

M-1253

最終報告書

試験名：p-ニトロフェノールナトリウムのマウスを用いた小核試験

試験番号：M-1253

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

2. 目次

2.	目次	3
3.	試験実施概要	6
3.1	試験計画書	6
3.2	試験目的	6
3.3	試験委託者	6
3.4	試験受託者	6
3.5	試験実施施設	6
4.	要約	9
5.	緒言	10
6.	試験材料及び方法	11
6.1	被験物質、媒体及び陽性対照物質	11
6.1.1	被験物質	11
6.1.2	媒体	12
6.1.3	陽性対照物質	12
6.2	媒体、被験物質及び陽性対照物質の調製	12
6.2.1	媒体の調製	12
6.2.2	被験液の調製	12
6.2.3	陽性対照物質の調製	14
6.3	試験動物種及び系統の選択理由	14
6.4	試験動物	14
6.5	飼育条件	15
6.6	飼料、飲料水及び床敷中の混入物質	15
6.7	動物の識別及びケージへの表示	15
6.8	群分け	15
6.9	投与経路、投与方法及びそれらの選択理由	16
6.10	投与量及びその設定根拠並びに群構成	16
6.10.1	予備試験	16
6.10.2	本試験	16

6.11	観察及び検査の方法	17
6.11.1	一般状態の観察	17
6.11.2	体重測定	17
6.11.3	骨髓塗抹標本の作製	17
6.11.4	骨髓塗抹標本の観察	18
6.11.5	観察結果の判定	18
7.	試験結果	20
7.1	予備試験	20
7.1.1	一般状態	20
7.1.2	体重	20
7.1.3	骨髓塗抹標本の観察結果	20
7.2	本試験	20
7.2.1	一般状態	20
7.2.2	体重	20
7.2.3	骨髓塗抹標本の観察結果	20
8.	考察	22
9.	参考文献	23

M-1253

表

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

M-1253

3. 試験実施概要

3.1 試験計画書

試験番号 : M-1253
試験表題 : p-ニトロフェノールナトリウムのマウスを用いた小核試験

3.2 試験目的

マウス骨髄細胞を用いて、p-ニトロフェノールナトリウムの染色体異常誘発性の有無を明らかにした。なお、本試験は株式会社ボゾリサーチセンター動物実験委員会の承認を受けている。

3.3 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

3.4 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

3.5 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

4. 要約

p-ニトロフェノールナトリウムの染色体異常誘発能の有無を検討するため、Crlj:CD1(ICR)系(SPF)マウスを用いた小核試験を実施した。

p-ニトロフェノールナトリウムの 62.5、125 及び 250 mg/kg を経口投与し、投与後約 24 時間に骨髓塗抹標本を作製した。また、陰性対照として 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液、陽性対照としてマイトマイシン C の 1 mg/kg を投与する群を設定した。

その結果、各被験物質投与群の小核を有する幼若赤血球の出現頻度は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は示さず、用量依存的な増加も認められなかった。また、各被験物質投与群における全赤血球 200 個中に占める幼若赤血球の出現頻度は、陰性対照群と比較して、統計学的に有意な減少を示さなかったことから、骨髓細胞の増殖抑制作用は有しないと判断された。

なお、陰性対照群と陽性対照群の小核を有する幼若赤血球の出現頻度は当研究所の背景データの Mean $\pm$ 3S.D.の範囲内であったことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、p-ニトロフェノールナトリウムは本試験条件下で Crlj:CD1(ICR)系(SPF)マウスの骨髓において、染色体異常誘発能は無いと判定した。

M-1253

5. 緒言

本試験は、厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室からの委託により、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した。なお、試験は以下の基準を遵守して行った。

M-1253

6. 試験材料及び方法

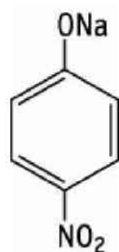
6.1 被験物質、媒体及び陽性対照物質

6.1.1 被験物質

名 称 : p-ニトロフェノールナトリウム・2水和物
p-Nitrophenol sodium salt
ナトリウム 4-ニトロフェノキシド
Sodium 4-nitrophenoxide

C A S 番 号 : 824-78-2

構造式又は示性式 :



$\text{NaOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

ロット番号 :
純度 : 99.9% (無水物として)、99.2% (2水和物として)
無水物としての含有量 : 81.1%
水分 : 18.8%
入手量 : 25 g×2 本
性状 : 黄色晶
融点 : >300°C
沸点 : 分解
分子量 : 197.12
安定性 : 動物試験終了後に被験物質を製造業者で分析し安定であることを確認した (添付資料 2)。
保存方法 : 冷暗所 (実測値: 3~7°C)、密栓
保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟 被験物質調製室

動物試験終了後、残量の一部を製造業者に返却し、安定性確認後すべてを廃棄した。

M-1253

6.1.2 媒体

名称	:	カルボキシメチルセルロースナトリウム (以下 CMC-Na と記す。)
ロット番号	:	4Y01 (予備試験、本試験)
規格	:	日本薬局方
製造元	:	丸石製薬株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室
選択理由	:	本被験物質は水に難溶であるため、均一な懸濁状態が得られる CMC-Na を選択した。

6.1.3 陽性対照物質

名称	:	マイトマイシン C (以下、MMC と略す。)
ロット番号	:	473AEJ
規格	:	日抗基注射用
力価	:	2 mg/vial
メーカー	:	協和醗酵工業株式会社
保存方法	:	室温、遮光
保存場所	:	御殿場研究所 第1研究棟発癌性物質室温保存庫
選択理由	:	MMC は小核試験に広く用いられ、背景データが豊富であり「毒性試験法ガイドライン」に従って選択した。

6.2 媒体、被験物質及び陽性対照物質の調製

6.2.1 媒体の調製

6.2.1.1 調製方法

CMC-Na を注射用水〔株式会社大塚製薬工場、ロット番号：6A93 (予備試験)、6A80 (本試験)〕に溶解し、0.5 w/v% CMC-Na 水溶液とした。

6.2.1.2 調製頻度及び保存方法

予備試験及び本試験ともに、冷蔵庫内に保存した (保存実測温度：予備試験、本試験とも 3～5℃)。なお、調製後 5 日以内 (使用期限：調製後 8 日間) に使用した。

6.2.2 被験液の調製

6.2.2.1 調製方法

各濃度ごとに被験物質 (無水物として補正した必要量、換算係数 1.233) を秤取し、0.5 w/v% CMC-Na 水溶液に懸濁して所定濃度とした。なお、被験液の残液は吸水性のよいペーパータオルに吸収させて焼却処分した。

6.2.2.2 保存方法

用時調製とし、保存しなかった。

6.2.2.3 安定性及び均一性

本被験物質の 1 及び 200 mg/mL 懸濁液（媒体：0.5 w/v% CMC-Na 水溶液）について、室温で 24 時間の安定性及び均一性が確認された（株式会社ボゾリサーチセンター試験番号：A-1997）。（添付資料 3）

6.2.2.4 被験液の濃度・均一性確認

本試験に使用した各濃度の被験液を上、中、下層より各 10 mL 採取し、濃度及び均一性を確認した結果、各濃度の表示値に対する濃度の割合は 99.5～102.0% で表示値 $\pm 10\%$ 以内であり、均一性（CV）も 0.4～0.8 % で値は 10% 以内であり問題はなかった（添付資料 4）。分析方法の概略は次の通りである。

6.2.2.5 分析方法の概略

1) 測定対象標準物質

名称	:	p-ニトロフェノールナトリウム・2 水和物
ロット番号	:	FDV01
保存方法	:	冷暗所（実測値：2～7°C）、密栓
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び生化学部標準物質保存場所

2) 測定実測試料の調製

以下の表に従い、測定試料をマグネチックスターラーで攪拌しながら、各画分 n=1 で採取し、以下の表に従い HPLC 移動相で希釈して測定実測試料を調製した。

測定試料 (mg/mL)	1 次希釈		2 次希釈		希釈率
	採取量 (mL)	定容量 (mL)	採取量 (mL)	定容量 (mL)	
6.25	1	25	1	50	1250
12.5	1	50	1	50	2500
25	1	100	1	50	5000

3) HPLC システム（Waters Corporation）

HPLC	:	2690 セパレーションモジュール
検出器	:	2487 デュアル λ UV/VIS 検出器
データ処理装置	:	ミレニアム ³² クロマトグラフィーマネジャー

4) HPLC 条件

カラム	:	Inertsil ODS-3 (4.6 mm I.D.×150 mm、ジーエルサイエンス株式会社)
カラム温度	:	30°C
移動相	:	メタノール/精製水 (1:1、v/v)
流速	:	1.0 mL/min
検出	:	UV (測定波長 225 nm)
試料注入量	:	10 µL

5) 測定値の算出

標準試料溶液を HPLC へ 3 回注入して p-ニトロフェノールナトリウムのピーク面積値の平均値 (Qs) を求めた。また、測定実測試料を HPLC へ 1 回ずつ注入して p-ニトロフェノールナトリウムのピーク面積値 (Qt) を求め、以下の式により測定試料中の p-ニトロフェノールナトリウム濃度を求めた。

$$\text{測定試料中 p-ニトロフェノールナトリウム濃度 (mg/mL)} = \frac{Q_t}{Q_s} \times A \times F \times \frac{1}{1000}$$

- Qt : 測定実測試料の p-ニトロフェノールナトリウムのピーク面積値
 Qs : 標準試料溶液の p-ニトロフェノールナトリウムの平均ピーク面積値
 A : 標準試料溶液中の p-ニトロフェノールナトリウム濃度 (µg/mL)
 F : 希釈率

6.2.3 陽性対照物質の調製

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

注1 : 日本薬局方 (株式会社大塚製薬工場、ロット番号 : 6A80)

注2 : 日本薬局方 (株式会社大塚製薬工場、ロット番号 : 6C00)

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

マウスは小核試験に広く用いられており、この試験に使用される系統のマウスは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物

ICR 系 SPF マウス [CrIj:CD1(ICR)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] を 7 週齢で、予備試験用として雌雄各 48 匹^{注3}、本試験用として雄 42 匹^{注4} を入手した。動物の入荷日を 1 日と数え、予備試験、本試験とも 8 日間検疫・馴化飼育した。検疫・馴化飼育期間中には体重測定 (入荷日、検疫終了日及び群分け日) 及

び体外表、栄養状態、行動などの一般状態の観察をし、その結果をもとに異常のない動物（予備試験は雌雄各 36 匹、本試験は雄 30 匹）を選択し、8 週齢で試験に供した。試験系から除外された動物数は、予備試験が雌雄各 12 匹、本試験は雄 12 匹であった。

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

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

6.5 飼育条件

動物は温度（予備試験 21～24℃、本試験 21～24℃）、相対湿度（予備試験 37～57 %、本試験 43～64 %）、換気回数 1 時間当たり 10～15 回、照明 1 日 12 時間（07:00～19:00）の飼育室（飼育室番号：予備試験 110 号室、本試験 501 号室）で、床敷（ホワイトフレーク：日本チャールス・リバー株式会社）を入れたプラスチックケージ（W 155×D 245×H 150mm：日本クレア株式会社）に 1 匹ずつ収容し、固形飼料 CRF-1〔オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：060808（予備試験、本試験）〕及び飲料水（御殿場市営水道水：給水瓶使用）を自由に摂取させ飼育した。

6.6 飼料、飲料水及び床敷中の混入物質

飼料、飲料水及び床敷中の混入物質については、飼料は使用したロットごとに分析したデータを、床敷は 2006 年 10 月に分析したデータを財団法人日本食品分析センターからそれぞれ入手し、飲料水については、水道法に準拠した水質の分析を東芝機械環境センター株式会社に定期的（年 4 回）に依頼し、試験期間を保証するデータを入力し、それぞれ異常のないことを確認して、その写しを保存した。

6.7 動物の識別及びケージへの表示

- | | | |
|--------|---|---|
| 小動物用耳標 | ： | 予備試験では 505～600、本試験では 818～859 の番号が刻印された耳標を入荷時に装着した。 |
| 動物番号 | ： | 群分け後は群ごとに 1 から始まる番号をつけた。
予備試験では、100 の位は群、10 の位は性（雄は 0 番、雌は 1 番）、1 の位は個体番号とした。本試験では、投与量ごと（陰性対照群、低、中、高用量群及び陽性対照群の順）に 4 桁の番号をつけた。本試験の場合、1000 の位は群、100 の位は性（雄は 0 番）、10 と 1 の位は個体番号とした。各飼育ケージに用量（群）ごとに色分けしたケージラベルを付け、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び骨髓採取日を明記した。 |

6.8 群分け

動物は、検疫・馴化期間中、異常がみられなかった個体を使用した。群分け当日（投

与日)の体重により層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等になるよう各群を構成した。使用した動物の投与日における体重範囲は、予備試験が雄 32.4～35.8 g、雌 24.0～28.9 g、本試験が雄 31.3～35.4 gであった。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ(ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割り当てる)により行った。また、投与日における動物の週齢は8週齢であった。群分け後の余剰動物は、予備試験及び本試験とも動物試験終了日にエーテル深麻酔下で安楽死させた。

6.9 投与経路、投与方法及びそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口とした。投与容量は10 mL/kg 体重とし、マウスにフレキシブル胃ゾンデを用いて投与した。個体ごとの投与液量は投与日の体重を基準に算出した。陰性対照群には媒体を同様に投与した。陽性対照群にはマウス骨髄細胞に小核の誘発が報告されているMMCを25Gの注射針を用いて腹腔内に1回投与した。投与容量は10 mL/kg 体重とした。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

6.10.1 予備試験

予備試験における最高用量を毒性試験法ガイドラインで定める最高用量である2000 mg/kgとし、以下公比2で除し、1000、500、250 mg/kgを設定した。骨髄採取時間は投与後約24、48及び72時間とし、該当する各3匹より、大腿骨骨髄細胞を採取し塗抹標本を作製後観察した。群構成表を表1に示す。

表 1. 予備試験群構成表

群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与 容量 (mL/kg)	性	骨髄採取時間					
					投与後約 24 時間群		投与後約 48 時間群		投与後約 72 時間群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号	動物数	動物番号
低 用 量	250	25	10	雄	3	101～103	3	104～106	3	107～109
				雌	3	111～113	3	114～116	3	117～119
中 用 量	500	50	10	雄	3	201～203	3	204～206	3	207～209
				雌	3	211～213	3	214～216	3	217～219
高 用 量	1000	100	10	雄	3	301～303	3	304～306	3	307～309
				雌	3	311～313	3	314～316	3	317～319
最高用量	2000	200	10	雄	3	401～403	3	404～406	3	407～409
				雌	3	411～413	3	414～416	3	417～419

6.10.2 本試験

被験物質の投与量及び骨髄採取時期は予備試験の結果を基に以下のように決定した。

予備試験において、雌雄マウスに250、500、1000及び2000 mg/kgを単回投与した結果、投与後約2時間までに、1000及び2000mg/kg投与群の雌雄全例、500mg/kg投与群の雄6/9例、雌5/9例が死亡した。一般状態では被験物質の色に起因すると考えられる黄色尿が投与翌日までに各投与群に確認された。体重では、250mg/kg投与群の

雌雄で投与後 1 日目に減少傾向を示したが用量に依存したものではなかった。

また、幼若赤血球数及び小核を有する幼若赤血球の誘発頻度については、投与後約 24、48 及び 72 時間の骨髓細胞観察結果では、死亡例のみられた 500mg/kg 投与群及び死亡例のみられなかった 250mg/kg 投与群においても幼若赤血球数の減少及び小核を有する幼若赤血球の増加は認められなかった。

したがって、本試験における投与量は、ガイドラインの定める「それ以上の用量で致死が予想される用量」に該当する 250 mg/kg を高用量とし、以下公比 2 で除して、125 及び 62.5 mg/kg の 3 用量を設定した。これに媒体を投与する陰性対照群及び MMC を投与する陽性対照群を加え、計 5 群とした。1 群当たりの動物数は 6 匹とした。

骨髓採取時期はいずれの骨髓細胞観察時間でも明白な小核誘発頻度の上昇が認められなかったため投与後約 24 時間とした。また、毒性発現に明らかな性差が見られなかったため、雄のみで実施した。

なお、MMC の投与量は小核の誘発が報告されている 1 mg/kg とし、投与後約 24 時間に骨髓を採取した。群構成表を表 2 に示す。

表 2. 本試験群構成表

群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号	骨髓採取時間 (投与後)
陰性対照群	0	0	10	雄	6	1001～1006	約 24 時間
低用量群	62.5	6.25	10	雄	6	2001～2006	約 24 時間
中用量群	125	12.5	10	雄	6	3001～3006	約 24 時間
高用量群	250	25	10	雄	6	4001～4006	約 24 時間
陽性対照群	1*	0.1*	10	雄	6	5001～5006	約 24 時間

*MMC の投与量及び濃度を示す。

6.11 観察及び検査の方法

6.11.1 一般状態の観察

予備試験及び本試験とも、各群の投与前、投与直後、投与後約 2 時間、また、投与翌日から骨髓採取終了日まで 1 日 1 回、体外表、栄養状態、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

6.11.2 体重測定

予備試験では、投与日と投与翌日から骨髓採取終了日まで、9:00～11:14 に測定した。本試験では、投与日と投与翌日の骨髓採取日まで、9:37～11:13 に測定した。

6.11.3 骨髓塗抹標本の作製

小核の観察のための標本を、Schmid の方法^{1,2)}に従って作製した。すなわち、投与後所定の時間に該当するマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、両側の大腿骨を摘出した。その後 1 mL ディスポーザブル注射筒と 23G 注射針を用いて、約 0.1～0.2 mL の牛胎児血清〔GIBCO BRL、ロット番号：1299355（予備試験、本試験）〕で骨髓細胞を遠心

管に洗い出した。次に、この注射筒及び注射針を用いて骨髓細胞と牛胎児血清を混和して細胞をほぐし、1000 rpmで5分間遠心分離（トミー工業株式会社、卓上多本架遠心機 LC-220）し、上清を捨て、沈殿物をミキサーでよく混和しスライドグラスに塗抹した（塗抹標本は1匹につき左右大腿骨から各1枚を作製）。塗抹した標本は風乾させ、メタノール〔和光純薬工業株式会社、ロット番号：EWQ0288（予備試験、本試験）〕で3分間固定した後、再び風乾した。なお、標本の作製に際しては、動物番号と試料番号の対照表を作成し、標本には試験番号・ステージ・試料番号・試験の種類及び作製日を明記したラベルを付けた。

6.11.4 骨髓塗抹標本の観察

観察は盲検法で行うため試料番号をもとに、塗抹状態の良好な1枚を選択した。骨髓塗抹標本のアクリジンオレンジ蛍光染色及び観察は、Hayashiらの方法^{3,4)}に従った。予め40 µg/mLアクリジンオレンジ水溶液を少量滴下したカバーグラスに骨髓塗抹標本を載せた。波長490 nm付近の励起光、観察用フィルターとして515 nm以上の波長を透過するものを備えた蛍光顕微鏡（システム生物顕微鏡：オリンパス光学工業株式会社 BX40、ユニバーサル落射蛍光装置：オリンパス株式会社 BX-FLA）を用いて、総合倍率600倍で観察した。1個体当たり全赤血球200個中の幼若赤血球（以下、PCEと略す）と正染色赤血球を計数し、同時にPCE 2000個中の小核を有する幼若赤血球（以下、MNPCEと略す）を計数した。

6.11.5 観察結果の判定

結果は以下についてまとめた。

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

また、群ごとにMNPCE数とその出現頻度（%）、PCE数とその出現頻度（%）について平均値と標準偏差を算出し、各出現頻度（%）については最大値と最小値も算出した。

本試験では更に、小核の出現頻度に対する有意性の判定は、陰性対照群と陽性対照群のMNPCEの出現率が当社の背景データのMean±3S.D.内であることを確認した後、陰性対照群と被験物質投与群とを比較し、2項分布に基づくKastenbaum&Bowmanの検定⁵⁾（片側、 $p \leq 0.05$ ）並びにCochran Armitageの傾向検定⁶⁾（両側、 $p \leq 0.05$ 、0.01）を行った。PCEの出現頻度については、陰性対照群と各被験物質投与群との間でF検定⁷⁾で等分散性（片側、 $P < 0.05$ ）を調べ、分散が等しくなかった低及び中用量群にはAspin-Welchのt検定を、分散が等しかった高用量群にはStudentのt検定（両側、 $p < 0.05$ 、0.01）⁷⁾を行った。

また、陽性対照群については、MNPCEの出現頻度（%）を陰性対照群と比較し、2項分布に基づくKastenbaum&Bowmanの検定（片側、 $p \leq 0.05$ ）を行った。更にPCEの出現頻度についても、陰性対照群との間でF検定で等分散性（片側、 $p < 0.05$ ）を調

M-1253

べ、分散が等しかったため Student の t 検定（両側、 $p < 0.05$ 、 0.01 ）を行った。

7. 試験結果

7.1 予備試験

p-ニトロフェノールナトリウムの 250、500、1000 及び 2000 mg/kg を投与した。

7.1.1 一般状態

結果を Appendix 1-1 及び 1-2 に示した。

投与後約 2 時間までに、1000 及び 2000mg/kg 投与群の雌雄全例、500mg/kg 投与群の雄 6/9 例、雌 5/9 例が死亡した。一般状態では被験物質の色に起因すると考えられる黄色尿が投与翌日までに各投与群に確認された。

7.1.2 体重

結果を Appendix 2-1 及び 2-2 に示した。

250mg/kg 投与群の雌雄で投与後 1 日目に減少傾向を示したが用量に依存したものはなかった。

7.1.3 骨髄塗抹標本の観察結果

結果を Appendix 3-1～3-6 に示した。

幼若赤血球数及び小核を有する幼若赤血球の誘発頻度については、投与後約 24、48 及び 72 時間の骨髄細胞観察結果では、死亡例のみられた 500mg/kg 投与群及び死亡例のみられなかった 250mg/kg 投与群においても幼若赤血球数の減少及び小核を有する幼若赤血球数の増加は認められなかった。

7.2 本試験

p-ニトロフェノールナトリウムの 62.5、125 及び 250 mg/kg、陰性対照として 0.5 w/v%CMC-Na 水溶液、陽性対照として MMC の 1 mg/kg を投与した。

7.2.1 一般状態

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

各被験物質投与群において、黄色尿が投与翌日までに全例に確認された。

7.2.2 体重

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

各投与群において、投与翌日に増加抑制又は減少傾向がみられた。

7.2.3 骨髄塗抹標本の観察結果

個体別の結果を Appendix 6 に、総括を Table 3 にそれぞれ示した。

被験物質投与群では MNPCE の出現頻度が 62.5 mg/kg 投与群で 0.10 ± 0.05 %、125

mg/kg 投与群で 0.12 ± 0.04 %、250 mg/kg 投与群で 0.11 ± 0.06 %を示した。これらの値を陰性対照群の 0.11 ± 0.06 %と比較した結果、いずれの投与群も統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加は示さず、用量依存的 ($p \leq 0.05$ 、0.01) な増加も認められなかった。

また、各被験物質投与群の全赤血球 200 個中に占める PCE の出現頻度は、陰性対照群と比較して統計学的に有意 ($p < 0.05$ 、0.01) な減少を示さなかった。

更に、陽性対照群の MNPCE の出現頻度である 1.43 ± 0.46 %は、陰性対照群と比べ統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加を示し、全赤血球 200 個中に占める PCE の出現頻度は、陰性対照群と比較して統計学的に有意 ($p < 0.05$) な減少は示さなかった。

また、陰性対照群及び陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、当社の背景データの $\text{Mean} \pm 3\text{S.D.}$ の範囲内にあった。

8. 考察

p-ニトロフェノールナトリウムの染色体異常誘発能の有無を検討するため、Crlj:CD1(ICR)系(SPF)マウスを用いた小核試験を実施した。

投与量及び骨髓細胞の採取時期を決定するための予備試験では、雌雄マウスに 250、500、1000 及び 2000 mg/kg を単回投与した結果、投与後約 2 時間までに、1000 及び 2000 mg/kg 投与群の雌雄全例、500mg/kg 投与群の雄 6/9 例、雌 5/9 例が死亡した。一般状態では被験物質の色に起因すると考えられる黄色尿が投与翌日までに各投与群に確認された。体重では、250mg/kg 投与群の雌雄で投与後 1 日目に減少傾向を示したが用量に依存したものではなかった。

また、幼若赤血球数及び小核を有する幼若赤血球の誘発頻度については、投与後約 24、48 及び 72 時間の骨髓細胞観察結果では、死亡例のみられた 500 mg/kg 投与群及び死亡例のみられなかった 250 mg/kg 投与群においても幼若赤血球数の減少及び小核を有する幼若赤血球数の増加は認められなかった。

したがって、本試験における投与量は、ガイドラインの定める「それ以上の用量で致死が予想される用量」に該当する 250 mg/kg を高用量とし、以下公比 2 で除して、125 及び 62.5 mg/kg の 3 用量を設定した。

いずれの骨髓細胞観察時間でも明白な小核誘発頻度の上昇が認められなかったため投与後約 24 時間とした。また、毒性発現に明らかな性差が見られなかったため、雄のみで実施した。

その結果、MNPCE の出現頻度において、各被験物質投与群は陰性対照群に比べて有意な増加は認められず、用量相関性も認められなかった。

また、全赤血球 200 個中に占める PCE の出現頻度は、各被験物質投与群において陰性対照群と比較して、統計学的に有意な減少を示さなかったことから、骨髓細胞の増殖抑制作用は有さないと判断した。

更に、陽性対照群における MNPCE の出現頻度は、陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加を示した。

なお、陰性対照群と陽性対照群の MNPCE の出現頻度は当研究所の背景データの Mean $\pm$ 3S.D.の範囲内であったことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、p-ニトロフェノールナトリウムは本試験条件下で Crlj:CD1(ICR)系(SPF)マウスの骨髓において、染色体異常誘発能は無いと判定した。

なお、p-ニトロフェノールナトリウムは、復帰突然変異試験で陰性、染色体異常試験では染色体の構造異常が誘発され、陽性の結果が得られている^{8,9)}。

9. 参考文献

- 1) W. Schmid, Mutation Res. 31 , 9-15 (1975).
- 2) W. Schmid, "Chemical Mutagens," Vol. 4, ed. by A. Hollaender, Plenum Press, N.Y., London, 1976, pp.76-78.
- 3) M. Hayashi, T. Sofuni, M. Jr. Ishidate, Mutat. Res., 120, 241(1983).
- 4) 林 真, "小核試験," サイエンティスト社, 東京, 1991, pp.44-55.
- 5) M.A.Kastenbaum and K.O.Bowman, Mutation Res. 9, 527-549 (1970).
- 6) 吉村 功 編, "毒性・薬効データの統計解析," サイエンティスト社, 東京, 1987, pp. 67-69.
- 7) G. W. Snedecor, W. G. Cochran, "Statistical methods," 7, Iowa State University Press, 1980.
- 8) 野田 篤, 化学物質毒性試験報告書, 8, 828(2001).
- 9) 野田 篤, 化学物質毒性試験報告書, 8, 832(2001).

Table 1

A micronucleus test of p-Nitrophenol sodium salt in mice

Clinical signs

Group	Dose (mg/kg)		Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	1 day after administration
Negative control	0	Number of animals	6	6	6	6
		No abnormalities	6	6	6	6
Low	62.5	Number of animals	6	6	6	6
		No abnormalities	6	6	0	0
		Yellow urine	0	0	6	6
Middle	125	Number of animals	6	6	6	6
		No abnormalities	6	6	1	0
		Yellow urine	0	0	5	6
High	250	Number of animals	6	6	6	6
		No abnormalities	6	6	3	0
		Yellow urine	0	0	3	6
Positive control (Mitomycin C)	1	Number of animals	6	6	6	6
		No abnormalities	6	6	6	6

Table 2

A micronucleus test of p-Nitrophenol sodium salt in mice

Body weight

Group	Dose (mg/kg)		Day of administration	1 day after administration
Negative control	0	N	6	6
		Mean	33.0	32.4
		S.D.	1.4	1.3
Low	62.5	N	6	6
		Mean	33.0	32.8
		S.D.	1.2	1.3
Middle	125	N	6	6
		Mean	32.9	32.1
		S.D.	1.2	2.0
High	250	N	6	6
		Mean	33.0	31.7
		S.D.	1.3	1.2
Positive control (Mitomycin C)	1	N	6	6
		Mean	32.9	32.3
		S.D.	1.5	1.7

Unit : g

Table 3

A micronucleus test of p-Nitrophenol sodium salt in mice

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

Group	Dose (mg/kg)		No. of MNPCE in 2000 PCE	MNPCE(%) ^{a)}	No. of PCE in 200 erythrocytes	PCE(%) ^{b)}
Negative control	0	N	6	6	6	6
		Mean±S.D.	2 ± 1	0.11 ± 0.06	120 ± 11	59.9 ± 5.4
		Min./Max.		0.05 / 0.20		52.5 / 66.5
Low	62.5	N	6	6	6	6
		Mean±S.D.	2 ± 1	0.10 ± 0.05	113 ± 4	56.3 ± 2.0
		Min./Max.		0.05 / 0.15		53.5 / 59.0
Middle	125	N	6	6	6	6
		Mean±S.D.	2 ± 1	0.12 ± 0.04	116 ± 4	57.8 ± 2.0
		Min./Max.		0.05 / 0.15		55.0 / 60.0
High	250	N	6	6	6	6
		Mean±S.D.	2 ± 1	0.11 ± 0.06	110 ± 9	54.8 ± 4.5
		Min./Max.		0.05 / 0.20		52.0 / 64.0
Positive control (Mitomycin C)	1	N	6	6	6	6
		Mean±S.D.	29 ± 9	1.43 ± 0.46 ^{c)}	111 ± 6	55.5 ± 3.0
		Min./Max.		0.95 / 2.15		52.0 / 59.5

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

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

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