

照群については、投与開始を Day 2 とし、最終投与後 10 日 (Day 13) に器官を摘出した。

#### 13.2.6. 体重測定および一般状態観察

Day -8 (動物搬入時), Day 1 [群分け日 (投与開始日)], 8, 15, 22, 29 および 31 (器官摘出直前) に、電子天秤 (メトラー・トレド) を用いて体重を測定した。陽性対照群については、Day -8 (動物搬入時), Day 1 (群分け日) および 13 (器官摘出直前) に電子天秤を用いて体重を測定した。

投与開始から器官摘出まで、1 日 1 回以上、動物の一般状態を観察した。

#### 13.2.7. 器官 (臓器) 摘出, 肉眼観察および保存

炭酸ガスを用いて安楽死させた動物より、肝臓, 胃, 腎臓, 肺および甲状腺を摘出し、肉眼観察を行った。器官の摘出・保存は、以下の方法に従った。なお、解剖室の出入り口にはネズミ返しを設置した。

肝臓: 左葉の外側辺縁を生検トレパン (BP-50F, 貝印) を用いて 4 ヶ所程度くり抜いた。

くり抜いた肝臓は、それぞれ別のマイクロチューブに入れ、液体窒素 (LN<sub>2</sub>) 中で凍結させた。左葉を除くその他の葉は、ビニール袋に入れ、LN<sub>2</sub> を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。

胃: 噴門部は食道, 幽門部は十二指腸を含めた形で摘出し、大弯側を切開した後、内容物を生理食塩液で洗い出した。その後、粘膜を観察した上で前胃と腺胃に分割した。腺胃については保存袋に入れ、LN<sub>2</sub> 中で凍結させた。

腎臓: 左側の腎臓の被膜を取り、メスで厚さ約 1~2 mm にスライス (水平断で 2 枚程度) した。各スライスをそれぞれ別のマイクロチューブに入れ、LN<sub>2</sub> 中で凍結させた。残りの部位および右側の腎臓は保存袋に入れ、LN<sub>2</sub> を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。

肺: 右肺を摘出した後、保存袋に入れ、LN<sub>2</sub> を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。

甲状腺: 気管から両側にある甲状腺を剥離し、マイクロチューブに入れ、LN<sub>2</sub> 中で凍結させた。

凍結後は超低温フリーザー中 (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

突然変異頻度の算出は肝臓および胃について実施した。

#### 13.2.8. ゲノム DNA の抽出

ダウンス型ホモジナイザーに組織破碎用緩衝液 (RNase を含む) 3 mL を分注し、氷中で冷却した。次いで、凍結組織片を入れ、ペッスルを用いてホモジナイズした。

あらかじめ 0.5 mol/L ショ糖溶液 3 mL を入れて氷冷しておいた 15 mL 容の遠心管に上記の組織破砕液を静かに重層し、遠心機 (LC-122, トミー精工) を用いて 3000 r/min (1710 G) で 10 分間遠心した。上清をスポイト等で除去後、冷却した RNase 含有ダウンズ緩衝液 3 mL を加え、よく懸濁させた (核/細胞懸濁液)。

この核/細胞懸濁液にプロテナーゼ K 溶液 3 mL を加えて静かに転倒混和し、3 時間程度 (懸濁液が透明になるまで) 50°C の条件で保温し、消化させた。等量 (6 mL) の Ph/Cl 混液を加え、数回転倒混和し、さらに 10 分間回転混和させた後、遠心機 (LC-122) を用いて 2500 r/min (1190 G) で 10 分間遠心した。上層 (水相) をトランスファーピペットで静かに回収し、新たな 15 mL 容の遠心管に移した。本操作を 2 回繰り返した。ただし、加える Ph/Cl 混液の量は回収した水相と等量とした。回収した水相と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混液 (容量比 24:1) を加え、数回転倒混和し、さらに 10 分間回転混和させた後、2500 r/min (1190 G) で 10 分間遠心した。水相を回収し、新しい 50 mL 容の遠心管に移した。遠心管にエタノールを徐々に加え、ゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA を 70%エタノールの入ったマイクロチューブに移し、およそ 10 分間浸した。次いで、遠心機 (MX-160) を用いて 13000 r/min (13240 G) で 10 分間遠心した。上清をマイクロピペットで可能な限り除いた後、チューブを室温に放置することにより残ったエタノールを蒸散させた。適量 (20~100  $\mu$ L 程度) の TE 緩衝液 (ニッポンジーン) を加え、一晚室温に放置し、残渣の DNA を溶解させた。調製後は、冷蔵にて保存した。

すべての DNA 溶液は、最終報告書作成後 3 ヶ月以内に処分する。

#### 13.2.9. 試験菌株の準備

容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに LB 培養液 30 mL, マルトース水溶液 (200 mg/mL) 300  $\mu$ L, アンピシリン溶液 (50 mg/mL) 30  $\mu$ L およびカナマイシン溶液 (20 mg/mL) 30  $\mu$ L を添加した。凍結保存 (設定値: -80°C) しておいた大腸菌 C 株 (*lacZ*<sup>-</sup>, *gal E*<sup>-</sup>) 懸濁液を融解した後、これに 50  $\mu$ L 接種した。37°C, 120 回/分の振盪条件で一晩培養し、前培養液とした。

容量 500 mL のバツフル付三角フラスコに新鮮な LB 培養液 100 mL およびマルトース水溶液 (200 mg/mL) 1 mL を添加し、次いで先の前培養液を 1 mL 植菌した後、同様に 4~6 時間 (OD が 0.6 程度) 培養を続けた。培養終了後、菌懸濁液を 10 分間遠心分離 (1000 r/min) した。10 mmol/L の硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を用いて再懸濁した (大腸菌懸濁液)。

### 13.2.10. ゲノム DNA のパッケージング

Transpack (Stratagene) 製品添付の Instruction Manual に従ってパッケージングを実施した。Transpack のチューブ (RED) を解凍した。200~600 µg/mL 程度の濃度に調製したゲノム DNA 溶液のおよそ 10 µL をチューブ (RED) に加え、ピペッティングにより混合した後、30°C の条件で 90 分間インキュベートした。次いで、チューブ (BLUE) を解凍し、その 10 µL をチューブ (RED) に加え、同様に混合した。さらに、30°C の条件で 90 分間インキュベートを続けた。各チューブに SM 緩衝液 700 µL を加え、十分に攪拌した (パッケージング DNA)。

### 13.2.11. パッケージング DNA のプレーティング

大腸菌懸濁液を総プラーク算出用 (タイター用) に 1 mL, 突然変異算出用 (セクション用) に 2 mL をそれぞれのチューブに分注しておいた。パッケージング DNA の全量 (およそ 700 µL) をセクション用チューブに加えた後 (およそ 2700 µL になる) 攪拌し、室温に 20~30 分放置してファージを大腸菌に感染させた。本溶液 30 µL を 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 270 µL に加えて 10 倍希釈した。本希釈液 30 µL をタイター用チューブに加えて攪拌した。

タイター用トップアガーの場合は、トップアガー 100 容量に対して、硫酸マグネシウム水溶液 (1 mol/L) 1 容量を加えた。セクション用トップアガーの場合は、トップアガー 100 容量に対して、P-gal 溶液 2 容量を加えた。

タイター用チューブに、タイター用トップアガー 17 mL を加え混和し、LB 寒天培地に全量を重層した。セクション用チューブには、セクション用トップアガー 16 mL を加え、タイター用と同様に LB 寒天培地に重層した。各プレートに 37°C の条件で一晩培養した。

総プラーク数が 30 万に達するまで上記のパッケージング操作を繰り返した。

## 13.3. プラークの計数

### 13.3.1. 総プラーク数の算出

タイター用プレートに出現したプラーク数 (N) を計数し、下記の式を用いて総プラーク数を求めた。

$$\begin{aligned} \text{総プラーク数} &= N \times (300 \mu\text{L}/30 \mu\text{L}) \times (2700 \mu\text{L}/30 \mu\text{L}) \\ &= 900 \times N \end{aligned}$$

### 13.3.2. 変異プラーク数の算出

セクション用プレートに出現したプラーク数を計数した。出現したプラーク数を変異プラーク数とした。

### 13.3.3. 突然変異頻度の算出

*lacZ* 遺伝子をレポーターとして用いた。

出現した変異プラーク数を総プラーク数で除して、当該組織での突然変異頻度を求めた。

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{変異プラーク数}}{\text{総プラーク数}}$$

### 13.4. 結果の解析

陽性対照群を除く各被験物質投与群の突然変異頻度は、最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散の場合は、Dunnett の多重比較検定で対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定し、不等分散（有意差が認められた）の場合は、Steel の検定で対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した。

陰性対照群と陽性対照群での突然変異頻度の比較は、最初に F 検定を実施し、有意差が認められない場合には、Student の t 検定を実施した。F 検定で有意差が認められた場合は、Aspin-Welch の t 検定を実施した。各検定の有意水準は両側 5%とした。

陰性対照群と比較し、被験物質群の突然変異頻度において統計学的な有意な増加が認められた場合に、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

## 14. 試験成立条件

陽性対照群の肝臓における突然変異頻度において、陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が認められた場合に、試験は成立したと判断した。

## 15. 試験結果

評価数 5 匹を確保できる用量（200 mg/kg）を最高用量とし、100 および 50.0 mg/kg を評価対象とした。

### 15.1. *lacZ* assay (肝臓)

試験結果を Table 1 に示す。

陰性対照群での突然変異頻度の平均値 ± SD は、 $75.0 \pm 11.5 (\times 10^{-6})$  であり、当該試験施設の背景データ (Appendix 4) に比べると高値を示したが、背景データの平均 ± 3SD 以内であった。なお、動物番号 1004 の個体値 [ $95.0 (\times 10^{-6})$ ] は、背景データの最高値を僅かに超えた。

ハイドロキノン投与群での突然変異頻度の平均値 ± SD は、50.0、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が、200 mg/kg/day の 1/5 例（動物番号 1402）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 ( $p \leq 0.05$ ) な増加が認められた。

#### 15.2. *lacZ* assay (胃)

試験結果を Table 2 に示す。

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。

ハイドロキノン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 ( $p \leq 0.05$ ) な増加が認められた。

#### 15.3. 体重および一般状態観察

試験結果を Appendix 1 および 2 に示す。

ハイドロキノン群は、陰性対照群と比較し、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。

なお、陽性対照群については、体重減少が認められた。

#### 15.4. 解剖時の肉眼観察

結果を Appendix 3 に示す。

いずれの投与群においても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。

### 16. 考察および結論

ハイドロキノン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 (Muta<sup>TM</sup> 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。

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、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、ハイドロキノン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ず、背景データの平均  $\pm$  3SD 以内であった。なお、200 mg/kg/day 投与群の 1/5 例 (動物番号 1402) 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、クローナ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、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 ( $p \leq 0.05$ ) 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、用量が不十分である可能性も考えられた。

## 17. 参考文献

- 1) Frank W. Kari, NTP technical report of the toxicology and carcinogenesis studies of hydroquinone (CAS No. 123-31-9) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage study). NTP TR 366, NIH Publication No. 90-2821, 1989.
- 2) Takayoshi Suzuki, Satoru Itoh, Madoka Nakajima, Noriyuki Hachiya and Takumi Hara. Target organ and time-course in the Mutagenicity of five carcinogens in Muta<sup>TM</sup> Mouse: a summary report of the second collaborative study of the transgenic mouse mutation assay by JEMS/MMS. *Mutat. Res.* 1999; 444: 259-268.
- 3) Véronique Thybaud, Stephen Dean, Takehiko Nohmi, Johan de Boer, George R. Douglas, Barry W. Glickman, Nancy J. Gorelick, John A. Heddle, Robert H. Heflich, Iain Lambert, Hans-Jörg Martus, Jon C. Mirsalis, Takayoshi Suzuki and Nobuhiro Yajima. In vivo transgenic mutation assays. *Mutation Research* 2003, 540: 141-151.

## 18. 試験関係資料の保存

当該試験の試験関係資料は、安評センター資料保存施設にて最終報告書作成後 10 年間保存される。その後の保存については、試験委託者と安評センターで協議し、別途定める。

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)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )	
D.W.	0	1001	666,000	47	70.6	75.0 $\pm$ 11.5	
		1002	348,300	24	68.9		
		1003	722,700	48	66.4		
		1004	652,500	62	95.0		
		1005	673,200	50	74.3		
Hydroquinone	50.0	1201	734,400	36	49.0	42.4 $\pm$ 13.3	
		1202	598,500	15	25.1		
		1203	938,700	46	49.0		
		1204	722,700	23	31.8		
		1205	719,100	41	57.0		
	100	1301	1,159,200	45	38.8	44.1 $\pm$ 8.5	
		1302	754,200	29	38.5		
		1303	1,125,000	50	44.4		
		1304	816,300	48	58.8		
		1305	919,800	37	40.2		
	200	1401	1,036,800	44	42.4	69.0 $\pm$ 40.1	
		1402	1,673,100	232	138.7		
		1403	760,500	42	55.2		
		1404	784,800	51	65.0		
		1405	527,400	23	43.6		
ENU	100	1501	596,700	81	135.7	158.0 $\pm$ 27.5	*(S)
		1502	611,100	107	175.1		
		1503	640,800	112	174.8		
		1504	803,700	147	182.9		
		1505	650,700	79	121.4		

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

\*: Significant difference from negative control ( $p \leq 0.05$ )

(S): Student t test

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)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
D.W.	0	1001	609,300	25	41.0	39.6 $\pm$ 7.5
		1002	420,300	21	50.0	
		1003	831,600	26	31.3	
		1004	846,900	36	42.5	
		1005	419,400	14	33.4	
Hydroquinone	50.0	1201	831,600	33	39.7	54.7 $\pm$ 14.0
		1202	736,200	41	55.7	
		1203	993,600	41	41.3	
		1204	588,600	41	69.7	
		1205	761,400	51	67.0	
	100	1301	741,600	27	36.4	46.7 $\pm$ 9.0
		1302	651,600	25	38.4	
		1303	914,400	45	49.2	
		1304	805,500	46	57.1	
		1305	763,200	40	52.4	
	200	1401	855,900	43	50.2	55.9 $\pm$ 12.3
		1402	721,800	40	55.4	
		1403	943,200	73	77.4	
		1404	1,445,400	70	48.4	
		1405	434,700	21	48.3	
ENU	100	1501	621,900	321	516.2	472.9 $\pm$ 31.3 * (A)
		1502	327,600	150	457.9	
		1503	745,200	369	495.2	
		1504	882,900	399	451.9	
		1505	582,300	258	443.1	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

\*: Significant difference from negative control ( $p \leq 0.05$ )

(A): Aspin-Welch t test



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)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)							Gain
			Day -8 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)	
D.W.	0	1001	24.5	25.5	25.7	26.3	27.3	27.2	27.8	2.3
		1002	24.0	25.0	24.8	25.3	25.9	26.1	25.5	0.5
		1003	23.8	25.8	26.4	26.2	26.1	26.6	26.3	0.5
		1004	24.4	26.4	25.8	26.4	27.4	28.9	27.7	1.3
		1005	23.2	24.7	24.4	24.9	25.1	26.3	26.6	1.9
		Mean±S.D.	24.0±0.5	25.5±0.7	25.4±0.8	25.8±0.7	26.4±1.0	27.0±1.1	26.8±1.0	1.3±0.8
Hydroquinone	25.0	1101	24.7	26.7	26.2	26.2	26.2	25.7	25.4	-1.3
		1102	24.3	24.6	22.9	24.4	24.5	25.7	25.6	1.0
		1103	24.2	25.5	25.6	27.1	27.7	28.6	29.8	4.3
		1104	23.2	24.8	25.2	24.9	25.0	25.8	25.6	0.8
		1105	25.1	25.9	25.8	25.7	26.4	25.5	24.8	-1.1
		Mean±S.D.	24.3±0.7	25.5±0.9	25.1±1.3	25.7±1.1	26.0±1.3	26.3±1.3	26.2±2.0	0.7±2.3
	50.0	1201	24.6	24.9	25.5	25.2	25.6	25.5	25.8	0.9
		1202	23.2	25.3	25.3	24.9	25.2	25.0	25.3	0.0
		1203	23.0	26.1	25.9	26.0	25.6	26.5	27.4	1.3
		1204	23.5	24.3	24.9	24.9	25.2	25.8	25.9	1.6
		1205	23.5	25.7	25.8	25.6	25.3	25.8	25.8	0.1
		1206	24.1	25.1	25.8	25.3	25.5	25.4	25.5	0.4
	Mean±S.D.	23.7±0.6	25.2±0.6	25.5±0.4	25.3±0.4	25.4±0.2	25.7±0.5	26.0±0.7	0.7±0.7	
	100	1301	25.4	25.0	24.9	25.4	25.3	25.3	25.6	0.6
		1302	24.3	27.1	26.5	27.0	25.8	26.0	26.1	-1.0
		1303	22.9	24.6	24.3	23.7	24.6	24.5	24.6	0.0
1304		23.6	26.0	24.8	25.1	26.3	26.2	26.5	0.5	
1305		23.4	24.9	25.3	25.3	26.1	25.5	25.6	0.7	
1306		24.0	25.5	26.7	26.7	27.1	27.7	27.5	2.0	
Mean±S.D.	23.9±0.9	25.5±0.9	25.4±1.0	25.5±1.2	25.9±0.9	25.9±1.1	26.0±1.0	0.5±1.0		
200	1401	24.6	25.3	26.2	26.8	26.6	27.2	27.2	1.9	
	1402	25.1	26.1	25.7	26.1	26.4	26.4	27.1	1.0	
	1403	24.0	25.8	27.1	28.0	28.2	27.8	28.0	2.2	
	1404	22.6	22.7	23.4	23.3	23.4	23.6	23.8	1.1	
	1405	22.6	24.7	23.9	23.4	24.3	23.0	23.2	-1.5	
	1406	24.4	25.3	24.3	24.7	23.9	23.7	23.4	-1.9	
Mean±S.D.	23.9±1.1	25.0±1.2	25.1±1.5	25.4±1.9	25.5±1.9	25.3±2.1	25.5±2.2	0.5±1.7		

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)  
 Gain= Day 31(Sacrificed)-Day 1(Allocated)

Appendix 1. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Body weight (g)			
			Day -8 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 13 (Sacrificed)	Gain
ENU	100	1501	25.4	27.0	25.9	-1.1
		1502	23.9	24.9	25.2	0.3
		1503	23.0	24.6	24.5	-0.1
		1504	23.6	25.4	24.3	-1.1
		1505	25.0	25.8	24.9	-0.9
		Mean±S.D.	24.2±1.0	25.5±0.9	25.0±0.6	-0.6±0.6

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

Gain= Day 13(Sacrificed)-Day 1(Allocated)

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)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment													
			1		2		3		4		5		6		7	
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
D.W.	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hydroquinone	25.0	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	50.0	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	100	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1305		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
1306		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
200	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment								
			1	2		3		4	5	6	7
				1st	2nd	1st	2nd				
ENU	100	1501		N	N	N	N	N	N	N	N
		1502		N	N	N	N	N	N	N	N
		1503		N	N	N	N	N	N	N	N
		1504		N	N	N	N	N	N	N	N
		1506		N	N	N	N	N	N	N	N

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)  
 N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment													
			8		9		10		11		12		13		14	
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
D.W.	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hydroquinone	25.0	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	50.0	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	100	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1305		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
1306		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
200	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment					
			8	9	10	11	12	13
ENU	100	1501	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N
		1505	N	N	N	N	N	N

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment													
			15		16		17		18		19		20		21	
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
D.W.	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hydroquinone	25.0	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	50.0	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	100	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1305		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
1306		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
200	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment													
			22		23		24		25		26		27		28	
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
D.W.	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hydroquinone	25.0	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	50.0	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	100	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1305		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
1306		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
200	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

N: Normal



## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment		
			29	30	31
D.W.	0	1001	N	N	N
		1002	N	N	N
		1003	N	N	N
		1004	N	N	N
		1005	N	N	N
Hydroquinone	25.0	1101	N	N	N
		1102	N	N	N
		1103	N	N	N
		1104	N	N	N
		1105	N	N	N
	50.0	1201	N	N	N
		1202	N	N	N
		1203	N	N	N
		1204	N	N	N
		1205	N	N	N
		1206	N	N	N
	100	1301	N	N	N
		1302	N	N	N
		1303	N	N	N
		1304	N	N	N
1305		N	N	N	
1306		N	N	N	
200	1401	N	N	N	
	1402	N	N	N	
	1403	N	N	N	
	1404	N	N	N	
	1405	N	N	N	
	1406	N	N	N	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

N: Normal

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)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
D.W.	0	1001	Liver	-
			Stomach	-
			Kidney	-
			Lung	-
			Thyroid gland	-
		1002	Liver	-
			Stomach	-
			Kidney	-
			Lung	-
			Thyroid gland	-
		1003	Liver	-
			Stomach	-
			Kidney	-
			Lung	-
			Thyroid gland	-
1004	Liver	-		
	Stomach	-		
	Kidney	-		
	Lung	-		
	Thyroid gland	-		
1005	Liver	-		
	Stomach	-		
	Kidney	-		
	Lung	-		
	Thyroid gland	-		

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

-: No remarkable change

## Appendix 3. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
Hydroquinone	25.0	1101	Liver	-
			Stomach	-
			Kidney	-
			Lung	-
			Thyroid gland	-
		1102	Liver	-
			Stomach	-
			Kidney	-
			Lung	-
			Thyroid gland	-
		1103	Liver	-
			Stomach	-
			Kidney	-
			Lung	-
			Thyroid gland	-
		1104	Liver	-
			Stomach	-
			Kidney	-
			Lung	-
			Thyroid gland	-
1105	Liver	-		
	Stomach	-		
	Kidney	-		
	Lung	-		
	Thyroid gland	-		

-: No remarkable change

## Appendix 3. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
Hydroquinone	50.0	1201	Liver	-
			Stomach	-
			Kidney	-
			Lung	-
			Thyroid gland	-
			1202	Liver
		Stomach	-	
		Kidney	-	
		Lung	-	
		Thyroid gland	-	
		1203	Liver	-
		Stomach	-	
		Kidney	-	
		Lung	-	
		Thyroid gland	-	
		1204	Liver	White patch, single, 2×1 mm
		Stomach	-	
		Kidney	Scarred, single, right, 1×0.5 mm	
		Lung	-	
		Thyroid gland	-	
		1205	Liver	-
		Stomach	-	
		Kidney	-	
		Lung	-	
Thyroid gland	-			
1206	Liver	-		
Stomach	-			
Kidney	-			
Lung	-			
Thyroid gland	-			

-: No remarkable change