


最終報告書

トランスジェニックマウスを用いる 1-Bromo-3-chloropropane の遺伝子突然変異試験

試験番号 : D848 (115-223)

平成 25 年 3 月 18 日

試験委託者
厚生労働省

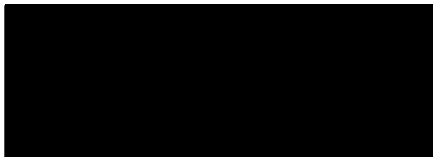
公益財団法人 食  安全性評価センター

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 1-Bromo-3-chloropropane の遺伝子突然変異試験

試験番号： D848 (115-223)

試験責任者：



平成 25 年 3 月 18 日

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.....	6
1. 表題.....	7
2. 試験目的.....	7
3. 遵守した GLP と動物実験関連規則，遺伝子組換え生物等関連規則および 準拠したガイドライン.....	7
4. 試験番号.....	7
5. 試験施設.....	7
6. 試験委託者.....	8
7. 試験責任者.....	8
8. 被験物質等管理責任者.....	8
9. 分担責任者.....	8
10. 試験日程.....	8
11. 被験物質.....	9
12. 対照物質.....	11
13. 試験材料および方法.....	12
14. 試験成立条件.....	29
15. 結果.....	30
16. 考察および結論.....	33
17. 参考文献.....	34
18. 試験関係資料の保存.....	35
19. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および 試験計画書に従わなかったこと.....	35

Tables

Table 1	Mortality in dose-finding study of 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	36
Table 2	Gross findings in dose-finding study of 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	37
Table 3	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in liver of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	39

Table 4	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	40
Table 5	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in stomach of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	41
Table 6	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in testis of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	42
Table 7	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in liver of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	43
Table 8	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	44
Table 9	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in stomach of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	45
Table 10	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in testis of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	46
Appendices		
Appendix 1	Body weight in dose-finding study of 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	47
Appendix 2	Clinical observations in dose-finding study of 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....	48
Appendix 3	Body weight in the gene mutation assay of 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	49
Appendix 4	Clinical observations in the gene mutation assay of 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	51
Appendix 5	Organ weight in the gene mutation assay of 1-bromo-3-chloropropane [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	58

Appendix 6 Individual gross findings on 1-bromo-3-chloropropane-treated transgenic mice
for the gene mutation assay [Male mice dosed once a day, for 28 days
(Oral administration, 3 days after final administration)]..... 60

信頼性保証書 65

要 約

1-Bromo-3-chloropropane の変異原性について、トランスジェニックマウス (*gpt delta*) を用いて肝臓、骨髄、胃 (腺胃) および精巣における遺伝子突然変異誘発性 (レポーター遺伝子: *gpt* および *red/gam*) を検討した。

1000, 300, 100 および 30.0 mg/kg の 4 用量について 1 日 1 回、24 時間間隔で 7 日間連続強制経口投与を実施した用量設定試験の結果、1000 mg/kg 群では Day 2 に 1/3 例の死亡が認められ、Day 3 および 4 にはそれぞれ 1 例について、翌日まで生存できないと判断されたため、速やかに剖検した。300 mg/kg 群以下の投与群では毒性兆候を示す一般状態の変化は認められず、体重の顕著な減少も認められなかった。また、剖検時の肉眼所見においても 300 mg/kg 群以下の投与群では特筆すべき変化は認められなかった。したがって、最大耐量付近と考えられる 300 mg/kg を高用量とし、公比 $\sqrt{10}$ 程度で除した以下 100 および 30.0 mg/kg の計 3 用量を被験物質群として設定した。

被験物質をトランスジェニックマウスに 28 日間反復強制経口投与し、最終投与後 3 日の肝臓、骨髄、胃 (腺胃) および精巣において *gpt* assay および *Spi* assay により遺伝子突然変異頻度を求めた。

その結果、1-Bromo-3-chloropropane 投与群の肝臓、骨髄、胃 (腺胃) および精巣のいずれにおいても、*gpt* assay および *Spi* assay による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) 経口投与群 (100 mg/kg) では、肝臓、骨髄および胃 (腺胃) で *gpt* assay による遺伝子突然変異頻度が上昇しており、遺伝子突然変異頻度は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。

Spi assay が適切に行われたか否かを確認するため、*Spi* assay で陽性であることが確認された別試験の肝臓を陽性対照群の肝臓として用いて *Spi* assay を実施した結果、遺伝子突然変異頻度は陰性対照群に比べて統計学的に有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められた。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、1-Bromo-3-chloropropane 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 (陰性) 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 1-Bromo-3-chloropropane の遺伝子突然変異試験

2. 試験目的

被験物質による標的器官での遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検討する (レポーター遺伝子: *gpt* および *red/gam*).

3. 遵守したGLPと動物実験関連規則, 遺伝子組換え生物等関連規則および準拠したガイドライン

GLP

新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 8 号, 平成 23・03・29 製局第 6 号, 環保企発第 110331010 号) 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 (安評センター動物実験倫理委員会承認番号 11-0213A).

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 (安評センター組換え DNA 実験安全委員会承認番号 64).

ガイドライン等

- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 488 (28 July 2011: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)
- Environmental Health Criteria 233 (United Nations WHO 2006; Transgenic Animal Mutagenicity Assays)

4. 試験番号

D848 (115-223)

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

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 東京都千代田区霞が関 1-2-2
Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

7. 試験責任者

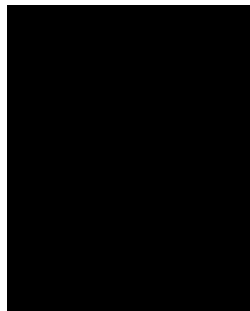
■ ■ ■ ■
公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582 番地 2
Tel: 0538-58-3573 Fax: 0538-58-1368
E-mail: masumori@anpyo.or.jp

8. 被験物質等管理責任者

■ ■ ■ ■

9. 分担責任者

変異原性実験：
検疫：
被験物質液調製：
飼育管理：
病理学検査：



10. 試験日程

試験開始日：	平成 24 年 1 月 27 日
実験開始日：	平成 24 年 2 月 6 日
【用量設定試験】	
動物入荷日：	平成 24 年 1 月 30 日
被験物質液調製日：	平成 24 年 2 月 6 日
投与開始日 (Day 1)：	平成 24 年 2 月 6 日
投与終了日 (Day 7)：	平成 24 年 2 月 12 日
動物観察終了日 (Day 8)：	平成 24 年 2 月 13 日
【トランスジェニック (TG) 試験】	
動物入荷予定日：	平成 24 年 2 月 20 日
被験物質液調製日：	平成 24 年 2 月 27 日, 3 月 5, 12 および 19 日

《陰性対照群, 被験物質群》

投与開始日 (Day 1) : 平成 24 年 2 月 29 日

投与終了日 (Day 28) : 平成 24 年 3 月 27 日

標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 31) : 平成 24 年 3 月 30 日

《陽性対照群》

投与日 (Day 2, Day 3) : 平成 24 年 3 月 1, 2 日

標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 13) : 平成 24 年 3 月 12 日

アッセイ終了日 : 平成 24 年 7 月 17 日

実験終了日 : 平成 24 年 7 月 17 日

試験終了日 : 平成 25 年 3 月 18 日

11. 被験物質

1-Bromo-3-chloropropane

(和名 : 1-ブロモ-3-クロロプロパン)

11.1. ロット番号

STJ5131

11.2. 含量

99.9% (キャピラリーカラム GC)

11.3. 購入先

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

11.4. 製造年月

平成 22 年 8 月

11.5. 有効期限

開封しない状態で受領日 (平成 24 年 1 月 6 日) から 1 年

11.6. 保存条件

遮光, 気密, 室温 (基準値 : 1~30°C)

11.7. 保存場所

被験物質調製室, 室温保管庫

- 室温保管室 ch. 74

保存期間 : 2012 年 1 月 6 日 ~ 2 月 1 日 (受領日 ~ 試験責任者への配布日)

実測値 : 20.2 ~ 21.9°C

- スーパードライ SD-121-02 ch. 40

保存期間：2012年2月1日～3月19日（試験責任者受領日～最終使用日）

実測値：20.4～23.9°C

システム不具合発生から解消までの間（2012年3月10日；11時40分）の保存温度は、バックアップデータで確認した。

実測値：23.1～24.1°C（2012年3月9日～12日）

11.8. CAS No.

109-70-6

11.9. 化学構造



11.10. 分子式

C₃H₆BrCl

11.11. 分子量

157.42

11.12. 物質の状態

無色澄明の液体

11.13. 融点／沸点

融点：-59°C

沸点：約 144°C

11.14. 密度

1.597 g/mL (20°C)

11.15. 溶解性

水に難溶

DMSO に易溶

トウモロコシ油に溶解

11.16. 安定性

加熱，燃焼，高温面との接触，光の影響により分解して有害ヒュームを生成する。

11.17. 取り扱い上の注意

強酸化剤，強塩基との接触をさける。

吸入したり，眼，皮膚および衣類に触れないように適切な保護具（マスク，手袋，保護眼鏡等）を着用する。

11.18. 残余被験物質の処理

実験終了後，残余被験物質の一部（約 2 g）を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し，残りを専用の容器（安全廃棄システム，NALGENE®）に廃棄した。

12. 対照物質

12.1. 陰性対照（溶媒）

被験物質液調製に媒体として使用するトウモロコシ油を陰性対照物質に選択した。

12.1.1. 物質名

トウモロコシ油

12.1.2. ロット番号

V1R7200

12.1.3. 製造元

ナカライテスク株式会社

12.1.4. 保存条件

室温

12.1.5. 保存場所

被験物質調製室

12.2. 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。

12.2.1. 対照物質名

エチルニトロソウレア（ENU）

12.2.2. ロット番号

4-RFS-48-2

12.2.3. 製造元

Toronto Research Chemicals Inc.

12.2.4. 保存条件
冷凍（基準値：-30~-5°C）

12.2.5. 保存場所
被験物質調製室，冷凍保管庫

13. 試験材料および方法

TG 試験で使用する動物が *gpt delta* トランスジェニックマウスであることから，PIA レベルの拡散防止処置とした。

13.1. 試験動物

13.1.1. 種
用量設定試験：マウス
TG 試験：マウス (*gpt delta* トランスジェニックマウス)

13.1.2. 系統
用量設定試験：C57BL/6JJmsSlc
TG 試験：C57BL/6JJmsSlc-Tg (*gpt delta*)

13.1.3. 生産場
日本エスエルシー株式会社

13.1.4. 週齢および体重
購入時：9 週齢
群分け時：10 週齢（体重；用量設定試験：25.2~26.9 g, TG 試験：23.7~28.4 g）

13.1.5. 購入動物数
用量設定試験：雄 15 匹
TG 試験：雄 34 匹

13.1.6. 使用動物数
用量設定試験：雄 12 匹
TG 試験：雄 34 匹

13.1.7. 種・系統選択理由
用量設定試験：TG 試験の親動物である本系統のマウスを選択した。

TG 試験：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。

13.2. 飼育管理

13.2.1. 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) 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、*gpt delta* トランスジェニックマウスの飼育期間中、出入り口にネズミ返しを設置した。

温度	23±3°C [実測値：22.8～23.1°C (用量設定試験), 22.8～23.0°C (TG 試験)]
湿度	55±20%RH [実測値：48.8～55.8%RH (用量設定試験), 48.5～54.6%RH (TG 試験)]
換気回数	12回以上/h
空気差圧	外気+30Pa 以上 (扉閉鎖時)
照明	12時間 (午前7時点灯, 午後7時消灯)

水洗式飼育機 (東京理工) を使用し、金属製飼育ケージ (W 10.0 × D 19.6 × H 13.0 cm) に動物を1匹ずつ収容した。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回の頻度で交換した。

13.2.2. 飼料

放射線滅菌固型飼料 (CRF-1, Lot No. 110908, 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 (No. AR-11-JP-002270-01) 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。なお、餌の補給は、給餌器の交換と同時にいった。

13.2.3. 給水

水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた。水道法に基づく水質検査を2011年10月および2012年4月に株式会社 エコプロ・リサーチで行い、2012年1, 2および3月に安評センターで細菌検査 (一般細菌および大腸菌検査) を実施した。検査結果 (水質検査：第113689-3号および第122682-3号, 細菌検査：第GT12-01号, 第GT12-02号および第GT12-03号) については、上水道水質基準の基準値内であることおよび細菌が検出されていないことを確認した。

13.3. 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、7日間 (トランスジェニック試験：9日間) 一般状態を観察し、搬入日 (用量設定試験：Day -7, トランスジェニック試験：Day -9) および検疫・馴化期間終了日 (Day 1) に体重を測定した。なお、一般状態および体重推移より試験に用いることが不適切と判断された動物は、観察されなかった。

13.4. 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。用量設定試験の群分けにより除外された動物は、余剰動物として扱い、群分け終了後 (2012 年 2 月 10 日) に炭酸ガスにより安楽死させた。

13.5. 個体識別

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

群分け後は、試験番号、飼育室番号、試験群、仮動物番号および個体識別番号を明記した個体識別カード (ID カード) を飼育ケージに付して識別した。

13.6. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

13.6.1. ダウンス緩衝液

以下の割合で調製した。

Na ₂ HPO ₄ (関東化学)	1.75	g
KH ₂ PO ₄ (関東化学)	0.25	g
NaCl (関東化学)	8	g
KCl (関東化学)	0.2	g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0] (Lot No. 01379K, ニッポンジーン)	20	mL
超純水	1000	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、オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌し、室温 (基準値: 1~30°C) で保存した。

13.6.2. RNase 含有ダウンス緩衝液

以下の割合で調製した。

ダウンス緩衝液	100	mL
RNase 溶液 (10 mg/mL, Lot No. 90002C, ニッポンジーン)	2.0	mL

用時調製した。

13.6.3. 0.5 mol/L ショ糖溶液

以下の割合で調製した。

ショ糖 (M.W. = 342.30)	17.1	g
ダウンス緩衝液	100	mL

フィルター (孔径 0.2 μm) をろ過除菌後、冷蔵 (基準値: 1~9°C) で保存した。

13.6.4. 組織破碎用緩衝液

以下の割合で調製した.

ダウンス緩衝液	45	mL
0.5 mol/L ショ糖溶液	45	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]	10	mL
RNase 溶液 (10 mg/mL)	2	mL

用時調製した.

13.6.5. 10 w/v% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液

以下の割合で調製した.

SDS (Lot No. STL8668, 和光純薬工業)	10	g
遺伝子工学用滅菌水 (Lot No. 02651H, ニッポンジーン)	100	mL

フィルター (孔径 0.2 μ m) をろ過除菌後, 室温 (基準値: 1~30°C) 保存した.

13.6.6. プロテナーゼ K 溶液

以下の割合で調製した.

プロテナーゼ K (Lot No. LAM2357, 和光純薬工業)	200	mg
遺伝子工学用滅菌水 (Lot No. 02651H あるいは 02702A)	60	mL
10 w/v% SDS 溶液	20	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 7.5] ^{注1)}	20	mL

注1) pH 8.0 の EDTA 溶液 (Lot No. 01440J, ニッポンジーン) を 1 mol/L の塩酸
で pH 7.5 に調整した後に使用した.

用時調製した.

13.6.7. フェノール/クロロホルム (Ph/Cl) 混液

以下の割合で調製した.

クロロホルム (Lot No. 311N1035 あるいは 401N1168, 関東化学)	100	mL
TE 飽和フェノール (Lot No. 07932A, ニッポンジーン)	100	mL

用時調製した.

13.7. 培地および培養液等の調製

13.7.1. LB 培養液

以下の割合で調製した.

Bacto tryptone (Lot No. 1285257, BD Diagnostic)	10	g
Bacto yeast extract (Lot No. 1105209, 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 (基準値: 1~9°C) 保存した.
3 ヶ月以内に使用した.

13.7.2. SM 緩衝液

以下の割合で調製した.

NaCl	5.84	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (関東化学)	2.03	g
1 mol/L Tris-HCl [pH 7.5] (Lot No. 00691C, ニッポンジーン)	50.0	mL
ゼラチン末 (Lot No. 912W2043, 関東化学)	100	mg
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温 (基準値: 1~30°C) で保存した.

13.7.3. 200 mg/mL マルトース水溶液

以下の割合で調製した.

マルトース (和光純薬工業)	20	g
超純水	100	mL

フィルター (孔径 0.2 μm) をろ過除菌後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.7.4. 5 × M9 salt

以下の割合で調製した.

Na ₂ HPO ₄	33.9	g
KH ₂ PO ₄	15.0	g
NaCl	2.50	g
NH ₄ Cl (和光純薬工業)	5.00	g
超純水	1000	mL

ビーカーに超純水を適量入れ, スターラーで攪拌しながら, 各試薬を少量ずつ添加した. 溶解後, 超純水を用いて定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後,

冷蔵（基準値：1～9℃）保存した。

13.7.5. 50 w/v%グリセロール

以下の割合で調製した。

グリセリン（1.260 g/mL, 和光純薬工業）	39.7	mL
超純水	100	mL

ビーカーに超純水を適量入れ、スターラーで攪拌しながら少しずつグリセリンを添加した。溶解後、超純水を用いて定容した。オートクレーブ（121℃, 20分）で滅菌した後、冷蔵（基準値：1～9℃）保存した。

13.7.6. 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液

以下の割合で調製した。

MgSO ₄ ·7H ₂ O	24.6	g
超純水	100	mL

オートクレーブ（121℃, 20分）滅菌後、室温（基準値：1～30℃）保存した。

13.7.7. 1 mol/L 塩化カルシウム水溶液

以下の割合で調製した。

CaCl ₂ ·2H ₂ O（和光純薬工業）	1.47	g
超純水	10	mL

オートクレーブ（121℃, 20分）滅菌後、冷蔵（基準値：1～9℃）保存した。

13.7.8. 1 w/v%チアミン水溶液

以下の割合で調製した。

チアミン塩酸塩（Lot No. WER5857, 和光純薬工業）	0.1	g
超純水	10	mL

フィルター（孔径 0.2 μm）ろ過除菌後、冷蔵（基準値：1～9℃）保存した。

13.7.9. 10 mg/mL アミノ酸水溶液

以下の割合で調製した。

L(-)-プロリン（Lot No. PEE2878, 和光純薬工業）	1	g
L-ロイシン（Lot No. CDJ4982, 和光純薬工業）	1	g
L(+)-イソロイシン（Lot No. ALH4672, 和光純薬工業）	1	g
超純水	100	mL

ビーカーに超純水を適量入れ、スターラーで攪拌しながら、各試薬を少量ずつ添加した。フィルター（孔径 0.2 μm）ろ過除菌後、冷蔵（基準値：1～9℃）保存した。

13.7.10. 20 mg/mL カナマイシン水溶液

以下の割合で調製した.

カナマイシン硫酸塩 (Lot No. LAR4778, 和光純薬工業)	20	mg
超純水	1	mL

フィルター (孔径 0.2 μ m) をろ過除菌後, 冷凍保存した.

13.7.11. 25 mg/mL クロラムフェニコール溶液

以下の割合で調製した.

クロラムフェニコール (Lot No. WKH3920, 和光純薬工業)	250	mg
エタノール (関東化学)	10	mL

フィルター (孔径 0.2 μ m) をろ過除菌後, 冷凍保存した.

13.7.12. 25 mg/mL 6-チオグアニン溶液 (6-TG 溶液)

以下の割合で調製した.

6-チオグアニン (Lot No. JI01 あるいは AEHGH, 東京化成)	25	mg
DMSO (和光純薬工業)	1	mL

アルミホイルを巻いて遮光し, 1 時間程度室温に放置した. 用時調製した.

13.7.13. ソフトアガー

以下の割合で調製した.

NaCl	6	g
バクトアガー (Lot No. 1038439 あるいは 1279022, BD Diagnostic)	6	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 に保温した.

6-TG ソフトアガーの場合は, さらに 25 mg/mL 6-TG 溶液 (用時調製) を使用直前に 1 mL 添加した.

13.7.14. M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地

以下の割合で調製した.

バクトアガー	15	g
超純水	800	mL

上記の試薬を秤量し, 所定量の超純水を添加後, スターラーバーを入れてオートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した. スターラーの上に 50°C の湯煎を置き, オートクレーブが終了したアガーを保温した.

Exp. No. D848 (115-223)
FINAL REPORT

5 × M9 salt	200	mL
50 w/v%グリセロール	20	mL
1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液	2	mL
1 mol/L 塩化カルシウム水溶液	0.1	mL
1 w/v%チアミン水溶液	0.5	mL
10 mg/mL アミノ酸水溶液	4	mL
25 mg/mL クロラムフェニコール溶液	1	mL
25 mg/mL 6TG 溶液 (M9 + Cm + 6TG 寒天培地のみ)	1	mL

アガールの温度が下がったら、スターラーを用いて攪拌しながら、上記の試薬を添加した。シャーレ（直径 90 mm）に寒天培地 25 mL を添加し、寒天培地が固化した後、プレートをラックに入れ、上からアルミホイルを掛けることで遮光し、室温で保存した。

13.7.15. 1/15 mol/L Na-K 緩衝液

以下の割合で調製した。

Na ₂ HPO ₄	7.57	g
KH ₂ PO ₄	1.82	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ（121°C, 20 分）で滅菌した後、室温（基準値：1~30°C）で保存した。

13.7.16. λ-trypticase 寒天培地

以下の割合で調製した。

BBL trypticase peptone (Lot No. 0230928, BD Diagnostic)	10	g
NaCl	5	g
バクトアガー	10	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ（121°C, 20 分）で滅菌した後、室温で約 60°C まで冷却し、1 mol/L MgSO₄ 10 mL を添加した（最終濃度 10 mmol/L）。シャーレ（直径 90 mm）に本寒天培地 25 mL を添加し、寒天培地が固化した後にプレートをラックに入れ、4°C で保存した。

13.7.17. λ -trypticase トップアガー

以下の割合で調製した.

BBL trypticase peptone	1	g
NaCl	0.5	g
バクトアガー	0.6	g
超純水	100	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温で約 60°C まで冷却し, 1 mol/L MgSO₄ 1 mL を添加した (最終濃度 10 mmol/L). 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.

13.8. 被験物質液等

13.8.1. 被験物質液の調製

被験物質をトウモロコシ油に溶解させた.

用量設定試験では, 4.00, 1.20, 0.400 および 0.120 g を正確に秤量し, それぞれ 20 mL 容のメスシリンダーに投入した. 秤量容器をトウモロコシ油で洗い, 洗液を先のメスシリンダーに入れた. トウモロコシ油を加え, 20 mL とすることにより 200, 60.0, 20.0 および 6.00 mg/mL 溶液を準備した. 各調製液について, 各投与用に気密容器に小分けし, アルミホイルで遮光した. 各調製液は室温保管庫 (温度基準 1~30°C, 実測値: 19.6~21.0°C) にて保存し, それぞれの投与に用いた.

TG 試験では, 1.50, 0.500 および 0.150 g をそれぞれ 25 mL 容のメスフラスコに正確に秤量した. トウモロコシ油を加え, 25 mL とすることにより 60.0, 20.0 および 6.00 mg/mL 溶液を準備した. 各調製液について, 各投与用に気密容器に小分けし, アルミホイルで遮光した. 各調製液は室温保管庫 [温度基準 1~30°C, 実測値: 20.3~22.2°C (バックアップ実測値: 19.6~21.9°C)] にて保存し, それぞれの投与に用いた.

13.8.2. 被験物質液の安定性

外部機関によって実施された「1-ブロモ-3-クロロプロパンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験」¹⁾において, トウモロコシ油中の被験物質は, 0.4~20 w/v% 溶液の濃度範囲で室温, 遮光条件下において 10 日間安定であることが確認されている.

13.8.3. 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.

13.8.4. 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 mol/L 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.

13.8.5. 残余対照物質液の処分

専用の容器（安全廃棄システム，NALGENE[®]）に廃棄した。

13.9. 対照群

13.9.1. 陰性対照群

被験物質液調製に用いる媒体であるトウモロコシ油を使用した。

13.9.2. 陽性対照群

gpt assay 用に，ガイドラインで推奨されている ENU を選択した。用量は文献²⁾により 100 mg/kg とし，すべての臓器を評価対照とした。Spi assay 用に，2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine が 400 ppm の用量で混餌投与され，陽性結果がでることが確認された別試験³⁾の肝臓を用いた。

13.10. 用量設定試験（予備試験）

13.10.1. 用量

外部機関で実施された試験の情報より，1-Bromo-3-chloropropane をマウスおよびラットに経口投与したときの LD₅₀ 値は，1290 および 680～1200 mg/kg であった^{4,5)}。また，「1-ブロモ-3-クロロプロパンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験」¹⁾においては，投与第 21 日から 25 日の間に，500 mg/kg 投与群の雄 10 例中 4 例が死亡し，5 例が瀕死状態により切迫屠殺した。20 および 100 mg/kg 投与群においては，死亡例は認められなかった。投与期間中，100 mg/kg 投与群以上で流涎が認められ，投与直後では，500 mg/kg 投与群で雄雌全例，100 mg/kg 投与群の雄 3/5 例，雌 2/5 例認められた。したがって，1000 mg/kg を最高用量とし，以下 300，100 および 30.0 mg/kg の 4 用量を設定した。

13.10.2. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg)	動物数	動物番号
被験物質	30.0	3	1101～1103
	100	3	1201～1203
	300	3	1301～1303
	1000	3	1401～1403

13.10.3. 投与方法および投与回数

被験物質の投与経路は経口とし，ディスパーザブルシリンジとテフロン製ゾンデを用いて 1 日 1 回，約 24 時間間隔で 7 日間連続強制投与した。投与容量は体重 100 g 当たり 0.5 mL とし，群分け時の体重から投与液量 (mL) を求めた。

13.10.4. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時, 検疫期間終了時(群分け時)および最終投与後1日に電子天秤(PG6002-S, メトラー・トレド)を用いて体重を測定した。また, 死亡動物については死亡発見時に体重を測定した。瀕死動物については, 瀕死を判断した時に体重を測定した。

初回投与日から最終投与後1日まで1日1回以上, 動物の一般状態を観察した後, 各用量の最終投与後1日での死亡率を求めた。

13.10.5. 病理学的検査

病理学的検査では, 肉眼観察のみを実施した。

平成24年2月13日に全生存動物を, イソフルラン麻酔下で放血により安楽死させた後, 剖検した。なお, 投与期間中の瀕死動物についても, 可能な限りイソフルラン麻酔下で放血により安楽死させて剖検した。死亡動物については, 発見後直ちに剖検した。

剖検では, 全例の体表, 自然開孔部を観察し, 腹腔, 胸腔, 骨盤腔, 頭蓋腔等の器官・組織を始めとする全身の諸器官・組織を肉眼観察した。すべての肉眼的異常について, 部位, 大きさ, 色調等を記録した。解剖後の屍体は速やかに処理した。

13.11. トランスジェニック (TG) 試験⁶⁻⁸⁾

13.11.1. 用量

用量設定試験の結果, 1000 mg/kg 群では Day 2 に 1/3 例の死亡が認められ, Day 3 および Day 4 にはそれぞれ1例について, 翌日まで生存できないと判断されたため, 速やかに剖検した。300 mg/kg 群以下の投与群では毒性兆候を示す一般状態の変化は認められず, 体重の顕著な減少も認められなかった。また, 解剖時の肉眼所見においても 300 mg/kg 群以下の投与群では特筆すべき変化は認められなかった。したがって, 最大耐量付近と考えられる 300 mg/kg を高用量とし, 公比 $\sqrt{10}$ 程度で除した以下 100 および 30.0 mg/kg の計3用量を被験物質群として設定した。

13.11.2. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg/day)	動物数		動物番号
		投与数	評価数	
陰性対照*	0	6	5	2001~2006
	30.0	6	5	2101~2106
被験物質	100	6	5	2201~2206
	300	10	5	2301~2310
陽性対照**	100	6	5	2401~2406

* : トウモロコシ油 ** : ENU (mg/kg)

13.11.3. 投与動物数

陰性対照群および被験物質投与群については、評価数 5 匹を確保するため、6 匹 (300 mg/kg 群については 10 匹) に投与した。死亡例等が認められなかったことから、動物番号の小さい順に 5 匹を評価に使用した。評価に使用しない動物については、13.11.7. に記載する各器官 (臓器) を摘出した後に凍結保存し、ゲノム DNA の抽出は行わなかった。

13.11.4. 投与方法および投与回数

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胃ゾンデを用いて、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 100 g 当たり 0.5 mL とし、13.11.6. の項で測定した最新の体重から求めた。

陽性対照物質の投与は、腹腔内投与とし、25G 注射針を装着したディスポーザブルシリンジを用いて 1 日 1 回、2 日間腹腔内投与した。投与液量は、体重 100 g 当たり 1 mL とし、Day 1 の体重を基に算出した。

13.11.5. 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 -9) から群分け日 (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。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。陽性対照群については、Day 2 および 3 に投与し、投与後 10 日 (Day 13) に器官を摘出した。

なお、発現期間は、OECD Guideline for the Testing of Chemicals 488 に準じて設定した。

13.11.6. 体重測定および一般状態観察

Day -9 (動物搬入時)、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 (PG6002-S、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 -9 (動物搬入時)、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。

器官摘出まで、1 日 1 回以上、動物の一般状態を観察した。

13.11.7. 器官 (組織) 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から、肝臓、大腿骨、胃および精巣を摘出し、これら器官の肉眼観察を行った。また、摘出した器官 (肝臓および精巣) についての重量を、電子天秤 (PG403-S、メトラー・トレド) を用いて測定し、記録した。なお、解剖室の出入り口にはネズミ返しを設置した。

器官重量/体重比 (相対重量) を、剖検日の体重および器官重量から算出した [(器官重量 / 剖検日の体重) × 100]。なお、肝臓および精巣の測定単位は g (小数第 2 位ま

で)とした。

各器官の摘出・保存は、以下の方法に従った。

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ヵ所程度くり抜いた。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（LN₂）中で凍結させた。残った左葉およびその他の葉は、保存袋に入れ、LN₂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。

大腿骨：左右の大腿骨を摘出した後、チューブに入れ、LN₂で凍結させた。

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，LN₂中で凍結させた。

精巣：左右の精巣を摘出した後，それぞれ別のマイクロチューブに入れ，液体窒素（LN₂）中で凍結させた。

凍結後は，超低温フリーザー（MDF-U281AT あるいは MDF-U71V，三洋電機，設定値：-80℃，基準値：-90～-60℃）中に保存した。

すべての摘出器官（臓器）は，最終報告書作成後まで保存される。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。

13.11.8. 摘出器官の選択理由

肝臓：本被験物質による影響が示唆され，主要な代謝器官であり，被験物質が比較的高濃度で存在すると考えられるため。

大腿骨：本被験物質による影響が示唆され，造血器官であるため。

胃：本被験物質による影響が示唆され，経口投与では初期に被験物質と接触する器官であるため。

精巣：本被験物質による影響が示唆され，次世代への影響を確認するため。

13.11.9. 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 を入れて氷冷した 15 mL 容の遠心管に上記の組織破碎液を静かに重層し，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し，冷却してある RNase 含有ダウンス緩衝液 3 mL を加え，よく懸濁した（核／細胞懸濁液）。骨髄の場合は，適量の RNase 含有ダウンス緩衝液を用いて大腿骨から骨髄を洗い出し，ペッスルを用いてホモジナイズした（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，1～5

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(約 6 mL) の Ph/Cl 混液を加え, 数回転倒混和し, 10 分間ローテーターを用いて回転混和後, 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, 10 分間ローテーターを用いて回転混和後, 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(100 μ L)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.

Spi assay で陽性結果がでることが確認された別試験の肝臓についても DNA 抽出を実施し, Spi assay についてのみ実施した.

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.

13.11.10. 試験菌株の準備 (gpt assay)

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 μ L およびカナマイシン水溶液(20 mg/mL) 30 μ L を添加した. これに凍結保存(設定値: -80°C)しておいた大腸菌 YG6020 株を融解した後, 50 μ L 接種した. 37°C, 120 回/分の振盪条件で一晚(14~18 時間)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, LB 培養液 100 mL, マルトース水溶液(200 mg/mL) 1 mL およびカナマイシン水溶液(20 mg/mL) 100 μ L を添加し, 次いで, 先の前培養液 1.5 mL を殖菌した後, 同様に 2~6 時間程度培養を続けた. 培養終了後, 培養液を 10 分間遠心分離(2000 r/min)した. 上清を捨て, 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 50 mL で再懸濁した(大腸菌懸濁液).

13.11.11. 試験菌株の準備 (Spi assay)

容量 200 mL のバツフル付三角フラスコ 3 本に LB 培養液を 30 mL ずつ添加した. これに凍結保存(設定値: -80°C)しておいた大腸菌(XL-1 Blue MRA), 大腸菌[XL-1 Blue MRA (P2)] および大腸菌[WL95 (P2)] *を融解した後, それぞれ 50 μ L ずつ接種した. 37°C, 120 回/分の振盪条件で一晚(14~18 時間)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 3 本に, LB 培養液 100 あるいは 20 mL, マルトース水溶液(200 mg/mL) 1 あるいは 0.2 mL をそれぞれ添加し, 次いで, 先の前培養

液を 1.5 あるいは 0.3 mL ずつ殖菌した後、同様に 2~6 時間程度培養を続けた。培養終了後、培養液を 10 分間遠心分離 (2000 r/min) した。上清を捨て、10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を 50 mL ずつ添加し、再懸濁した (大腸菌懸濁液)。

Confirmation 用の試験菌株の準備は、使用量に合わせて、適宜、準備量を変更した。

* : Spi⁻変異体候補プラークの confirmation の際に使用

13.11.12. ゲノム DNA のパッケージング (*gpt*, Spi⁻ assay 共通)

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。100~600 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。インキュベート終了後、各チューブ内の合計液量が 300 µL になるように SM 緩衝液を加え、十分に攪拌した (パッケージング溶液)。パッケージング溶液は使用時まで、氷中にて保存した。

13.11.13. パッケージング溶液のプレーティング (*gpt* assay)

大腸菌懸濁液 (YG6020 株) を、総プラーク算出用 (タイター用) 小試験管 2 本および突然変異算出用 (セレクション用) 小試験管 5 本に 200 µL ずつ分注しておいた。10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を希釈用チューブに 495 µL ずつ分注した。希釈用チューブにパッケージング溶液 5 µL を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した。これを希釈液とした。希釈液をタイター用小試験管 2 本に 5 µL ずつ添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した。パッケージング溶液をセレクション用小試験管 5 本に約 60 µL ずつ添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した (5 本目のセレクション用小試験管には残っているパッケージング溶液全量を添加した)。タイター用小試験管およびセレクション用小試験管を 37°C で 20 分程度静置した。静置後、37°C、120 回/分の振盪条件で 30 分間培養した。タイター用小試験管に、トップアガー 2.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、M9+Cm 寒天培地に全量を重層した。これをタイター用プレートとした。セレクション用小試験管に 6TG トップアガー 2.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、M9+Cm+6TG 寒天培地に全量を重層した。これをセレクション用プレートとした。タイター用プレートは 37°C の条件で 2~3 日間、セレクション用プレートは 37°C の条件で 5 日間培養した。

13.11.14. パッケージング溶液のプレーティング (Spi⁻ assay)

大腸菌懸濁液 (XL-1 Blue MRA) を、総プラーク算出用 (タイター用) 小試験管 2 本に 200 µL ずつ分注しておいた。大腸菌懸濁液 [XL-1 Blue MRA (P2)] を、突然変異算

出用 (セレクション用) 小試験管 2 本に 200 μ L ずつ分注しておいた. 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を希釈用チューブに 495 μ L ずつ分注した. 希釈用チューブにパッケージング溶液 5 μ L を添加し, ボルテックスミキサーで攪拌した. これを希釈液とした. 希釈液をタイター用チューブ 2 本に 5 μ L ずつ添加し, ボルテックスミキサーで攪拌した. パッケージング溶液をセレクション用チューブ 2 本に約 150 μ L ずつ添加し, ボルテックスミキサーでゆるやかに攪拌した (2 本目のセレクション用チューブには残っているパッケージング溶液全量を添加した). タイター用チューブおよびセレクション用チューブを 37°C で 20 分程度静置した. タイター用チューブおよびセレクション用チューブに, λ -trypticase トップアガー 2.5 mL を加え, ボルテックスミキサーで攪拌し, λ -trypticase 寒天培地に全量を重層した. これをタイター用プレートおよびセレクション用プレートとした. タイター用およびセレクション用プレートは 37°C で一晚 (14~18 時間) 培養した.

13.11.15. コロニーの計数 (*gpt* assay)

培養終了後, コロニー数を用手法にて計数した. ただし, セレクション用プレートのコロニーは, 培養開始 5 日目で 6TG の析出により, コロニーの識別が困難になるため, 3 および 4 日目の時点で候補コロニーを確認した.

13.11.16. プラークの計数 (*Spi* assay)

培養終了後, プラーク数を用手法にて計数した.

13.11.17. コロニーの confirmation (*gpt* assay)

すべての *gpt* 変異体候補コロニーについて, confirmation を実施した.

未使用の M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地に方眼紙を貼り付けた.

セレクション用プレートのコロニーに, ストリーク箇所の通し番号をつけた. セレクション用プレートのコロニー数と同数の滅菌済みマイクロチューブを準備した. 準備したマイクロチューブに 1/15 mol/L Na-K buffer を 50 μ L ずつ分注した. セレクション用プレートのコロニーを滅菌済み爪楊枝の先で軽く触れた. 爪楊枝の先を 1/15 mol/L Na-K buffer でよく洗った. 爪楊枝を M9 + Cm + 6TG 寒天培地, M9 + Cm 寒天培地の順にストリークした. 37°C の条件で 2~3 日間培養した. M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地の両方に, 生育が認められたコロニーを変異コロニーとした. 変異コロニーの値は, confirmation 後の値を用いた.

13.11.18. プラークの confirmation (*Spi* assay)

すべての *Spi* 変異体候補プラークについて WL95 (P2) 株を含めた confirmation を実施した.

大腸菌 XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2) および WL95 (P2) を小試験管に 200 μ L

ずつ分注した。分注した小試験管に、 λ -trypticase トップアガーを 2.5 mL ずつ加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、未使用の λ -trypticase 寒天培地に全量を重層した。重層後、プレートを約 1 時間乾燥させた。乾燥後、重層したプレートに方眼紙を貼り付けた。

セレクション用プレートのプラークに、スポット箇所の通し番号をつけた。セレクション用プレートのプラーク数と同数の滅菌済みマイクロチューブを準備した。準備したマイクロチューブに SM 緩衝液を 60 μ L ずつ分注した。セレクション用プレートのプラークをパスツールピペットあるいは広口チップを用いて寒天ごとくり抜いた。SM 緩衝液 60 μ L を分注したマイクロチューブにくり抜いた寒天を入れた。これを confirmation 液とした。大腸菌 XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2) および WL95 (P2) を重層した λ -trypticase 寒天培地に confirmation 液をそれぞれ 1~2 μ L ずつスポットした。37°C の条件で一晩 (14~18 時間) 培養した。大腸菌 XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2) および WL95 (P2) の 3 つのプレート上でプラークを形成したものを変異プラークとした。変異プラークの値は、confirmation 後の値を用いた。

13.11.19. 総コロニー数の算出 (gpt assay)

タイター用プレートに出現したコロニー数 (N) を計数し、下記の式を用いて総コロニー数を求めた。

総コロニー数 = タイター用プレートに出現したコロニー数 \times Dilution Factor

$$\begin{aligned} \text{総コロニー数} &= \frac{N \times 100 \times 300 (\mu\text{L})}{5 (\mu\text{L})} \\ &= 6000 \times N \end{aligned}$$

13.11.20. 突然変異頻度 (Mutant Frequency) の算出 (gpt assay)

突然変異頻度は、セレクション用プレートのコロニー総数 (Confirmation 後の値) を総コロニー数で除して、当該組織での突然変異頻度を求めた。

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{セレクション用プレートのコロニー総数 (Confirmation 後の値)}}{\text{総コロニー数}}$$

13.11.21. 総プラーク数の算出 (Spi assay)

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。

総プラーク数 = タイター用プレートに出現したプラーク数 \times Dilution Factor

$$\begin{aligned} \text{総プラーク数} &= \frac{N \times 100 \times 300 (\mu\text{L})}{5 (\mu\text{L})} \\ &= 6000 \times N \end{aligned}$$

13.11.22. 突然変異頻度 (Mutant Frequency) の算出 (Spi assay)

突然変異頻度は、セレクション用プレートのプラーク総数 (Confirmation 後の値) 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。

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{セレクション用プレートのプラーク総数(Confirmation 後の値)}}{\text{総プラーク数}}$$

13.12. 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、Dunnnett 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た。Bartlett の等分散検定で不等分散(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差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する。有意な増加が認められなかった場合は、試験の妥当性を評価し、その結果、試験が成立しないと判断した場合は、再試験を実施する。

なお、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ので、試験は成立したと判断した。

15. 結果

15.1. 用量設定試験

結果を Table 1 および 2 ならびに Appendix 1 および 2 に示す.

1-Bromo-3-chloropropane 投与の 1000 mg/kg 群で Day 2 に 1/3 例の死亡が認められ, Day 3 および Day 4 にはそれぞれ 1 例について, 翌日まで生存できないと判断されたため, 速やかに剖検した. 300 mg/kg 群以下の投与群では毒性兆候を示す一般状態の変化は認められず, 体重の顕著な減少も認められなかった.

また, 剖検時の肉眼所見では, 300 mg/kg 群以下の投与群では特筆すべき変化は認められなかった.

15.2. 遺伝子突然変異試験

15.2.1. 肝臓

15.2.1.1. *gpt* assay

試験結果を Table 3 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $1.66 \pm 1.41 \times 10^{-6}$ ($0.59 \sim 4.04 \times 10^{-6}$) であった.

1-Bromo-3-chloropropane 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 30.0 mg/kg 群で $1.55 \pm 1.16 \times 10^{-6}$, 中用量の 100 mg/kg 群で $2.43 \pm 0.61 \times 10^{-6}$, 高用量の 300 mg/kg 群で $3.43 \pm 1.97 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $8.79 \pm 3.59 \times 10^{-6}$ と増加を示し, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた.

15.2.1.2. *Spi* assay

試験結果を Table 7 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $4.37 \pm 1.63 \times 10^{-6}$ ($3.02 \sim 6.87 \times 10^{-6}$) であった.

1-Bromo-3-chloropropane 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 30.0 mg/kg 群で $3.84 \pm 2.37 \times 10^{-6}$, 中用量の 100 mg/kg 群で $1.05 \pm 1.44 \times 10^{-6}$, 高用量の 300 mg/kg 群で $3.71 \pm 2.49 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照サンプルにおける各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $12.35 \pm 2.44 \times 10^{-6}$ と増加を示し, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた.

15.2.2. 骨髄

15.2.2.1. *gpt* assay

試験結果を Table 4 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $0.95 \pm 0.94 \times 10^{-6}$ ($0.00 \sim 1.90 \times 10^{-6}$) であった.

1-Bromo-3-chloropropane 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 30.0 mg/kg 群で $0.34 \pm 0.47 \times 10^{-6}$, 中用量の 100 mg/kg 群で $1.46 \pm 1.62 \times 10^{-6}$, 高用量の 300 mg/kg 群で $1.46 \pm 1.09 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $74.85 \pm 34.78 \times 10^{-6}$ と増加を示し, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた.

15.2.2.2. *Spi* assay

試験結果を Table 8 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $3.05 \pm 2.47 \times 10^{-6}$ ($1.17 \sim 6.35 \times 10^{-6}$) であった.

1-Bromo-3-chloropropane 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 30.0 mg/kg 群で $2.51 \pm 2.34 \times 10^{-6}$, 中用量の 100 mg/kg 群で $4.83 \pm 3.40 \times 10^{-6}$, 高用量の 300 mg/kg 群で $3.66 \pm 3.60 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

15.2.3. 胃 (腺胃)

15.2.3.1. *gpt* assay

試験結果を Table 5 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $1.43 \pm 0.64 \times 10^{-6}$ ($0.79 \sim 2.42 \times 10^{-6}$) であった.

1-Bromo-3-chloropropane 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 30.0 mg/kg 群で $0.89 \pm 0.63 \times 10^{-6}$, 中用量の 100 mg/kg 群で $1.17 \pm 0.92 \times 10^{-6}$, 高用量の 300 mg/kg 群で $0.87 \pm 0.85 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $14.52 \pm 4.37 \times 10^{-6}$ と増加を示し, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた.

15.2.3.2. Spi assay

試験結果を Table 9 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $1.65 \pm 1.49 \times 10^{-6}$ (0.00～ 3.90×10^{-6}) であった.

1-Bromo-3-chloropropane 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 30.0 mg/kg 群で $2.88 \pm 2.58 \times 10^{-6}$, 中用量の 100 mg/kg 群で $1.57 \pm 1.38 \times 10^{-6}$, 高用量の 300 mg/kg 群で $1.50 \pm 2.48 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

15.2.4. 精巢

15.2.4.1. gpt assay

試験結果を Table 6 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $0.82 \pm 0.55 \times 10^{-6}$ (0.00～ 1.39×10^{-6}) であった.

1-Bromo-3-chloropropane 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 30.0 mg/kg 群で $0.71 \pm 0.63 \times 10^{-6}$, 中用量の 100 mg/kg 群で $0.66 \pm 0.87 \times 10^{-6}$, 高用量の 300 mg/kg 群で $0.62 \pm 0.49 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

陽性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $1.29 \pm 0.92 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

15.2.4.2. Spi assay

試験結果を Table 10 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は $1.03 \pm 1.09 \times 10^{-6}$ (0.00～ 2.84×10^{-6}) であった.

1-Bromo-3-chloropropane 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 低用量の 30.0 mg/kg 群で $1.45 \pm 2.02 \times 10^{-6}$, 中用量の 100 mg/kg 群で $1.33 \pm 2.17 \times 10^{-6}$, 高用量の 300 mg/kg 群で $1.17 \pm 1.08 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意差はなく, 同程度であった.

15.2.5. 体重および一般状態観察

試験結果を Appendix 3 および 4 に示す.

1-Bromo-3-chloropropane の 300 mg/kg 群では, 1/10 例で Day15 以降に結節 (鼻部) が認められたが, 明確な体重減少は観察されなかった. 結節発生の原因は不明であるが, その発生率の低さから偶発的なものと判断された. 陰性対照群および 1-Bromo-3-chloropropane のその他の投与群では, 明確な体重減少および一般状態の変化

は観察されなかった。

15.2.6. 器官重量および器官重量/体重比

試験結果を Appendix 5 に示す。

いずれの 1-Bromo-3-chloropropane 投与群においても、陰性対照群と比較し、明確な器官重量および器官重量/体重比の変化は認められなかった。

15.2.7. 解剖時の肉眼所見

試験結果を Appendix 6 に示す。

いずれの 1-Bromo-3-chloropropane 投与群においても、特筆すべき変化は認められなかった。

16. 考察および結論

1-Bromo-3-chloropropane の肝臓、骨髄、胃（腺胃：以下胃）および精巣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 (*gpt delta*) を用いた遺伝子突然変異誘発性（レポーター遺伝子：*gpt* および *red/gam*）を実施した。

1000, 300, 100 および 30.0 mg/kg の 4 用量について 1 日 1 回、24 時間間隔で 7 日間連続強制経口投与を実施した用量設定試験の結果、1000 mg/kg 群では Day 2 に 1/3 例の死亡が認められ、Day 3 および 4 にはそれぞれ 1 例について、翌日まで生存できないと判断されたため、速やかに剖検した。300 mg/kg 群以下の投与群では一般状態の変化も体重の顕著な減少も認められなかった。また、剖検時の肉眼所見においても 300 mg/kg 群以下の投与群では特筆すべき変化は認められなかった。したがって、最大耐量付近と考えられる 300 mg/kg を高用量とし、公比 $\sqrt{10}$ 程度で除した以下 100 および 30.0 mg/kg の計 3 用量を被験物質群として設定した。

トランスジェニック試験では 28 日間強制経口投与し、3 日間の遺伝子突然変異発現期間をおいた後、各器官を摘出し、肝臓、骨髄、胃および精巣について *gpt assay* および *Spi* assay により遺伝子突然変異頻度を求めた。

その結果、1-Bromo-3-chloropropane 投与群の肝臓、骨髄、胃および精巣のいずれにおいても、*gpt assay* および *Spi* assay による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。

本被験物質 (1-Bromo-3-chloropropane) については、細菌を用いる復帰突然変異試験⁹⁾において、代謝活性化系非存在下 (-S9) の大腸菌 WP2*uvrA* 株および代謝活性化系存在下 (+S9) の大腸菌 WP2*uvrA* 株ならびにサルモネラ菌 TA100, TA1535 株において陽性であり、突然変異の誘発が代謝活性化により少し増強されている。また、CHL 細胞を用いる染色体異常試験¹⁰⁾においても短時間処理の-S9 および+S9 で陽性であり、染色体構造異常の誘発が代謝活性化により増強されている。しかしながら、ラットを用いたアル

カリ溶出試験で、類似化合物の 1,2,3-tribromo-propane および 1,2-dibromo-3-chloropropane が腎臓に DNA 損傷性を誘発しているにもかかわらず、被験物質である 1-Bromo-3-chloropropane では DNA 損傷性が認められていない¹¹⁾。これは、ハロゲン化プロパン類の代謝物の違いによるものと考えられており、第 2 相の抱合反応（特にグルタチオン抱合）による生成物の量的、質的な違いによるものと考えられる。また、細菌を用いる復帰突然変異試験および CHL 細胞を用いる染色体異常試験で用いた代謝活性化系は、第 1 相のみの反応であることに加え、得られている遺伝毒性が比活性値および D₂₀ 値等を考慮すると遺伝毒性作用が強いものとは考え難いことから、最大耐量付近で投与されたマウスの肝臓、骨髄、胃および精巣においては遺伝子突然変異を誘発しないものと考えられた。

陽性対照物質のエチルニトロソウレア (ENU) 経口投与群 (100 mg/kg) は、肝臓、骨髄および胃で *gpt* assay による遺伝子突然変異頻度が上昇しており、遺伝子突然変異頻度は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。

Spi assay で陽性結果が出ることが確認された別試験の肝臓を陽性対照群の肝臓として用いて *Spi* assay を実施した結果、遺伝子突然変異頻度は明確な高値を示し、陰性対照群に比べて統計学的に有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められた。したがって、試験成立条件を満たしたことから、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、1-Bromo-3-chloropropane 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（陰性）と判定された。

17. 参考文献

- 1) ■■■■■ : 1-ブロモ-3-クロロプロパンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, (財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
- 2) 能美健彦 : 変異原性試験で何がわかるか : 21 世紀の展望, Environ. Mutagen Res., 24 (2002) 75-80.
- 3) K. Masumura, K. Matsui, M. Yamada, M. Horiguchi, K. Ishida, M. Watanabe, O. Ueda, H. Suzuki, Y. Kanke, K.R. Tindall, K. Wakabayashi, T. Sofuni and T. Nohmi, Mutagenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) in the new *gpt* delta transgenic mouse. Cancer Letters 143 (1999) 241-244.
- 4) IUCLID (International Uniform Chemical Information Data Base) Data Sheet, EU (1995)
- 5) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), US NIOSH (1996)

- 6) T. Nohmi, M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni, A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi^r and 6-thioguanine selections, Environmental Molecular Mutagenesis 28 (1996) 465-470.
- 7) T. Nohmi, T. Suzuki and K. Masumura, Recent advance in the protocols of transgenic mouse mutation assays, Mutation Research 455 (2000) 191-215.
- 8) V. Thybaud, S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima, In vivo transgenic mutation assays. Mutation Research 540 (2003) 141-151.
- 9) ████████ : 1-ブロモ-3-クロロプロパンの細菌を用いる復帰突然変異試験, (財) 食品農医薬品安全性評価センター
- 10) ████████ : 1-ブロモ-3-クロロプロパンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験, (財) 食品農医薬品安全性評価センター
- 11) M. Lag, E.J. Soderlund, J.G. Omichinski, G. Brunborg, J.A. Holme, J.E. Dahl, S.D. Nelson, E. Dybing, Effect of bromine and chlorine positioning in the induction of renal and testicular toxicity by halogenated propanes. Chemical Research in Toxicology 4 (1991) 528-534.

18. 試験関係資料の保存

当該試験の下記資料は、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。

- 試験計画書 (原本)
- 被験物質 (2 g)
- 被験物質に関する資料 (使用記録, 調製記録, その他)
- 生データ (投与記録, 体重測定記録, 症状観察記録, ゲノム DNA 抽出記録, 突然変異頻度測定結果, その他)
- 最終報告書 (原本)
- その他の試験関係資料

19. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかったこと

該当する事項はなかった。

Table 1. Mortality in dose-finding study of 1-bromo-3-chloropropane
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment								Mortality	
			1	2	3	4	5	6	7	8		
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	1101	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1102	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1103	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	100	1201	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1202	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1203	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	300	1301	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1302	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1303	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
1000	1401	Live	Live	Live	Moribund						3 / 3	
	1402	Live	Dead									
	1403	Live	Live	Moribund								

Table 2. Gross findings in dose-finding study of 1-bromo-3-chloropropane
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Sex: Male		Group : 1-Bromo-3-chloropropane			
Group	Animal ID-No.	Classification	Experimental day	Organ	Findings and comments
30.0 mg/kg	1101	Sacrificed	8	Normal	
	1102	Sacrificed	8	Normal	
	1103	Sacrificed	8	Spleen	Black patch, single, 3x2 mm
100 mg/kg	1201	Sacrificed	8	Normal	
	1202	Sacrificed	8	Normal	
	1203	Sacrificed	8	Normal	
300 mg/kg	1301	Sacrificed	8	Normal	
	1302	Sacrificed	8	Spleen	Black patch, single, 2x2 mm
	1303	Sacrificed	8	Spleen	Black patch, single, 5x4 mm

Table 2. -continued

Sex: Male		Group : 1-Bromo-3-chloropropane				
Group	Animal ID-No.	Classification	Experimental day	Organ	Findings and comments	
1000 mg/kg	1401	Moribund	4	Thymus	Atrophic	
				Liver	Pale	
					Evident lobule	
				Spleen	Black patch, single, 3x2 mm	
					Kidney	Pale, bilateral
		1402	Dead	2		[Autolysis (slight)]
	Spleen				Black patch, single, 6x3 mm	
					Stomach	Black patch, a few, glandular stomach, 2x1 mm
		1403	Moribund	3	Eye	White patch, single, bilateral, cornea, diameter 2 mm
Liver	White patch, single, 8x2 mm					
Stomach	Black patch, a few, glandular stomach, diameter 1.5 mm					

Table 3. Induction of mutation (*gpt* assay) in liver of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane
 [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 colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	990,000	4	4.04	1.66 \pm 1.41
		2002	1,695,000	1	0.59	
		2003	894,000	1	1.12	
		2004	1,302,000	1	0.77	
		2005	1,674,000	3	1.79	
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	1,152,000	2	1.74	1.55 \pm 1.16
		2102	1,260,000	0	0.00	
		2103	1,653,000	2	1.21	
		2104	1,242,000	4	3.22	
		2105	1,272,000	2	1.57	
	100	2201	1,440,000	4	2.78	2.43 \pm 0.61
		2202	1,146,000	2	1.75	
		2203	1,239,000	4	3.23	
		2204	1,044,000	2	1.92	
		2205	1,212,000	3	2.48	
	300	2301	1,359,000	3	2.21	3.43 \pm 1.97
		2302	1,002,000	5	4.99	
		2303	1,365,000	1	0.73	
		2304	1,071,000	4	3.73	
		2305	909,000	5	5.50	
ENU	100	2401	1,182,000	8	6.77	8.79 \pm 3.59 * (S)
		2402	1,206,000	8	6.63	
		2403	1,356,000	9	6.64	
		2404	1,677,000	15	8.94	
		2405	1,002,000	15	14.97	

Corn oil: Negative control (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)

(S): Student t test

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

Table 4. Induction of mutation (*gpt* assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane
 [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 colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	894,000	0	0.00	0.95 \pm 0.94
		2002	1,389,000	0	0.00	
		2003	1,575,000	3	1.90	
		2004	1,017,000	1	0.98	
		2005	1,080,000	2	1.85	
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	1,287,000	0	0.00	0.34 \pm 0.47
		2102	1,677,000	0	0.00	
		2103	1,158,000	1	0.86	
		2104	1,161,000	1	0.86	
		2105	1,128,000	0	0.00	
	100	2201	954,000	1	1.05	1.46 \pm 1.62
		2202	549,000	2	3.64	
		2203	1,044,000	0	0.00	
		2204	765,000	2	2.61	
		2205	1,101,000	0	0.00	
	300	2301	753,000	0	0.00	1.46 \pm 1.09
		2302	1,029,000	2	1.94	
		2303	870,000	1	1.15	
		2304	1,011,000	3	2.97	
		2305	804,000	1	1.24	
ENU	100	2401	726,000	83	114.33	74.85 \pm 34.78 *(A)
		2402	570,000	63	110.53	
		2403	459,000	27	58.82	
		2404	1,011,000	46	45.50	
		2405	1,110,000	50	45.05	

Corn oil: Negative control (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)

(A): Aspin-Welch t test

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

Table 5. Induction of mutation (*gpt* assay) in stomach of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane
 [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 colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	2,127,000	2	0.94	1.43 \pm 0.64
		2002	2,115,000	3	1.42	
		2003	2,520,000	4	1.59	
		2004	2,547,000	2	0.79	
		2005	1,656,000	4	2.42	
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	1,566,000	1	0.64	0.89 \pm 0.63
		2102	1,488,000	2	1.34	
		2103	1,239,000	2	1.61	
		2104	2,283,000	2	0.88	
		2105	2,466,000	0	0.00	
	100	2201	1,626,000	4	2.46	1.17 \pm 0.92
		2202	2,565,000	2	0.78	
		2203	3,771,000	4	1.06	
		2204	3,837,000	6	1.56	
		2205	4,062,000	0	0.00	
	300	2301	3,177,000	0	0.00	0.87 \pm 0.85
		2302	1,296,000	2	1.54	
		2303	1,878,000	0	0.00	
		2304	1,647,000	3	1.82	
		2305	1,980,000	2	1.01	
ENU	100	2401	2,025,000	40	19.75	14.52 \pm 4.37 * (A)
		2402	2,814,000	41	14.57	
		2403	2,832,000	39	13.77	
		2404	2,280,000	18	7.89	
		2405	1,863,000	31	16.64	

Corn oil: Negative control (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)

(A): Aspin-Welch t test

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

Table 6. Induction of mutation (*gpt* assay) in testis of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane
 [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 colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	3,378,000	4	1.18	0.82 \pm 0.55
		2002	3,762,000	0	0.00	
		2003	1,065,000	1	0.94	
		2004	1,743,000	1	0.57	
		2005	2,157,000	3	1.39	
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	1,182,000	2	1.69	0.71 \pm 0.63
		2102	2,379,000	2	0.84	
		2103	1,863,000	0	0.00	
		2104	3,816,000	2	0.52	
		2105	2,049,000	1	0.49	
	100	2201	2,283,000	5	2.19	0.66 \pm 0.87
		2202	2,085,000	1	0.48	
		2203	4,035,000	1	0.25	
		2204	2,475,000	1	0.40	
		2205	4,251,000	0	0.00	
	300	2301	2,400,000	3	1.25	0.62 \pm 0.49
		2302	4,908,000	4	0.81	
		2303	3,864,000	3	0.78	
		2304	3,768,000	1	0.27	
		2305	2,754,000	0	0.00	
ENU	100	2401	2,727,000	5	1.83	1.29 \pm 0.92
		2402	1,938,000	5	2.58	
		2403	3,006,000	3	1.00	
		2404	2,418,000	2	0.83	
		2405	4,395,000	1	0.23	

Corn oil: Negative control (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)

Table 7. Induction of mutation (Spi⁻ assay) in liver of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane
 [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 colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	291,000	2	6.87	4.37 \pm 1.63
		2002	918,000	3	3.27	
		2003	663,000	2	3.02	
		2004	849,000	3	3.53	
		2005	582,000	3	5.15	
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	1,152,000	2	1.74	3.84 \pm 2.37
		2102	792,000	4	5.05	
		2103	960,000	4	4.17	
		2104	786,000	1	1.27	
		2105	858,000	6	6.99	
	100	2201	777,000	0	0.00	1.05 \pm 1.44
		2202	318,000	0	0.00	
		2203	414,000	1	2.42	
		2204	1,662,000	0	0.00	
		2205	711,000	2	2.81	
	300	2301	732,000	1	1.37	3.71 \pm 2.49
		2302	294,000	1	3.40	
		2303	1,038,000	5	4.82	
		2304	636,000	1	1.57	
		2305	678,000	5	7.37	
PhIP #	400 ppm	4-1	4,437,000	52	11.72	12.35 \pm 2.44 * (S)
		4-2	2,040,000	21	10.29	
		4-3	3,990,000	60	15.04	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

PhIP: Positive control (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, dietary administration)

#: The samples stored for other experiment were used in this study.

(S): Student t test

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

Table 8. Induction of mutation (Spi⁻ assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane
 [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 colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	315,000	2	6.35	3.05 \pm 2.47
		2002	720,000	1	1.39	
		2003	789,000	1	1.27	
		2004	858,000	1	1.17	
		2005	591,000	3	5.08	
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	483,000	2	4.14	2.51 \pm 2.34
		2102	3,414,000	1	0.29	
		2103	711,000	2	2.81	
		2104	516,000	0	0.00	
		2105	375,000	2	5.33	
	100	2201	405,000	3	7.41	4.83 \pm 3.40
		2202	222,000	0	0.00	
		2203	540,000	2	3.70	
		2204	459,000	2	4.36	
		2205	462,000	4	8.66	
	300	2301	300,000	0	0.00	3.66 \pm 3.60
		2302	591,000	1	1.69	
		2303	783,000	2	2.55	
		2304	321,000	3	9.35	
		2305	426,000	2	4.69	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Table 9. Induction of mutation (Spi⁻ assay) in stomach of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane
 [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 colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	1,008,000	0	0.00	1.65 \pm 1.49
		2002	927,000	2	2.16	
		2003	1,308,000	1	0.76	
		2004	1,419,000	2	1.41	
		2005	513,000	2	3.90	
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	636,000	3	4.72	2.88 \pm 2.58
		2102	564,000	1	1.77	
		2103	621,000	0	0.00	
		2104	474,000	3	6.33	
		2105	642,000	1	1.56	
	100	2201	732,000	1	1.37	1.57 \pm 1.38
		2202	531,000	2	3.77	
		2203	729,000	0	0.00	
		2204	1,848,000	3	1.62	
		2205	2,715,000	3	1.10	
	300	2301	798,000	0	0.00	1.50 \pm 2.48
		2302	564,000	1	1.77	
		2303	600,000	0	0.00	
		2304	759,000	0	0.00	
		2305	699,000	4	5.72	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Table 10. Induction of mutation (Spi⁻ assay) in testis of transgenic mice treated with 1-bromo-3-chloropropane
 [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 colony forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	2001	1,944,000	1	0.51	1.03 \pm 1.09
		2002	1,713,000	2	1.17	
		2003	1,410,000	4	2.84	
		2004	5,025,000	0	0.00	
		2005	1,593,000	1	0.63	
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	519,000	0	0.00	1.45 \pm 2.02
		2102	996,000	5	5.02	
		2103	1,434,000	1	0.70	
		2104	1,137,000	1	0.88	
		2105	1,536,000	1	0.65	
	100	2201	993,000	0	0.00	1.33 \pm 2.17
		2202	1,014,000	1	0.99	
		2203	891,000	0	0.00	
		2204	1,914,000	1	0.52	
		2205	777,000	4	5.15	
	300	2301	549,000	1	1.82	1.17 \pm 1.08
		2302	4,359,000	0	0.00	
		2303	744,000	2	2.69	
		2304	4,221,000	2	0.47	
		2305	1,161,000	1	0.86	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Appendix 1. Body weight in dose-finding study of 1-bromo-3-chloropropane
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)				Gain (g)
			Day -7 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8 (Sacrificed)	Dead (Moribund)	
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	1101	24.7	26.9	26.6		-0.3
		1102	23.3	25.2	25.3		0.1
		1103	23.5	25.6	24.8		-0.8
		Mean±S.D.	23.8±0.8	25.9±0.9	25.6±0.9		-0.3±0.5
	100	1201	23.5	25.5	26.3		0.8
		1202	23.6	25.9	25.0		-0.9
		1203	24.9	26.9	26.3		-0.6
		Mean±S.D.	24.0±0.8	26.1±0.7	25.9±0.8		-0.2±0.9
	300	1301	24.3	26.7	26.8		0.1
		1302	23.4	25.2	24.2		-1.0
		1303	23.9	26.4	26.7		0.3
		Mean±S.D.	23.9±0.5	26.1±0.8	25.9±1.5		-0.2±0.7
1000	1401	23.0	25.4		20.0 (M: Day 4)		
	1402	23.0	26.4		24.5 (D: Day 2)		
	1403	23.4	26.1		24.1 (M: Day 3)		
	Mean±S.D.	23.1±0.2	26.0±0.5				

M: Moribund, D: Dead

Gain= Day 8(Sacrificed)-Day 1(Allocated)

Appendix 2. Clinical observations in dose-finding study of 1-bromo-3-chloropropane
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment							
			1	2	3	4	5	6	7	8
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	1101	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N
	100	1201	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N
	300	1301	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N
	1000	1401	N	N	St	Em, Dla, Ir, St, Hy, Pt, Ed, M				
		1402	N	D						
		1403	N	St, Ir, Pt	An, Pp, Ir, Hy, Pi, Sf, Pt, La, M					

N: Normal, D: Dead, M: Moribund, St: Staggering, Em: Emaciation, Dla: Decrease in locomotor activity
 Ir: Irregular respiration, Hy: Hypothermia, Pt: Ptosis (ocular region), Ed: Eye discharge
 An: Anorexia, Pp: Prone position, Pi: Piloerection, Sf: Soiled fur (Anogenital region), La: Lacrimation

Appendix 3. Body weight in the gene mutation assay of 1-bromo-3-chloropropane
 [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 -9 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)	
Corn oil	0	2001	24.8	26.6	26.4	26.8	27.4	27.5	27.4	0.8
		2002	25.8	25.9	26.3	26.1	27.8	27.0	27.5	1.6
		2003	25.0	26.6	25.3	25.7	26.9	26.4	27.0	0.4
		2004	23.5	25.5	25.6	25.0	26.2	26.0	26.8	1.3
		2005	24.5	25.9	25.5	25.3	25.6	25.8	25.8	-0.1
		2006	24.9	25.5	25.7	26.6	27.4	27.0	27.4	1.9
		Mean±S.D.	24.8±0.8	26.0±0.5	25.8±0.4	25.9±0.7	26.9±0.8	26.6±0.7	27.0±0.6	1.0±0.8
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	23.8	24.6	24.6	25.6	26.3	25.8	25.9	1.3
		2102	25.9	26.3	25.6	25.7	26.4	26.7	26.1	-0.2
		2103	24.6	27.0	26.3	26.0	26.6	26.7	26.7	-0.3
		2104	24.2	25.9	25.5	25.0	25.7	25.1	25.2	-0.7
		2105	24.1	25.4	25.2	25.5	26.1	26.8	26.1	0.7
		2106	23.7	23.7	23.5	25.1	25.2	25.4	25.2	1.5
		Mean±S.D.	24.4±0.8	25.5±1.2	25.1±1.0	25.5±0.4	26.1±0.5	26.1±0.7	25.9±0.6	0.4±0.9
	100	2201	25.7	27.3	27.1	27.5	27.5	27.3	27.4	0.1
		2202	24.1	25.2	25.8	25.2	25.2	26.5	26.2	1.0
		2203	23.6	24.4	24.4	25.7	26.3	26.1	26.2	1.8
		2204	23.3	24.1	24.4	25.0	26.0	26.4	26.8	2.7
		2205	24.4	25.1	24.8	25.3	25.7	25.8	26.2	1.1
		2206	24.3	26.4	26.6	26.9	27.2	27.1	27.2	0.8
		Mean±S.D.	24.2±0.8	25.4±1.2	25.5±1.2	25.9±1.0	26.3±0.9	26.5±0.6	26.7±0.5	1.3±0.9
	300	2301	26.3	27.2	26.8	28.1	28.8	28.2	28.0	0.8
		2302	23.7	25.0	24.7	25.8	27.5	27.6	27.7	2.7
		2303	23.2	23.8	23.9	25.0	25.3	25.3	25.6	1.8
		2304	23.7	25.6	25.6	26.2	26.9	26.8	26.4	0.8
		2305	24.1	25.9	25.2	26.2	27.2	26.9	26.3	0.4
		2306	25.1	26.4	27.1	26.7	27.7	28.4	27.4	1.0
		2307	25.4	26.0	27.0	27.2	28.1	28.4	27.8	1.8
		2308	26.0	28.4	29.3	29.2	29.5	30.5	29.1	0.7
		2309	24.9	25.3	25.4	26.7	26.8	27.5	26.7	1.4
		2310	23.0	24.5	24.7	25.3	25.9	27.1	26.8	2.3
Mean±S.D.	24.5±1.2	25.8±1.3	26.0±1.6	26.6±1.3	27.4±1.3	27.7±1.4	27.2±1.0	1.4±0.8		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Gain= Sacrificed-Day 1(Allocated)

Appendix 3. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Body weight (g)			
			Day -9 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 13 (Sacrificed)	Gain
ENU	100	2401	25.6	27.5	25.7	-1.8
		2402	23.4	23.9	22.8	-1.1
		2403	24.1	25.4	24.3	-1.1
		2404	24.4	25.9	26.3	0.4
		2405	26.0	27.0	26.5	-0.5
		2406	25.3	25.7	25.3	-0.4
		Mean±S.D.	24.8±1.0	25.9±1.3	25.2±1.4	-0.8±0.8

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

Gain= Sacrificed-Day 1(Allocated)

Appendix 4. Clinical observations in the gene mutation assay of 1-bromo-3-chloropropane
 [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
Corn oil	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	100	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	300	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2304	N	N	N	N	N	N	N
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N
2307		N	N	N	N	N	N	N	
2308		N	N	N	N	N	N	N	
2309		N	N	N	N	N	N	N	
2310		N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			1	2	3	4	5	6	7
ENU	100	2401	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N
		2404	N	N	N	N	N	N	N
		2405	N	N	N	N	N	N	N
		2406	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 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			8	9	10	11	12	13	14
Corn oil	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	100	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	300	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2304	N	N	N	N	N	N	N
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N
2307		N	N	N	N	N	N	N	
2308		N	N	N	N	N	N	N	
2309		N	N	N	N	N	N	N	
2310		N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment					
			8	9	10	11	12	13
ENU	100	2401	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N
		2404	N	N	N	N	N	N
		2405	N	N	N	N	N	N
		2406	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 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			15	16	17	18	19	20	21
Corn oil	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	100	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	300	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2304	N	N	N	N	N	N	N
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N
2307		N	N	N	N	N	N	N	
2308		NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	
2309		N	N	N	N	N	N	N	
2310		N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal NN: Nodule nose

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			22	23	24	25	26	27	28
Corn oil	0	2001	N	N	N	N	N	N	N
		2002	N	N	N	N	N	N	N
		2003	N	N	N	N	N	N	N
		2004	N	N	N	N	N	N	N
		2005	N	N	N	N	N	N	N
		2006	N	N	N	N	N	N	N
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N
		2106	N	N	N	N	N	N	N
	100	2201	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N
		2204	N	N	N	N	N	N	N
		2205	N	N	N	N	N	N	N
		2206	N	N	N	N	N	N	N
	300	2301	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N
		2304	N	N	N	N	N	N	N
		2305	N	N	N	N	N	N	N
		2306	N	N	N	N	N	N	N
2307		N	N	N	N	N	N	N	
2308		NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	
2309		N	N	N	N	N	N	N	
2310		N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal NN: Nodule nose

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment		
			29	30	31
Corn oil	0	2001	N	N	N
		2002	N	N	N
		2003	N	N	N
		2004	N	N	N
		2005	N	N	N
		2006	N	N	N
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	N	N	N
		2102	N	N	N
		2103	N	N	N
		2104	N	N	N
		2105	N	N	N
		2106	N	N	N
	100	2201	N	N	N
		2202	N	N	N
		2203	N	N	N
		2204	N	N	N
		2205	N	N	N
		2206	N	N	N
	300	2301	N	N	N
		2302	N	N	N
		2303	N	N	N
		2304	N	N	N
		2305	N	N	N
		2306	N	N	N
2307		N	N	N	
2308		NN	NN	NN	
2309		N	N	N	
2310		N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal NN: Nodule nose

Appendix 5. Organ weight in the gene mutation assay of 1-bromo-3-chloropropane
 [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)	Organ weight(g) and organ weight per body weight(%)			
				Liver		Testis	
				(g)	(%)	(g)	(%)
Corn oil	0	2001	27.4	1.08	3.94	0.20	0.73
		2002	27.5	1.41	5.13	0.21	0.76
		2003	27.0	1.42	5.26	0.21	0.78
		2004	26.8	1.39	5.19	0.19	0.71
		2005	25.8	1.34	5.19	0.19	0.74
		2006	27.4	1.15	4.20	0.20	0.73
		Mean±S.D.	27.0±0.6	1.30±0.15	4.82±0.59	0.20±0.01	0.74±0.02
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	25.9	1.42	5.48	0.19	0.73
		2102	26.1	1.37	5.25	0.23	0.88
		2103	26.7	1.47	5.51	0.22	0.82
		2104	25.2	1.37	5.44	0.16	0.63
		2105	26.1	1.21	4.64	0.22	0.84
		2106	25.2	1.32	5.24	0.20	0.79
		Mean±S.D.	25.9±0.6	1.36±0.09	5.26±0.33	0.20±0.03	0.78±0.09
	100	2201	27.4	1.52	5.55	0.21	0.77
		2202	26.2	1.42	5.42	0.19	0.73
		2203	26.2	1.12	4.27	0.20	0.76
		2204	26.8	1.47	5.49	0.21	0.78
		2205	26.2	1.40	5.34	0.21	0.80
		2206	27.2	1.46	5.37	0.19	0.70
Mean±S.D.	26.7±0.5	1.40±0.14	5.24±0.48	0.20±0.01	0.76±0.04		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Appendix 5. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)	Organ weight(g) and organ weight per body weight(%)			
				Liver		Testis	
				(g)	(%)	(g)	(%)
1-Bromo-3-chloropropane	300	2301	28.0	1.53	5.46	0.21	0.75
		2302	27.7	1.48	5.34	0.21	0.76
		2303	25.6	1.37	5.35	0.18	0.70
		2304	26.4	1.43	5.42	0.20	0.76
		2305	26.3	1.07	4.07	0.19	0.72
		2306	27.4	1.38	5.04	0.22	0.80
		2307	27.8	1.53	5.50	0.22	0.79
		2308	29.1	1.56	5.36	0.22	0.76
		2309	26.7	1.43	5.36	0.20	0.75
		2310	26.8	1.37	5.11	0.18	0.67
		Mean±S.D.	27.2±1.0	1.42±0.14	5.20±0.42	0.20±0.02	0.75±0.04
ENU	100	2401	25.7	1.36	5.29	0.16	0.62
		2402	22.8	1.23	5.39	0.15	0.66
		2403	24.3	1.30	5.35	0.15	0.62
		2404	26.3	1.51	5.74	0.16	0.61
		2405	26.5	1.51	5.70	0.16	0.60
		2406	25.3	1.48	5.85	0.16	0.63
				Mean±S.D.	25.2±1.4	1.40±0.12	5.55±0.24

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

Appendix 6. Individual gross findings on 1-bromo-3-chloropropane-treated transgenic mice for the gene mutation assay
 [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
Corn oil	0	2001	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2002	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2003	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2004	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2005	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2006	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

-: No remarkable change

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
1-Bromo-3-chloropropane	30.0	2101	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2102	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2103	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2104	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2105	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2106	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
1-Bromo-3-chloropropane	100	2201	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2202	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2203	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2204	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2205	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2206	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
1-Bromo-3-chloropropane	300	2301	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2302	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2303	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2304	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2305	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2306	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2307	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2308	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2309	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2310	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Organs	Findings
ENU	100	2401	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2402	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
		2403	Stomach	-
			Testis	-
			Liver	-
		2404	Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		2405	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
		2406	Testis	-
			Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

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

-: No remarkable change

信 頼 性 保 証 書

表 題： トランスジェニックマウスを用いる 1-Bromo-3-chloropropane の遺伝子突然変異試験

試験番号： D848 (115-223)

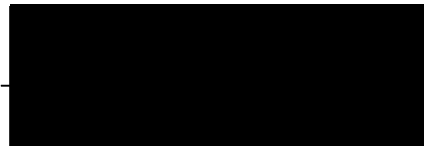
本試験は、新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について（平成23年3月31日薬食発0331第8号，平成23・03・29製局第6号，環保企発第110331010号）に従って実施され、本最終報告書に記載された成績は、試験の生データを正確に反映していることを保証する。

なお、本試験の信頼性保証部門による調査記録を次頁に示す。

平成~~23~~²⁵年~~3~~³月~~18~~¹⁸日

所属： 公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
信頼性保証部門責任者

氏名：



調査記録

調査項目	調査実施日	試験責任者および 運営管理者への報告日	調査 担当者
試験計画書	平成 24 年 2 月 1 日	平成 24 年 2 月 1 日	
コンピュータプロトコール (LATOX-F/V5)	平成 24 年 2 月 20 日	平成 24 年 2 月 20 日	
動物搬入	平成 24 年 2 月 20 日	平成 24 年 2 月 20 日	
試験計画書の変更書 (#1)	平成 24 年 2 月 22 日	平成 24 年 2 月 22 日	
被験物質液の調製	平成 24 年 2 月 27 日	平成 24 年 2 月 27 日	
群分けおよび投与開始	平成 24 年 2 月 29 日	平成 24 年 2 月 29 日	
試験計画書の変更書 (#2)	平成 24 年 3 月 12 日	平成 24 年 3 月 14 日	
標的器官摘出	平成 24 年 3 月 30 日	平成 24 年 3 月 30 日	
ゲノム DNA の抽出	平成 24 年 4 月 3 日	平成 24 年 4 月 3 日	
試験計画書の変更書 (#3)	平成 24 年 4 月 17 日	平成 24 年 4 月 17 日	
ゲノム DNA のパッケージ ング, プレーティング (Spi assay)	平成 24 年 4 月 24 日	平成 24 年 4 月 24 日	
プラークの計数	平成 24 年 4 月 25 日	平成 24 年 4 月 25 日	
ゲノム DNA のパッケージ ング, プレーティング (gpt assay)	平成 24 年 5 月 25 日	平成 24 年 5 月 25 日	
生データおよび最終報告書 草案	平成 24 年 8 月 8~10 日	平成 24 年 8 月 10 日	
生データおよび最終報告書	平成 25 年 3 月 18 日	平成 25 年 3 月 18 日	