

最終報告書

o-sec-ブチルフェノールのラット小核試験

(試験番号：B070401)

株式会社三菱化学安全科学研究所

2. 目次

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	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	11
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	13
6.3.8	入荷動物数	13
6.3.9	検疫・馴化	13
6.3.10	群分け	13
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	14
6.4	動物飼育	14
6.4.1	飼育室	14
6.4.2	飼育環境	14
6.4.3	飼育器材	15
6.4.4	床敷	15
6.4.5	飼料	15
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	16
6.6	対照物質の調製	16
6.6.1	陽性対照物質	16
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	18
6.7.4	体重測定	18
6.7.5	一般状態観察	18
6.7.6	標本作製時期	19
6.7.7	標本作製時期設定理由	19
6.7.8	標本作製	19
6.7.9	評価に用いる動物	19
6.7.10	標本の観察	19
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	20

6.8.2	全赤血球中の多染性赤血球の割合	20
6.8.3	動物体重	20
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	21
7.	結果および考察	22
7.1	体重	22
7.2	一般状態	22
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	22
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

o-sec-ブチルフェノールのラット小核試験

3.2 試験番号

B070401

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 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

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
〒108-0023 東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地

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 *o*-sec-ブチ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 75, 150, 300 および 600 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 (コーン油) 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.

雄では何れの被験物質投与群においても死亡例は認められなかったため, 150, 300 および 600 mg/kg/day 群について, 雌では 300 mg/kg/day 群の 1 例で誤投与による死亡例が認められたため, 被験物質投与群は生存した全個体について, それぞれ小核をもつ PCE (MNPCE) の出現頻度を求めた.

その結果, 雄の 600 mg/kg/day 群で MNPCE の出現頻度は $0.20 \pm 0.05\%$ を示し, 陰性対照群 (出現頻度: $0.06 \pm 0.08\%$) と比較して有意な ($p \leq 0.01$) 増加が認められた. また, その増加に用量依存性 ($p \leq 0.05$) も認められ, 小核試験陽性と判定された. しかしながら, 600 mg/kg/day 群における MNPCE 出現頻度 ($0.20 \pm 0.05\%$) は試験施設における陰性対照群の背景値の範囲 (MNPCE 出現頻度: $\text{Mean} \pm 3\text{SD} = 0.13 \pm 0.24\%$, 動物数 449 例) 内の値であり, 統計学的には有意な増加と判定されたが, 生物学的には有意な増加ではないものと考えた. 雌では, いずれの被験物質群においても陰性対照群と比較して有意な MNPCE 数の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.

被験物質の *o*-sec-ブチルフェノールは本試験条件下で, 雄では小核試験陽性, 雌では小核試験陰性と判定されたが, 雄の陽性結果は試験施設における陰性対照群の背景値の範囲内の値であり, 生物学的に有意な増加ではなく, 本被験物質はラット骨髓細胞における染色体異常誘発性を有し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

o-sec-ブチルフェノール [別名：2- (1-メチルプロピル) フェノール]

6.1.2 CAS 番号

89-72-5

6.1.3 ロット番号

6.1.4 純度

99.5%

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：16.2～26.4℃），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

本州化学工業株式会社

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) セル板（KBr）の上に被験物質を一滴落とした。
- (2) (1) の上にもう一枚のセル板（KBr）を密着させた。
- (3) 分光光度計にセットし，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

コーン油

6.2.1.2 製造元

純正化学株式会社

6.2.1.3 ロット番号

6G2122

6.2.1.4 保管条件

室温（許容範囲：10～30℃，入手日から最終使用日までの実測値：16.7～29.0℃）

6.2.1.5 使用期限

2012 年 2 月 23 日

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 7 月 4 日）および検疫終了日（2007 年 7 月 9 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 7 月 9 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7月10日)における全試験動物の体重範囲は雄 247～272 g, 雌 168～189 g であり、平均体重(雄 258.5 g, 雌 178.1 g) $\pm$ 20%以内(雄 206.8～310.2 g, 雌 142.5～213.7)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7月12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: 42775Z721)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 4125 室, 検疫終了から標本作製日までは 2124 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: 21.8～22.9℃)

6.4.2.2 相対湿度

許容範囲 35.0～75.0% (実測値: 46.6～62.2%)

6.4.2.3 換気

6～20 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：070403，070517）

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7月6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（2006年8月22日、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、被験物質を秤量した。
- (2) コーン油を加え、攪拌して溶解した。
- (3) 下表の通り、コーン油で定容した。

濃度 (mg/mL)	被験物質秤量値 (g)	定容量 (mL)
7.5	0.6	80
15	1.2	80
30	2.4	80
60	4.8	80

6.6 対照物質の調製

6.6.1 陽性対照物質

紫外線をカットした照明下で調製した。

- (1) CP を 320 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：7A79N）を加え 160 mL とし，超音波処理により溶解した（2 mg/mL 溶液）。
- (3) 投与回毎に褐色ガラス瓶に分取し，使用日まで冷蔵（許容範囲 1～10℃，調剤から最終使用までの実測値：3.7～5.8℃）で保管した。
- (4) 投与には 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 B070415）は 150, 300, 600, 1200 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，雌雄共に 1200 mg/kg/day 群では死亡例が認められ，600 mg/kg/day 群でも一般状態の変化（雄：全例で歩行異常，雌：全例で歩行異常，2/3 例で自発運動の低下，1/3 例で伏臥位および呼吸不整）がみられた。これらの結果に基づき，被験物質用量は下記（公比 2，4 用量）を設定した。

雄：75, 150, 300, 600 mg/kg/day

雌：75, 150, 300, 600 mg/kg/day

また，媒体（コーン油）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。

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 (コーン油)	0	2	p.o.	最終 投与後 24 時間	5	10101～10105
被験物質群 (<i>o</i> -sec- ブチルフェノール)	75	2	p.o.		5	10201～10205
	150	2	p.o.		5	10301～10305
	300	2	p.o.		5	10401～10405
	600	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 (コーン油)	0	2	p.o.	最終 投与後 24 時間	5	50101～50105
被験物質群 (<i>o</i> -sec- ブチルフェノール)	75	2	p.o.		5	50201～50205
	150	2	p.o.		5	50301～50305
	300	2	p.o.		5	50401～50405
	600	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（1 回目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 時間後、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、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 分間以上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

〈雄〉

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、全例生存したので上位 3 用量（150, 300, 600 mg/kg/day 群）を選択し、その全動物について評価した。

〈雌〉

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 300 mg/kg/day 群の 1 例が誤投与により死亡し、評価動物数が減少した。これを補うために、被験物質群については生存した全動物（75, 150, 300, 600 mg/kg/day 群）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

- (1) 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%）。
- (2) 被験物質群のいずれかで有意差がみられる場合は，SAS 前臨床パッケージ[8]の Cochran-Armitage 検定を行い（有意水準：5%），用量反応性を確認した。

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 検定の結果，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%および 1%）。
- (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 検定の結果，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%および 1%）。
- (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 B070401_（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統計学的に有意な差はみられなかったが、雄の 600 mg/kg/day 群、雌の 75 および 150 mg/kg/day 群において 2 回目投与直前の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)

雄の 75, 150, 300 mg/kg/day 群では一般状態の異常はみられなかった。600 mg/kg/day 群では初回投与後 1 時間までに 1 例で下痢が、別の 2 例で 2 回目投与後の 1 時間までに歩行異常、3 時間後には軽度な自発運動の低下が認められた。雌の 75, 150 mg/kg/day 群および 300 mg/kg/day 群 (1 例は標本作製前に誤投与により死亡) では一般状態の異常はみられなかった。600 mg/kg/day 群では初回投与後 1 時間までに 2 例で歩行異常がみられ、この内 1 例では軽度な自発運動の低下が認められた。同 2 例を含む 4 例では 2 回目投与後の 1 時間までに歩行異常がみられ、この内 2 例では軽度な自発運動の低下がみられた。投与後 1 時間までに歩行異常がみられた動物 4 例の内 3 例では投与 3 時間後にも歩行異常および軽度な自発運動の低下が認められた。

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、被験物質の 150, 300 および 600 mg/kg/day 群でそれぞれ 10, 14 および 20 個 (出現頻度は各々 0.10 ± 0.05 , 0.14 ± 0.09 および $0.20 \pm 0.05\%$) を示し、陰性対照群の 6 個 (出現頻度: $0.06 \pm 0.08\%$) と比較して 600 mg/kg/day 群では有意な ($p \leq 0.01$) 増加が認められた。また、その増加に用量依存性 ($p \leq 0.05$) も認められ、小核試験陽性と判定された。しかしながら、600 mg/kg/day 群における MNPCE 出現頻度 ($0.20 \pm 0.05\%$) は試験施設における陰性対照群の背景値の範囲 (Appendix 2-1, MNPCE 出現頻度: $\text{Mean} \pm 3\text{SD} = 0.13 \pm 0.24\%$, 動物数 449 例) 内の値であり、今回実施した陰性対照群の値 (出現頻度: $0.06 \pm 0.08\%$) が低かったことに起因する陽性結果と考えられた [9]。

赤血球中の PCE の割合は、被験物質の 150, 300 および 600 mg/kg/day 群でそれぞれ $54.7 \pm 3.4\%$, $52.9 \pm 5.1\%$ および $56.6 \pm 1.4\%$ であり、陰性対照群 ($51.0 \pm 5.2\%$) 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 545 個（出現頻度 $5.45 \pm 1.25\%$ ）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 $44.7 \pm 5.1\%$ であった。

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= $0.13 \pm 0.24\%$, PCE の割合：Mean $\pm$ 3SD= $53.2 \pm 8.7\%$, 動物数 449 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）あるいは 8000 個（2000 個 $\times$ 4 匹／300 mg/kg/day 群のみ）の PCE 中の MNPCE 出現数は、被験物質の 75, 150, 300 および 600 mg/kg/day 群でそれぞれ 13, 9, 8 および 11 個（出現頻度は各々 0.13 ± 0.08 , 0.09 ± 0.05 , 0.10 ± 0.07 および $0.11 \pm 0.04\%$ ）であり、陰性対照群の 11 個（出現頻度 $0.11 \pm 0.05\%$ ）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 75, 150, 300 および 600 mg/kg/day 群でそれぞれ $57.0 \pm 3.5\%$, $53.4 \pm 3.7\%$, $53.8 \pm 5.8\%$ および $52.7 \pm 3.0\%$ であり、陰性対照群（ $55.0 \pm 5.7\%$ ）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 319 個（出現頻度 $3.19 \pm 1.30\%$ ）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 $25.8 \pm 4.0\%$ 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：Mean $\pm$ 3SD= $0.13 \pm 0.21\%$, PCE の割合：Mean $\pm$ 3SD= $51.8 \pm 10.2\%$, 動物数 55 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。

以上の試験結果から、*o*-sec-ブチルフェノールは雌性においてラット小核試験陰性と判定されたが雄性では陽性と判定された。しかしながら雄性でみられた陽性結果は、試験施設における陰性対照群の背景値の範囲内の値であり、統計学的には有意な増加と判定されたが、生物学的には有意な増加ではないものと考えた[9]。

8. 結論

被験物質の *o*-sec-ブチルフェノールは本試験条件下で、雄では小核試験陽性、雌では小核試験陰性と判定されたが、雄の陽性結果は試験施設における陰性対照群の背景値の範囲内の値であり、本被験物質はラット骨髄細胞における染色体異常誘発性を有し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.
- [8] SAS Institute Inc. SAS/STAT Software: Changes and Enhancements, through Release 6.11, Cary, NC: SAS Institute Inc.; 1996.
- [9] Hayashi, M., I. Yoshimura, T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1989) A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 347-356.

Table 1-1 Body weight (Male)

Treatment group	Dose level (mg/kg) Frequency Route	Animal number	Body weight (g)		
			Just before the first dosing	Just before the second dosing	Before preparation of specimens
Negative control (Corn oil)	0	10101	260	267	280
		10102	250	256	269
	Twice ¹ p.o.	10103	263	267	280
		10104	272	277	285
		10105	250	250	265
		Mean±SD	259.0 ± 9.3	263.4 ± 10.5	275.8 ± 8.4
Test substance (<i>o</i> -sec- Butylphenol)	75	10201	262	270	283
		10202	254	261	270
	Twice ¹ p.o.	10203	258	263	276
		10204	264	266	278
		10205	253	259	270
		Mean±SD	258.2 ± 4.8	263.8 ± 4.3	275.4 ± 5.5
	150	10301	263	271	289
		10302	251	255	269
	Twice ¹ p.o.	10303	256	264	274
		10304	256	262	274
		10305	261	266	280
		Mean±SD	257.4 ± 4.7	263.6 ± 5.9	277.2 ± 7.7
	300	10401	247	254	269
		10402	258	264	273
	Twice ¹ p.o.	10403	268	272	287
		10404	267	270	282
		10405	257	261	275
		Mean±SD	259.4 ± 8.6	264.2 ± 7.2	277.2 ± 7.2
	600	10501	252	250	263
		10502	257	262	268
	Twice ¹ p.o.	10503	262	261	274
		10504	268	262	280
		10505	251	253	264
		Mean±SD	258.0 ± 7.1	257.6 ± 5.7	269.8 ± 7.2
Positive control (CP)	20	10601	261	263	275
		10602	265	264	279
	Twice ¹ p.o.	10603	265	266	276
		10604	258	259	266
		10605	247	249	260
		Mean±SD	259.2 ± 7.4	260.2 ± 6.8	271.2 ± 7.9

CP: Cyclophosphamide monohydrate

1. In a 24 hr-interval

Table 1-2 Body weight (Female)

Treatment group	Dose level (mg/kg) Frequency Route	Animal number	Body weight (g)		
			Just before the first dosing	Just before the second dosing	Before preparation of specimens
Negative control (Corn oil)	0	50101	184	185	193
		50102	179	179	181
	Twice ¹ p.o.	50103	176	175	182
		50104	180	187	196
		50105	171	174	179
		Mean±SD	178.0 ± 4.8	180.0 ± 5.8	186.2 ± 7.7
Test substance (<i>o</i> -sec-Butylphenol)	75	50201	182	181	190
		50202	187	185	193
	Twice ¹ p.o.	50203	179	178	187
		50204	169	169	183
		50205	174	175	178
		Mean±SD	178.2 ± 7.0	177.6 ± 6.1	186.2 ± 5.9
	150	50301	175	176	184
		50302	178	179	186
	Twice ¹ p.o.	50303	183	180	187
		50304	183	180	188
		50305	171	170	171
		Mean±SD	178.0 ± 5.2	177.0 ± 4.2	183.2 ± 7.0
	300	50401	187	190	194
		50402	177	180	181
	Twice ¹ p.o.	50403	188	191	197
		50404	173	174	188
		50405	170	172	NA ²
		Mean±SD	179.0 ± 8.2	181.4 ± 8.8	190.0 ± 7.1
	600	50501	179	184	199
		50502	173	172	175
	Twice ¹ p.o.	50503	181	187	186
		50504	189	189	198
		50505	173	175	174
		Mean±SD	179.0 ± 6.6	181.4 ± 7.5	186.4 ± 12.0
Positive control (CP)	20	50601	178	173	179
		50602	185	188	194
	Twice ¹ p.o.	50603	168	165	174
		50604	174	170	175
		50605	177	185	191
		Mean±SD	176.4 ± 6.2	176.2 ± 9.9	182.6 ± 9.3

CP: Cyclophosphamide monohydrate, NA: Not Applicable

1. In a 24 hr-interval

2. Body weights of animals (50405) at a find of dead was 166 g.

Table 2-1 Clinical signs (Male)

Treatment group	Dose level (mg/kg)	Animal number	Clinical signs						
			First dosing			Second dosing			Before preparation of specimens
			Before	0-1 hr after	3 hr after	Before	0-1 hr after	3 hr after	
Negative control (Corn oil)	0	10101	-	-	-	-	-	-	-
		10102	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10103	-	-	-	-	-	-	-
		10104	-	-	-	-	-	-	-
		10105	-	-	-	-	-	-	-
Test substance (o-sec-Butylphenol)	75	10201	-	-	-	-	-	-	-
		10202	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10203	-	-	-	-	-	-	-
		10204	-	-	-	-	-	-	-
		10205	-	-	-	-	-	-	-
	150	10301	-	-	-	-	-	-	-
		10302	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10303	-	-	-	-	-	-	-
		10304	-	-	-	-	-	-	-
		10305	-	-	-	-	-	-	-
	300	10401	-	-	-	-	-	-	-
		10402	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10403	-	-	-	-	-	-	-
		10404	-	-	-	-	-	-	-
		10405	-	-	-	-	-	-	-
	600	10501	-	-	-	-	A	D(+)	-
		10502	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10503	-	-	-	-	-	-	-
		10504	-	Di	-	-	-	-	-
		10505	-	-	-	-	A	D(+)	-
Positive control (CP)	20	10601	-	-	-	-	-	-	-
		10602	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	10603	-	-	-	-	-	-	-
		10604	-	-	-	-	-	-	-
		10605	-	-	-	-	-	-	-

CP: Cyclophosphamide monohydrate,

-: No abnormality, D: Decrease in locomotor activity, A: ataxic gait, Di: Diarrhea, Grade: + = Slight

1. In a 24 hr-interval

Table 2-2 Clinical signs (Female)

Treatment group	Dose level		Clinical signs						
	(mg/kg)	Animal number	First dosing			Second dosing			Before preparation of specimens
	Frequency Route		Before	0-1 hr after	3 hr after	Before	0-1 hr after	3 hr after	
Negative control (Corn oil)	0	50101	-	-	-	-	-	-	-
		50102	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50103	-	-	-	-	-	-	-
		50104	-	-	-	-	-	-	-
		50105	-	-	-	-	-	-	-
Test substance (<i>o</i> -sec-Butylphenol)	75	50201	-	-	-	-	-	-	-
		50202	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50203	-	-	-	-	-	-	-
		50204	-	-	-	-	-	-	-
		50205	-	-	-	-	-	-	-
	150	50301	-	-	-	-	-	-	-
		50302	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50303	-	-	-	-	-	-	-
		50304	-	-	-	-	-	-	-
		50305	-	-	-	-	-	-	-
	300	50401	-	-	-	-	-	-	-
		50402	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50403	-	-	-	-	-	-	-
		50404	-	-	-	-	-	-	-
		50405	-	-	-	-	-	-	De
	600	50501	-	D(+),A	-	-	A	D(+),A	-
		50502	-	-	-	-	D(+),A	D(+),A	-
	Twice ¹ p.o.	50503	-	-	-	-	-	-	-
		50504	-	-	-	-	A	-	-
		50505	-	A	-	-	D(+),A	D(+),A	-
Positive control (CP)	20	50601	-	-	-	-	-	-	-
		50602	-	-	-	-	-	-	-
	Twice ¹ p.o.	50603	-	-	-	-	-	-	-
		50604	-	-	-	-	-	-	-
		50605	-	-	-	-	-	-	-

CP: Cyclophosphamide monohydrate,

-: No abnormality, De: Death (by miss administration), D: Decrease in locomotor activity, A: ataxic gait, Grade: + = Slight

1. In a 24 hr-interval

Table 3-1 Results of micronucleus test (Male)

Treatment group	Dose level (mg/kg) 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 (Corn oil)	0	10101	2000	0	0.00	1000	46.6
		10102	2000	1	0.05	1000	51.4
	Twice ¹ p.o.	10103	2000	0	0.00	1000	49.4
		10104	2000	4	0.20	1000	59.8
		10105	2000	1	0.05	1000	47.9
	Total / Mean±SD		10000	6	0.06 ± 0.08		51.0 ± 5.2
Test substance (<i>o</i> -sec-Butylphenol)	150	10301	2000	1	0.05	1000	57.6
		10302	2000	3	0.15	1000	54.9
	Twice ¹ p.o.	10303	2000	1	0.05	1000	52.7
		10304	2000	3	0.15	1000	58.1
		10305	2000	2	0.10	1000	50.0
	Total / Mean±SD		10000	10	0.10 ± 0.05		54.7 ± 3.4
	300	10401	2000	2	0.10	1000	58.4
		10402	2000	2	0.10	1000	45.2
	Twice ¹ p.o.	10403	2000	2	0.10	1000	56.5
		10404	2000	2	0.10	1000	53.4
		10405	2000	6	0.30	1000	51.1
	Total / Mean±SD		10000	14	0.14 ± 0.09		52.9 ± 5.1
	600	10501	2000	3	0.15	1000	55.6
		10502	2000	4	0.20	1000	55.8
	Twice ¹ p.o.	10503	2000	5	0.25	1000	58.2
		10504	2000	5	0.25	1000	55.4
		10505	2000	3	0.15	1000	58.0
	Total / Mean±SD		10000	20 ^{##}	0.20 ± 0.05		56.6 ± 1.4
Positive control (CP)	20	10601	2000	84	4.20	1000	49.7
		10602	2000	137	6.85	1000	37.8
	Twice ¹ p.o.	10603	2000	107	5.35	1000	42.9
		10604	2000	132	6.60	1000	49.7
		10605	2000	85	4.25	1000	43.4
	Total / Mean±SD		10000	545 ^{##}	5.45 ± 1.25		44.7 ± 5.1

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

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.In this test, dose-dependent increase of the MNPCEs was detected using Cochran-Armitage test ($p \leq 0.05$).

Table 3-2 Results of micronucleus test (Female)

Treatment group	Dose level (mg/kg) 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 (Corn oil)	0	50101	2000	2	0.10	1000	59.5
		50102	2000	2	0.10	1000	56.6
		50103	2000	4	0.20	1000	53.3
		50104	2000	1	0.05	1000	59.7
		50105	2000	2	0.10	1000	45.9
	Total / Mean±SD		10000	11	0.11 ± 0.05		55.0 ± 5.7
Test substance (<i>o</i> -sec-Butylphenol)	75	50201	2000	4	0.20	1000	52.0
		50202	2000	3	0.15	1000	55.7
		50203	2000	2	0.10	1000	61.2
		50204	2000	0	0.00	1000	59.1
		50205	2000	4	0.20	1000	57.0
	Total / Mean±SD		10000	13	0.13 ± 0.08		57.0 ± 3.5
	150	50301	2000	3	0.15	1000	57.5
		50302	2000	2	0.10	1000	50.5
		50303	2000	2	0.10	1000	53.2
		50304	2000	0	0.00	1000	56.6
		50305	2000	2	0.10	1000	49.1
	Total / Mean±SD		10000	9	0.09 ± 0.05		53.4 ± 3.7
	300	50401	2000	1	0.05	1000	59.7
		50402	2000	1	0.05	1000	53.3
		50403	2000	2	0.10	1000	56.0
		50404	2000	4	0.20	1000	46.0
		Total / Mean±SD	8000	8	0.10 ± 0.07		53.8 ± 5.8
	600	50501	2000	2	0.10	1000	48.3
		50502	2000	3	0.15	1000	51.1
		50503	2000	1	0.05	1000	54.2
		50504	2000	3	0.15	1000	53.8
		50505	2000	2	0.10	1000	56.0
	Total / Mean±SD		10000	11	0.11 ± 0.04		52.7 ± 3.0
Positive control (CP)	20	50601	2000	54	2.70	1000	27.0
		50602	2000	77	3.85	1000	30.6
		50603	2000	51	2.55	1000	20.2
		50604	2000	35	1.75	1000	27.4
		50605	2000	102	5.10	1000	23.7
	Total / Mean±SD		10000	319 ^{##}	3.19 ± 1.30		25.8 ± 4 ^{**}

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

CP: Cyclophosphamide monohydrate

l. 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.