M-1493

原本

最　終　報　告　書

1,4-Dichlorobutane のマウスを用いた小核試験

試験番号：M-1493

試験期間：2012 年 11 月 2 日-2013 年 3 月 15 日

試験実施施設
株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所
〒412-0039　静岡県御殿場市かまど 1284

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

試験受託者
株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065　東京都渋谷区大山町 36-7

1. GLP 陳述書

試験番号　　：　　M-1493

試験表題　　：　　1,4-Dichlorobutane のマウスを用いた小核試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- 「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」
  （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）
- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」
  （OECD 理事会：1997 年 11 月 26 日）

[redacted]　2013　年　3 月　15 日 [redacted]

試験責任者
株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所

2. 目次

1. GLP陳述書 2
2. 目次 3
3. 試験実施概要 6
3.1 試験番号 6
3.2 試験表題 6
3.3 試験目的 6
3.4 試験委託者 6
3.5 試験受託者 6
3.6 試験実施施設 6
3.7 試験日程 6
3.8 試験責任者 7
3.9 試験担当者 7
3.10 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 7
3.11 資料保存 7
3.12 試験責任者の記名・なつ印 8
4. 要約 9
5. 緒言 10
6. 試験材料及び方法 11
6.1 被験物質、媒体及び陽性対照物質 11
6.1.1 被験物質 11
6.1.2 媒体 11
6.1.3 陽性対照物質 12
6.2 媒体、投与液及び陽性対照物質の調製 12
6.2.1 媒体の調製 12
6.2.2 投与液の調製 12
6.2.2.1 調製方法 12
6.2.2.2 保存方法 12
6.2.2.3 安定性 12
6.2.2.4 被験液の濃度確認 12
6.2.3 陽性対照物質の調製 14
6.3 試験動物種及び系統の選択理由 14
6.4 試験動物 14
6.5 飼育条件 15
6.6 飼料、飲料水及び床敷中の混入物質 15
6.7 動物の識別及びケージへの表示 15
6.8 群分け 15

6.9　投与経路、投与方法及びそれらの選択理由 16
6.10　投与量及びその設定根拠並びに群構成 16
6.10.1　予備試験 16
6.10.2　本試験 16
6.11　観察及び検査の方法 17
6.11.1　一般状態の観察 17
6.11.2　体重測定 17
6.11.3　骨髄塗抹標本の作製 17
6.11.4　骨髄塗抹標本の観察 18
6.11.5　観察結果の判定 18
7.　試験結果 19
7.1　予備試験 19
7.1.1　一般状態 19
7.1.2　体重 19
7.2　本試験 19
7.2.1　一般状態 19
7.2.2　体重 19
7.2.3　骨髄塗抹標本の観察結果 19
8.　考察 21
9.　参考文献 22

添付資料

添付資料 1	試験成績書（1,4-Dichlorobutane の安定性）	23
添付資料 2	試験成績書（被験液中 1,4-Dichlorobutane の安定性）	25

表

Table 1	Clinical signs	26
Table 2	Body weight	27
Table 3	Observation of bone marrow smears (About 24 hours after the 2nd administration)	28

付表

Appendix 1-1、1-2	Clinical signs (Preliminary study)	29
Appendix 2-1、2-2	Body weight (Preliminary study)	31
Appendix 3	Clinical signs	33
Appendix 4	Body weight	34
Appendix 5	Observation of bone marrow smears (About 24 hours after the 2nd administration)	35

信頼性保証書 36

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

M-1493

3.2 試験表題

1,4-Dichlorobutane のマウスを用いた小核試験

3.3 試験目的

マウス骨髄細胞を用いて、1,4-Dichlorobutane の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

3.4 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

3.5 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065　東京都渋谷区大山町 36-7

3.6 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所
〒412-0039　静岡県御殿場市かまど 1284

3.7 試験日程

試験開始日　：　2012 年 11 月　2 日
被験物質受領日　：　2012 年 10 月　4 日
試験責任者への被験物質配布日
：　2012 年 11 月　6 日
実験開始日（予備試験 1 回目の投与日）
：　2012 年 11 月 19 日
予備試験
動物入荷日　：　2012 年 11 月 12 日
投与日　：　2012 年 11 月 19 日　（1 回目投与日）
2012 年 11 月 20 日　（2 回目投与日）
本試験
動物入荷日　：　2012 年 11 月 28 日

投与日　　：　2012 年 12 月　5 日　（1 回目投与日）
　　2012 年 12 月　6 日　（2 回目投与日）
骨髄採取日　　：　2012 年 12 月　7 日
実験終了日（本試験の標本観察終了日）
　　：　2012 年 12 月 12 日
試験終了日　　：　2013 年　3 月 15 日

3.8　試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所　研究部

3.9　試験担当者

被験物質保存責任者：
試験主担当者　　：
化学分析責任者　　：
統計解析責任者　　：

[redacted]

3.10　試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

3.11　資料保存

試験計画書（試験計画書変更書を含む）原本、記録文書、生データ及び報告書類（最終報告書は原本）は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

3.12　試験責任者の記名・なつ印

[redacted]　2013 年 3 月 15 日 [redacted]

株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所

4. 要約

1,4-Dichlorobutane の染色体異常誘発能の有無を検討するため、Crlj:CD1(ICR)SPF マウスを用いた小核試験を実施した。

1,4-Dichlorobutane の 250、500 及び 1000 mg/kg/日を約 24 時間間隔で 2 回経口投与し、2 回目投与後約 24 時間に骨髄塗抹標本を作製し観察した。また、陰性対照としてコーン油を被験物質投与群と同じ頻度で投与し、陽性対照としてマイトマイシン C の 1 mg/kg を 1 回投与し、骨髄塗抹標本を作製し観察を行った。

その結果、各被験物質投与群の小核を有する幼若赤血球の出現頻度は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示さず、用量依存的な変化も認められなかった。

また、各被験物質投与群における全赤血球 200 個中に占める幼若赤血球の出現頻度は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な変化を示さなかった。

なお、陰性対照群と陽性対照群の小核を有する幼若赤血球の出現頻度は、当研究所における各々の背景データの平均値±3S.D.の範囲内であったことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、1,4-Dichlorobutane は本試験条件下で Crlj:CD1(ICR)SPF マウスの骨髄において、染色体異常誘発能は無いと判定した。

5. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室からの委託により、1,4-Dichlorobutane の安全性評価の一環として、マウスを用いた小核試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準じて行った。

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」
  （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）
- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」
  （OECD 理事会：1997 年 11 月 26 日）

毒性試験ガイドライン

- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
  （平成 23 年 3 月 31 日；薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号）
- 「OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 474」
  （OECD 理事会：1997 年 7 月 21 日）

動物の福祉

- 「動物の愛護及び管理に関する法律」
  （昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号）
- 「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」
  （平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号）
- 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」
  （日本学術会議、平成 18 年 6 月 1 日）

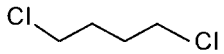
本試験は、試験施設の動物実験委員会の承認を受けて実施した。

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質、媒体及び陽性対照物質

6.1.1 被験物質

被験物質である 1,4-Dichlorobutane は東京化成工業株式会社より入手した。当試験に使用した被験物質のロット番号、性状等は次の通りである。

名称	:	1,4-Dichlorobutane
和名	:	1,4-ジクロロブタン
別名	:	Tetramethylene Chloride
CAS 番号	:	110-56-5
官報公示整理番号	:	(2)-61
構造式及び分子式	:	 $C_4H_8Cl_2$
分子量	:	127.01
物理的状態 (20°C)	:	液体
形状	:	透明
色	:	無色~ほとんど無色
沸点	:	155°C
比重 (20/20)	:	1.1406
屈折率 n20/D	:	1.4545
ロット番号	:	DE6GA
純度 (GC)	:	99.8%
入手量	:	75 mL (25 mL×3 本)
保存方法	:	冷暗所（実測値：3~8°C）、密栓
保存場所	:	御殿場研究所　被験物質保存室、第 3 研究棟被験物質調製室及び生化学部標準物質保存場所
安定性	:	動物試験終了後、試験受託者で被験物質の安定性を確認し、動物試験期間中、安定であることが確認された（添付資料 1）。
使用後の処理	:	動物試験終了後の残量はすべて廃棄した。

6.1.2 媒体

名称	:	コーン油
規格	:	生化学用
メーカー	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	LAE4488

保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所　第 3 研究棟被験物質調製室
選択理由	:	本被験物質は第二石油類であることから、コーン油を選択した。

6.1.3　陽性対照物質

名称	:	マイトマイシン C（以下 MMC と記す。）
メーカー	:	協和発酵キリン株式会社
ロット番号	:	557AJL
力価	:	2 mg/vial
保存方法	:	室温、遮光
保存場所	:	御殿場研究所　第 3 研究棟被験物質調製室　発癌性物質室温保存庫
選択理由	:	MMC は小核試験に広く用いられ、背景データが豊富であり「毒性試験ガイドライン」に従って選択した。

6.2　媒体、投与液及び陽性対照物質の調製

6.2.1　媒体の調製

コーン油をそのまま用いた。また、本試験では陰性対照用として投与日ごとに、1 日必要量を褐色ガラス瓶に採取し、投与に用いた。

6.2.2　投与液の調製

6.2.2.1　調製方法

濃度ごとに被験物質を秤取し、コーン油を加えて希釈し、所定量にメスアップした。1 日分ずつ必要な量を 2 日分褐色ガラス瓶に分注した。

6.2.2.2　保存方法

冷所〔冷蔵庫内、許容値：1~10°C、実測値：4.1~5.8°C（予備試験）、4.1~5.8°C（本試験）〕に保存し、調製後最大 7 日以内に使用した。

6.2.2.3　安定性

0.36~200 mg/mL 濃度液について、冷所（冷蔵庫内、許容値：1~10°C）7 日間+室温 24 時間まで安定であることが株式会社ボゾリサーチセンターで確認されている（試験番号：A-2541、添付資料 2）。

6.2.2.4　被験液の濃度確認

本試験に使用する前の各被験液よりそれぞれ 10 mL 採取し、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で濃度を確認した結果、表示値に対する割合は 25 mg/mL 被験

液で 100.4%、50 mg/mL 被験液で 100.8%、100 mg/mL 被験液で 98.6%であり、いずれも評価基準（表示値に対する割合：100±10%）を満たした。なお、GC 測定法バリデーションは株式会社ボゾリサーチセンター（試験番号：A-2541）で実施された。

GC 測定法の概略を以下に示した。

分析方法の概略

1) 標準物質

1,4-Dichlorobutane

ロット番号：DE6GA

2) 測定実測試料の調製

被験液の任意の場所から n=1 で採取し、以下の表に従い、測定実測試料を用時調製した。

被験液濃度 (mg/mL)	溶解		1 次希釈		2 次希釈		希釈率
	採取量 (mL)	定容量 (mL)	溶解溶液採取量 (mL)	定容量 (mL)	1 次希釈液採取量 (mL)	定容量 (mL)	
25	1	25	5	50	9	50	12500/9
50	1	50	5	50	9	50	25000/9
100	1	100	5	50	9	50	50000/9

溶媒：アセトン

3) GC システム

GC : HP6890N（Agilent Technologies Inc.）
インジェクタ : G2613A（Agilent Technologies Inc.）
オートサンプラトレイ : G2614A（Agilent Technologies Inc.）
データ処理ソフト : GC ChemStation G2070AJ（Agilent Technologies Inc.）

4) GC 測定条件

カラム : DB-1（0.32 mm I.D.×30 m、膜厚 0.25 μm、Agilent Technologies Inc.）
キャリアガス : He
流量モード : コンスタントフローモード
流量 : 3.0 mL/min
注入口 : スプリット注入口
スプリット比 : 5:1
注入口温度 : 250°C
検出器 : Flame ionization detector（FID）

検出器温度	:	300°C
H_2 流量	:	45 mL/min
Air 流量	:	450 mL/min
メイクアップガス（N_2）流量	:	40 mL/min
オーブン温度	:	40°C（Hold 1 分）→ 80°C（10°C/min、Hold 2 分）
注入量	:	3 μL

5) 測定結果の保証

- 再注入及び再測定

再注入及び再測定を必要とする事象はなかった。

6.2.3 陽性対照物質の調製

用時に、MMC の 0.1 mg/mL 水溶液を調製した。すなわち、MMC（2 mg/vial）1 瓶を注射用水[注1] 5 mL で溶解した後、2 mL を採取して、生理食塩液[注2] を 6 mL 加えて 8 mL とした。

注 1： 日本薬局方〔（株）大塚製薬工場、ロット番号：2B97〕
注 2： 日本薬局方〔（株）大塚製薬工場、ロット番号：1D73〕

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

マウスは小核試験に広く用いられており、この試験に使用される系統のマウスは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物

ICR 系 SPF マウス〔Crlj:CD1(ICR)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター〕を 7 週齢で、予備試験用として雌雄各 16 匹[注3]、本試験用として雄 30 匹[注4] を購入し、予備試験、本試験とも入荷日を 1 日と数え、8 日間検疫・馴化飼育した。検疫・馴化期間中には体重測定（入荷日、検疫終了日及び群分け日）及び体外表、栄養状態、行動などの一般状態を 1 日 1 回観察し、その結果をもとに異常のない動物（予備試験：雌雄各 12 匹、本試験：雄 25 匹）を選択し、8 週齢で試験に供した。

使用した動物の群分け日（1 回目投与日、陽性対照群は投与前日）における体重範囲は、予備試験が雄 30.5~36.4 g、雌 21.6~25.3 g[注5]、本試験が雄 30.9~37.2 g であった。

注 3： 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 15 匹であったが、実際には雌雄各 16 匹が納入された。
注 4： 試験計画書に従い、注文匹数は雄 29 匹であったが、実際には雄 30 匹が納入された。
注 5： 群分け時（1 回目投与日）の体重測定において、試験計画書に規定されている体重範囲の下限 23g に満たない動物が 16 匹中 7 匹みられた。群構成に必要な匹数 12 匹を確保するため、試験計画書記載の条件に近い動物 3 匹を群分けに使用した。当該動物 3 匹は、検疫・馴化期間中の一般状態に異常はみられず、体重も増加傾向を示していることから

試験動物として使用しても問題はないと判断した。

6.5　飼育条件

動物は温度（許容範囲 23±3°C）が予備試験 23~24°C、本試験 23~24°C、相対湿度（許容範囲 50±20%）が予備試験 41~52%、本試験 38~46%、換気回数 1 時間当たり 12~17 回、照明 1 日 12 時間（07:00~19:00）の飼育室（飼育室番号：3101 号室）で床敷（ホワイトフレーク：日本チャールス・リバー株式会社、ロット番号：2011-6、2012-2）を入れたプラスチックケージ（W 155 × D 245 × H 150mm：日本クレア株式会社）に 1 匹ずつ収容し、固形飼料 CR-LPF（放射線滅菌：オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：120711、120816）及び飲料水（御殿場市営水道水：給水瓶使用）を自由に摂取させ飼育した。

6.6　飼料、飲料水及び床敷中の混入物質

飼料、飲料水及び床敷中の混入物質については、飼料及び床敷は使用したロットごとに分析したデータを Eurofins Scientific Analytics からそれぞれ入手し、飲料水については、水道法に準拠した水質の分析を芝浦セムテック株式会社に定期的（年 4 回）に依頼し、試験期間を保証するデータを入手し、それぞれ異常のないことを確認して、その写しを保存した。

6.7　動物の識別及びケージへの表示

小動物用耳標　：　予備試験では 861~892、本試験では 970~999 の番号が刻印された耳標を入荷時に装着した。

動物番号　：　予備試験では、100 の位は群、10 の位は性（雄は 0 番、雌は 1 番）、1 の位は個体番号とした。本試験では、投与量ごと（陰性対照群、低、中、高用量群及び陽性対照群の順）に 4 桁の番号をつけた。1000 の位は群、100 の位は性（雄は 0 番）、10 と 1 の位は個体番号とした。予備試験、本試験とも個体番号は 1 から始まる番号をつけた。各飼育ケージに用量（群）ごとに色分けしたケージラベルを付け、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号及び耳標番号を表示した。更に予備試験では動物実験終了日、本試験では骨髄採取日を明記した。

6.8　群分け

動物は、検疫・馴化期間中に、体重及び一般状態に異常がみられなかった個体を使用した。群分け当日（1 回目投与日）の体重を基に、各群の平均体重ができるだけ均等になるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法

及び無作為抽出法の組合せ（ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割り当てた）により行った。群分け後の余剰動物は、1 回目の投与終了後に予備試験、本試験とも試験より除外し、研修・研究用動物として動物管理責任者に移管した（予備試験：2012 年 11 月 19 日、本試験：2012 年 12 月 5 日）。

6.9　投与経路、投与方法及びそれらの選択理由

投与経路は、毒性試験に一般的に用いられる経口投与とした。投与容量は 10 mL/kg 体重とし、マウスにフレキシブル胃ゾンデを用いて、確実な毒性量に暴露させるため約 24 時間間隔で 2 回投与した。

個体ごとの投与液量は投与日の体重を基準に算出した。また、陰性対照群にはコーン油を同様に投与した。陽性対照群にはマウス骨髄細胞に小核の誘発が報告されている MMC を 25 G の注射針を用いて腹腔内に 1 回投与した。投与容量は 10 mL/kg 体重とした。

6.10　投与量及びその設定根拠並びに群構成

6.10.1　予備試験

本試験における投与量を設定するために予備試験を行った。

予備試験の投与量は、最高用量を毒性試験ガイドラインで定める 2000 mg/kg/日とし、以下公比 2 で除して 1000、500 及び 250 mg/kg/日の 4 用量を設定した。1 群当たりの動物数は雌雄各 3 匹とした。また、2 回目投与後の約 24 時間後の生存動物については炭酸ガス吸入により安楽死させ、骨髄採取は行わなかった。群構成表を表 1.に示す。

表 1. 予備試験群構成表

群	投与量 (mg/kg/日)	濃　度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与回数	性	動物数	動物番号
低 用 量	250	25	10	2	雄 雌	3 3	101~103 111~113
中 用 量	500	50	10	2	雄 雌	3 3	201~203 211~213
高 用 量	1000	100	10	2	雄 雌	3 3	301~303 311~313
最高用量	2000	200	10	2	雄 雌	3 3	401~403 411~413

6.10.2　本試験

予備試験において、各群雌雄 3 匹のマウスを用いて 250、500、1000 及び 2000 mg/kg/日を約 24 時間間隔で 2 回経口投与した結果、2 回目投与翌日までに、2000 mg/kg/日投与群の雄 2/3 例、雌 1/3 例の死亡が確認された。一般状態では 1000 及び 2000 mg/kg/日投与群に着色尿（橙黄色）がみられた。体重では、1000 及び 2000 mg/kg/日投与群

で減少傾向がみられた。

したがって、本試験における投与量は、死亡例がみられず最大耐量と思われる 1000 mg/kg/日を高用量とし、以下公比 2 で除して、500 及び 250 mg/kg/日の 3 用量を設定した。これに媒体を投与する陰性対照群及び MMC を投与する陽性対照群を加え、計 5 群とした。1 群当たりの動物数は 5 匹とした。

骨髄採取時期は、2 回目投与後約 24 時間とした。また、毒性発現に明らかな性差が見られなかったため、雄のみで実施した。

なお、MMC の投与量は 1 mg/kg とし、投与後約 24 時間に骨髄を採取した。群構成表を表 2.に示す。

表 2. 本試験群構成表

群	投与量 (mg/kg/日)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与回数	性	動物数	動物番号	骨髄採取時間（投与後）
陰性対照	0	0	10	2	雄	5	1001~1005	約 24 時間 a)
低 用 量	250	25	10	2	雄	5	2001~2005	約 24 時間 a)
中 用 量	500	50	10	2	雄	5	3001~3005	約 24 時間 a)
高 用 量	1000	100	10	2	雄	5	4001~4005	約 24 時間 a)
陽性対照	1*	0.1*	10	1	雄	5	5001~5005	約 24 時間

*：MMC の投与量及び濃度を示す。　a)：2 回目の投与時間から起算

6.11　観察及び検査の方法

6.11.1　一般状態の観察

予備試験及び本試験とも、投与日は投与前、投与直後、投与後約 2 時間、また、その他の日は 1 日 1 回、一般状態（体外表、栄養状態、行動及び排泄物など）の観察を実施した。陽性対照群については、投与前日にも観察した。

6.11.2　体重測定

予備試験では、1 回目投与日から 2 回目投与翌日まで 1 日 1 回測定した（8:59~9:49）。本試験では、1 回目投与日から 2 回目投与翌日まで（陽性対照群については投与前日にも測定）1 日 1 回測定した（8:22~11:13）。

6.11.3　骨髄塗抹標本の作製

標本作製前に試料番号と動物番号の対照表を作成した。試料番号は 1 個体ごとに右大腿骨が奇数、左大腿骨が偶数となるように連番を振った。小核の観察のための標本を、Schmid の方法 [1,2] に従って作製した。すなわち、投与後所定の時間に試料番号順にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、両側の大腿骨を摘出し両端を切断した。その後 1 mL ディスポーザブル注射筒と 23 G 注射針を用いて、約 0.1~0.2 mL の牛胎児血清（GIBCO BRL、ロット番号：1017510）で骨髄細胞を遠心管に洗い出した。次に、この注射筒及び注射針を用いて骨髄細胞と牛胎児血清を混和して細胞をほぐし、1000 rpm で 5 分間遠心分離（トミー工業株式会社、卓上多本架遠心機 LC-220）し、

上清を捨て、沈殿物をミキサーでよく混和し、スライドグラスに塗抹した（塗抹標本は1匹につき左右大腿骨から各1枚を作製）。塗抹した標本は風乾させ、メタノール（和光純薬工業株式会社、ロット番号：EPF6315）で3分間固定した後、再び風乾した。なお、標本には試験番号、ステージ（骨髄採取時期）、試料番号、試験の種類（小核試験）及び作製日を明記したラベルを付けた（盲検法）。

6.11.4　骨髄塗抹標本の観察

観察は盲検法で行うため1個体ごとに連番となった試料番号をもとに、塗抹状態の良好なスライドグラス1枚を選択した。骨髄塗抹標本のアクリジンオレンジ蛍光染色及び観察は、Hayashiらの方法[3,4]に従った。予め40 μg/mLアクリジンオレンジ水溶液を少量滴下したカバーグラスにスライドグラスを載せた。波長490 nm付近の励起光、観察用フィルターとして515 nm以上の波長を透過するものを備えた蛍光顕微鏡（システム生物顕微鏡 BX40：オリンパス株式会社、ユニバーサル落射蛍光装置 BX-FLA：オリンパス株式会社）を用いて、総合倍率600倍で観察した。

観察終了後の標本は廃棄した。また、観察に用いなかった標本は、全ての標本観察終了後廃棄した。

6.11.5　観察結果の判定

1個体について、全赤血球200個中の幼若赤血球（以下、PCEと記す）数及び正染性赤血球数と2000個のPCEに対する小核を有する幼若赤血球（以下、MNPCEと記す）数を計数し、それぞれの出現頻度（%）を求めた。

また、群ごとにMNPCE数とその出現頻度（%）、PCE数とその出現頻度（%）について平均値と標準偏差を算出し、各出現頻度（%）については最大値と最小値も記録した。

小核の出現頻度に対する有意性の判定は、陰性対照群と陽性対照群のMNPCEの出現頻度（%）が当研究所の背景データの平均値±3S.D.内であることを確認した後、陰性対照群と被験物質投与群とを比較し、2項分布に基づくKastenbaum&Bowmanの検定[5]（有意水準：片側5%）並びにCochran Armitageの傾向検定[6]（有意水準：両側1及び5%）を行った。更にPCEの出現頻度については、陰性対照群と各被験物質投与群との間でBartlettの検定[7]を行い等分散性（有意水準：両側1%）を調べ、分散が均一だったためDunnettの検定[8]（有意水準：両側1及び5%）を行った。

7. 試験結果

7.1 予備試験

1,4-Dichlorobutane の 250、500、1000 及び 2000 mg/kg/日を投与した。

7.1.1 一般状態

結果を Appendix 1-1、1-2 に示した。

2 回目投与翌日までに、2000 mg/kg/日投与群の雄 2/3 例、雌 1/3 例の死亡が確認された。一般状態では 1000 及び 2000 mg/kg/日投与群に着色尿（橙黄色）がみられた。

7.1.2 体重

結果を Appendix 2-1、2-2 に示した。

体重では、1000 及び 2000 mg/kg/日投与群で減少傾向がみられた。

7.2 本試験

1,4-Dichlorobutane の 250、500 及び 1000 mg/kg/日、陰性対照としてコーン油、陽性対照として MMC の 1 mg/kg を投与した。

7.2.1 一般状態

個体別の結果を Appendix 3 に、総括を Table 1 にそれぞれ示した。

1000 mg/kg/日投与群において着色尿（橙黄色）が散見された。陰性対照群及び陽性対照群では一般状態に変化はみられなかった。

7.2.2 体重

個体別の結果を Appendix 4 に、総括を Table 2 にそれぞれ示した。

陰性対照群と比較して、各被験物質投与群で体重推移に異常はみられなかった。陽性対照群については、体重推移に異常はみられなかった。

7.2.3 骨髄塗抹標本の観察結果

個体別の結果を Appendix 5 に、総括を Table 3 にそれぞれ示した。

被験物質投与群では MNPCE の出現頻度が 250 mg/kg/日投与群で 0.07±0.03%、500 mg/kg/日投与群で 0.13±0.08%、1000 mg/kg/日投与群で 0.09±0.04%を示した。これらの値を陰性対照群の 0.15±0.09%と比較した結果、いずれの被験物質投与群も統計学的に有意な増加は示さず、用量依存的な変化も認められなかった。

また、各被験物質投与群の全赤血球 200 個中に占める PCE の出現頻度は、陰性対照群と比較して、統計学的に有意な変化は示さなかった。

なお、陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、陰性対照群と比べ顕著に増加した。さらに、陰性対照群及び陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、当研究所における各々の

背景データの平均値±3S.D.の範囲内であった。

8. 考察

1,4-Dichlorobutane の染色体異常誘発能の有無を検討するため、Crlj:CD1(ICR)SPF マウスを用いた小核試験を実施した。

投与量を決定するための予備試験では、各群雌雄 3 匹のマウスを用いて 250、500、1000 及び 2000 mg/kg/日を約 24 時間間隔で 2 回経口投与した結果、2 回目投与翌日までに、2000 mg/kg/日投与群の雄 2/3 例、雌 1/3 例の死亡が確認された。一般状態では 1000 及び 2000 mg/kg/日投与群に着色尿（橙黄色）がみられた。体重では、1000 及び 2000 mg/kg/日投与群で減少傾向がみられた。

この結果をもとに、本試験では、死亡例がみられず最大耐量と思われる 1000 mg/kg/日を高用量とし、以下公比 2 で除して、500 及び 250 mg/kg/日を約 24 時間間隔で 2 回経口投与し、2 回目投与後約 24 時間に骨髄塗抹標本を作製し観察した。

また、陰性対照としてコーン油を被験物質投与群と同じ頻度で投与する群、陽性対照として MMC の 1 mg/kg を 1 回投与する群を設定し、投与後所定の時間に骨髄塗抹標本を作製し観察を行った。1 群当たりの動物数は雄 5 匹とした。

その結果、MNPCE の出現頻度において、各被験物質投与群は陰性対照群に比べて統計学的に有意な増加は認められず、用量依存的な変化も認められなかった。

また、各被験物質投与群における全赤血球 200 個中に占める PCE の出現頻度は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な変化を示さなかった。

なお、陰性対照群と陽性対照群の MNPCE の出現頻度は、当研究所における各々の背景データの平均値±3S.D.の範囲内であったことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、1,4-Dichlorobutane は本試験条件下で Crlj:CD1(ICR)SPF マウスの骨髄において、染色体異常誘発能は無いと判定した。

なお、ほ乳類培養細胞に対しては、代謝活性化条件下で染色体異常誘発作用を示した[9]が、生体で染色体異常誘発性を調べるマウス小核試験では陰性であった。このことは、本被験物質が生体内で分解され、遺伝毒性誘発性が低減化されることを示唆する。

類似物質である 1,8-Dichlorooctane では、復帰突然変異試験で陰性[10]、染色体異常試験で陽性[11]、小核試験で陰性[12]、1-クロロブタンでは、復帰突然変異試験[13]及び染色体異常試験で陰性[14]との報告がある。

9. 参考文献

1) W. Schmid, Mutation Res. 31, 9-15 (1975).
2) W. Schmid, "Chemical Mutagens," Vol. 4, ed. by A. Hollaender, Plenum Press, N.Y., London, 1976, pp.76-78.
3) M. Hayashi, T. Sofuni, M. Jr. Ishidate, Mutat. Res., 120, 241(1983).
4) 林　真，"小核試験," サイエンティスト社，東京，1991, pp.44-55.
5) M.A.Kastenbaum and K.O.Bowman, Mutation Res. 9, 527-549 (1970).
6) 吉村　功 編, "毒性・薬効データの統計解析," サイエンティスト社，東京，1987, pp. 67-69.
7) Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. 8th ed. Ames: Iowa State University Press (1989).
8) Dunnett CW. (1955): A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Journal of the American Statistical Association, 50, 1096-1121.
9) 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（株式会社　日本バイオリサーチセンター、試験番号：971327）、2009
10) 1,8-ジクロロオクタンの細菌を用いる復帰突然変異試験（株式会社　日本バイオリサーチセンター、試験番号：902027）、2009
11) 1,8-ジクロロオクタンのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験（株式会社　日本バイオリサーチセンター）、試験番号：971127、2009
12) 1,8-Dichlorooctane のマウスを用いた小核試験（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：M-1494）、2013
13) [redacted]：化学物質毒性試験報告書, 2, 117(1995).
14) [redacted]：化学物質毒性試験報告書, 2, 121(1995).

試験番号：M-1493 (revised version)
(1/2)

試験成績書
[1,4-Dichlorobutane の安定性]

ステージ	:	動物試験（投与）終了後
測定日	:	2012 年 12 月 11 日
被験物質	:	1,4-Dichlorobutane （ロット番号：DE6GA）
試験項目	:	赤外吸収スペクトルの確認　液膜法
評価基準	:	安定性のスペクトルを特性のスペクトルと比較するとき、同様な赤外吸収スペクトルである。
結果	:	安定性のスペクトルを特性のスペクトルと比較したとき、同様な赤外吸収スペクトルが得られた。 なお、赤外吸収スペクトルは次のページに示す。
基準	:	「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」（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）
判定	:	適

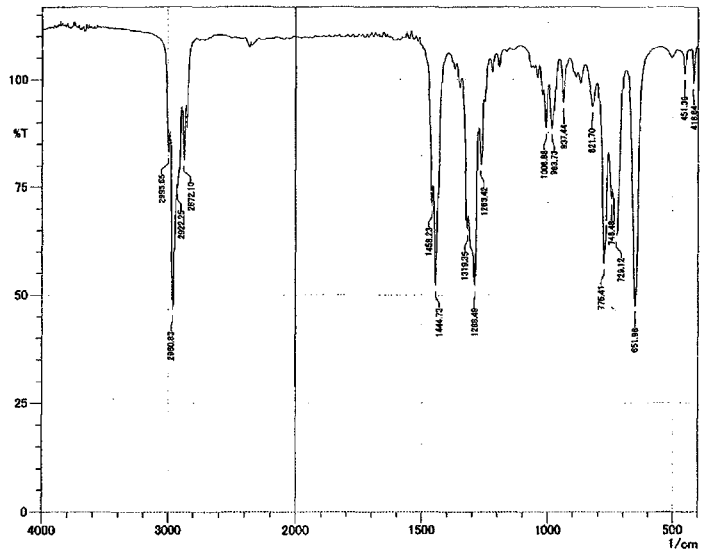
[redacted]　2013 年 1 月 18 日

化学分析責任者
株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所

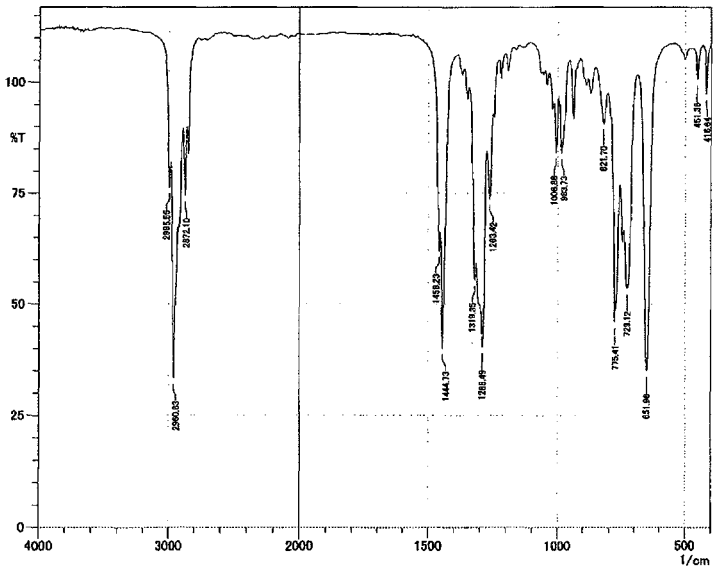
試験番号：M-1493 (revised version)
(2/2)

結果　　：　赤外吸収スペクトル

(特性のスペクトル)



(安定性のスペクトル)



試験番号：A-2541（訂正版）

試験成績書
（被験液中 1,4-Dichlorobutane の安定性）

被験物質　：　1,4-Dichlorobutane（ロット番号：DE6GA）
形態（媒体）　：　溶液（コーン油）
保存条件　：　褐色ガラスビンにて、冷所（冷蔵庫内、許容値：1~10°C）又は室温保存
保存期間　：　冷所 7 日間 + 室温 24 時間保存
評価基準
　安定性　：　残存率が 100.0 ±10.0%以内。

結果：

被験液 (mg/mL)		測定濃度（mg/mL）	
		調製直後	冷所 7 日間+ 室温 24 時間保存後
0.36		0.347	0.380
		0.346	0.364
		0.343	0.350
	平均値	0.345	0.365
	残存率（%）	–	105.8
200		202	223
		203	221
		206	214
	平均値	204	219
	残存率（%）	–	107.4

判定　：　適

基準　：　「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」（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）

[redacted]　2012 年 11 月 2 日

試験責任者
株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所

Table 1 A micronucleus test of 1,4-Dichlorobutane in mice

Clinical signs

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)		1st administration			2nd administration			1 day after the 2nd administration
			Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	
Negative control	0	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
Low	250	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
Middle	500	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
High	1000	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	4	5	5	4
		Colored urine (orange yellow)	0	0	0	1	0	0	1
Positive control [a)] (Mitomycin C)	1	Number of animals	5	-	-	5	5	5	5
		No abnormalities	5	-	-	5	5	5	5

- : No observation

a) : Administration was done only once for the positive control group.

Table 2 A micronucleus test of 1,4-Dichlorobutane in mice

Body weight

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)		Before 1st administration	Before 2nd administration	1 day after the 2nd administration
Negative control	0	N	5	5	5
		Mean	34.4	34.3	34.6
		S.D.	1.8	1.7	1.7
Low	250	N	5	5	5
		Mean	34.7	34.2	34.5
		S.D.	1.7	1.5	1.6
Middle	500	N	5	5	5
		Mean	34.5	34.4	34.2
		S.D.	1.6	1.5	1.4
High	1000	N	5	5	5
		Mean	34.3	34.2	34.5
		S.D.	2.0	2.7	2.3
Positive control [a)] (Mitomycin C)	1	N	5	5	5
		Mean	34.6	34.3	34.9
		S.D.	1.5	1.5	2.3

Unit : g

a) : Administration was done only once for the positive control group.

Table 3 A micronucleus test of 1,4-Dichlorobutane in mice

Observation of bone marrow smears (About 24 hours after the 2nd administration)

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)		No. of MNPCE in 2000 PCE	MNPCE(%) [b)]	No. of PCE in 200 erythrocytes	PCE(%) [c)]
Negative control	0	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	3 ± 2	0.15 ± 0.09	124 ± 8	62.0 ± 4.1
		Min. / Max.		0.00 / 0.25		58.0 / 68.5
Low	250	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	1 ± 1	0.07 ± 0.03	117 ± 12	58.7 ± 5.9
		Min. / Max.		0.05 / 0.10		50.0 / 64.0
Middle	500	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	3 ± 2	0.13 ± 0.08	121 ± 7	60.5 ± 3.7
		Min. / Max.		0.05 / 0.25		55.0 / 65.5
High	1000	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	2 ± 1	0.09 ± 0.04	118 ± 9	59.2 ± 4.7
		Min. / Max.		0.05 / 0.15		53.5 / 66.5
Positive control [a)] (Mitomycin C)	1	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	51 ± 17	2.57 ± 0.86	119 ± 8	59.7 ± 4.1
		Min. / Max.		1.05 / 3.15		54.5 / 64.0

a) : Administration was done only once for the positive control group.
b): Proportion(%) of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) per 2000 polychromatic erythrocytes (PCE)
c): Proportion(%) of polychromatic erythrocytes (PCE, including MNPCE) per 200 erythrocytes
No significant difference in any treated groups from negative control group.

Appendix 1-1 A micronucleus test of 1,4-Dichlorobutane in mice

Clinical signs (Preliminary study)

Sex	Group	Dose (mg/kg/day)		1st administration			2nd administration			1 day after the 2nd administration
				Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	
Male	Low	250	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	Middle	500	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	High	1000	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	1	3	3	3
			Colored urine (orange yellow)	0	0	0	2	0	0	0
	Highest	2000	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	0	3	3	0
			Colored urine (orange yellow)	0	0	0	3	0	0	1
			Dead	0	0	0	0	0	0	2

Appendix 1-2 A micronucleus test of 1,4-Dichlorobutane in mice

Clinical signs (Preliminary study)

Sex	Group	Dose (mg/kg/day)		1st administration			2nd administration			1 day after the 2nd administration
				Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	
Female	Low	250	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	Middle	500	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	High	1000	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	2	3	3	3
			Colored urine (orange yellow)	0	0	0	1	0	0	0
	Highest	2000	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	1	3	3	1
			Colored urine (orange yellow)	0	0	0	2	0	0	1
			Dead	0	0	0	0	0	0	1

Appendix 2-1 A micronucleus test of 1,4-Dichlorobutane in mice

Body weight (Preliminary study)

Sex	Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	Before 1st administration	Before 2nd administration	1 day after the 2nd administration
Male	Low	250	101	35.2	35.0	35.2
			102	32.4	32.6	32.3
			103	34.0	32.9	33.1
			Mean	33.9	33.5	33.5
			S.D.	1.4	1.3	1.5
	Middle	500	201	33.1	32.7	32.7
			202	36.4	36.3	36.6
			203	33.3	32.8	31.5
			Mean	34.3	33.9	33.6
			S.D.	1.9	2.1	2.7
	High	1000	301	34.7	34.1	33.2
			302	30.5	28.5	30.3
			303	34.0	34.0	29.4
			Mean	33.1	32.2	31.0
			S.D.	2.3	3.2	2.0
	Highest	2000	401	33.9	30.2	28.8
			402	35.9	32.5	Dead
			403	32.6	28.9	Dead
			Mean	34.1	30.5	28.8
			S.D.	1.7	1.8	

Unit : g

Appendix 2-2 A micronucleus test of 1,4-Dichlorobutane in mice

Body weight (Preliminary study)

Sex	Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	Before 1st administration	Before 2nd administration	1 day after the 2nd administration
Female	Low	250	111	25.3	24.7	24.1
			112	23.0	22.4	22.4
			113	23.3	23.5	23.4
			Mean	23.9	23.5	23.3
			S.D.	1.3	1.2	0.9
	Middle	500	211	25.2	26.2	26.3
			212	22.8	23.5	23.1
			213	23.7	23.5	24.1
			Mean	23.9	24.4	24.5
			S.D.	1.2	1.6	1.6
	High	1000	311	24.5	25.5	25.3
			312	21.6	21.0	19.7
			313	24.0	24.0	21.9
			Mean	23.4	23.5	22.3
			S.D.	1.6	2.3	2.8
	Highest	2000	411	22.4	19.2	18.2
			412	24.9	22.2	20.3
			413	24.0	21.9	Dead
			Mean	23.8	21.1	19.3
			S.D.	1.3	1.7	

Unit : g

Appendix 3 A micronucleus test of 1,4-Dichlorobutane in mice

Clinical signs

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	1st administration			2nd administration			1 day after the 2nd administration
			Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	Before administration	Immediately after administration	About 2 hours after administration	
Negative control	0	1001	-	-	-	-	-	-	-
		1002	-	-	-	-	-	-	-
		1003	-	-	-	-	-	-	-
		1004	-	-	-	-	-	-	-
		1005	-	-	-	-	-	-	-
Low	250	2001	-	-	-	-	-	-	-
		2002	-	-	-	-	-	-	-
		2003	-	-	-	-	-	-	-
		2004	-	-	-	-	-	-	-
		2005	-	-	-	-	-	-	-
Middle	500	3001	-	-	-	-	-	-	-
		3002	-	-	-	-	-	-	-
		3003	-	-	-	-	-	-	-
		3004	-	-	-	-	-	-	-
		3005	-	-	-	-	-	-	-
High	1000	4001	-	-	-	T	-	-	-
		4002	-	-	-	-	-	-	-
		4003	-	-	-	-	-	-	-
		4004	-	-	-	-	-	-	T
		4005	-	-	-	-	-	-	-
Positive control [a] (Mitomycin C)	1	5001	-	/	/	-	-	-	-
		5002	-	/	/	-	-	-	-
		5003	-	/	/	-	-	-	-
		5004	-	/	/	-	-	-	-
		5005	-	/	/	-	-	-	-

- : No abnormalities

/ : No observation

T: Colored urine (orange yellow)

a) : Administration was done only once for the positive control group.

Appendix 4 A micronucleus test of 1,4-Dichlorobutane in mice

Body weight

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	Before 1st administration	Before 2nd administration	1 day after the 2nd administration
Negative control	0	1001	35.8	36.0	36.0
		1002	31.4	31.5	31.7
		1003	34.6	34.5	34.9
		1004	35.7	35.4	35.4
		1005	34.7	34.1	34.9
		Mean	34.4	34.3	34.6
		S.D.	1.8	1.7	1.7
Low	250	2001	35.1	34.5	35.3
		2002	37.2	36.4	36.5
		2003	32.7	32.3	32.6
		2004	33.5	34.1	34.6
		2005	35.2	33.5	33.3
		Mean	34.7	34.2	34.5
		S.D.	1.7	1.5	1.6
Middle	500	3001	36.0	35.3	34.5
		3002	31.9	32.0	32.2
		3003	35.5	35.7	35.9
		3004	34.8	34.8	34.6
		3005	34.5	34.0	33.8
		Mean	34.5	34.4	34.2
		S.D.	1.6	1.5	1.4
High	1000	4001	34.7	33.8	34.3
		4002	35.7	36.7	36.8
		4003	34.6	34.5	35.2
		4004	30.9	29.9	30.7
		4005	35.7	36.3	35.6
		Mean	34.3	34.2	34.5
		S.D.	2.0	2.7	2.3
Positive control [a)] (Mitomycin C)	1	5001	36.4	36.2	38.3
		5002	32.6	32.4	32.3
		5003	34.8	34.2	34.6
		5004	35.4	35.4	35.6
		5005	33.6	33.5	33.5
		Mean	34.6	34.3	34.9
		S.D.	1.5	1.5	2.3

Unit : g

a) : Administration was done only once for the positive control group.

Appendix 5 A micronucleus test of 1,4-Dichlorobutane in mice

Observation of bone marrow smears (About 24 hours after the 2nd administration)

Sex : Male

Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	No. of MNPCE in 2000 PCE	Mean ± S.D.	MNPCE(%) [b]	Mean ± S.D. (Min / Max)	No. of PCE in 200 erythrocytes	Mean ± S.D.	PCE(%) [c]	Mean ± S.D. (Min / Max)
Negative control	0	1001	3	3 ± 2	0.15	0.15 ± 0.09	118	124 ± 8	59.0	62.0 ± 4.1
		1002	0		0.00	(0.00 / 0.25)	116		58.0	(58.0 / 68.5)
		1003	4		0.20		137		68.5	
		1004	5		0.25		124		62.0	
		1005	3		0.15		125		62.5	
Low	250	2001	1	1 ± 1	0.05	0.07 ± 0.03	111	117 ± 12	55.5	58.7 ± 5.9
		2002	1		0.05	(0.05 / 0.10)	126		63.0	(50.0 / 64.0)
		2003	2		0.10		122		61.0	
		2004	1		0.05		128		64.0	
		2005	2		0.10		100		50.0	
Middle	500	3001	2	3 ± 2	0.10	0.13 ± 0.08	120	121 ± 7	60.0	60.5 ± 3.7
		3002	2		0.10	(0.05 / 0.25)	122		61.0	(55.0 / 65.5)
		3003	3		0.15		110		55.0	
		3004	1		0.05		131		65.5	
		3005	5		0.25		122		61.0	
High	1000	4001	1	2 ± 1	0.05	0.09 ± 0.04	116	118 ± 9	58.0	59.2 ± 4.7
		4002	2		0.10	(0.05 / 0.15)	107		53.5	(53.5 / 66.5)
		4003	2		0.10		118		59.0	
		4004	3		0.15		118		59.0	
		4005	1		0.05		133		66.5	
Positive control [a] (Mitomycin C)	1	5001	55	51 ± 17	2.75	2.57 ± 0.86	109	119 ± 8	54.5	59.7 ± 4.1
		5002	21		1.05	(1.05 / 3.15)	128		64.0	(54.5 / 64.0)
		5003	60		3.00		127		63.5	
		5004	58		2.90		119		59.5	
		5005	63		3.15		114		57.0	

a): Administration was done only once for the positive control group.

b): Proportion(%) of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) per 2000 polychromatic erythrocytes (PCE)

c): Proportion(%) of polychromatic erythrocytes (PCE, including MNPCE) per 200 erythrocytes

信頼性保証書（1/2）

試験番号　：　M-1493

試験表題　：　1,4-Dichlorobutane のマウスを用いた小核試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

- 「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」
  （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）
- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」
  （OECD 理事会：1997 年 11 月 26 日）

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2013 年 3 月 15 日
株式会社ボゾリサーチセンター
信頼性保証部門 [redacted]

試験における調査

項　目	担当者	調　査　日	試験責任者及び運営管理者への報告日
試験計画書	[redacted]	2012 年 11 月 2 日	2012 年 11 月 2 日
試験計画書変更書（1）		2012 年 11 月 27 日	2012 年 11 月 28 日
コンピュータプロトコール		2012 年 11 月 28 日	2012 年 11 月 28 日
調製・保存（被験物質）		2012 年 11 月 30 日	2012 年 11 月 30 日
被験液の濃度確認		2012 年 11 月 30 日	2012 年 11 月 30 日
群分け・体重測定・投与・一般状態の観察		2012 年 12 月 5 日	2012 年 12 月 5 日

信頼性保証書（2/2）

項　目	担当者	調　査　日	試験責任者及び運営管理者への報告日
調製・保存（陽性対照物質）	[redacted]	2012年 12月 6日	2012年 12月 6日
投与・一般状態の観察（陽性対照物質）		2012年 12月 6日	2012年 12月 7日
骨髄塗抹標本の作製		2012年 12月 7日	2012年 12月 7日
骨髄塗抹標本の観察		2012年 12月 7日	2012年 12月 7日
被験物質の安定性		2012年 12月 11日	2012年 12月 11日
生データ		2013年 1月 16日 2013年 1月 17日	2013年 1月 18日
改善確認		2013年 1月 21日	2013年 1月 21日
最終報告書草案・表・付表		2013年 1月 16日 2013年 1月 17日	2013年 1月 18日
測定レポート（被験液の濃度確認：案）		2013年 1月 17日	2013年 1月 18日
改善確認		2013年 1月 21日	2013年 1月 21日
測定レポート（被験液の濃度確認）		2013年 1月 21日	2013年 1月 21日
最終報告書		2013年 3月 15日	2013年 3月 15日

プロセス調査

項　目	試験番号	担当者	調　査　日	試験責任者及び運営管理者への報告日
動物入荷	B-7372	[redacted]	2012年 11月 12日	2012年 11月 12日
検疫・馴化	B-7372		2012年 11月 12日	2012年 11月 12日
	B-7372		2012年 11月 16日	2012年 11月 16日