M-1472

原本

最 終 報 告 書

試験名：2-Mercaptobenzimidazole のマウスを用いた小核試験

試験番号：M-1472

試験期間：2011 年 11 月 24 日-2012 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-1472

試験表題　　：　　2-Mercaptobenzimidazole 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]　2012 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 試験計画書 6
3.2 試験目的 6
3.3 試験委託者 6
3.4 試験受託者 6
3.5 試験実施施設 6
3.6 試験日程 6
3.7 試験責任者 7
3.8 試験担当者 7
3.9 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
3.10 資料保存 7
3.11 試験責任者の記名・なつ印 7
4. 要約 8
5. 緒言 9
6. 試験材料及び方法 10
6.1 被験物質、媒体及び陽性対照物質 10
6.1.1 被験物質 10
6.1.2 媒体 11
6.1.3 陽性対照物質 11
6.2 媒体、投与液及び陽性対照物質の調製 11
6.2.1 媒体の調製 11
6.2.1.1 調製方法 11
6.2.1.2 保存方法 11
6.2.2 投与液の調製 11
6.2.2.1 調製方法 11
6.2.2.2 保存方法 12
6.2.2.3 安定性・均一性 12
6.2.2.4 被験液の濃度・均一性確認 12
6.2.3 陽性対照物質の調製 13
6.3 試験動物種及び系統の選択理由 13
6.4 試験動物 13
6.5 飼育条件 14
6.6 飼料、飲料水及び床敷中の混入物質 14
6.7 動物の識別及びケージへの表示 14

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 15
6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成 15
6.10.1 予備試験 15
6.10.2 本試験 15
6.11 観察及び検査の方法 16
6.11.1 一般状態の観察 16
6.11.2 体重測定 16
6.11.3 骨髄塗抹標本の作製 16
6.11.4 骨髄塗抹標本の観察 17
6.11.5 観察結果の判定 17
7. 試験結果 18
7.1 予備試験 18
7.1.1 一般状態 18
7.1.2 体重 18
7.2 本試験 18
7.2.1 一般状態 18
7.2.2 体重 18
7.2.3 骨髄塗抹標本の観察結果 18
8. 考察 20
9. 参考文献 21

添付資料

添付資料 1	試験成績書（2-Mercaptobenzimidazole の安定性）
添付資料 2	試験成績書（被験液中 2-Mercaptobenzimidazole の安定性・均一性）

表

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

付表

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

信頼性保証書

3. 試験実施概要

3.1 試験計画書

試験番号 : M-1472
試験表題 : 2-Mercaptobenzimidazole のマウスを用いた小核試験

3.2 試験目的

マウス骨髄細胞を用いて、2-Mercaptobenzimidazole の染色体異常誘発性の有無を明らかにした。

3.3 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

3.4 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

3.5 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

3.6 試験日程

試験開始日 : 2011 年 11 月 24 日
被験物質受領日 : 2011 年 11 月 14 日
被験物質出庫日 : 2011 年 11 月 24 日
予備試験
動物入荷日 : 2011 年 12 月 5 日
実験開始日（予備試験 1 回目の投与日）
: 2011 年 12 月 12 日 (1 回目投与日)
2011 年 12 月 13 日 (2 回目投与日)
本試験
動物入荷日 : 2012 年 1 月 9 日
投与日 : 2012 年 1 月 16 日 (1 回目投与日)
2012 年 1 月 17 日 (2 回目投与日)
骨髄採取日 : 2012 年 1 月 18 日
実験終了日（本試験の標本観察終了日）
: 2012 年 1 月 19 日

試験終了日　　：　2012年　3月　15日

3.7　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

[redacted]

3.8　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]

3.9　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。

3.10　資料保存

試験計画書原本（試験計画書変更書を含む）、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。保存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に連絡し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。

3.11　試験責任者の記名・なつ印

[redacted]　2012　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

2-Mercaptobenzimidazole 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。

2-Mercaptobenzimidazole の 50、100 及び 200mg/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 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液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 1mg/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、2-Mercaptobenzimidazole 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、2-Mercaptobenzimidazole 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、最終改正平成 23 年 8 月 30 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)

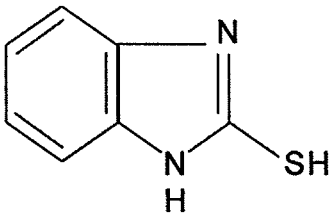
本試験は動物実験委員会の承認を受けている（承認番号：G110154）。

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 2-Mercaptobenzimidazole 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	:	2-Mercaptobenzimidazole
別名	:	2-Benzimidazolethiol
CAS 番号	:	583-39-1
官報公示整理番号	:	(5)-472、(5)-474
構造式及び示性式	:	
		$C_7H_6N_2S$
分子量	:	150.20
物理的状態 (20°C)	:	固体
形状	:	結晶~粉末
色	:	白色~ほとんど白色
融点	:	304°C
溶解性	:	メタノール、エタノールに可溶 アセトンに微溶 水、ベンゼン、クロロホルム、トルエン、n-ヘキサンに難溶
オクタノール/水分配係数	:	1.66
ロット番号	:	3LXCF
純度 (中和滴定)	:	100.1%
入手量	:	75g (25g×3 本)
保存方法	:	冷暗所（実測値：2~8°C）、密栓
保存場所	:	御殿場研究所　被験物質保存室、第 1 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、安定であることを確認した（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	:	カルボキシメチルセルロースナトリウム（以下 CMC-Na と記す。）
規格	:	日本薬局方
メーカー	:	丸石製薬株式会社
ロット番号	:	0507
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所　第 1 研究棟被験物質調製室
選択理由	:	本被験物質は水に難溶であるため、均一な懸濁状態が得られる CMC-Na 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	:	550AJC
力価	:	2mg/vial
保存方法	:	室温、遮光
保存場所	:	御殿場研究所　第 1 研究棟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

6.2.1.1　調製方法

必要量の CMC-Na を秤取して加温した注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号：0A97（予備試験）、1A82（本試験））に加えて分散させ冷却後溶解し、0.5%CMC-Na 水溶液とした。また、本試験では陰性対照用として被験物質を秤取する前に、1 日分ずつ必要な量の媒体を 2 日分褐色ガラス瓶に分注した。

6.2.1.2　保存方法

投与液の調製に使用するまで冷蔵庫内（実測値：4.5~6.5°C（予備試験）、4.6~5.8°C（本試験））に保存した。陰性対照用に分注した媒体は投与液と共に保存し、調製後最大 10 日以内に使用した。

6.2.2　投与液の調製

6.2.2.1　調製方法

各濃度について被験物質を秤取し、乳鉢内で媒体に懸濁して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：4.5~6.1°C（予備試験）、4.0~6.1°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・均一性

0.5%CMC-Na水溶液を媒体とする本被験物質の0.05~200mg/mL濃度液は冷所（冷蔵庫内、許容値：1~10°C）7日間＋室温24時間まで安定かつ均一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-2443、添付資料2）。

6.2.2.4　　被験液の濃度・均一性確認

本試験に使用する前の各被験液の上、中、下層よりそれぞれ10mL採取し、濃度及び均一性を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認した結果、表示値に対する割合は5mg/mL被験液で96.8%、10mg/mL被験液で98.0%、20mg/mL被験液で100.5%、均一性はそれぞれ0.6%、0.6%及び1.5%であり、いずれも評価基準（表示値に対する割合：100±10%、均一性：10%以下）を満たした。なお、HPLC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-2443)で実施された。HPLC測定法の概略を以下に示した。

分析方法の概略

2-Mercaptobenzimidazole

ロット番号：3LXCF

1)　測定実測試料の調製

以下に示すように、各測定試料をマグネチックスターラーで撹拌しながら、n=1で採取し、溶媒で希釈し、測定実測試料を用時調製した。なお、1次希釈では、超音波処理を実施した後、定容とした。

測定試料 (mg/mL)	1次希釈		2次希釈		希釈率
	採取量 (mL)	定容量 (mL)	1次希釈液 採取量 (mL)	定容量 (mL)	
5	1	50	0.5	10	1000
10	1	100	0.5	10	2000
20	1	200	0.5	10	4000

溶媒：アセトニトリル

2)　HPLCシステム

HPLC　　：　2695セパレーションモジュール（Waters Corporation）

検出器　　：　2487デュアルλ UV/VIS検出器（Waters Corporation）

データ処理装置　：　Empower（Waters Corporation）

3)　HPLC 測定条件

カラム　：　Symmetry C18（4.6mm I.D. × 250mm、粒子径 5μm、Waters Corporation）

カラム恒温槽設定温度　：　40°C

移動相　：　精製水／アセトニトリル／リン酸混液（800/200/1、v/v/v）

流量　：　1mL/min

検出　：　UV（測定波長 305nm）

試料注入量　：　10μL

オートサンプラー内設定温度　：　10°C

4)　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 0.1mg/mL 水溶液を調製した。すなわち、MMC（2mg/vial）1 瓶を注射用水[注1] 5mL で溶解した後、2mL を採取して、生理食塩液[注2] を 6mL 加えて 8mL とした。

注 1：　日本薬局方〔（株）大塚製薬工場、ロット番号：1A82〕
注 2：　日本薬局方〔（株）大塚製薬工場、ロット番号：0K92〕

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 18 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・馴化飼育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 15 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 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 32.8~36.6g、雌 24.9~28.3g、本試験が雄 31.9~36.0g であった。群分け後の残余動物は、1 回目の投与日に試験から除外し、炭酸ガス吸入により安楽死させた（予備試験が雌雄各 3 匹、本試験が雄 5 匹）。

注 3： 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 17 匹であったが、実際には雌雄各 18 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。

6.5 飼育条件

動物は温度（許容範囲 23±3°C）が予備試験 21~25°C、本試験 23~24°C、相対湿度（許容範囲 50±20%）が予備試験 47~58%、本試験 45~52%、換気回数 1 時間当たり 10~15 回、照明 1 日 12 時間（07:00~19:00）の飼育室（飼育室番号：予備試験 103 号室、本試験 104 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）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 CRF-1〔オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号:110803（予備試験）、110908（本試験）〕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 434~469、本試験では 708~737 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試験終了日、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）により行い、動物配置図を作成した。

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 10mL/kg 体重とし、マウスにフレキシブル胃ゾンデを用いて、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 0.5%CMC-Na 水溶液を同様に投与した。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 25G の注射針を用いて腹腔内に 1 回投与した。投与容量は 10mL/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

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 2000mg/kg/日とし、以下公比約 3 で除して 600mg/kg/日を高用量、200mg/kg/日を中用量、100mg/kg/日を低用量及び 50mg/kg/日を最低用量とする 5 用量を設定した。1 群当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
最低用量	50	5	10	2	雄 雌	3 3	101~103 111~113
低 用 量	100	10	10	2	雄 雌	3 3	201~203 211~213
中 用 量	200	20	10	2	雄 雌	3 3	301~303 311~313
高 用 量	600	60	10	2	雄 雌	3 3	401~403 411~413
最高用量	2000	200	10	2	雄 雌	3 3	501~503 511~513

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 50、100、200、600 及び 2000mg/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、

2000mg/kg/日投与群の雌雄全例、600mg/kg/日投与群の雄 1/3 例、雌 2/3 例の死亡が確認された。一般状態では、600 及び 2000mg/kg/日投与群で腹臥・横臥がみられた。体重では、600mg/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200mg/kg/日を高用量とし、以下公比 2 で除して、100 及び 50mg/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、雄のみで実施することとした。

なお、MMC の投与量は小核の誘発が報告されている 1mg/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	50	5	10	2	雄	5	2001~2005	約 24 時間 a)
中 用 量	100	10	10	2	雄	5	3001~3005	約 24 時間 a)
高 用 量	200	20	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。

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(8:54~11:14)。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（8:42~9:23）。

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。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 1mL ディスポーザブル注射筒と 23G 注射針を用いて、約 0.1~0.2mL の牛胎児血清（GIBCO BRL、ロット番号：705424）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、

1000rpm 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、試料番号、試験の種類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 40μg/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 490nm 付近の励起光、観察用フィルターとして 515nm 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

2-Mercaptobenzimidazole の 50、100、200、600 及び 2000mg/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、2000mg/kg/日投与群の雌雄各 3 例、600mg/kg/日投与群の雄 1 例、雌 2 例の死亡が確認された。一般状態では、600 及び 2000mg/kg/日投与群の雌雄で腹臥・横臥がみられた。

7.1.2 体重

結果を Appendix 2-1、2-2 に示した。

体重では、600mg/kg/日投与群で減少傾向がみられた。

7.2 本試験

2-Mercaptobenzimidazole の 50、100 及び 200mg/kg/日、陰性対照として 0.5%CMC-Na 水溶液、陽性対照として MMC の 1mg/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。

一般状態では、200mg/kg/日において自発運動の減少が散見された。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 50mg/kg/日投与群で 0.09±0.07%、100mg/kg/日投与群で 0.04±0.04%、200mg/kg/日投与群で 0.13±0.10%を示した。これらの値を陰性対照群の 0.09±0.10%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（$p<0.05$）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

2-Mercaptobenzimidazole 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 50、100、200、600 及び 2000mg/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、2000mg/kg/日投与群の雌雄全例、600mg/kg/日投与群の雄 1/3 例、雌 2/3 例の死亡が確認された。一般状態では、600 及び 2000mg/kg/日投与群で腹臥・横臥がみられた。体重では、600mg/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 200mg/kg/日を高用量とし、以下公比 2 で除して、100 及び 50mg/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 0.5%CMC-Na 水溶液を被験物質投与群と同じ頻度で投与する群、陽性対照としてマイトマイシン C の 1mg/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、2-Mercaptobenzimidazole 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、2-Mercaptobenzimidazole は、復帰突然変異試験で陰性、染色体異常試験では染色体の構造異常が誘発され、陽性の結果が得られている[9, 10]。

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) [redacted] : 化学物質毒性試験報告書, 3, 325(1996).
10) [redacted] : 化学物質毒性試験報告書, 3, 329(1996).

M-1472
添付資料 1 (1/2)

試験番号：M-1472 (1/2)

試験成績書
（被験物質の安定性）

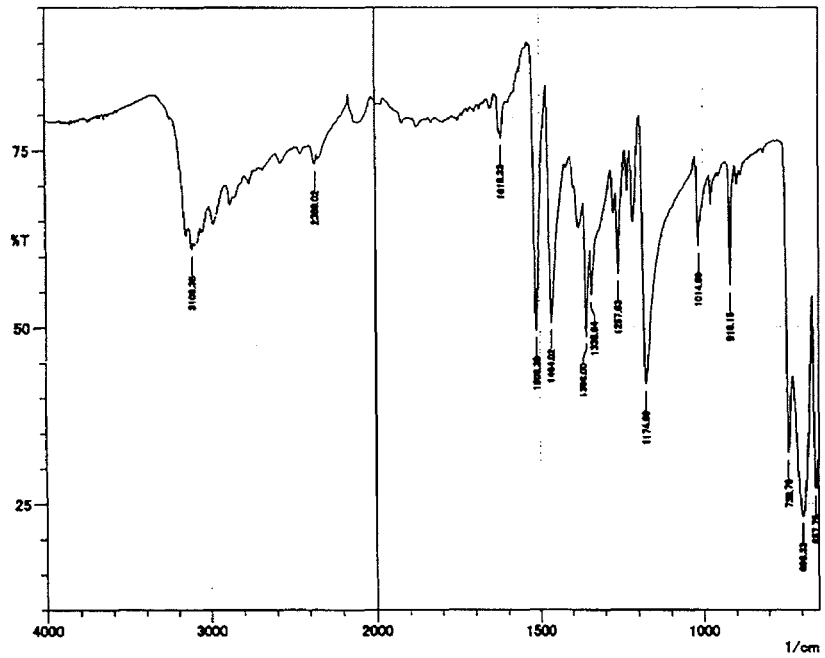
ステージ	：	投与終了後
測定日	：	2012 年 1 月 25 日
被験物質	：	2-Mercaptobenzimidazole（ロット番号；3LXCF）
試験項目	：	赤外吸収スペクトルの確認〔全反射測定法（ATR 法）〕
判定基準	：	参照スペクトル [1]と同様な赤外吸収スペクトルが得られること。
		1)　　：2-Mercaptobenzimidazole の特性試験（株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所、試験番号：A-2434）
結果	：	参照スペクトルと同様な赤外吸収スペクトルが得られた。赤外吸収スペクトルは次のページに示す。
判定	：	適
基準	：	「新規化学物質等に係る試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 1 月 27 日

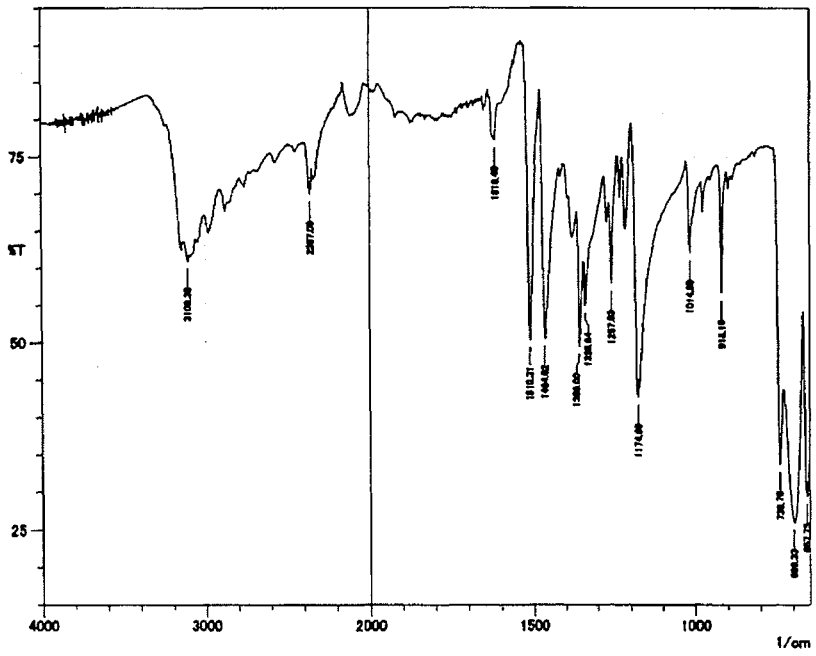
化学分析責任者
株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所

試験番号：M-1472 (2/2)

結果　　：　赤外吸収スペクトル



（投与終了後）



（参照スペクトル）

A-2443

試験成績書 2

試験番号：A-2443

試験成績書
（被験液中 2-Mercaptobenzimidazole の安定性・均一性）

被験物質　：　2-Mercaptobenzimidazole（ロット番号；3LXCF）
形態（媒体）　：　懸濁液（0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液）

評価基準
安定性　：　安定性の指標として残存率｛調製直後の測定濃度の平均値（100）に対する保存後の測定濃度の平均値の割合｝が 100±10.0%以内。
均一性　：　調製直後及び保存した被験液の変動係数（CV）が 10.0%以下。

結果：

調製濃度 (mg/mL)	採取層	測定濃度（mg/mL）		
		調製直後	冷所 4 日間+室温 24 時間保存後	冷所 7 日間+室温 24 時間保存後
0.0500	上層	0.0485	0.0478	0.0476
	中層	0.0484	0.0480	0.0476
	下層	0.0494	0.0480	0.0475
	平均値	0.0487	0.0479	0.0476
	標準偏差	0.0005	0.0001	0.0001
	残存率（%）	100	98.4	97.7
	変動係数（%）	1.0	0.2	0.2
200	上層	200	199	205
	中層	199	180	191
	下層	195	190	205
	平均値	198	190	200
	標準偏差	2	9	8
	残存率（%）	100	96.0	101.0
	変動係数（%）	1.0	4.7	4.0

判定　：　被験液中の 2-Mercaptobenzimidazole は、褐色ガラス瓶中で冷所 7 日間及び室温 24 時間安定かつ均一であった。

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]　2011 年 12 月 9 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 2-Mercaptobenzimidazole in mice

Clinical signs

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	50	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
Middle	100	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	5	5	5	5	5
High	200	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormalities	5	5	4	5	5	3	5
		Decrease in spontaneous movement	0	0	1	0	0	2	0
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 2-Mercaptobenzimidazole in mice

Body weight

Group	Dose (mg/kg/day)		1st administration	2nd administration	1 day after the 2nd administration
Negative control	0	N	5	5	5
		Mean	33.9	34.5	34.7
		S.D.	1.0	1.6	1.7
Low	50	N	5	5	5
		Mean	33.7	34.7	34.8
		S.D.	1.2	1.6	1.6
Middle	100	N	5	5	5
		Mean	33.7	34.3	34.3
		S.D.	1.1	2.0	2.3
High	200	N	5	5	5
		Mean	33.8	34.2	33.4
		S.D.	1.0	1.2	1.4
Positive control [a)] (MitomycinC)	1	N	5	5	5
		Mean	34.0	33.6	33.9
		S.D.	1.3	2.3	2.4

Unit : g

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

Table 3 A micronucleus test of 2-Mercaptobenzimidazole in mice

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

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.	2 ± 2	0.09 ± 0.10	119 ± 9	59.5 ± 4.3
		Min. / Max.		0.00 / 0.25		54.5 / 65.5
Low	50	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	2 ± 1	0.09 ± 0.07	122 ± 11	60.9 ± 5.4
		Min. / Max.		0.00 / 0.15		53.5 / 66.0
Middle	100	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	1 ± 1	0.04 ± 0.04	109 ± 15	54.3 ± 7.3
		Min. / Max.		0.00 / 0.10		42.5 / 61.5
High	200	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	3 ± 2	0.13 ± 0.10	108 ± 21	53.9 ± 10.4
		Min. / Max.		0.00 / 0.25		38.5 / 66.0
Positive control [a] (Mitomycin C)	1	N	5	5	5	5
		Mean ± S.D.	39 ± 15	1.97 ± 0.73	112 ± 13	56.2 ± 6.7
		Min. / Max.		1.05 / 2.55		49.0 / 65.0

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 2-Mercaptobenzimidazole 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	Lowest	50	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	Low	100	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	Middle	200	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	High	600	Number of animals	3	3	3	3	2	2	2
			No abnormalities	3	3	3	2	2	1	0
			Prone/Lateral position	0	0	0	0	0	1	2
			Dead	0	0	0	1	0	0	0
	Highest	2000	Number of animals	3	3	3	3			
			No abnormalities	3	3	0	0			
			Prone/Lateral position	0	0	3	0			
			Dead	0	0	0	3			

Appendix 1-2

A micronucleus test of 2-Mercaptobenzimidazole 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	Lowest	50	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	Low	100	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	Middle	200	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	3	3
	High	600	Number of animals	3	3	3	3	3	3	3
			No abnormalities	3	3	3	3	3	1	1
			Prone/Lateral position	0	0	0	0	0	2	0
			Dead	0	0	0	0	0	0	2
	Highest	2000	Number of animals	3	3	3	3			
			No abnormalities	3	3	0	0			
			Prone/Lateral position	0	0	3	0			
			Dead	0	0	0	3			

Appendix 2-1 A micronucleus test of 2-Mercaptobenzimidazole in mice

Body weight (Preliminary study)

Sex	Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	1st administration	2nd administration	1 day after the 2nd administration
Male	Lowest	50	101	34.4	35.4	34.5
			102	34.2	35.0	35.1
			103	32.8	33.8	32.8
			Mean	33.8	34.7	34.1
			S.D.	0.9	0.8	1.2
	Low	100	201	33.9	35.2	33.5
			202	33.9	35.5	35.0
			203	36.6	37.7	38.8
			Mean	34.8	36.1	35.8
			S.D.	1.6	1.4	2.7
	Middle	200	301	34.6	33.6	32.9
			302	33.1	33.2	33.1
			303	34.2	34.6	33.1
			Mean	34.0	33.8	33.0
			S.D.	0.8	0.7	0.1
	High	600	401	33.9	32.0	30.6
			402	34.9	34.5	33.0
			403	33.6	Dead	
			Mean	34.1	33.3	31.8
			S.D.	0.7		
	Highest	2000	501	34.7	Dead	
			502	33.1	Dead	
			503	34.2	Dead	
			Mean	34.0		
			S.D.	0.8		

Unit : g

Appendix 2-2 A micronucleus test of 2-Mercaptobenzimidazole in mice

Body weight (Preliminary study)

Sex	Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	1st administration	2nd administration	1 day after the 2nd administration
Female	Lowest	50	111	26.9	27.0	27.1
			112	24.9	26.1	24.6
			113	26.9	28.0	26.4
			Mean	26.2	27.0	26.0
			S.D.	1.2	1.0	1.3
	Low	100	211	25.8	27.9	27.4
			212	27.8	29.3	29.5
			213	26.3	27.5	27.2
			Mean	26.6	28.2	28.0
			S.D.	1.0	0.9	1.3
	Middle	200	311	26.0	28.9	29.3
			312	28.3	28.4	29.5
			313	26.2	27.2	25.9
			Mean	26.8	28.2	28.2
			S.D.	1.3	0.9	2.0
	High	600	411	26.9	25.0	Dead
			412	27.3	25.4	Dead
			413	25.7	25.4	25.5
			Mean	26.6	25.3	25.5
			S.D.	0.8	0.2	
	Highest	2000	511	25.7	Dead	
			512	26.8	Dead	
			513	27.4	Dead	
			Mean	26.6		
			S.D.	0.9		

Unit : g

Appendix 3

A micronucleus test of 2-Mercaptobenzimidazole in mice

Clinical signs

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	50	2001	-	-	-	-	-	-	-
		2002	-	-	-	-	-	-	-
		2003	-	-	-	-	-	-	-
		2004	-	-	-	-	-	-	-
		2005	-	-	-	-	-	-	-
Middle	100	3001	-	-	-	-	-	-	-
		3002	-	-	-	-	-	-	-
		3003	-	-	-	-	-	-	-
		3004	-	-	-	-	-	-	-
		3005	-	-	-	-	-	-	-
High	200	4001	-	-	-	-	-	A	-
		4002	-	-	-	-	-	A	-
		4003	-	-	-	-	-	-	-
		4004	-	-	A	-	-	-	-
		4005	-	-	-	-	-	-	-
Positive control [a] (Mitomycin C)	1	5001	-	/	/	-	-	-	-
		5002	-	/	/	-	-	-	-
		5003	-	/	/	-	-	-	-
		5004	-	/	/	-	-	-	-
		5005	-	/	/	-	-	-	-

- : No abnormalities

/ : No observation

A :Decrease in spontaneous movement

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

Appendix 4 A micronucleus test of 2-Mercaptobenzimidazole in mice

Body weight

Group	Dose (mg/kg/day)	Animal number	1st administration	2nd administration	1 day after the 2nd administration
Negative control	0	1001	34.3	35.1	35.8
		1002	35.3	36.5	36.6
		1003	33.3	33.4	33.5
		1004	34.0	34.9	35.2
		1005	32.6	32.5	32.4
		Mean	33.9	34.5	34.7
		S.D.	1.0	1.6	1.7
Low	50	2001	33.5	35.7	35.9
		2002	34.8	36.4	36.0
		2003	34.9	34.9	35.7
		2004	33.6	34.3	34.4
		2005	31.9	32.2	32.2
		Mean	33.7	34.7	34.8
		S.D.	1.2	1.6	1.6
Middle	100	3001	33.5	32.2	33.0
		3002	33.6	34.9	34.5
		3003	34.5	35.9	36.9
		3004	32.0	32.0	31.0
		3005	34.9	36.3	35.9
		Mean	33.7	34.3	34.3
		S.D.	1.1	2.0	2.3
High	200	4001	34.4	35.7	35.5
		4002	33.8	34.5	32.8
		4003	32.4	33.3	32.7
		4004	35.1	34.6	34.1
		4005	33.3	32.7	31.9
		Mean	33.8	34.2	33.4
		S.D.	1.0	1.2	1.4
Positive control [a)] (Mitomycin C)	1	5001	34.2	33.4	33.4
		5002	32.8	30.9	30.9
		5003	33.0	32.6	33.0
		5004	36.0	37.1	37.4
		5005	34.1	33.9	34.7
		Mean	34.0	33.6	33.9
		S.D.	1.3	2.3	2.4

Unit : g

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

Appendix 5

A micronucleus test of 2-Mercaptobenzimidazole in mice

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

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	1	2 ± 2	0.05	0.09 ± 0.10	122	119 ± 9	61.0	59.5 ± 4.3
		1002	5		0.25	(0.00 / 0.25)	109		54.5	(54.5 / 65.5)
		1003	2		0.10		113		56.5	
		1004	1		0.05		120		60.0	
		1005	0		0.00		131		65.5	
Low	50	2001	1	2 ± 1	0.05	0.09 ± 0.07	130	122 ± 11	65.0	60.9 ± 5.4
		2002	3		0.15	(0.00 / 0.15)	132		66.0	(53.5 / 66.0)
		2003	0		0.00		107		53.5	
		2004	2		0.10		114		57.0	
		2005	3		0.15		126		63.0	
Middle	100	3001	0	1 ± 1	0.00	0.04 ± 0.04	123	109 ± 15	61.5	54.3 ± 7.3
		3002	0		0.00	(0.00 / 0.10)	115		57.5	(42.5 / 61.5)
		3003	1		0.05		114		57.0	
		3004	1		0.05		106		53.0	
		3005	2		0.10		85		42.5	
High	200	4001	1	3 ± 2	0.05	0.13 ± 0.10	132	108 ± 21	66.0	53.9 ± 10.4
		4002	5		0.25	(0.00 / 0.25)	118		59.0	(38.5 / 66.0)
		4003	0		0.00		112		56.0	
		4004	3		0.15		100		50.0	
		4005	4		0.20		77		38.5	
Positive control [a] (Mitomycin C)	1	5001	51	39 ± 15	2.55	1.97 ± 0.73	116	112 ± 13	58.0	56.2 ± 6.7
		5002	50		2.50	(1.05 / 2.55)	98		49.0	(49.0 / 65.0)
		5003	26		1.30		100		50.0	
		5004	49		2.45		118		59.0	
		5005	21		1.05		130		65.0	

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

M-1472

信頼性保証書（1/3）

試験番号　：　M-1472

試験表題　：　2-Mercaptobenzimidazole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。

2012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]	2011年11月24日	2011年11月24日
試験計画書変更書（1）		2011年11月29日	2011年11月30日
コンピュータプロトコール		2011年12月21日	2011年12月22日
試験計画書変更書（2）		2012年1月10日	2012年1月10日
調製・保存（被験物質）		2012年1月10日	2012年1月10日
被験液の濃度・均一性確認		2012年1月10日	2012年1月10日
群分け・投与・一般状態の観察		2012年1月16日	2012年1月16日
調製（陽性対照物質）		2012年1月17日	2012年1月17日

M-1472

信頼性保証書（2/3）

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
投与・一般状態の観察（陽性対照物質）	[redacted]	2012年　1月　17日	2012年　1月　17日
骨髄塗抹標本の作製		2012年　1月　18日	2012年　1月　18日
骨髄塗抹標本の観察		2012年　1月　18日	2012年　1月　18日
被験物質の安定性		2012年　1月　25日	2012年　1月　25日
生データ（入荷～標本観察、飼育関係、被験液の濃度・均一性確認、被験物質の安定性）		2012年　2月　3日 2012年　2月　6日 2012年　2月　9日 2012年　2月　10日	2012年　2月　10日
改善確認		2012年　2月　14日	2012年　2月　14日
最終報告書草案・表・付表		2012年　2月　7日 2012年　2月　9日 2012年　2月　10日	2012年　2月　10日
改善確認		2012年　2月　14日	2012年　2月　14日
生データ（被験物質関係）		2012年　3月　13日	2012年　3月　14日
測定レポート（被験液の濃度・均一性確認）		2012年　3月　13日	2012年　3月　14日
最終報告書		2012年　3月　15日	2012年　3月　15日

M-1472

信頼性保証書（3/3）

プロセス調査

項　目	試験番号	担当者	調　査　日	試験責任者 あるいは 部門責任者及び 運営管理者への 報告日
動物入荷	M-1481	[redacted]	2011年12月19日	2011年12月20日
検疫・馴化	M-1481		2011年12月19日	2011年12月20日
	M-1481		2011年12月26日	2011年12月26日
飼育管理	B-7122		2011年10月　7日	2011年10月11日
陽性対照物質の管理	－		2011年11月11日	2011年11月12日

－：該当せず