

Table 1. Concentration of HQ in rat plasma after i.v. administration as aqueous solution.

Concentration of administered HQ (%)	Time after administration (min)	Concentration of HQ in plasma (ppm)
2	1	8.37
	3	4.40
	5	2.20
	10	0.55
	15	0.05
	30	0.00
	60	0.00
5	1	14.59
	3	8.96
	5	6.81
	10	2.51
	15	1.01
	30	0.00
	60	0.00
10	1	49.64
	3	28.08
	5	20.14
	10	11.89
	15	7.81
	30	1.31
	60	0.00

Table 2. Hydroquinone concentration in rat plasma after administration of 2% hydroquinone aqueous solution to abdomen.

Treatment to abdomen	Time after administration (min)	Hydroquinone concentration (ppm)
Tape-strip	0	0.21
	30	1.78
	60	2.17
	120	0.90
	180	0.61
	240	0.29
	Intact	0
30		0.00
60		0.00
120		0.00
180		0.00
240		0.00

Table 3. Hydroquinone concentration in rat plasma after administration of products to tape- stripped abdomen.

Sample	Time after administration (min)	Hydroquinone concentration (ppm)
HQ1	0	0.00
	30	0.00
	60	0.00
	120	0.00
	180	0.00
	240	0.00
HQ2	0	0.00
	30	3.70
	60	4.64
	120	0.31
	180	0.00
	240	0.00
HQ3	0	0.00
	30	0.00
	60	0.00
	120	0.00
	180	0.00
	240	0.00
HQ4	0	0.00
	30	0.00
	60	0.00
	120	0.00
	180	0.00
	240	0.01

厚生労働科学研究費補助金・厚生労働科学特別研究事業
化粧品の自主的配合原料の安全性確認に必要とされるリスク評価情報の収集に関する研究
平成24年度分担研究報告書

化粧品原料の遺伝毒性評価手法に関する研究

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

安全性が懸念されている化粧品原料であるハイドロキノン (HQ) の in vivo 遺伝毒性を、トランスジェニックマウス (MutaTM mouse) を用いた in vivo 遺伝子突然変異試験により評価した。OECD ガイドライン (TG488) に従い、MutaTM mouse に HQ を 50、100、200mg/kg、28 日間経口投与し、3 日後に肝臓、胃での LacZ の突然変異頻度 (MF) を測定した。その結果、HQ 投与群の肝臓および胃のいずれにおいても MF 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。以上のことから、当該試験条件下において、HQ 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と判定された。

キーワード；化粧品、ハイドロキノン、遺伝毒性、突然変異、トランスジェニックマウス

A. 研究目的

現在、店頭あるいはインターネットを通じて流通している多数の化粧品の中で、美肌を目的として添加されているハイドロキノン (HQ) については、その安全性が明らかではない。特に HQ は、げっ歯類においてイニシエーション作用による催腫瘍性、もしくはプロモーション作用による腫瘍誘発の増強作用があることが報告されていることから、その発がん性が懸念されている。本研究では、HQ の in vivo における遺伝毒性、特に遺伝子突然変異誘発性を検討し、その発がんにおけるイニシエーション作用の関与を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

トランスジェニックマウス (MutaTM Mouse；雄) は株式会社 日本医科学動物資材研究所から購入した。HQ は和光純薬工業株式会社製 (lot#WEJ0292) を用いた。OECD ガイドライン (TG488) に従い、MutaTM Mouse を一群 5~6 匹に分け、HQ を 0、50、100、200mg/kg を 28 日間経口投与し、3 日後に肝臓、胃での LacZ の突然変異頻度 (MF) を測定した。尚、試験は公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センターに委託し、非 GLP で行った。

C. 結果

肝臓：陰性対照群での突然変異頻度の平均値 ± SD は、75.0 ± 11.5 (×10⁻⁶) であり、

背景データの平均 \pm 3SD 以内であった。尚、1 個体は [95.0 ($\times 10^{-6}$)] は、背景データの最高値を僅かに超えた。HQ 投与群での突然変異頻度の平均値 \pm SD は、50、100 および 200 mg/kg/day でそれぞれ 42.4 \pm 13.3 ($\times 10^{-6}$)、44.1 \pm 8.5 ($\times 10^{-6}$) および 69.0 \pm 40.1 ($\times 10^{-6}$) であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。200 mg/kg/day の 1/5 例の個別値 [138.7 ($\times 10^{-6}$)] のみ平均+3SD を上回った。

陽性対照群における突然変異頻度の平均値 \pm SD は、158.0 \pm 27.5 ($\times 10^{-6}$) であり、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た。

胃：陰性対照群での突然変異頻度の平均値 \pm SD は、39.6 \pm 7.5 ($\times 10^{-6}$) であり、背景データの平均 \pm 3SD 以内であった。HQ 投与群での突然変異頻度の平均値 \pm SD は、50.0、100 および 200 mg/kg/day でそれぞれ 54.7 \pm 14.0 ($\times 10^{-6}$)、46.7 \pm 9.0 ($\times 10^{-6}$) および 55.9 \pm 12.3 ($\times 10^{-6}$) であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、背景データの平均 \pm 3SD 以内であった。陽性対照群における突然変異頻度の平均値 \pm SD は、472.9 \pm 31.3 ($\times 10^{-6}$) であり、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た。

その他：HQ 群は用量依存的に体重の増加抑制傾向が認められたが、毒性徴候を示す一般状態の変化は観察されなかった。また、いずれの投与群においても解剖時に被験物質の影響と考えられる肉眼的異常は認められなかった。

D. 考 察

HQ の肝臓および胃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 (MutaTM mouse) を用いた遺伝子突然変異誘発性 (レポーター遺伝子: lacZ) 試験を実施した。これまで報告された毒性情報より 200 mg/kg/day を最高用量とし、100、50.0 および 25.0 mg/kg/day 用量で各群 5 あるいは 6 匹に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与し、3 日間の遺伝子突然変異発現期間をおいた後、肝臓、胃、腎臓、肺および甲状腺を摘出した。いずれの被験物質投与群においても死亡例が認められなかったため、200、100 および 50.0 mg/kg/day 投与群の 3 用量の肝臓および腺胃について lacZ assay による遺伝子突然変異頻度評価対象とした。その結果、HQ 投与群の肝臓および胃 (腺胃) のいずれにおいても遺伝子突然変異頻度 (MF) 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。尚、200 mg/kg/day 投与群の 1/5 例のみ、肝臓の MF が背景データの平均 +3SD をこえていたが、同じ用量群の他の動物においては陰性対照群と大きな差がないことから、クロール変異により偶発的に増加したものではないかと考えられた。しかしながら、これを結論付けるには遺伝子解析が必要である。陽性対照のエチルニトロソウレア (ENU) 投与群では、肝臓および胃 (腺胃) において陰性対照群と比較して統計学的に有意に遺伝子突然変異を誘発したことから、当該試験が適切な条件下でなされたと判断された。

以上のことから HQ 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と判定された。ただし、これまでの報告から HQ のマウスでの LD50 は

200mg/kg 程度と予測し、これを最高用量として試験を実施したが、死亡例、および毒性徴候を示す一般状態の変化は観察されなかったことから、MF の評価には用量が不十分である可能性も考えられる。

HQ の遺伝毒性に関してはこれまで多くの報告がある。HQ は、エームス試験で一般的に使用されている標準株では突然変異の増加を引き起こさないが、酸化変異原物質に感受性の高い TA104 株には変異原性を示した報告がある。TA104 で認められた変異原性は、superoxide dismutase (SOD) 及び catalase によりほぼ完全に阻害されたことから、活性酸素種の関与が示唆される。

哺乳類培養細胞を用いた試験では、染色体異常、小核、姉妹染色分体交換や DNA 鎖切断が引き起こされたことが報告されているが、エームス試験と同様に、SOD や S9mix 添加による HQ のそれら遺伝毒性誘発の低下が認められている。チャイニーズハムスターの細胞を用いた小核試験では、陽性結果が得られたが、小核の誘発が染色体の構造異常によるものか、数的異常によるものかは明らかではなかった。Catalase は、HQ による構造異常に由来する小核の形成を阻害し、グルタチオンは HQ による構造異常および数的異常に由来する小核の形成両方を阻害した。その他、マウスリンフォーマ試験でも陽性の報告がある。

In vivo 遺伝毒性試験ではマウスを用いた試験で、骨髄に小核及び染色体異常陽性の報告がある。HQ を投与したマウスの骨髄では、高倍数体及び染色体消失 (何れも数的

異常)が認められた。マウスの脾細胞では小核が観察され、精母細胞や精原細胞では染色体異常及び高倍数体が観察された。マウスのスポットテスト、ラットを用いた優勢致死試験では陰性結果が得られている。シヨウジョウバエを用いた試験では HQ は伴性劣性致死突然変異を引き起こさなかった。

以上のことから HQ は in vitro、in vivo において染色体異常を引き起こすが、突然変異を引き起こす明らかな証拠は無い。また、染色体異常も DNA 損傷による構造異常よりむしろ、非 DNA 損傷により数的異常が主と考えられる。今回の、試験結果もこれまでの報告を支持するものであり、in vivo での遺伝子突然変異誘発性が無いとすることの妥当性は高いと考えられる。

D. 結論

当該試験条件下において、HQ はトランスジェニックマウスの肝臓および胃 (腺胃) 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。しかしながら、最高用量 (200 mg/kg/day) においても、毒性徴候を示す一般状態の変化は観察されなかったことから量が不十分である可能性も考えられた。

D. 参考資料

最終報告書「トランスジェニックマウスを用いるハイドロキノンの遺伝子突然変異試験【GLP 非適用】試験番号：E639 (079-522) 公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター」を添付した。

最終報告書

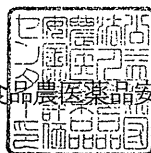
トランスジェニックマウスを用いるハイドロキノンの遺伝子突然変異試験
【GLP 非適用】

試験番号 : E639 (079-522)

2013年5月22日

試験委託者
国立医薬品食品衛生研究所

公益財団法人 食品農薬薬品安全性評価センター



Page 1 of 40

本書類は原本を複写したものであり
原本と相違ないことを保証します。
2013年5月22日
試験責任者 益森勝志

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ヒドロキノンの遺伝子突然変異試験

試験番号： E639 (079-522)

試験責任者： 益森勝志 2013年5月22日
益森勝志
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. 遵守した動物実験関連規則, 遺伝子組換え生物等関連規則および参考としたガイドライン ..	6
4. 試験番号.....	6
5. 試験施設.....	6
6. 試験委託者	6
7. 試験責任者	7
8. 試験従事者 (分担責任者)	7
9. 試験日程.....	7
10. 被験物質.....	7
11. 対照物質.....	9
12. 試験材料および方法.....	9
13. 試験方法.....	14
14. 試験成立条件	19
15. 試験結果.....	19
16. 考察および結論.....	20
17. 参考文献.....	21
18. 試験関係資料の保存.....	21

Tables

Table 1	Induction of mutation in liver of transgenic mice treated with hydroquinone [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	22
Table 2	Induction of mutation in stomach of transgenic mice treated with hydroquinone [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	23

Appendices

Appendix 1	Body weight in the gene mutation assay of hydroquinone [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	24
Appendix 2	Clinical observations in the gene mutation assay of hydroquinone [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	26
Appendix 3	Individual gross findings in the gene mutation assay of hydroquinone [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	33

Appendix 4 Historical control data of transgenic rodent assay (*lacZ* assay)..... 39

Reference data

Reference data 1 検査成績書..... 40

要 約

ハイドロキノンの変異原性について、トランスジェニックマウス (MutaTM mouse) を用いて肝臓および胃における遺伝子突然変異誘発性 (レポーター遺伝子: *lacZ*) を検討した。

試験委託者の指示により 200 mg/kg/day を最高用量とし、100, 50.0 および 25.0 mg/kg/day 用量で各群 5 あるいは 6 匹に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。いずれの被験物質投与群においても死亡例が認められなかったため、最終投与後 3 日に全例から肝臓、胃、腎臓、肺および甲状腺を摘出した。200, 100 および 50.0 mg/kg/day の 3 用量の肝臓および胃について、*lacZ* assay による遺伝子突然変異頻度評価対象とした。

その結果、ハイドロキノンの投与群の肝臓および胃 (腺胃) のいずれにおいても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/day) では、肝臓および胃 (腺胃) で遺伝子突然変異頻度が上昇しており、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。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、ハイドロキノン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ハイドロキノンの遺伝子突然変異試験

2. 試験目的

In vivo での被験物質の標的器官における遺伝子（レポーター遺伝子：*lacZ*）の突然変異誘発性を検討する。

3. 遵守した動物実験関連規則、遺伝子組換え生物等関連規則および参考としたガイドライン

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（動物実験倫理委員会承認番号 12-0312A）。

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（組換え DNA 実験安全委員会承認番号 82）。

ガイドライン

OECD Guideline for the Testing of Chemicals 488 (28 July 2011: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)

4. 試験番号

E639 (079-522)

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

国立医薬品食品衛生研究所

総合評価研究室

小野 敦

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀一丁目 18 番 1 号

試験モニター 変異遺伝部
本間正充
Tel: 03-3700-1141 Fax: 03-3700-2348

7. 試験責任者

益森勝志
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: 0538-58-3573 Fax: 0538-58-1368
E-mail: masumori@anpyo.or.jp

8. 試験従事者 (分担責任者)

変異原性実験 :	大羽 みちよ
被験物質液の調製 :	大羽 みちよ
検疫 :	各務 進
飼育管理 :	山本 裕里子
病理学的検査 :	高見 成昭

9. 試験日程

試験開始日	2013年1月31日
【トランスジェニック試験】	
動物入荷日 :	2013年2月5日
《陰性対照群, 被験物質群》	
投与開始日 (Day 1) :	2013年2月13日
投与終了日 (Day 28) :	2013年3月12日
標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 31) :	2013年3月15日
《陽性対照群》	
投与日 (Day 2, Day 3) :	2013年2月14, 15日
標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 13) :	2013年2月25日

10. 被験物質

ハイドロキノンに関する情報を以下に示す。また、検査成績書を Reference data 1 に示す。

10.1. 被験物質名

ハイドロキノン
(英名 : Hydroquinone)

- 10.2. ロット番号
WEJ0292
- 10.3. 純度
99.3%
- 10.4. 製造元
和光純薬工業株式会社
- 10.5. 保存条件
室温, 遮光
- 10.6. 保存場所
被験物質調製室, 室温保管庫
- 10.7. CAS 登録番号
123-31-9
- 10.8. 化学名
ヒドロキノン
- 10.9. 分子量
110.11
- 10.10. 分子式
 $C_6H_6O_2$
- 10.11. 性状
白色の結晶
- 10.12. 融点
174°C
- 10.13. 水への溶解度
5.9 g/100 mL (15°C)
- 10.14. 蒸気圧
0.12 Pa (25°C)
- 10.15. 取り扱い上の注意
マスク・手袋・保護眼鏡の着用
- 10.16. 残余被験物質の処理
実験終了後, 試験委託者へ返却した。

11. 対照物質

11.1. 陰性対照 (媒体)

被験物質液調製の媒体として使用する注射用水を陰性対照物質に選択した。

11.1.1. 物質名

日本薬局方注射用水 (注射用水)

11.1.2. 製品名

大塚蒸留水

11.1.3. 製造元

株式会社大塚製薬工場

11.1.4. 保存条件

室温

11.1.5. 保存場所

被験物質調製室, 室温保管庫

11.2. 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。

11.2.1. 物質名

エチルニトロソウレア (ENU)

11.2.2. 製造元

Toronto Research Chemicals Inc.

12. 試験材料および方法

12.1. 試験動物

使用する動物がトランスジェニックマウス (MutaTM Mouse) であることから, PIA レベルの拡散防止処置とした。

12.1.1. 種

CD₂-LacZ80/HazfBR マウス (MutaTM Mouse : トランスジェニックマウス)

12.1.2. 系統

CDF1 (BALB/C × DBA/2) [SPF]

12.1.3. 生産場

株式会社 日本医科学動物資材研究所

12.1.4. 週齢

購入時：9 週齢

群分け時：10 週齢

12.1.5. 購入動物数

雄 36 匹

12.1.6. 使用動物数

雄 33 匹

12.1.7. 種・系統選択理由

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。

12.2. 飼育管理

12.2.1. 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) [陽圧] 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，MutaTM Mouse の飼育期間中，出入口にネズミ返しを設置した。

温度	20～26°C
湿度	35～70%RH
換気回数	12 回以上/h
空気差圧	外気+30 Pa 以上（扉閉鎖時）
照明	12 時間（午前 7 時点灯，午後 7 時消灯）

エコケージ (W 18.2 × D 26.0 × H 12.8 cm) に床敷き (ALPHA-driTM, Shepherd Specialty Papers) を入れ，動物を 1 匹ずつ収容した。給餌器およびケージは，群分け時および週 1 回，給水ボトルは 2, 3 日に 1 回の頻度で交換した。床敷き中の汚染物質に関する分析証明書を製造元から入手しその値が日本実験動物飼料協会/コンタミナント分析基準案の許容基準値内であることを確認した。

12.2.2. 飼料

放射線滅菌固型飼料 (CRF-1, 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。

餌の補給は，ケージ交換と同時に行った。

12.2.3. 給水

水道水を給水ボトルから自由に摂取させた。水道法に基づく水質検査を6ヵ月に1回、株式会社 エコプロ・リサーチで行い、上水道水質基準（平成15年5月30日厚生労働省令第101号）の基準値内であることを確認した。また、水質検査を実施しない月には、安評センターで細菌検査（一般細菌および大腸菌検査）を行い、細菌が検出されていないことを確認した。

12.3. 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、8日間一般状態を観察し、搬入日（Day -8）および検疫・馴化期間終了日（Day 1）に体重を測定した。検疫・馴化期間中に、体重の変動および一般状態から試験に用いることが不適切と判断された動物は、直ちに除外し、余剰動物として扱った。

12.4. 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。

群分けにより除外された動物は、余剰動物として扱い、試験群と区別して飼育し、2013年2月25日（Day 13）に炭酸ガスを用いて安楽死させた。また、安楽死まで動物の一般状態を1日1回確認した。

12.5. 個体識別

動物入荷時に通し番号を割り付け、検疫・馴化期間中は、飼育ケージに仮動物番号カードを付け、さらに、油性インクで動物の尾部に仮動物番号（連番）を記入し個体の識別を行った。検疫・馴化期間中に、動物の耳介に仮動物番号を入れ墨した。

群分け後の動物については、個別飼育ケージに試験番号および個体識別番号（仮動物番号を含む）等を明記した個体識別カード（IDカード）を付けて識別した。

12.6. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

12.6.1. ダウンス緩衝液

およそ 1600 mL の超純水に以下の試薬を加えた。

Na ₂ HPO ₄	3.50 g
KH ₂ PO ₄	0.50 g
NaCl	16 g
KCl	0.4 g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0] (ニッポンジーン)	40 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、超純水で 2000 mL に定容

した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌し, 室温で保存した.

12.6.2. RNase 含有ダウンス緩衝液

ダウンス緩衝液	166.6	mL
RNase 溶液 (10 mg/mL, ニッポンジーン)	3.332	mL

用時調製とした.

12.6.3. 0.5 mol/L ショ糖溶液

ショ糖 (MW = 342.30) 85.5 g を約 400 mL のダウンス緩衝液に溶解し, 500 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20~0.22 μm) をろ過除菌後, 冷蔵保存した.

12.6.4. 組織破碎用緩衝液

ダウンス緩衝液	74.97	mL
0.5 mol/L ショ糖溶液	74.97	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]	16.66	mL
RNase 溶液 (10 mg/mL)	3.332	mL

用時調製とした.

12.6.5. 10 w/v% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液

[調製例]

SDS (和光純薬工業) 20 g を約 160 mL の遺伝子工学用滅菌水 (ニッポンジーン) に溶解し, 200 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20~0.22 μm) をろ過除菌後, 室温保存した.

12.6.6. プロテナーゼ K 溶液

プロテナーゼ K (和光純薬工業)	340	mg
遺伝子工学用滅菌水	102	mL
10 w/v% SDS 溶液	34	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 7.5] ^{注1)}	34	mL

注1) pH 8.0 の EDTA 溶液 (ニッポンジーン) を 0.5~2 mol/L の塩酸で pH 7.5 に調整した後に使用した.

用時調製とした.

12.6.7. フェノール/クロロホルム (Ph/Cl) 混液

クロロホルム (関東化学)	375	mL
TE 飽和フェノール (ニッポンジーン)	375	mL

用時調製とした.

12.7. 培地および培養液等の調製

12.7.1. LB 培養液

Bacto tryptone (BD Diagnostic)	10	g
Bacto yeast (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, 冷蔵保存した.

12.7.2. LB 寒天培地

下記の割合で, 超純水が 250~1300 mL の LB 寒天培地を調製した.

Bacto tryptone	10	g
Bacto yeast	5	g
NaCl	5	g
バクトアガー (BD Diagnostic)	15	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, シャーレ (直径 150 mm) に 20 mL ずつ分注した.

12.7.3. LB トップアガー

下記の割合で, 超純水が 200~1000 mL の LB トップアガーを調製した.

Bacto tryptone	10	g
Bacto yeast	5	g
NaCl	5	g
バクトアガー	7	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 の条件で保温した.

12.7.4. SM 緩衝液

およそ 700 mL の超純水に以下の試薬を加えた.

NaCl	5.84	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.03	g
1 mol/L Tris-HCl [pH 7.5] (ニッポンジーン)	50.0	mL
ゼラチン末 (関東化学)	100	mg

超純水で 1000 mL に定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温

で保存した。

12.7.5. P-gal 溶液

Phenyl β -D-galactoside [P-gal] (Sigma-Aldrich)	7500 または 900	mg
ジメチルスルホキシド [DMSO] (和光純薬工業)	25 または 3	mL

調製後、室温で保存した。

12.7.6. 被験物質液等の調製

2013年2月12日、18日、25日および3月4日に被験物質2gを秤量後、メスフラスコに移して注射用水約80mLを加え溶解させた。さらに、注射用水を加えて100mLに定容し、20.0mg/mL液を準備した。この20.0mg/mL調製液50mLを注射用水を用いて100mLに定容することにより、10.0mg/mL液を調製した。以下同様な操作を繰り返して、5.00、2.50mg/mL液を調製する（それぞれ7日分）。各調製液については各投与用に褐色バイアル瓶に小分け（7日分および予備1本）した。各調製液は窒素置換した後、室温保管庫（温度基準1~30°C）にて保存し、それぞれの投与に用いた。

12.7.6.1. 被験物質液の安定性

水溶液中の被験物質は、5mg/mLの濃度で褐色バイアル瓶、窒素置換および室温条件下において21日間安定であることが確認されている¹⁾。試験実施前に2.00および20.0mg/mLの濃度について、文献¹⁾を基に褐色バイアル瓶、窒素置換および室温条件下において9日間の安定性を確認した結果、当該条件下で安定であった。

12.7.7. 残余被験物質液の処分

専用の容器（安全廃棄システム、NALGENE[®]）に廃棄した。

12.7.8. 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 M 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。

12.7.9. 残余陽性対照物質液の処分

専用の容器（安全廃棄システム、NALGENE[®]）に廃棄した。

13. 試験方法

13.1. 対照群

13.1.1. 陰性対照群

被験物質液調製に用いる媒体である注射用水を使用した。

13.1.2. 陽性対照群

ENU を使用し、用量は 100 mg/kg とした。

13.2. トランスジェニック (TG) 試験^{2),3)}

13.2.1. 用量

試験委託者の指示により 200 mg/kg/day を最高用量とし、公比 2 で除した 100, 50.0 および 25.0 mg/kg/day とする計 4 用量を設定した。

13.2.2. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg/day)	動物数		動物番号
		投与匹数	評価匹数	
陰性対照*	0	5	5	1001~1005
	25.0	5	5	1101~1105
ハイドロキノン	50.0	6	5	1201~1206
	100	6	5	1301~1306
	200	6	5	1401~1406
陽性対照**	100	5	5	1501~1505

* : DW ** : ENU

13.2.3. 投与動物数および評価対象

被験物質群 (50.0, 100 および 200 mg/kg/day) については、評価数 5 匹を確保するため、6 匹に投与した。評価数 5 匹を確保できる用量を評価中の最高用量とし、以下 2 用量 (計 3 用量) を評価対象とした。評価に使用しない動物については、13.2.7.に記載する各器官 (臓器) を摘出した後保存し、ゲノム DNA の抽出は行わなかった。

13.2.4. 投与方法および投与回数

媒体および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 10 g 当たり 0.1 mL とし、13.2.6.の項で測定する最新の体重から求めた。

陽性対照物質の投与は、遺伝毒性試験で通常用いられている腹腔内投与とし、注射針を装着したディスポーザブルシリンジを用いて 2 回腹腔内投与した。投与液量は、体重 10 g 当たり 0.1 mL とし、Day 1 の体重を基に算出した。

13.2.5. 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 -8) から検疫・馴化期間終了日 (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