

最終報告書

C.I.ピグメントレッド 22 のラット小核試験

(試験番号：B070403)

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

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

6.3.2	動物種選択理由	13
6.3.3	系統	13
6.3.4	系統選択理由	13
6.3.5	微生物制御レベル	13
6.3.6	購入先	13
6.3.7	入荷時週齢	14
6.3.8	入荷動物数	14
6.3.9	検疫・馴化	14
6.3.10	群分け	14
6.3.11	投与開始時週齢	14
6.3.12	投与開始時週齢選択理由	14
6.3.13	投与開始時体重	14
6.3.14	動物の識別	14
6.3.15	余剰動物の処分法	15
6.4	動物飼育	15
6.4.1	飼育室	15
6.4.2	飼育環境	15
6.4.3	飼育器材	15
6.4.4	床敷	16
6.4.5	飼料	16
6.4.6	飲用水	16
6.4.7	収容匹数	16
6.5	被験物質投与液の調製	17
6.6	対照物質の調製	17
6.6.1	陰性対照物質（媒体）	17
6.6.2	陽性対照物質の調製	17
6.7	小核試験	17
6.7.1	投与	17
6.7.2	動物数	18
6.7.3	群構成	19
6.7.4	体重測定	19
6.7.5	一般状態観察	19
6.7.6	標本作製時期	19
6.7.7	標本作製時期設定理由	20
6.7.8	標本作製	20
6.7.9	評価に用いる動物	20
6.7.10	標本の観察	20
6.8	統計処理	20

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	22
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	24
9.	参考文献	25

Tables

Table 1	Body weight	27
Table 2	Clinical signs	29
Table 3	Results of micronucleus test	31

3. 試験実施概要

3.1 表題

C.I.ピグメントレッド 22 のラット小核試験

3.2 試験番号

B070403

3.3 目的

ラット骨髓細胞における小核誘発性を指標として、被験物質の生体内における染色体異常誘発性の有無を検討する。

3.4 適用ガイドライン

- (1) 医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて
(医薬審第 1604 号, 平成 11 年 11 月 1 日)
- (2) Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No.474, 1997)

3.5 適用 GLP

OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

3.6 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

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 C.I. ピグメントレッド 22 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 250, 500, 1000 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 (0.1 w/v% Tween80 添加 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, いずれの投与群においても死亡例は認められなかったため, 陰性対照群, 被験物質投与群の 500, 1000, 2000 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 C.I. ピグメントレッド 22 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

C.I.ピグメントレッド 22

[別名：2-ヒドロキシ-1-[(2-メチル-5-ニトロフェニル)アゾ]-N-フェニルナフタレン-3-カルボキサミド]

6.1.2 CAS 番号

6448-95-9

6.1.3 ロット番号

6.1.4 純度

99 wt%以上

6.1.5 保存条件

室温（許容範囲：10～30℃，受領日から実験終了後安定性確認日までの実測値：17.7～26.4℃），遮光，気密

6.1.6 保管場所

被験物質保管場所（41）

6.1.7 提供者（製造元）

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碎した。
- (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 をメノウ乳鉢で粉碎・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

0.1 w/v%Tween80 添加 0.5 w/v%CMC-Na 水溶液

[以下, 0.1 % Tween80 添加 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

Tween80: 関東化学(株)

CMC-Na: 和光純薬工業(株)

局方注射用水: (株)大塚製薬工場

6.2.1.3 ロット番号

Tween80: 807X1315

CMC-Na: SDL2940

局方注射用水: 7E91

6.2.1.4 保管条件

Tween80: 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℃)

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

Tween80: 2011 年 11 月 22 日

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 7 日）および検疫終了日（2007 年 11 月 12 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 12 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 13 日）における全試験動物の体重範囲は雄 256～280 g，雌 178～204 g であり，平均体重（雄 268.2 g，雌 192.5 g） $\pm 20\%$ 以内（雄 214.6～321.8 g，雌 154.0～231.0 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15日）に、ペントバルビタールナトリウム（ネンプタール[®]、大日本住友製薬株式会社、ロット番号：42775Z721, 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：21.7～23.6℃）

6.4.2.2 相対湿度

許容範囲 35.0～75.0%（実測値：48.0～72.0%）

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浄剤（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9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9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)
25	1.50	60
50	3.00	60
100	6.00	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) 800 mL の局方注射用水（株大塚製薬工場）を攪拌しながら、CMC-Na を少しずつ加え溶解させた。
- (3) Tween80 をガラス容器に 1 g 秤量した。
- (4) これに約 100 mL の局方注射用水を加え、攪拌して溶解させた。
- (5) (2)と(4)を合わせ、さらに局方注射用水を加えて 1000 mL にメスアップした。
- (6) 冷蔵（許容範囲：1～10℃，調剤から最終使用までの実測値：3.7～5.8℃）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：3.7～5.8℃），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 B070417）は 250, 500, 1000, 2000 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、雌雄ともにいずれの用量でも死亡例は認められず、赤色便以外の一般状態の変化も認められなかった。これらの結果に基づき、雌雄ともに適用ガイドラインで規定されている 2000 mg/mL/kg を最高用量とし、以下公比 2 で 1000, 500, 250 mg/kg/day の計 4 用量を設定した。

また、媒体（0.1 %Tween80 添加 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 (0.1%Tween80 添加 0.5%CMC-Na)	0	2	p.o.	最終 投与後 24 時間	5	10101～10105
被験物質群 (C.I.ピグ メントレッド 22)	250	2	p.o.		5	10201～10205
	500	2	p.o.		5	10301～10305
	1000	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 (0.1%Tween80 添加 0.5%CMC-Na)	0	2	p.o.	最終 投与後 24 時間	5	50101～50105
被験物質群 (C.I.ピグ メントレッド 22)	250	2	p.o.		5	50201～50205
	500	2	p.o.		5	50301～50305
	1000	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。

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：42775Z721, 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、スライドグラスに伸展した。

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、雌雄とも全例生存したので、上位 3 用量（500, 1000, 2000 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で検定を行った（有意水準：両側 5%）。
- (4) Williams 検定で全て有意差がなかったため、それぞれ 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、雄は等分散であったため、Student の *t*-検定、雌は不等分散であったため Aspin-Welch の *t*-検定により、それぞれ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で検定を行った（有意水準：両側 5%）。
- (4) Williams 検定で全て有意差がなかったため、それぞれ 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%）。

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 B070403_ (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陰性対照群と比較して有意な差はみられなかったが、雌の 2000 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、雌の 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)

雌雄いずれの投与群においても、一般状態の異常はみられなかったが、被験物質投与群では、雌雄共に 1 回目投与翌日から全てのケージ内に被験物質と考えられる赤色便が認められた。

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 17 個 (出現頻度: $0.17 \pm 0.08\%$)、被験物質群では 500, 1000 および 2000 mg/kg/day 群でそれぞれ 11, 11 および 10 個 (出現頻度はそれぞれ 0.11 ± 0.05 , 0.11 ± 0.08 および $0.10 \pm 0.05\%$) 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 500, 1000 および 2000 mg/kg/day 群でそれぞれ $54.1 \pm 1.6\%$, $52.7 \pm 4.7\%$, $55.9 \pm 1.8\%$ であり、陰性対照群 ($52.3 \pm 2.3\%$) 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 590 個 (出現頻度: $5.90 \pm 1.60\%$) 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 $29.5 \pm 6.2\%$ 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: $\text{Mean} \pm 3\text{SD} = 0.13 \pm 0.21\%$, PCE の割合: $\text{Mean} \pm 3\text{SD} = 53.2 \pm 9.0\%$, 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×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 500, 1000 および 2000 mg/kg/day 群でそれぞれ 8, 7 および 13 個 (出現頻度はそれぞれ 0.08 ± 0.03 , 0.07 ± 0.08 および $0.13 \pm 0.10\%$) 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 500, 1000 および 2000 mg/kg/day 群でそれぞれ $57.5 \pm 2.1\%$, $54.1 \pm 3.7\%$, $54.7 \pm 2.7\%$ であり、陰性対照群 ($55.3 \pm 1.7\%$) 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 360 個 (出現頻度 $3.60 \pm 1.19\%$) 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 $26.0 \pm 7.0\%$ 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: $\text{Mean} \pm 3\text{SD} = 0.13 \pm 0.21\%$, PCE の割合: $\text{Mean} \pm 3\text{SD} = 51.4 \pm 9.9\%$, 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 C.I.ピグメントレッド 22 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 C.I.ピグメントレッド 22 は、本試験条件下で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。

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.

Table 1-1 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 solution containing 0.1% Tween80)	0	10101	266	274	285
		10102	267	274	286
	Twice ¹ p.o.	10103	256	266	278
		10104	277	284	295
		10105	271	283	298
		Mean±SD	267.4 ± 7.7	276.2 ± 7.4	288.4 ± 8.1
Test substance (C. I. Pigment Red 22)	250	10201	262	273	280
		10202	279	287	298
	Twice ¹ p.o.	10203	262	265	276
		10204	271	280	292
		10205	270	276	285
		Mean±SD	268.8 ± 7.1	276.2 ± 8.2	286.2 ± 8.9
	500	10301	262	269	281
		10302	266	281	292
	Twice ¹ p.o.	10303	273	281	296
		10304	270	286	295
		10305	265	276	284
		Mean±SD	267.2 ± 4.3	278.6 ± 6.4	289.6 ± 6.7
	1000	10401	267	273	281
		10402	270	278	294
	Twice ¹ p.o.	10403	280	283	299
		10404	276	282	292
		10405	269	276	291
		Mean±SD	272.4 ± 5.4	278.4 ± 4.2	291.4 ± 6.6
	2000	10501	269	279	294
		10502	263	273	286
	Twice ¹ p.o.	10503	270	280	290
		10504	274	277	291
		10505	256	262	277
		Mean±SD	266.4 ± 7.0	274.2 ± 7.3	287.6 ± 6.6
Positive control (CP)	20	10601	264	267	280
		10602	257	260	273
	Twice ¹ p.o.	10603	275	277	294
		10604	272	277	289
		10605	267	272	285
		Mean±SD	267.0 ± 7.0	270.6 ± 7.2	284.2 ± 8.1

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

1. In a 24 hr-interval

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 solution containing 0.1% Tween80)	0	50101	186	189	193
		50102	194	193	203
	Twice ¹ p.o.	50103	194	199	200
		50104	189	189	194
		50105	187	189	191
		Mean±SD	190.0 ± 3.8	191.8 ± 4.4	196.2 ± 5.1
Test substance (C. I. Pigment Red 22)	250	50201	202	203	209
		50202	178	179	188
	Twice ¹ p.o.	50203	200	200	206
		50204	191	197	202
		50205	204	207	215
		Mean±SD	195.0 ± 10.7	197.2 ± 10.8	204.0 ± 10.1
	500	50301	196	204	208
		50302	187	188	193
		Twice ¹ p.o.	50303	204	211
		50304	194	195	204
		50305	182	188	194
		Mean±SD	192.6 ± 8.5	197.2 ± 10.1	202.2 ± 8.4
	1000	50401	204	211	214
		50402	187	189	190
		Twice ¹ p.o.	50403	194	197
		50404	193	188	198
		50405	188	189	194
		Mean±SD	193.2 ± 6.8	194.2 ± 9.7	198.6 ± 9.2
	2000	50501	195	189	203
		50502	188	189	191
		Twice ¹ p.o.	50503	198	200
		50504	195	192	195
		50505	189	194	202
		Mean±SD	193.0 ± 4.3	192.8 ± 4.5	198.2 ± 5.1
Positive control (CP)	20	50601	182	181	189
		50602	190	191	196
	Twice ¹ p.o.	50603	183	182	190
		50604	201	196	201
		50605	200	202	206
		Mean±SD	191.2 ± 9.0	190.4 ± 9.0	196.4 ± 7.2

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

1. In a 24 hr-interval

Table 2-1 Clinical signs (Male)

Treatment group	Dose level (mg/kg/day) Frequency Route	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 solution containing 0.1% Tween80)	0	10101	-	-	-	-	-	-	-
		10102	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10103	-	-	-	-	-	-	-
		10104	-	-	-	-	-	-	-
		10105	-	-	-	-	-	-	-
Test substance (C. I. Pigment Red 22)	250	10201	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10202	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	Twice ¹ p.o.	10203	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10204	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10205	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	500	10301	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10302	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	Twice ¹ p.o.	10303	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10304	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10305	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	1000	10401	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10402	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	Twice ¹ p.o.	10403	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10404	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10405	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	2000	10501	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10502	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	Twice ¹ p.o.	10503	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10504	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		10505	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
Positive control (CP)	20	10601	-	-	-	-	-	-	-
		10602	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10603	-	-	-	-	-	-	-
		10604	-	-	-	-	-	-	-
		10605	-	-	-	-	-	-	-

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

-: No abnormality

1. In a 24 hr-interval

2. Reddish feces were found in cages of test substance groups.

Table 2-2 Clinical signs (Female)

Treatment group	Dose level (mg/kg/day) Frequency Route	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 solution containing 0.1% Tween80)	0	50101	-	-	-	-	-	-	-
		50102	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50103	-	-	-	-	-	-	-
		50104	-	-	-	-	-	-	-
		50105	-	-	-	-	-	-	-
Test substance (C. I. Pigment Red 22)	250	50201	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50202	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	Twice ¹ p.o.	50203	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50204	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50205	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	500	50301	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50302	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	Twice ¹ p.o.	50303	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50304	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50305	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	1000	50401	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50402	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	Twice ¹ p.o.	50403	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50404	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50405	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	2000	50501	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50502	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
	Twice ¹ p.o.	50503	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50504	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
		50505	-	-	-	- ²	- ²	- ²	- ²
Positive control (CP)	20	50601	-	-	-	-	-	-	-
		50602	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50603	-	-	-	-	-	-	-
		50604	-	-	-	-	-	-	-
		50605	-	-	-	-	-	-	-

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

-: No abnormality

1. In a 24 hr-interval

2. Reddish feces were found in cages of test substance groups.

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 solution containing 0.1% Tween80)	0	10101	2000	3	0.15	1000	50.7
		10102	2000	5	0.25	1000	55.6
	Twice ¹ p.o.	10103	2000	3	0.15	1000	52.9
		10104	2000	1	0.05	1000	49.7
		10105	2000	5	0.25	1000	52.6
	Total / Mean±SD		10000	17	0.17 ± 0.08		52.3 ± 2.3
Test substance (C. I. Pigment Red 22)	500	10301	2000	3	0.15	1000	55.9
		10302	2000	1	0.05	1000	55.3
	Twice ¹ p.o.	10303	2000	1	0.05	1000	54.4
		10304	2000	3	0.15	1000	52.2
		10305	2000	3	0.15	1000	52.9
	Total / Mean±SD		10000	11	0.11 ± 0.05		54.1 ± 1.6
	1000	10401	2000	1	0.05	1000	47.2
		10402	2000	3	0.15	1000	50.0
	Twice ¹ p.o.	10403	2000	0	0.00	1000	51.4
		10404	2000	3	0.15	1000	55.9
		10405	2000	4	0.20	1000	58.9
	Total / Mean±SD		10000	11	0.11 ± 0.08		52.7 ± 4.7
	2000	10501	2000	3	0.15	1000	56.7
		10502	2000	3	0.15	1000	55.2
	Twice ¹ p.o.	10503	2000	1	0.05	1000	54.5
		10504	2000	2	0.10	1000	54.6
		10505	2000	1	0.05	1000	58.7
	Total / Mean±SD		10000	10	0.10 ± 0.05		55.9 ± 1.8
Positive control (CP)	20	10601	2000	144	7.20	1000	35.3
		10602	2000	101	5.05	1000	25.4
	Twice ¹ p.o.	10603	2000	154	7.70	1000	33.0
		10604	2000	116	5.80	1000	33.0
		10605	2000	75	3.75	1000	20.6
	Total / Mean±SD		10000	590 ^{##}	5.90 ± 1.60		29.5 ± 6.2 ^{**}

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 solution containing 0.1% Tween80)	0	50101	2000	4	0.20	1000	58.0
		50102	2000	0	0.00	1000	53.7
	Twice ¹ p.o.	50103	2000	2	0.10	1000	55.4
		50104	2000	3	0.15	1000	54.2
		50105	2000	4	0.20	1000	55.4
	Total / Mean±SD		10000	13	0.13 ± 0.08		55.3 ± 1.7
Test substance (C. I. Pigment Red 22)	500	50301	2000	2	0.10	1000	60.1
		50302	2000	2	0.10	1000	57.7
	Twice ¹ p.o.	50303	2000	1	0.05	1000	54.4
		50304	2000	2	0.10	1000	56.9
		50305	2000	1	0.05	1000	58.4
	Total / Mean±SD		10000	8	0.08 ± 0.03		57.5 ± 2.1
	1000	50401	2000	1	0.05	1000	58.4
		50402	2000	1	0.05	1000	54.1
	Twice ¹ p.o.	50403	2000	4	0.20	1000	55.5
		50404	2000	0	0.00	1000	48.2
		50405	2000	1	0.05	1000	54.4
	Total / Mean±SD		10000	7	0.07 ± 0.08		54.1 ± 3.7
	2000	50501	2000	2	0.10	1000	52.4
		50502	2000	6	0.30	1000	54.2
	Twice ¹ p.o.	50503	2000	1	0.05	1000	58.6
		50504	2000	2	0.10	1000	52.3
		50505	2000	2	0.10	1000	56.2
	Total / Mean±SD		10000	13	0.13 ± 0.10		54.7 ± 2.7
Positive control (CP)	20	50601	2000	53	2.65	1000	19.5
		50602	2000	53	2.65	1000	20.5
	Twice ¹ p.o.	50603	2000	58	2.90	1000	23.7
		50604	2000	98	4.90	1000	30.6
		50605	2000	98	4.90	1000	35.9
Total / Mean±SD		10000	360 ^{##}	3.60 ± 1.19		26.0 ± 7.0 ^{**}	

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 Aspin & Welch *t*-test.