2000	1	0.05	1000	52.9
		10205	2000	3	0.15	1000	32.7
	Total /Mean±SD		10000	14	0.14 ± 0.05	49.9 ± 10.1	
	200	10301	2000	2	0.10	1000	57.3
		10302	2000	3	0.15	1000	59.3
	Twice ¹ p.o.	10303	2000	3	0.15	1000	57.2
		10304	2000	1	0.05	1000	45.3
		10305	2000	1	0.05	1000	56.1
Total /Mean±SD		10000	10	0.10 ± 0.05	55.0 ± 5.6		
600	10401	2000	0	0.00	1000	52.4	
	10402	2000	1	0.05	1000	53.8	
Twice ¹ p.o.	10403	2000	0	0.00	1000	52.7	
	10404	2000	2	0.10	1000	47.9	
	10405	2000	0	0.00	1000	36.9	
Total /Mean±SD		10000	3	0.03 ± 0.04	48.7 ± 7.0		
Positive control (CP)	20	10601	2000	115	5.75	1000	24.6
		10602	2000	145	7.25	1000	15.1
	Twice ¹ p.o.	10603	2000	75	3.75	1000	20.3
		10604	2000	63	3.15	1000	22.2
		10605	2000	86	4.30	1000	21.0
Total /Mean±SD		10000	484 ^{##}	4.84 ± 1.66	20.6 ± 3.5 ⁺⁺		

PCEs: Polychromatic erythrocytes, MNPCEs: Micronucleated PCEs, NCEs: Normochromatic erythrocytes

CMC-Na: Carboxymethylcellulose sodium salt, CP: Cyclophosphamide monohydrate

1. In a 24 hr-interval

^{##}: Significantly increase compared to the negative control ($p \leq 0.01$) by Kastenbaum & Bowman's method.⁺⁺: Significantly decrease compared to the negative control ($p \leq 0.01$) by student's *t*-test.

Table 3-2 Results of micronucleus test (Female)

Treatment group	Dose level (mg/kg/day) Frequency Route	Animal number	MNPCEs			PCEs ratio among total erythrocytes	
			Number of PCEs scored	Number	Incidence (%)	Number of erythrocytes scored	PCEs/ (PCEs+NCEs) (%)
Negative control (0.5% CMC-Na)	0 Twice ¹ p.o.	50101	2000	1	0.05	1000	52.3
		50102	2000	2	0.10	1000	48.1
		50103	2000	2	0.10	1000	58.5
		50104	2000	3	0.15	1000	50.7
		50105	2000	5	0.25	1000	50.8
Total /Mean±SD			10000	13	0.13 ± 0.08	52.1 ± 3.9	
Test substance (4-(1-methylethenyl) phenol)	60 Twice ¹ p.o.	50201	2000	1	0.05	1000	54.0
		50202	2000	6	0.30	1000	48.9
		50203	2000	2	0.10	1000	54.7
		50204	2000	3	0.15	1000	54.8
		50205	2000	3	0.15	1000	54.2
Total /Mean±SD			10000	15	0.15 ± 0.09	53.3 ± 2.5	
	200 Twice ¹ p.o.	50301	2000	3	0.15	1000	50.0
		50302	2000	3	0.15	1000	56.9
		50303	2000	0	0.00	1000	60.6
		50304	2000	1	0.05	1000	53.7
		50305	2000	1	0.05	1000	52.3
Total /Mean±SD			10000	8	0.08 ± 0.07	54.7 ± 4.1	
	600 Twice ¹ p.o.	50401	2000	2	0.10	1000	52.9
		50402	2000	5	0.25	1000	48.3
		50403	2000	2	0.10	1000	38.9
		50404	2000	0	0.00	1000	40.9
		50405	2000	6	0.30	1000	48.9
Total /Mean±SD			10000	15	0.15 ± 0.12	46.0 ± 5.9*	
Positive control (CP)	20 Twice ¹ p.o.	50601	2000	71	3.55	1000	23.7
		50602	2000	78	3.90	1000	17.0
		50603	2000	58	2.90	1000	27.5
		50604	2000	60	3.00	1000	26.3
		50605	2000	59	2.95	1000	22.9
Mean±SD			10000	326 ^{##}	3.26 ± 0.44	23.5 ± 4.1 ⁺⁺	

PCEs: Polychromatic erythrocytes, MNPCEs: Micronucleated PCEs, NCEs: Normochromatic erythrocytes

CMC-Na: Carboxymethylcellulose sodium salt, CP: Cyclophosphamide monohydrate

1. In a 24 hr interval

##: Significantly increase compared to the negative control ($p \leq 0.01$) by Kastenbaum & Bowman's method.*: Significantly decrease compared to the negative control ($p \leq 0.05$) by Williams' test.++: Significantly decrease compared to the negative control ($p \leq 0.01$) by student's *t*-test.