
1,4-ジクロロブタンのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

最 終 報 告 書

作成日 2009年 10月 30日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

1. 目 次

表 紙.....	1
1. 目 次.....	2
2. 最終報告書作成者署名.....	4
3. 試験概要.....	5
4. 試験従事者及び業務分担.....	7
5. 要 約.....	8
6. 緒 言.....	9
7. 試験材料及び試験方法.....	9
7.1. 被験物質, 媒体, 陽性対照物質及び陰性対照物質.....	9
7.1.1. 被験物質.....	9
7.1.2. 媒体 (陰性対照物質)	9
7.1.3. 陽性対照物質.....	9
7.1.4. 陰性対照物質.....	9
7.2. 検体液.....	10
7.2.1. 被験物質.....	10
7.2.2. 陽性対照物質.....	10
7.3. 試験細胞.....	10
7.4. 培養液.....	11
7.5. S9 mix.....	11
7.6. 細胞数の調整及び細胞播種.....	11
7.7. 細胞増殖抑制試験.....	11
7.8. 染色体異常試験.....	12
7.8.1. 試験濃度及び処理群.....	13
7.8.2. 検体液の処理.....	13
7.8.3. 標本作製.....	13
7.8.4. 細胞数の計測.....	14
7.9. 標本観察.....	14
7.10. 試験の成立条件.....	14
7.11. 統計学的方法.....	14
7.12. 判定基準.....	14
7.12.1. D_{20} 値の計算式.....	15
7.12.2. TR 値の計算式.....	15
8. 試験成績.....	16
8.1. 染色体異常試験.....	16
8.1.1. 短時間処理法.....	16
8.1.2. 連続処理法.....	16
9. 考 察.....	17
10. 文 献.....	17

Table 1.	Cell growth inhibition test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells	
	-The short treatment method-	18
Table 2.	Cell growth inhibition test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells	
	-The continuous treatment method-.....	19
Table 3.	Chromosomal aberration test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells	
	-The short treatment method-	20
Table 4.	Chromosomal aberration test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells	
	-The continuous treatment method-.....	21
Figure 1.	Cell growth inhibition test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells	22
Figure 2.	Cell growth inhibition test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells	23
Appendix 1-1.	Chromosomal aberration test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells	
	-The short treatment method-	24
Appendix 1-2.	Chromosomal aberration test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells	
	-The short treatment method-	25
Appendix 2.	Chromosomal aberration test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells	
	-The continuous treatment method-.....	26
Attachment 1.	Composition of Eagle's Minimum Essential Medium (MEM)	
	(List No.11095-080)	27
Attachment 2.	Preparation of S9.....	28
Attachment 3.	Composition of S9 mix	28
Attachment 4.	The background data of chromosomal aberration test with cultured CHL cells.....	29
Photograph 1~3		30
Photograph 4~6		31
Photograph 7		32

2. 最終報告書作成者署名

試験番号: 971327

表 題 : 1,4-ジクロロブタンのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

2009 年 10 月 30 日

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

試験責任者

3. 試験概要

被験物質名: 1,4-ジクロロブタン

試験系: チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞)

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
東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設: 株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島六丁目104番地

試験目的: 1,4-ジクロロブタンのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無について検討した。

準拠したガイドライン:

「OECD 化学品テストガイドライン, 473 In vitro 哺乳類動物細胞を用いる染色体異常試験」(1997年7月21日採択), 平成15年11月21日付(平成18年11月20日最終改正)(薬食発第1121002号: 厚生労働省医薬食品局長, 平成15・11・13製局第2号: 経済産業省製造産業局長, 環企発第031121002号: 環境省総合環境政策局長連名通知)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「化学物質の慢性毒性試験, 生殖能及び後世に及ぼす影響に関する試験, 催奇形性試験, 変異原性試験, がん原性試験, 生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守した 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15年11月21日付(平成20年7月4日最終改正), 薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環企発第031121004号]

OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (OECD 化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

試験開始日: 2008年 7月 7日

試験終了日: 2009年 10月 30日

試験実施日: 試験系細胞の再培養実施日	2008 年 8 月 18 日
細胞増殖抑制試験	
細胞播種日	2008 年 8 月 25 日
検体液添加日	2008 年 8 月 28 日
細胞数計測日	2008 年 8 月 29 日
染色体異常試験	
細胞播種日	2008 年 9 月 5 日
検体液添加日	2008 年 9 月 8 日
細胞数計測及び標本作製日	2008 年 9 月 9 日
標本観察終了日	2008 年 9 月 25 日

資料及び標本の保存場所:

この試験において試験施設で発生するすべての資料（試験計画書及びその変更書の原本、生データ、最終報告書の原本）は、株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所の資料保存室に保存し、標本は標本保存室に保存する。保存期間は最終報告書提出後 10 年間とする。

SOP 及び試験計画書に従わなかったこと:

当試験において、SOP 及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

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:

当試験において、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は認められなかった。

4. 試験従事者及び業務分担

試験責任者:

(試験計画書の作成, 検体の調製, 試験の実施, 細胞数の計測, 標本作製, データの確認, 最終報告書の作成)

試験従事者:

(検体の調製, 試験の実施, 細胞数の計測, 標本作製, 標本観察)

(細胞数の計測)

(被験物質, 陽性対照物質, 陰性対照物質の管理)

5. 要 約

1,4-ジクロロブタンの染色体異常誘発性の有無を、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞）を用い、短時間処理法（6 時間処理の S9 mix 添加及び S9 mix 無添加）と連続処理法（24 時間処理）で検討した。

1,4-ジクロロブタンの試験濃度は、細胞増殖抑制試験の結果から、50%細胞増殖抑制濃度（IC₅₀）及び細胞の生存率を指標に、短時間処理法の S9 mix 添加では 81.3, 162.5, 325 及び 650 µg/mL, S9 mix 無添加では 162.5, 325, 650 及び 1300 µg/mL, 連続処理法では 40.6, 81.3, 162.5 及び 325 µg/mL の公比 2 で 4 段階を設定した。

試験の結果、短時間処理法の S9 mix 無添加及び連続処理法では、数的及び構造的異常細胞の出現率は、ともに 5%未満であったが、短時間処理法の S9 mix 添加では、構造的異常細胞の出現率が用量依存的に増加し、162.5 µg/mL では 7.0%, 325 µg/mL では 12.0%, 650 µg/mL では 15.5%と陽性の判定基準の 10%を上回った。

各試験系列で用いた陽性対照物質は、明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、当試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。

以上の結果、本試験の条件下において、1,4-ジクロロブタンは、非代謝系列である短時間処理法の S9 mix 無添加及び連続処理法では、いずれにおいても数的及び構造的異常ともに染色体異常を誘発することはなかったが、代謝系列である短時間処理法の S9 mix 添加では、構造的異常を有する細胞が 10%以上出現し、その出現率に用量依存性が認められたことから、1,4-ジクロロブタンは、代謝されることにより染色体異常（構造的異常）を誘発することが示唆され、陽性と判定する。

6. 緒 言

1,4-ジクロロブタンのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無について検討した。

7. 試験材料及び試験方法

7.1. 被験物質、媒体、陽性対照物質及び陰性対照物質

7.1.1. 被験物質

被験物質の1,4-ジクロロブタン（英語名称: 1,4-Dichlorobutane, CAS No. 110-56-5, 比重: 1.14, 引火点: 53°C, 発火点: 220°C, 沸点: 155°C, 分子量: 127.01）は、無色透明の液体である。当試験には、東京化成工業株式会社から入手したもの〔ロット番号: FGH02, 純度 (GC) : 99.8%〕を用いた。入手後は、試験施設の被験物質保管室の保管庫〔冷蔵庫: BMS-500F3, 日本フリーザー株式会社, 設定温度: 4°C (実測値: 2.1~6.4°C)〕内に冷蔵・遮光・密閉の条件下で保管した。

なお、1,4-ジクロロブタンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験及び 14 日間回復試験（試験番号: 502427, 株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所）の投与期間終了後に製造元で再分析した結果、含量は 99.8%であり、使用期間中の安定性が確認された。

7.1.2. 媒体（陰性対照物質）

媒体には、ジメチルスルホキシド（以下 DMSO, 紫外吸収スペクトル用, ロット番号: WF032, 使用期限: 2013 年 3 月 18 日, 株式会社同仁化学研究所）を用いた。DMSO は、使用時まで試験施設の被験物質保管室の保管庫〔設定温度: 23°C (実測値: 21.6~23.4°C)〕内に室温・遮光の条件下で保管した。

7.1.3. 陽性対照物質

陽性対照物質として、マイトマイシン C（以下 MMC）とジメチルニトロサミン（以下 DMN）を用いた。

MMC〔商品名: マイトマイシン注用 2 mg, 1 バイアル中に、日局マイトマイシン C 2 mg (力価) と日局塩化ナトリウムを含有, ロット番号: 506AGB, 使用期限: 2011 年 2 月, 協和醗酵工業株式会社〕と、DMN〔含量: 99.7%, ロット番号: EWP0054, 使用期限: 2011 年 12 月 26 日 (自社規定), 和光純薬工業株式会社〕は、いずれも市販品を購入した。購入後は、いずれも使用時まで試験施設の被験物質保管室の保管庫〔冷蔵庫: MPR-311D, 三洋電機株式会社, 設定温度: 4°C (実測値: 3.5~4.3°C)〕内に、冷蔵の条件下で保管した。

7.1.4. 陰性対照物質

陰性対照物質は、被験物質の媒体として用いた DMSO とした。

7.2. 検体液

7.2.1. 被験物質

7.2.1.1. 調製方法

細胞増殖抑制試験では、1,4-ジクロロブタン 1313 mg (実秤量値: 1313.0 mg) を秤量 (電子天秤: AT261, メトラー・トレド株式会社) し、DMSO に溶解して最高濃度液 (131.3 mg/mL) 10 mL を調製した。131.3 mg/mL の一部を DMSO で段階希釈して、65.65, 32.83, 16.41, 8.206, 4.103, 2.052, 1.026 及び 0.513 mg/mL を調製した。

染色体異常試験では、1,4-ジクロロブタン 1313 mg (実秤量値: 1313.1 mg) を秤量 (電子天秤: AT261, メトラー・トレド株式会社) し、DMSO に溶解して最高濃度液 (131.3 mg/mL) を 10 mL 調製した。131.3 mg/mL の一部を DMSO で段階希釈して、65.65, 32.83, 16.41, 8.206 及び 4.103 mg/mL を調製した。

細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験とも、使用後の残液は廃棄処分した。また、当試験における表示濃度は培養液に添加したときの最終濃度であるため、検体液はあらかじめ表示濃度の 101 倍濃度を調製した。

7.2.1.2. 被験物質調製液の安定性及び濃度分析

被験物質調製液の安定性及び濃度分析は実施しなかった。

7.2.1.3. 調製頻度

用時に調製した。

7.2.2. 陽性対照物質

MMC 及び DMN [必要量を電子天秤 (AT261, メトラー・トレド株式会社) にて秤量] とも、生理食塩液 (局方品, ロット番号: M6K90, 株式会社大塚製薬工場) に溶解して必要濃度 (表示濃度の 11 倍) を調製した。調製は用時に行い、使用後の残液は廃棄処分した。

以下に試験系列に対する陽性対照物質名、調製濃度及び試験濃度を示した。

		物質名	調製濃度 (µg/mL)	試験濃度 (µg/mL)
短時間処理法	S9 mix 添加	DMN	5500	500
	S9 mix 無添加	MMC	1.1	0.1
連続処理法		MMC	0.55	0.05

7.3. 試験細胞

試験には、2000 年 11 月 28 日に大日本製薬株式会社ラボラトリープロダクツ部から入手したチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いた。細胞は、DMSO を 10% 添加した培養液に浮遊し、1 mL に小分けをして液体窒素保存容器内に凍結保管した。試験に際し、凍結してある細胞 (継代数: 15 回, 染色体モード数: 25 本, 倍化時間: 16.7 時間, マイコプラズマ: 陰

性)を融解し、増殖させて使用した。細胞の継代は、培養ビン (Nunc 製) を用いて 3~4 日ごとに行った。以下に各試験における再培養からの継代数を示した。

細胞増殖抑制試験		3 回
染色体異常試験		6 回

なお、実験操作は空調設備を備えた染色体異常試験室 (G 棟) で行った。

7.4. 培養液

Eagle の最少必須培養液 (Eagle's minimum essential medium, 以下 Eagle's MEM) の組成を, Attachment 1 に示した。培養液は, Eagle's MEM 液体培地 (ロット番号: 440761, GIBCO, リスト No. 11095-080) に, 非働化 (56°C, 30 分) した仔牛血清 (ロット番号: 655639, GIBCO) を最終調製量の 10% となるように加えて調製した。なお, 調製した培養液は用時に 37°C に加温して使用した。

7.5. S9 mix

S9 は, Attachment 2 の方法により 2008 年 4 月 11 日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの (ロット番号: 08041101) を用いた。S9 は 2008 年 5 月 13 日に購入し, 使用時まで -80°C 設定の冷凍庫 [型式: BFV-130 (LR), エスベック株式会社] 内に凍結保管した。

S9 mix は, S9 以外の各物質を調製混合して溶液とし, これをメンブランフィルター ($\phi 0.2 \mu\text{m}$, NALGENE®) で濾過した後, 使用直前に S9 を加えて調製した。S9 mix の組成を Attachment 3 に示した。

7.6. 細胞数の調整及び細胞播種

培養ビンに 0.25% トリプシン溶液を加えて細胞を剥離し, 遠心分離 [1000 rpm ($181 \times g$), 5 分間, 小形冷却遠心機 (型式: CF 5RX, 日立工機株式会社), 以下同様] により細胞を回収した後, 新鮮な培養液を加えて細胞浮遊液を作製した。この浮遊液中の細胞数を血球計算盤を用いて計測し, 細胞数が 2×10^4 個/5 mL になるように培養液を加えて調整した。調整した細胞浮遊液を 5 mL ずつ, 直径 60 mm の滅菌シャーレ (CORNING) に播種し, 温度を 37°C, CO₂ 濃度を 5% に設定した炭酸ガスインキュベーター (型式: BNA-121D, エスベック株式会社, 以下 CO₂ インキュベーター) 内で 3 日間培養したものを試験に用いた。

シャーレは, 細胞増殖抑制試験では 1 濃度につき 1 枚を, 染色体異常試験では 1 濃度につき細胞数の計測用に 1 枚, 染色体標本作製用に 2 枚を用いた。また, シャーレには試験番号, 被験物質名又は対照物質名, 濃度を記入し, さらに短時間処理法の場合は S9 mix の有無を, 連続処理法の場合は培養時間を記入することにより識別した。

7.7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における 1,4-ジクロロブタンの試験濃度を設定するために, 細胞増殖抑制試験を行った。試験は, 短時間処理法の S9 mix 添加及び S9 mix 無添加と連続処理法 (24 時間処理) の 3 系列で実施した。

短時間処理法の S9 mix 添加では、シャーレから培養液を 2.5 mL 除去した後に、S9 mix 0.5 mL と被験物質調製液あるいは陰性対照物質 30 μ L を添加した。S9 mix 無添加では、シャーレから培養液を 2.0 mL 除去した後に、検体液を S9 mix 添加の場合と同様に添加した。いずれのシャーレも CO₂ インキュベーター内で 6 時間培養した後に新鮮な培養液 5.0 mL に取り替えて、さらに 18 時間培養した。

連続処理法では、シャーレに被験物質調製液あるいは陰性対照物質 50 μ L を添加し、CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。

また、いずれの試験系列とも、検体液添加時と処理終了時に被験物質の析出の有無を肉眼的に観察した。

短時間処理法及び連続処理法とも、培養終了後、各シャーレに 0.25% トリプシン溶液を約 3 mL 加えて細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて、細胞数を計測した。計測は 1 枚のシャーレ当たり 3 回行い、その平均を用いて陰性対照群の細胞数を 100% とし、各濃度における細胞の生存率を求めた。

試験濃度は、短時間処理法及び連続処理法とも適用ガイドラインに基づき、10 mM 相当の 1300 μ g/mL を最高濃度とし、以下公比 2 により 650, 325, 162.5, 81.3, 40.6, 20.3, 10.2 及び 5.08 μ g/mL の計 9 濃度とし、その他に陰性対照を設けた。

短時間処理法の試験結果を Table 1 及び Figure 1 に示した。

S9 mix 添加における細胞の生存率は、5.08 ~ 81.3 μ g/mL では 90% 以上を示したが、162.5 μ g/mL 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の 1300 μ g/mL では 17% であった。

S9 mix 無添加における細胞の生存率は、5.08 ~ 162.5 μ g/mL では 90% 以上を示したが、325 μ g/mL 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の 1300 μ g/mL では 43% であった。

Probit 法により算出した 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) は、S9 mix 添加では 354.5 μ g/mL、S9 mix 無添加では 1423.6 μ g/mL であった。

なお、S9 mix 添加及び S9 mix 無添加とも、検体液添加時に最高濃度の 1300 μ g/mL において透明な油滴状の析出物が認められたが、処理終了時にはすべての濃度において析出物は認められなかった。

連続処理法の試験結果を Table 2 及び Figure 2 に示した。

細胞の生存率は、5.08 ~ 40.6 μ g/mL では 90% 以上を示したが、81.3 μ g/mL 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の 1300 μ g/mL では生細胞は認められなかった。

Probit 法により算出した IC₅₀ は、163.6 μ g/mL であった。

なお、検体液添加時に最高濃度の 1300 μ g/mL において透明な油滴状の析出物が認められたが、処理終了時にはすべての濃度において析出物は認められなかった。

7.8. 染色体異常試験

試験は、短時間処理法の S9 mix 添加及び S9 mix 無添加と連続処理法 (24 時間処理) の 3 系列で実施した。

7.8.1. 試験濃度及び処理群

試験濃度は、細胞増殖抑制試験で求めた IC_{50} 及び細胞の生存率を指標に公比 2 で 4 段階設定した。すなわち、短時間処理法の S9 mix 添加では 81.3, 162.5, 325 及び 650 $\mu\text{g/mL}$, S9 mix 無添加では 162.5, 325, 650 及び 1300 $\mu\text{g/mL}$, 連続処理法では 40.6, 81.3, 162.5 及び 325 $\mu\text{g/mL}$ とした。

処理群は、試験系列ごとに被験物質、陰性対照及び陽性対照群を設けた。陽性対照として短時間処理法の S9 mix 添加には DMN (500 $\mu\text{g/mL}$) , S9 mix 無添加には MMC (0.1 $\mu\text{g/mL}$) を、連続処理法には MMC (0.05 $\mu\text{g/mL}$) を用いた。

7.8.2. 検体液の処理

7.8.2.1. 短時間処理法

S9 mix 添加用シャーレからは培養液を 2.5 mL 除去した後に、S9 mix 0.5 mL と被験物質調製液あるいは陰性対照物質の場合は 30 μL を、陽性対照物質の場合は 0.3 mL を添加した。S9 mix 無添加用シャーレからは培養液を 2.0 mL 除去した後に、検体液を S9 mix 添加の場合と同様に添加した。いずれのシャーレも CO_2 インキュベーター内で 6 時間培養した後に新鮮な培養液 5.0 mL に取り替えて、さらに 18 時間培養した後に細胞数の計測及び染色体標本の作製をした。なお、検体液添加時と処理終了時に被験物質の析出の有無を肉眼的に観察した。

7.8.2.2. 連続処理法

シャーレに、被験物質調製液あるいは陰性対照物質の場合は 50 μL を、陽性対照物質の場合は 0.5 mL を添加し、 CO_2 インキュベーター内で 24 時間培養した後に細胞数の計測及び染色体標本の作製をした。なお、検体液添加時と処理終了時に被験物質の析出の有無を肉眼的に観察した。

7.8.3. 標本作製

短時間処理法及び連続処理法とも、培養終了 2 時間前に 10 $\mu\text{g/mL}$ 濃度のコルセミド液を各シャーレに 0.1 mL 添加して、分裂中期細胞を得た。培養終了後、各シャーレに 0.25% トリプシン溶液を約 3 mL 加えて細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後、75 mmol/L 塩化カリウム水溶液で低張処理 (37°C, 15 分間) をした。低張処理が終了した後、再び遠心分離し、メタノールと酢酸を 3:1 の割合で混合して氷冷した固定液で脱水固定を行い、同固定液で細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液をスライドガラス上の 2 ヲ所に一滴ずつ滴下して細胞を広げ、乾燥後、2% の Giemsa 染色液で約 15 分間染色した。

スライド標本は 1 シャーレ当たり 3 枚作製し、乱数を用いてコード番号を割り付けた。なお、観察終了後にスライド標本は、試験番号、被験物質名又は対照物質名、濃度、試験法、S9 mix の有無 (短時間処理法) 又は培養時間 (連続処理法)、標本作製日を記入したラベルを貼付した。

7.8.4. 細胞数の計測

短時間処理法及び連続処理法とも、培養終了後、各シャーレに 0.25%トリプシン溶液を約 3 mL 添加して細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて、細胞数を計測した。

計測は 1 枚のシャーレ当たり 3 回行い、その平均値を用いて陰性対照群の細胞数を 100%として各濃度における細胞の生存率を求めた。

7.9. 標本観察

石館の方法¹⁾を参考にして、染色体がよく広がった分裂中期像の細胞を 1 シャーレ当たり 100 個、1 濃度当たり 200 個観察した。標本の観察はコード番号順に行い、観察結果と試験濃度との照合は、全標本を観察した後に行った。

染色体異常は、数的異常と構造的異常に分類した。数的異常は倍数体 (polyploid) 及び核内倍化 (endoreduplication) を観察対象とし、構造的異常はギャップ (以下 gap)、染色分体型切断 (chromatid break, 以下 ctb)、染色分体型切断 (chromosome break, 以下 csb)、染色分体型交換 (chromatid exchange, 以下 cte)、染色分体型交換 (chromosome exchange, 以下 cse)、断片化 (fragmentation, 以下 frg) に分類し、これらの染色体異常を有する細胞を陽性細胞 1 個として記録した。なお、ギャップと切断の判別は、染色体又は染色分体の断片が軸の同一線上にあるものをギャップとし、同一線上からはずれているものを切断としたが、断片が同一線上にあっても非染色部分が染色分体幅より大きいものは切断とした。染色体異常の総数は、ギャップを含めた場合と含めない場合とに分けて記録した。なお、当試験で認められた染色体異常を、型別に代表例について写真撮影をした (Photograph 1~7)。

7.10. 試験の成立条件

陰性対照群において、染色体異常を有する細胞の出現率が 5%未満で、陽性対照群においてギャップ以外の染色体異常を有する細胞の出現率が 10%以上を示し、さらに陰性及び陽性対照群の染色体異常の出現率が、当試験施設のバックグラウンドデータ (Attachment 4) の範囲内を示し、試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした。

7.11. 統計学的方法

染色体異常を有する細胞の出現率は、下記の判定基準に従ったため有意差検定は行わなかった。

7.12. 判定基準

試験の結果は、数的異常又は構造的異常を有する細胞の出現率が 5%未満の場合を陰性、5%以上 10%未満の場合を疑陽性とした。さらにその出現率が 10%以上を示し、濃度の増加に伴って増加した場合を陽性とした。なお、構造的異常の染色体を有する細胞の出現率は、ギャップを含めた場合と含めない場合で算出し、ギャップを含めない場合の出現率により判定した。

また、構造的異常を有する細胞の出現率が10%以上を示したことから、観察細胞の20%に異常がみられる濃度 (D_{20} 値) 及び単位濃度 (mg/mL) 当たりの染色分体交換 (cte) を持つ細胞の出現頻度の比較値 (TR 値) を以下に示す計算式に従って求めた。

7.12.1. D_{20} 値の計算式

7.12.1.1. 回帰曲線

陽性結果のある系列のデータを、陰性対照を含めて、最少二乗法を用いて以下の2式で示した回帰曲線を求めた。

$$Y = a \times \chi + b \cdots \cdots (\alpha)$$

$$Y = a \times \log \chi + b \cdots \cdots (\beta)$$

ここで、Y は染色体異常をもつ細胞の出現頻度 (%), χ は濃度 (mg/mL)。

7.12.1.2. 陰性対照の濃度

式(β)における陰性対照の濃度 (χ_0) は以下のように求めた。

$$\chi_0 = \log L - (\log H - \log L) / (N - 1)$$

ここで、L は最小濃度 (mg/mL), H は最高濃度 (mg/mL), N は被験物質処理群の群数。

7.12.1.3. 相関係数

式(α) 及び (β) に対する相関係数 r をそれぞれ求めるとともに、得られた回帰曲線より D_{20} 値を算出した。

7.12.1.4. D_{20} 値の採用条件

D_{20} 値が最小濃度の1/10以下、あるいは最高濃度の10倍以上の場合には、濃度依存性がないものとして、その D_{20} 値を対象外とした。

7.12.1.5. S 値

7.12.1.4. で対象となった D_{20} 値及びそれぞれの r を用いて以下の計算を行った。

$$S = D_{20} / r \times 1/n^2 \cdots \cdots (\gamma)$$

ここで、 n は計算に用いた群数 (陰性対照群も含む)。

7.12.1.6. D_{20} 値

式 (γ) の S 値が最小となる時の D_{20} 値を、最終的に被験物質の D_{20} 値として採用した (有効桁数は2)。

7.12.2. TR 値の計算式

7.12.2.1. TR 値の算出法

陽性結果を示す処理群のうち、染色分体型交換 (cte) 異常をもつ細胞の出現率が1%以上あるものについて、以下のように TR 値を求めた。

$$TR = E / D \cdots \cdots (\delta)$$

ここで、E は cte をもつ細胞の出現頻度 (%), D はそのときの処理濃度 (mg/mL)。

7.12.2.2. TR 値の採用条件

式 (δ) で求めた TR 値のうちで最大の値を、最終的に被験物質の TR 値として採用した (有効桁数は2)。

8. 試験成績

8.1. 染色体異常試験

8.1.1. 短時間処理法 (Table 3 及び Appendices 1-1 ~ 1-2)

1,4-ジクロロブタン処理群の数的異常細胞の出現率は、S9 mix 添加及び S9 mix 無添加とも、すべての濃度で 2.0% 以下の陰性であった。一方、構造的異常細胞の出現率は、S9 mix 添加において 650 µg/mL で 15.5%、325 µg/mL で 12.0%、162.5 µg/mL で 7.0% と陽性結果となった。構造的異常細胞の出現率が 10% を上回ったため、D₂₀ 値及び TR 値を算出したところ、それぞれ 0.76 mg/mL、34 であった。

1,4-ジクロロブタン処理群の S9 mix 添加における細胞の生存率は、81.3 µg/mL では 97% であったが、162.5 µg/mL 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の 650 µg/mL では 34% であった。S9 mix 無添加における細胞の生存率は、162.5 µg/mL では 92% であったが、325 µg/mL 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の 1300 µg/mL では 49% であった。

被験物質の析出は、S9 mix 添加では、検体液添加時と処理終了時ともすべての濃度において認められなかった。S9 mix 無添加では、検体液添加時に最高濃度の 1300 µg/mL において透明な油滴状の析出物が認められたが、処理終了時にはすべての濃度において析出物は認められなかった。

陰性対照の数的異常細胞の出現率は、S9 mix 添加では 0%、S9 mix 無添加では 1.0% であった。構造的異常細胞の出現率は、S9 mix 添加では 0%、S9 mix 無添加では 1.0% であった。また、陽性対照 (S9 mix 添加: DMN; 500 µg/mL, S9 mix 無添加: MMC; 0.1 µg/mL) の数的異常細胞の出現率は、S9 mix 添加では 1.0%、S9 mix 無添加では 0% であった。構造的異常細胞の出現率は、S9 mix 添加では 68.0%、S9 mix 無添加では 47.5% であった。

陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、バックグラウンドデータの範囲内であり、試験の成立条件を満たすものであった。

8.1.2. 連続処理法 (Table 4 及び Appendix 2)

1,4-ジクロロブタン処理群の数的異常細胞の出現率は、すべての濃度で 1.0% 以下と陰性であった。構造的異常細胞の出現率も、すべての濃度で 1.0% 以下と陰性であった。

1,4-ジクロロブタン処理群の細胞の生存率は、40.6 µg/mL では 97% であったが、81.3 µg/mL 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の 325 µg/mL では 32% であった。

被験物質の析出は、検体液添加時と処理終了時ともすべての濃度において認められなかった。

陰性対照の数的異常細胞及び構造的異常細胞の出現率は 0.5% であった。また、陽性対照 (MMC: 0.05 µg/mL) における数的異常細胞の出現率は 1.0%、構造的異常細胞の出現率は 43.0% であった。

陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、バックグラウンドデータの範囲内であり、試験の成立条件を満たすものであった。

9. 考 察

1,4-ジクロロブタンの染色体異常誘発性の有無を、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験により検討した。

1,4-ジクロロブタン処理群の数的異常細胞の出現率は、いずれの試験系列においても、5%に満たなかったため、1,4-ジクロロブタンは数的異常を誘発しないものと思われる。一方、構造的異常細胞の出現率は、短時間処理法の S9 mix 無添加及び連続処理法（24 時間処理）では 5%に満たなかったが、短期間処理法の S9 mix 添加において 10%以上を示し、用量依存的に増加したため、1,4-ジクロロブタンは構造的異常を誘発するものと思われる。1,4-ジクロロブタンの D_{20} 値は 0.76 mg/mL、TR 値は 34 であった。

染色体異常誘発物質には、そのものが活性をもつ場合と代謝されて活性化する場合がある。1,4-ジクロロブタンは、短時間処理法の S9 mix 添加のみ高率に異常細胞が出現していることから代謝活性化を受けることが窺われる。

短時間処理法及び連続処理法の各試験系列において、陰性対照及び陽性対照群の異常細胞出現率は、バックグラウンドデータの範囲内であり、試験の成立条件を満たすものであった。

以上の結果、本試験の条件下において、1,4-ジクロロブタンは、非代謝系列である短時間処理法の S9 mix 無添加及び連続処理法では、いずれにおいても数的及び構造的異常ともに染色体異常を誘発することはなかったが、代謝系列である短時間処理法の S9 mix 添加では、構造的異常を有する細胞が 10%以上出現し、その出現率に用量依存性が認められたことから、1,4-ジクロロブタンは、代謝されることにより染色体異常（構造的異常）を誘発することが示唆され、陽性と判定する。

10. 文 献

- 1) 祖父尼 俊雄監修: 染色体異常試験データ集（改訂 1998 年版）、株式会社エル・アイ・シー

Table 1. Cell growth inhibition test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test Substance	Concentration (µg/mL)	Treated for 6 hr with S9 mix			Treated for 6 hr without S9 mix		
		No. of cells ($\times 10^4$ /plate)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	No. of cells ($\times 10^4$ /plate)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	70	100	—	61	100	—
1,4-Dichlorobutane	5.08	69	99	354.5	62	102	1423.6
	10.2	70	100		59	97	
	20.3	66	94		56	92	
	40.6	66	94		58	95	
	81.3	65	93		58	95	
	162.5	54	77		56	92	
	325	33	47		49	80	
	650	22	31		38	62	
	1300 ^{b)}	12	17		26	43	

a) : (1,4-Dichlorobutane treated group / negative control) $\times 100$.

b) : Clear oil drop-like precipitations were noted in culture fluid at the initiation.

Table 2. Cell growth inhibition test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells
-The continuous treatment method-

Test Substance	Concentration (µg/mL)	Treated for 24 hr		
		No. of cells ($\times 10^4$ /plate)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	61	100	—
1,4-Dichlorobutane	5.08	58	95	163.6
	10.2	61	100	
	20.3	58	95	
	40.6	55	90	
	81.3	50	82	
	162.5	28	46	
	325	18	30	
	650	9	15	
	1300 ^{b)}	0	0	

a): (1,4-Dichlorobutane treated group / negative control) $\times 100$.

b): Clear oil drop-like precipitations were noted in culture fluid at the initiation.

Table 3. Chromosomal aberration test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test substance	Concentration (µg/mL)	With(+) or without(-) S9 mix	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations											Survival ratio ^{e)} (%)
				No.of polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)		Judgement ^{b)}	
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Negative control	—	+	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	100
1,4-Dichlorobutane	81.3	+	200	2	0	1.0	—	0	3	0	4	0	0	6	6	3.0	3.0	—	97
	162.5	+	200	1	0	0.5	—	0	3	0	13	0	0	14	14	7.0	7.0	±	87
	325	+	200	4	0	2.0	—	0	6	0	21	0	0	24	24	12.0	12.0	+	47
	650	+	200	1	0	0.5	—	0	7	0	27	1	1	31	31	15.5	15.5	+	34
	Dimethylnitrosamine	500	+	200	2	0	1.0	—	0	45	0	114	0	0	136	136	68.0	68.0	+
Negative control	—	—	200	2	0	1.0	—	0	1	0	2	0	0	2	2	1.0	1.0	—	100
1,4-Dichlorobutane	162.5	—	200	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	92
	325	—	200	2	0	1.0	—	0	1	0	1	0	0	2	2	1.0	1.0	—	83
	650	—	200	1	0	0.5	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	63
	1300*	—	200	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	49
	Mitomycin C	0.1	—	200	0	0	0	—	0	38	0	70	0	0	95	95	47.5	47.5	+

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): (1,4-Dichlorobutane treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: Clear oil drop-like precipitations were noted in culture fluid at the initiation.

Table 4. Chromosomal aberration test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells
—The continuous treatment method—

Test substance	Concentration (µg/mL)	Time of treatment (hr)	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations											Survival ratio ^{e)} (%)
				No.of polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence ^{a)} (%)		Judgement ^{b)}	
								gap	ctb	csb	cte	cse	fig	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Negative control	—	24	200	1	0	0.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100
1,4-Dichlorobutane	40.6	24	200	2	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97
	81.3	24	200	1	1	1.0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	85
	162.5	24	200	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	49
	325	24	200	0	0	0	—	0	1	0	1	0	0	2	2	1.0	1.0	—	32
	Mitomycin C	0.05	24	200	2	0	1.0	—	0	37	0	61	1	0	86	86	43.0	43.0	+

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; -: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): (1,4-Dichlorobutane treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

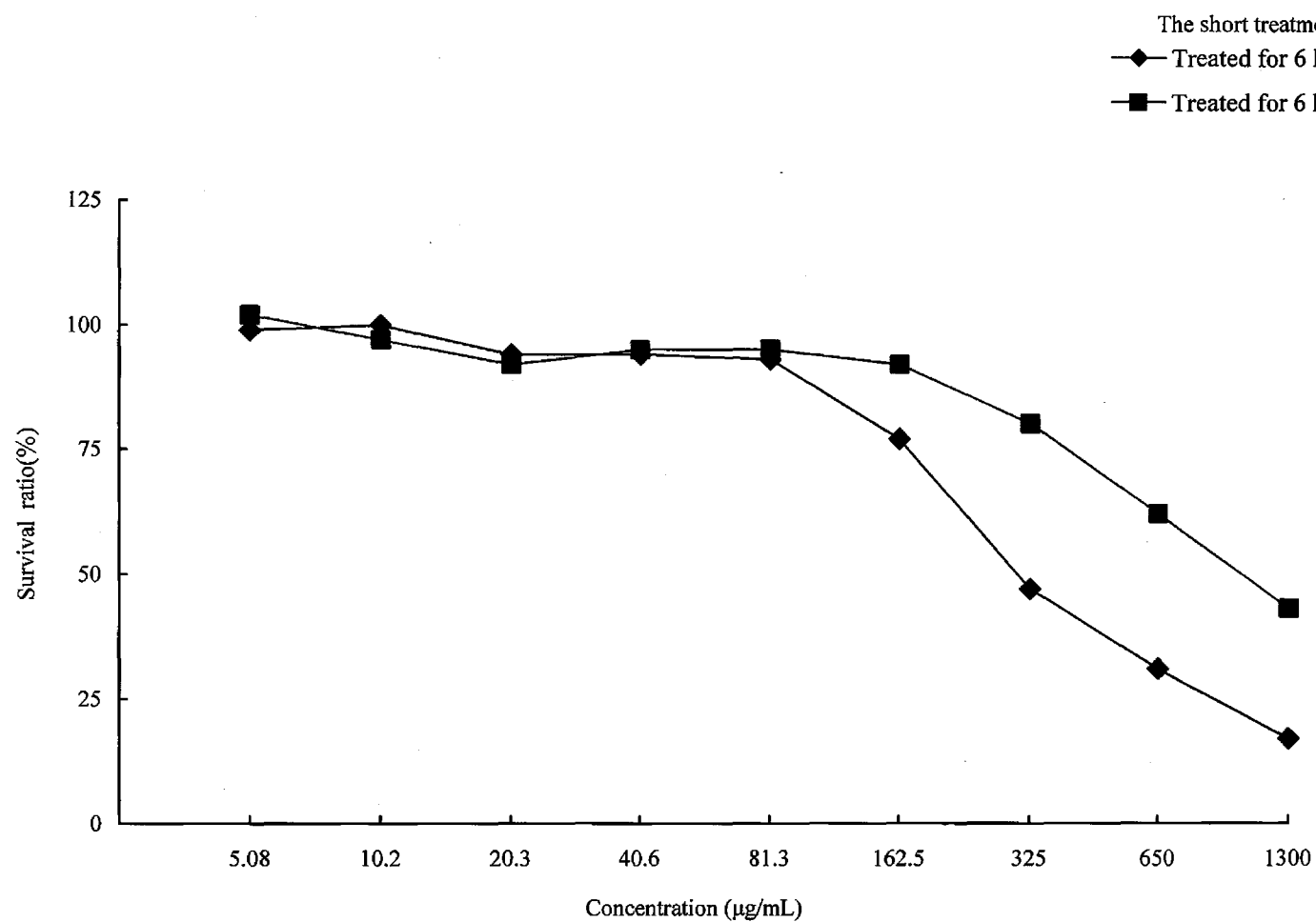


Figure 1. Cell growth inhibition test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells.

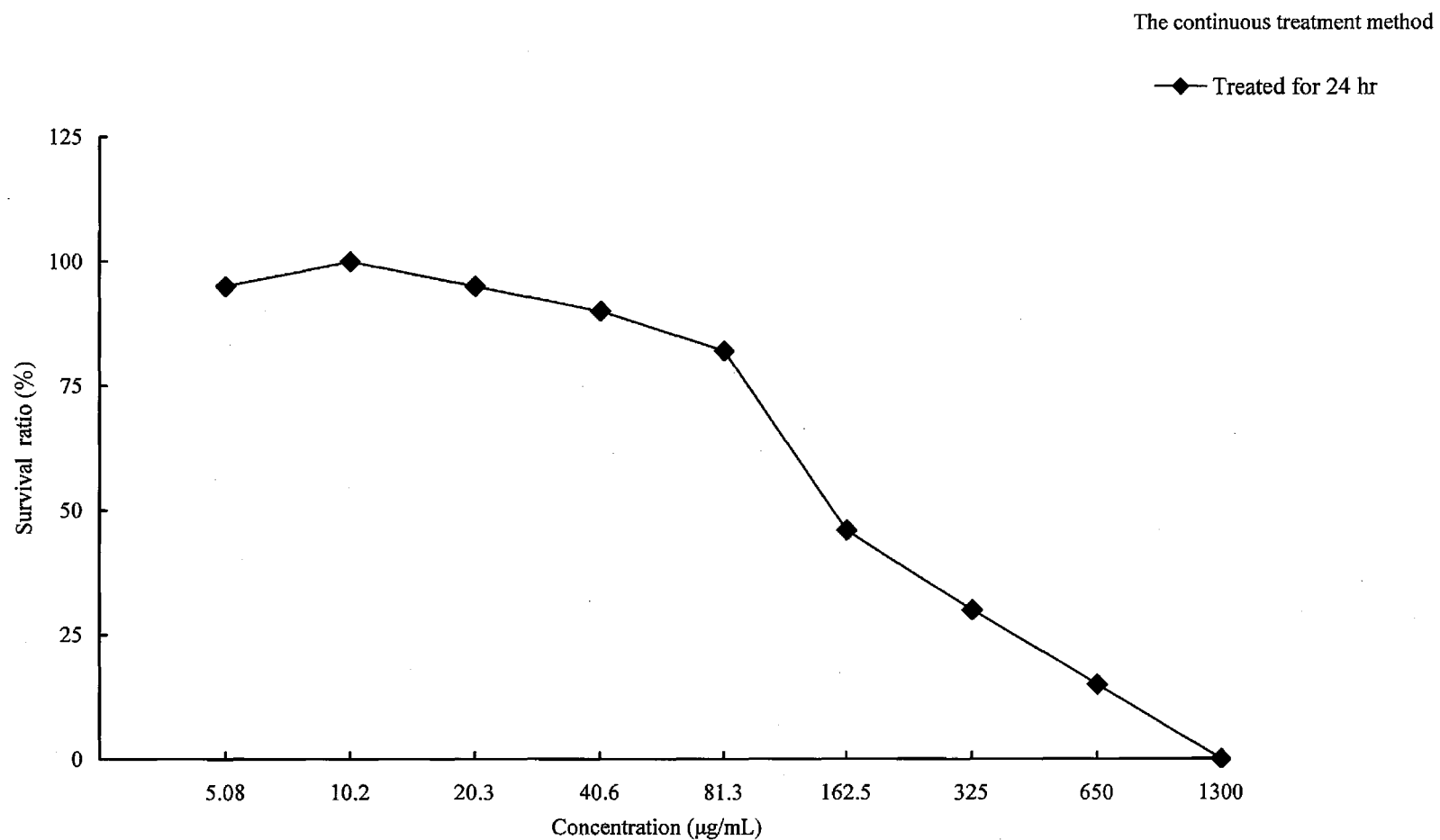


Figure 2. Cell growth inhibition test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells.

Appendix 1-1. Chromosomal aberration test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test Substance	Concentration (µg/mL)	With (+) or without (-) S9 mix	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)	
				No.of polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)			Judgement ^{b)}
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	+	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	100
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1,4-Dichlorobutane	81.3	+	100	1	0	1.0	—	0	3	0	2	0	0	4	4	3.0	3.0	—	97
			100	1	0			0	0	0	2	0	0	2	2				
	162.5	+	100	0	0	0.5	—	0	0	0	6	0	0	6	6	7.0	7.0	±	87
			100	1	0			0	3	0	7	0	0	8	8				
	325	+	100	2	0	2.0	—	0	3	0	10	0	0	11	11	12.0	12.0	+	47
			100	2	0			0	3	0	11	0	0	13	13				
	650	+	100	1	0	0.5	—	0	2	0	10	1	0	12	12	15.5	15.5	+	34
			100	0	0			0	5	0	17	0	1	19	19				
Dimethylnitrosamine	500	+	100	1	0	1.0	—	0	19	0	53	0	0	65	65	68.0	68.0	+	79
			100	1	0			0	26	0	61	0	0	71	71				

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; -: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): (1,4-Dichlorobutane treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

Appendix 1-2. Chromosomal aberration test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test substance	Concentration (µg/mL)	With (+) or without (-) S9 mix	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)	
				No.of polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)			Judgement ^{b)}
								gap	ctb	csb	cte	cse	fig	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	—	100	1	0	1.0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	1.0	1.0	—	100
			100	1	0			0	1	0	1	0	0	1	1				
1,4-Dichlorobutane	162.5	—	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	92
			100	0	0			0	1	0	0	0	0	1	1				
	325	—	100	2	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0	—	83
			100	0	0			0	1	0	1	0	0	2	2				
	650	—	100	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	63
			100	0	0			0	0	0	1	0	0	1	1				
	1300*	—	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	49
			100	0	0			0	0	0	1	0	0	1	1				
Mitomycin C	0.1	—	100	0	0	0	—	0	16	0	35	0	0	47	47	47.5	47.5	+	86
			100	0	0			0	22	0	35	0	0	48	48				

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; -: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): (1,4-Dichlorobutane treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: Clear oil drop-like precipitations were noted in culture fluid at the initiation.

Appendix 2. Chromosomal aberration test of 1,4-Dichlorobutane with cultured CHL cells
—The continuous treatment method—

Test substance	Concentration (µg/mL)	Time of treatment (hr)	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)	
				No.of polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)			Judgement ^{b)}
								gap	ctb	csb	cte	cse	fig	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	24	100	0	0	0.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0					
1,4-Dichlorobutane	40.6	24	100	1	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0					
	81.3	24	100	1	0	1.0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	85
			100	0	1			0	0	0	0	0	0	0					
	162.5	24	100	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	49
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0					
	325	24	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0	—	32
			100	0	0			0	1	0	1	0	0	2	2				
Mitomycin C	0.05	24	100	0	0	1.0	—	0	16	0	31	0	0	40	40	43.0	43.0	+	86
			100	2	0			0	21	0	30	1	0	46	46				

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): (1,4-Dichlorobutane treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

Attachment 1. Composition of Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (List No.11095-080)

Constituents	Concentration (mg/L) *	Constituents	Concentration (mg/L) *
CaCl ₂ (anhyd.)	200	L-Methionine	15
KCl	400	L-Phenylalanine	32
MgSO ₄ (anhyd.)	98	L-Threonine	48
NaCl	6800	L-Tryptophan	10
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	140	L-Tyrosine (disodium salt)	52
		L-Valine	46
D-Glucose	1000		
Phenol red	10		
L-Arginine · HCl	126	D-Ca pantothenate	1
L-Cystine · 2HCl	31	Choline chloride	1
L-Glutamine	292	Folic acid	1
L-Histidine HCl · H ₂ O	42	Iso-Inositol	2
L-Isoleucine	52	Niacinamide	1
L-Leucine	52	Pyridoxal · HCl	1
L-Lysine · HCl	73	Riboflavin	0.1
		Thiamine · HCl	1

*: Final concentration in distilled water per liter.

Attachment 2. Preparation of S9

Animal used		Inducing substance	
Species, Strain	Rat, CrI:CD (SD)	Name	Phenobarbital (PB)
Sex	Male		5,6-Benzoflavone (BF)
Age	7 weeks	Administration method	i.p.
Body weight	217.2 ± 10.3 g* (n = 92)	Day of administration and Dose	day 1 PB 30 mg/kg day 2,3 and 4 PB 60 mg/kg day 3 BF 80 mg/kg

*: Mean ± S.D.

Attachment 3. Composition of S9 mix

Constituents	Quantity in 1 mL S9 mix	Constituents	Quantity in 1 mL S9 mix
S9	0.3 mL	Glucose-6-phosphate	5 µmol
MgCl ₂	5 µmol	NADP	4 µmol
KCl	33 µmol	HEPES buffer (pH 7.2)	4 µmol

The background data of chromosomal aberration test with cultured CHL cells

Test cells: A fibroblast cell line from the lung of a Chinese hamster (CHL/IU)

Supplier of cells: Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

Date of supply of cells: 2000.11.28

Accumulation of data: 2007.1.30 ~ 2007.12.18

	Time	S9 mix	Cell number		Numerical aberration		Structural aberration							
					Polyploid	endoreduplication	gap	ctb	csb	cte	cse	frg	Total (+g)	Total (-g)
Negative control	6-18	+	3000	Mean ± S.D. (min / max)	0.5 ± 0.67 (0 / 2)	0.1 ± 0.29 (0 / 1)	0 ± 0 (0 / 0)	0 ± 0.21 (0 / 1)	0.0 ± 0.18 (0 / 1)	0.2 ± 0.39 (0 / 1)	0 ± 0 (0 / 0)	0 ± 0 (0 / 0)	0.1 ± 0.35 (0 / 1)	0.1 ± 0.35 (0 / 1)
	6-18	-	3000	Mean ± S.D. (min / max)	0.3 ± 0.62 (0 / 2)	0 ± 0 (0 / 0)	0 ± 0 (0 / 0)	0.4 ± 0.49 (0 / 1)	0 ± 0 (0 / 0)	0.1 ± 0.28 (0 / 1)	0 ± 0 (0 / 0)	0 ± 0 (0 / 0)	0.5 ± 0.59 (0 / 2)	0.5 ± 0.59 (0 / 2)
	24-0	-	2800	Mean ± S.D. (min / max)	0.5 ± 0.67 (0 / 2)	0 ± 0 (0 / 0)	0 ± 0 (0 / 0)	0.1 ± 0.35 (0 / 1)	0 ± 0 (0 / 0)	0.3 ± 0.65 (0 / 2)	0.0 ± 0.21 (0 / 1)	0 ± 0 (0 / 0)	0.5 ± 0.67 (0 / 2)	0.5 ± 0.67 (0 / 2)
DMN 500 µg/mL	6-18	+	3000	Mean ± S.D. (min / max)	0.6 ± 0.90 (0 / 3)	0.0 ± 0.21 (0 / 1)	0 ± 0 (0 / 0)	25.7 ± 4.75 (17 / 34)	0 ± 0 (0 / 0)	54.7 ± 5.47 (47 / 65)	0.2 ± 0.61 (0 / 2)	0.1 ± 0.29 (0 / 1)	64.2 ± 4.40 (57 / 73)	64.2 ± 4.40 (57 / 73)
MMC 0.1 µg/mL	6-18	-	3000	Mean ± S.D. (min / max)	0.5 ± 0.83 (0 / 3)	0 ± 0 (0 / 0)	0 ± 0 (0 / 0)	25.3 ± 5.02 (17 / 36)	0 ± 0 (0 / 0)	39.5 ± 5.43 (28 / 50)	0.1 ± 0.34 (0 / 1)	0.2 ± 0.48 (0 / 2)	52.3 ± 4.69 (47 / 63)	52.3 ± 4.69 (47 / 63)
MMC 0.05 µg/mL	24-0	-	2800	Mean ± S.D. (min / max)	0.2 ± 0.50 (0 / 2)	0 ± 0 (0 / 0)	0 ± 0 (0 / 0)	18.4 ± 3.75 (10 / 25)	0 ± 0 (0 / 0)	30.0 ± 3.36 (23 / 37)	0.2 ± 0.50 (0 / 2)	0 ± 0 (0 / 0)	40.9 ± 3.08 (36 / 47)	40.9 ± 3.08 (36 / 47)

(min / max) : No. of cells with numerical or structural aberration observed in 100 cells.

Hashima Laboratory , Nihon Bioresearch Inc.

No.

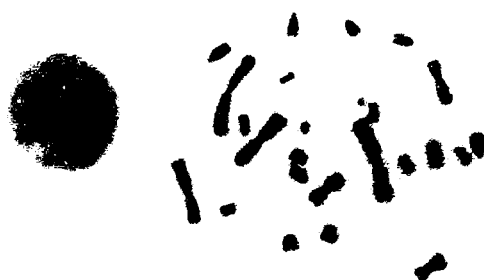
Photograph 1

Negative control

The short treatment method

(+S9 mix)

Type :normal



No.

Photograph 2

1,8-Dichlorooctane 14.8 $\mu\text{g/mL}$

The short treatment method

(+S9 mix)

Type :polyploid



No.

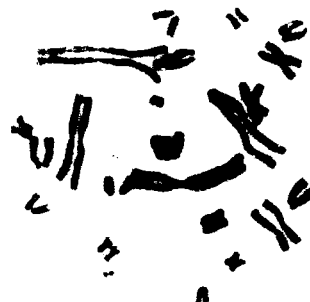
Photograph 3

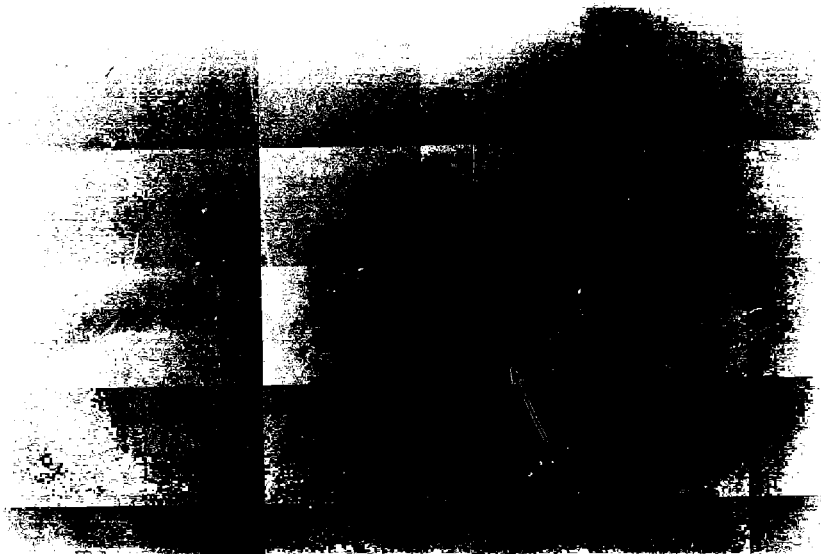
1,8-Dichlorooctane 59.4 $\mu\text{g/mL}$

The short treatment method

(-S9 mix)

Type :endoreduplication





No.

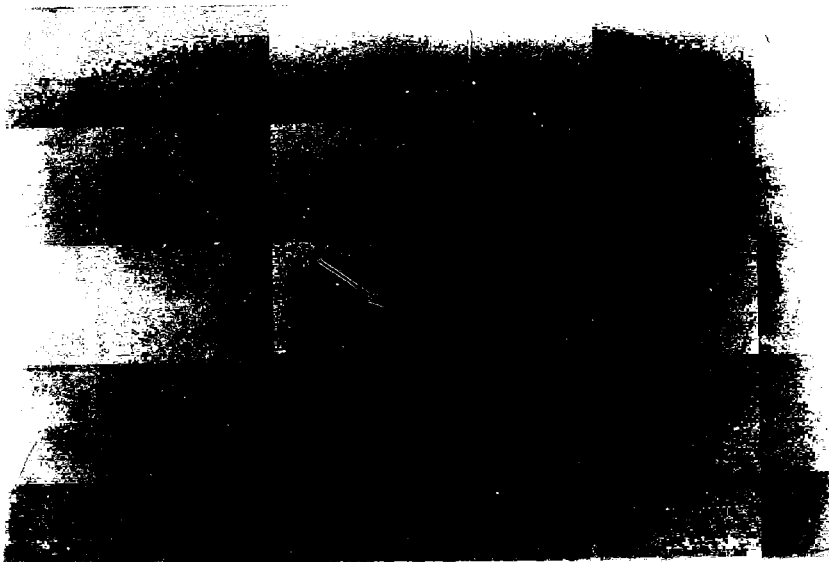
Photograph 4

1,8-Dichlorooctane 237.5 $\mu\text{g/mL}$

The short treatment method

(-S9 mix)

Type :ctb



No.

Photograph 5

MMC 0.1 $\mu\text{g/mL}$

The short treatment method

(-S9 mix)

Type : cte



No.

Photograph 6

1,8-Dichlorooctane 29.7 $\mu\text{g/mL}$

The continuous treatment method

(24 hr)

Type : cse

No.

Photograph 7

1,8-Dichlorooctane 118.8 $\mu\text{g/mL}$

The short treatment method

(+S9 mix)

Type :fragmentation

No.

No.

E-L

E-L

信頼性保証陳述書

試験番号 : 971327

表 題 : 1,4-ジクロロブタンのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

当試験に関して、2008年7月7日から2009年10月30日にかけて調査を実施し、その結果は運営管理者及び試験責任者に報告した。

当試験が「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15年11月21日(平成20年7月4日最終改正)、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号]及びOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (OECD 化学物質の安全性試験の実施に関する基準) に従って実施され、この最終報告書には試験の方法が正確に記載され、かつ生データが正確に反映されていることを保証する。

(調査の状況は、別紙1のとおりである。)

2009 年 10 月 30 日

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

信頼性保証部門責任者



別紙 1

調 査 項 目	調査実施日			調査結果報告日		
1. 試験計画書	2008年	7月	7日	2008年	7月	7日
2. 細胞の再培養	2008年	8月	18日	2008年	8月	18日
3. 細胞播種 (細胞増殖抑制試験)	2008年	8月	25日	2008年	8月	28日
4. 被験物質の管理	2008年	8月	28日	2008年	8月	28日
5. 検体の調製 (細胞増殖抑制試験)	2008年	8月	28日	2008年	8月	28日
6. 添加 (細胞増殖抑制試験)	2008年	8月	28日	2008年	8月	28日
7. 試験計画書変更書 (No.1)	2008年	9月	5日	2008年	9月	9日
8. 陽性対照の調製 (染色体異常試験)	2008年	9月	8日	2008年	9月	9日
9. 添加 (染色体異常試験)	2008年	9月	8日	2008年	9月	9日
10. 細胞数計測 (染色体異常試験)	2008年	9月	9日	2008年	9月	9日
11. 標本作製 (染色体異常試験)	2008年	9月	9日	2008年	9月	9日
12. 標本観察	2008年	9月	25日	2008年	9月	25日
13. 生データ	2008年	10月	23日	2008年	10月	24日
		～	10月 24日			
14. 標本	2008年	10月	24日	2008年	10月	24日
15. 最終報告書 (一次案)	2008年	10月	24日	2008年	10月	24日
16. 生データ (再調査)	2008年	11月	4日	2008年	11月	4日
17. 最終報告書 (一次案) (再調査)	2008年	11月	4日	2008年	11月	4日
18. 最終報告書	2009年	10月	30日	2009年	10月	30日