

目 次

	(頁)
1. 試験表題.....	4
2. 試験番号.....	4
3. 試験目的.....	4
4. 試験施設.....	4
5. 試験委託者.....	4
6. 試験実施期間.....	4
7. 試験責任者.....	5
8. 担当責任者.....	5
9. 業務分担及び試験従事者の氏名.....	5
10. GLP及びガイドライン.....	5
11. 試験関係資料の保存.....	5
12. 要約.....	6
13. 試験材料及び方法.....	7
13.1. 被験物質.....	7
13.2. 被験物質液.....	7
13.3. 陰性対照物質.....	8
13.4. 陽性対照物質.....	8
13.5. 試験細胞.....	8
13.6. S9 mix.....	9
13.7. 細胞増殖抑制試験.....	10
13.8. 染色体異常試験.....	11
13.9. 試験系の識別.....	12
13.10. 試験成立条件.....	12
13.11. 結果の判定.....	12
13.12. 統計学的処理.....	13
14. 試験結果.....	13
14.1. 細胞増殖抑制試験.....	13
14.2. 染色体異常試験.....	13
15. 考察及び結論.....	13
16. 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及び 試験計画書に従わなかったこと.....	13

17. 参考文献.....13

Figure 1 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA

Figure 2 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA in satellite group

Table 1 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA

Table 2 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA in satellite group

Table 3 Chromosomal aberration of CHL/IU cells treated with AcPepA in short-term treatment

Table 4 Chromosomal aberration of CHL/IU cells treated with AcPepA in continuous treatment

1. 試験表題

AcPepA のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験番号

FBM 09-8541

3. 試験目的

AcPepA の安全性評価の一環として、ほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を検討した。

4. 試験施設

スギ生物科学研究所株式会社

(旧：株式会社富士バイオメディックス 小淵沢総合研究所)

〒408-0044 山梨県北杜市小淵沢町 10221 番地

TEL 0551-36-2455 FAX 0551-36-3895

5. 試験委託者

医療法人さわらび会福祉村病院 長寿医学研究所

〒441-8124 愛知県豊橋市野依町山中 19-14

TEL 0532-46-7501 FAX 0532-46-8940

委託担当者：岡田秀親

6. 試験実施期間

試験期間 2009年2月4日 ～ 2009年4月30日

試験開始日 2009年2月4日

細胞増殖抑制試験

細胞播種日 2009年2月9日

被験物質処理 2009年2月12日

毒性評価日 2009年2月13日

染色体異常試験

細胞播種日 2009年2月23日

被験物質処理日 2009年2月26日

標本作製日 2009年2月27日

試験終了日 2009年4月30日

7. 試験責任者

佐藤 福弘
スギ生物科学研究所株式会社 毒性試験部

8. 担当責任者

培養, 標本作製	山中妙子
染色体観察	山中妙子
毒性評価	山中妙子
統計学的処理	正木文夫

9. 業務分担及び試験従事者の氏名

培養, 標本作製	佐藤福弘, 山中妙子, 川口恵未
毒性評価	佐藤福弘, 山中妙子
染色体観察	佐藤福弘, 山中妙子, 川口恵未
被験物質の調製	佐藤福弘, 山中妙子
統計学的処理	正木文夫
被験物質の管理	高橋善康

10. GLP 及びガイドライン

本試験は GLP 非適用とした。

参考ガイドライン：厚生労働省の「遺伝毒性試験ガイドライン」（平成 11 年 11 月 1 日医薬審第 1604 号）

11. 試験関係資料の保存

保存場所：スギ生物科学研究所株式会社 資料保存施設

保存資料：最終報告書（原本），試験計画書（原本），被験物質及び細胞等に関する記録，生データ，試験操作記録，標本，その他記録文書

保存期間：本試験終了後 5 年間保存。その後の措置については試験委託者と協議の上決定する。

12. 要約

チャイニーズハムスター雌肺由来の細胞 CHL/IU を用いて、短時間処理法の代謝活性化系非存在下、代謝活性化系存在下並びに連続処理法の 3 処理法により、AcPepA の細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験を行った。

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、染色体異常試験の群構成を、短時間処理法、連続処理法ともに最高用量を 4000 µg/mL とし、2000, 1000 及び 500 µg/mL の 4 用量とした。さらに、それぞれに陰性及び陽性対照群を設けた。

標本観察対象用量は、短時間処理法、連続処理法ともに 4000, 2000 及び 1000 µg/mL とした。

その結果、短時間処理法、連続処理法ともに、構造異常及び数的異常の増加は認められなかった。

以上の結果、AcPepA は CHL/IU 細胞の染色体に対して染色体異常を誘発しないと結論した。

13. 試験材料及び方法

13.1. 被験物質

名称：AcPepA

ロット番号：2K08045

受領日：2009年1月30日

供給元：株式会社バイオロジカ (NeoMPS)

性状：凍結乾燥品 (GMP 製造品), 白色粉末

含量：97.7% (100%として使用した)

分子量：1635.9

溶解性：生理食塩水に 4 mg/mL 溶解

保存条件：冷凍 (-20°C 以下), 遮光, 気密

保存場所：研究本館 検体調製室 メディカルフリーザー (設定温度：-30°C, 許容範囲：
-40～-20°C)

実測温度 (-32～-28°C, 2009年1月30日～2009年2月26日)

取扱い上の注意：マスク及び手袋を着用した。

残余被験物質の管理：実験終了後, 被験物質管理責任者に移管した。

13.2. 被験物質液

13.2.1. 媒体

培養液を用いた。

13.2.2. 被験物質液の調製

被験物質は用時調製とし, 溶解性が生理食塩水に 4 mg/mL より処理用量の1倍濃度を調製した。(13.7.1., 13.8.1. 群構成参照)

細胞増殖抑制試験では, 被験物質 160.11 mg を秤量し, 媒体を加えて 4 mg/mL 液を調製した。公比 $\sqrt{10}$ で希釈し, 4, 1.26, 0.400, 0.126, 0.040, 0.0126, 0.004 及び 0.00126 mg/mL の計 8 段階の濃度液を調製した。

染色体異常試験では 400.19 mg を秤量し媒体を加えて, 4 mg/mL 液を調製した。公比 2 で希釈し短時間処理法, 連続処理法で計 4 段階の濃度液 (4, 2, 1 及び 0.5 mg/mL) を調製した。

13.2.2.1. 残余被験物質液の処理

焼却処分した。

13.3. 陰性対照物質

媒体を用いた。

13.4. 陽性対照物質

13.4.1. 代謝活性化系非存在下

名称：Mitomycin C（以下，MMCと略す）

製造発売元：Sigma-Aldrich Inc.

ロット番号：075K1923

13.4.2. 代謝活性化系存在下

名称：Cyclophosphamide（以下，CPと略す）

製造発売元：Sigma-Aldrich Inc.

ロット番号：076K1050

13.4.3. 陽性対照物質の選択理由及び調製

既知の染色体異常誘発物質であり，陽性対照に広く利用されているため選択した。処理濃度は細胞に対して陽性反応を示す濃度とした。陽性対照物質は下表の通りとし，生理食塩液に溶解し，超低温槽（ -80°C ）に凍結保存したものを用時に解凍して培養液にその 1/100 容量を添加した。

処理方法	陽性対照物質	最終処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
短時間処理法 代謝活性化系非存在下	MMC	0.05
短時間処理法 代謝活性化系存在下	CP	5.0
連続処理法 代謝活性化系非存在下	MMC	0.05

13.5. 試験細胞

13.5.1. 使用細胞株及び選択理由

本細胞株チャイニーズハムスター雌肺由来の CHL/IU 細胞（継代数 14）は，大日本住友製薬株式会社から 2006 年 11 月 21 日に購入し，継代数 20 の細胞を試験に使用した。細胞周期は約 15.7 時間，マイコプラズマ陰性及び染色体数モード 25 本のもを使用し

た。本細胞株は、遺伝毒性試験ガイドラインで推奨されているため使用した。

13.5.2. 培養液及び培養条件

Eagle の MEM の液体培地 (Invitrogen Corporation) にペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (Invitrogen Corporation, 50 mg/L) を 1% 及び仔牛血清 (Lot No. 683862, Invitrogen Corporation) を 10% の割合で添加したものを培養液とした。培養容器は 60 mm プレートを用いて、37°C, CO₂ 濃度 5% で培養した。

13.6. S9 mix

13.6.1. S9

製造後 6 ヶ月以内の S9 (Lot No. 08103108, オリエンタル酵母工業株式会社) を試験に使用した。S9 の調製方法 (製品説明書) を以下に示す。

使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) 及び 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量 及び 投与回数	PB: 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2~4 日目) BF: 80 mg/kg 1 回 (3 日目)
投与方法	腹腔内投与

13.6.2. コファクターの調製

以下の割合で調製し、氷冷下で保存した。

20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	2 mL
50 mmol/L MgCl ₂	1 mL
330 mmol/L KCl	1 mL
50 mmol/L G-6-P	1 mL
40 mmol/L NADP	1 mL
注射用水	1 mL

13.6.3. S9 mix の調製

用時にコファクターと S9 を 7 : 3 の割合で混合した。S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した。

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol

培養液中の S9 濃度を 5% とした。(培養液中の S9 蛋白量は 1.10 mg/mL であった)

13.7. 細胞増殖抑制試験

13.7.1. 群構成

染色体異常試験における最高用量を設定するために、細胞増殖抑制試験を行った。

細胞増殖抑制試験の最高用量は、4000 μg/mL とし、以下公比 $\sqrt{10}$ で 1260, 400, 126, 40.0, 12.6, 4.00 及び 1.26 μg/mL の計 8 用量を設定した。また、陰性対照群を設けた。

13.7.2. 処理法

4×10³ 細胞/mL の細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養後、短時間処理法の代謝活性化系非存在下と代謝活性化系存在下並びに連続処理法(代謝活性化系非存在下)により処理した。連続処理法の処理時間は、細胞周期(15.7 時間)の 1.5 倍となる約 24 時間とした。被験物質液による処理は培養液を全量交換することによって行った。1 用量あたり 60 mm プレート 2 枚を用いた。

1) 短時間処理法 代謝活性化系非存在下

培養液を全量抜き取り、被験物質液を 3 mL 添加し、細胞を 6 時間処理培養した後、ダルベッコリン酸緩衝液 (pH 7.1, Invitrogen Corporation, 以下 PBS) で洗い、培養液 5 mL を加え、更に 18 時間回復培養した。

2) 短時間処理法 代謝活性化系存在下

培養液を全量抜き取り、S9 mix 0.5 mL 及び被験物質液を 2.5 mL を加え、細胞を 6 時間処理培養後、PBS で洗い、培養液 5 mL を加え、更に 18 時間回復培養した。

3) 連続処理法

培養液を全量抜き取り、被験物質液を 5 mL 添加し、細胞を 24 時間連続処理培養した。

被験物質添加時及び培養処理終了時に被験物質の析出の有無を確認した。

13.7.3. 毒性評価

培養終了後、培養液に生細胞数測定試薬を添加した。培養器内で約3時間呈色反応を行った後、96ウェルプレートに100 µLずつ分注した。マイクロプレートリーダーを用い、吸光度を測定し、ホルマザン量(WST-8)を算出した。用量あたりの平均ホルマザン量より、陰性対照群を100%として被験物質群の細胞増殖率を算出し、細胞増殖率50%を挟む2点間を結ぶ直線から、概略の50%細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)を求めた。

13.8. 染色体異常試験

13.8.1. 群構成

細胞増殖抑制試験の結果、IC₅₀は、短時間処理法、連続処理法ともに4000 µg/mLを超える用量であった。従って、染色体異常試験の用量は、短時間処理法、連続処理法ともに、最高用量を4000 µg/mLとし、2000、1000及び500 µg/mLの計4用量を設定した。また、陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

13.8.2. 処理法

13.7.2.と同じ方法で、3系列の処理培養を行った。1用量あたり60 mmのプレートは4枚を用い、2枚は標本作製に、2枚はサテライト群とし毒性評価に用いた。陽性対照群はプレート2枚とし標本作製のみに用いた。

13.8.3. 染色体標本作製

被験物質液処理開始後、約24時間後(正常細胞周期の約1.5周期に相当)に標本作製した。コルセミドを添加し、分裂期の細胞を蓄積した。0.1%EDTA添加1.25%トリプシン処理し、遠心分離(1000 rpm, 5分)により細胞を回収した。次に0.075 mol/L塩化カリウム液を加え、カルノア液で固定し、細胞をスライドガラス上で風乾した。プレート当たり3枚の標本作製を作り、2%ギムザ液(MERCK)(1/15 mol/Lリン酸塩緩衝液pH 6.8, 和光純薬工業株式会社で調製)で染色した。

13.8.4. サテライト群の毒性評価

染色体異常試験において毒性を評価するために、1用量あたりプレート2枚をサテライト群とし、細胞増殖抑制試験と同じ方法(13.7.3.)で評価した。

13.8.5. 染色体観察の対象群

短時間処理法，連続処理法ともに 4000 µg/mL を最高用量とし，2000 及び 1000 µg/mL の連続する 3 用量を観察の対象とした。また，それぞれの陰性対照群及び陽性対照群についても観察対象とした。

13.8.6. 染色体観察

染色体の構造異常は 1 プレート当たり 100 個，1 用量につき計 200 個の分裂中期細胞（染色体数：23～27 本）を 1000 倍の顕微鏡下で観察した。数的異常は 200 倍の顕微鏡下で 1 プレート当たり 200 個，1 用量につき計 400 個を観察した。

染色体の構造異常については染色分体型切断 (ctb)，染色分体型交換 (cte)，染色分体型切断 (csb)，染色分体型交換 (cse) 及びその他（断片化 (frg)，多数の異常 (mul)）などを観察した。ギャップ (gap) も観察したが，構造異常の集計は，ギャップのみを持つ細胞を除いた場合 (-gap) と加えた場合 (+gap) とに分けた。試験の評価はギャップのみを持つ細胞を除いた出現頻度 (-gap) とした。

数的異常においては倍数体 (pol) 及び核内倍加 (end) を観察した。倍数体は染色体モード数が 38 本以上のものを倍数体 (pol) と判定した。

13.9. 試験系の識別

スライドグラスに試験番号，処理系列，被験物質名，用量，プレート番号及び標本作製日のラベルを貼付した。

13.10. 試験成立条件

以下の 1)，2) が成立したので，試験結果の評価を行った。

- 1) 構造異常を持つ分裂中期細胞の出現頻度が，陰性対照群で 5% 未満，陽性対照群で 10% 以上認められること。
- 2) 被験物質処理群において分裂中期細胞を 200 個観察した用量が 3 用量あること。

13.11. 結果の判定

観察により，構造異常を有する細胞（ギャップは除く）が 5% 以上の出現頻度を示し， χ^2 検定及び用量依存性検定とともに陰性対照群に対して，統計学的に有意に増加した場合，石館らの判定基準¹⁾より疑陽性（5～9%）または陽性（10% 以上）と判定した。

数的異常は，倍数体を有する出現頻度が陰性対照群に対して，統計学的に有意に増加した場合を陽性と判定した。

13.12. 統計学的処理

異常細胞の出現頻度については Microsoft[®] Excel, version 2003 を用いて平均値を算出した。統計解析は Microsoft[®] windows 版 SAS[®]9.1.3 を用いて実施した。

短時間処理法、連続処理法ともに構造異常を有する細胞が 5%未満であったので、統計学的検定は実施しなかった。倍数体を持つ細胞の出現頻度について、Yates の補正を伴う χ^2 検定により、陰性対照群と被験物質処理群の差を有意水準片側 5%で解析した。

14. 試験結果

14.1. 細胞増殖抑制試験

細胞増殖率の結果を Figure 1, Table 1 に示した。

IC₅₀ 値は短時間処理法、連続処理法ともに 4000 µg/mL を超える値であった。

被験物質の析出はすべての用量で観察されなかった。

14.2. 染色体異常試験

細胞増殖率を Figure 2, IC₅₀ 値を Table 2 に、染色体異常の観察結果を Table 3, Table 4 に示した。

短時間処理法、連続処理法ともに構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群と被験物質処理群はいずれも 5%未満であった。倍数体を有する細胞の出現頻度については、陰性対照群に対して、被験物質処理群は差がなかった。

被験物質の析出はすべての用量で観察されなかった。

15. 考察及び結論

短時間処理法、連続処理法ともに構造異常及び数的異常を有する細胞の出現頻度の増加はいずれにおいても認められなかった。

以上の結果、本試験条件下で、AcPepA は CHL/IU 細胞に対して染色体異常を誘発しないと判断した。

16. 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及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。

17. 参考文献

- 1) 石館基 監修；改訂染色体異常試験データ集，エル・アイ・シー社，1987。

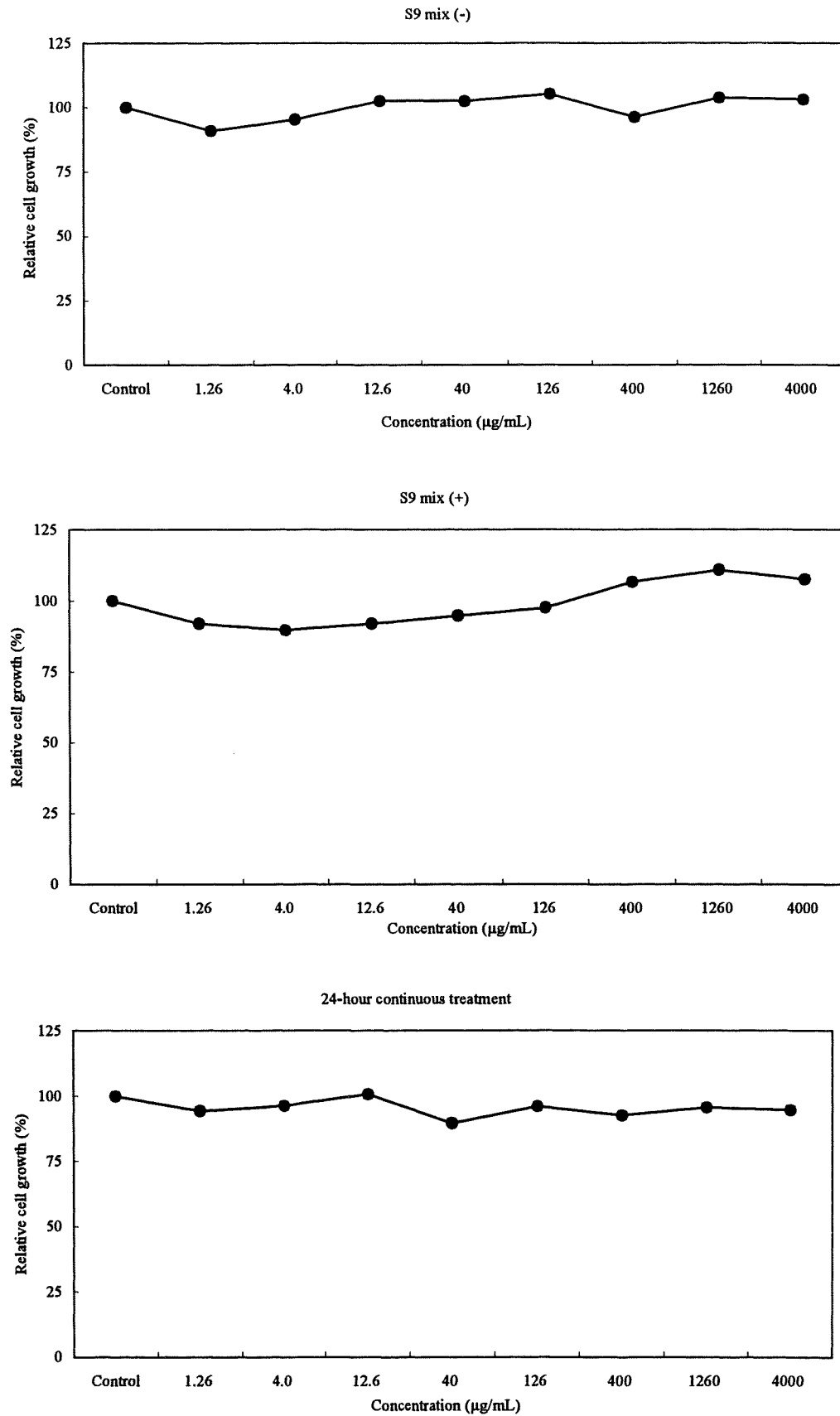


Figure 1 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA

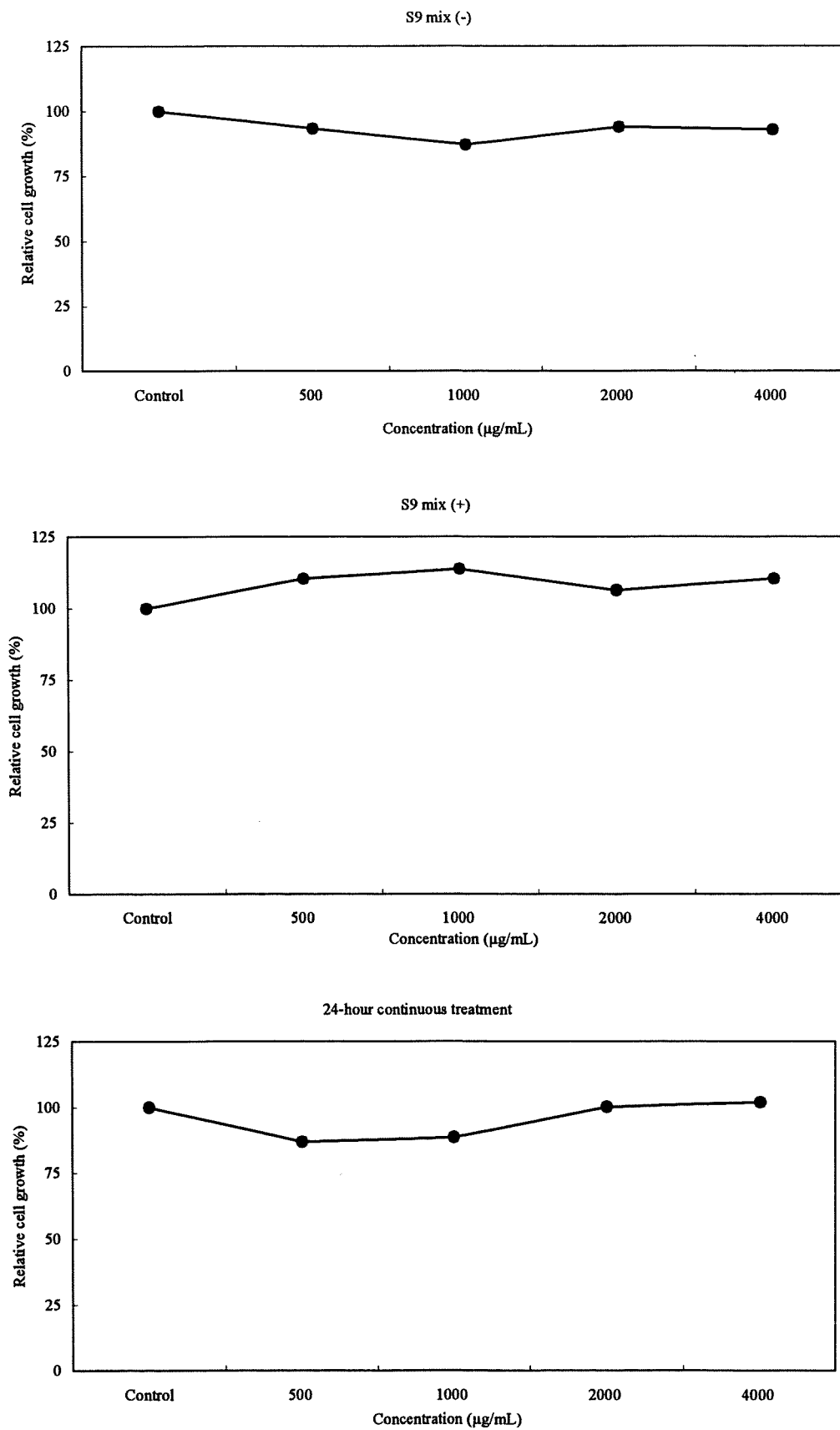


Figure 2 Cell growth inhibition of CHL/TU cells treated with AcPepA in satellite group

Table 1 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA

Concentration (µg/mL)	Short term treatment											
	S9 mix (-)						S9 mix (+)					
	WST-8 value	Mean	Relative cell growth (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	WST-8 value	Mean	Relative cell growth (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	WST-8 value	Mean	Relative cell growth (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
0 ^b	0.175	0.161	100.0		0.229	0.231	100.0		0.139	0.149	100.0	
	0.147				0.233				0.159			
1.26	0.142	0.147	91.0		0.213	0.213	92.0		0.135	0.141	94.3	
	0.151				0.212				0.146			
4.0	0.151	0.154	95.3		0.203	0.207	89.6		0.133	0.144	96.3	
	0.156				0.211				0.154			
12.6	0.163	0.165	102.5		0.204	0.213	92.0		0.137	0.150	100.7	
	0.167				0.221				0.163			
40	0.157	0.165	102.5	>4000	0.230	0.219	94.8	>4000	0.134	0.134	89.6	>4000
	0.173				0.208				0.133			
126	0.159	0.170	105.3		0.218	0.226	97.6		0.144	0.143	96.0	
	0.180				0.233				0.142			
400	0.147	0.155	96.3		0.239	0.247	106.7		0.137	0.138	92.6	
	0.163				0.254				0.139			
1260	0.161	0.167	103.7		0.258	0.256	110.8		0.138	0.143	95.6	
	0.173				0.254				0.147			
4000	0.158	0.166	103.1		0.249	0.249	107.6		0.140	0.141	94.6	
	0.174				0.248				0.142			

WST-8: Indication of cell survival

WST-8 value: The amount of WST-8 was converted from a measured value at 450 nm by a microplate-reader, mean of eight wells.

^b : Culture medium was used as vehicle.

Table 2 Cell growth inhibition of CHL/TU cells treated with AcPepA in satellite group

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Short term treatment						24-hour continuous treatment					
	S9 mix (-)			S9 mix (+)			WST-8 value	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Relative cell growth (%)	Mean	Relative cell growth (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	WST-8 value	Mean	Relative cell growth (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	WST-8 value	Mean						
0 ^{b)}	0.253	0.227	100.0	>4000	0.284	0.275	100.0	0.202	0.176	100.0	>4000	
500	0.200	0.212	93.4	>4000	0.265	0.303	110.4	0.149	0.153	86.9	>4000	
1000	0.217	0.198	87.2	>4000	0.307	0.313	113.8	0.152	0.156	88.6	>4000	
2000	0.206	0.213	94.0	>4000	0.299	0.292	106.4	0.153	0.176	100.3	>4000	
4000	0.200	0.211	92.9	>4000	0.323	0.303	110.4	0.146	0.179	102.0	>4000	
	0.195				0.302			0.165				
	0.218				0.300			0.175				
	0.208				0.284			0.177				
	0.218				0.311			0.184				
	0.203				0.295			0.174				

WST-8: Indication of cell survival

WST-8 value: The amount of WST-8 was converted from a measured value at 450 nm by a microplate-reader, mean of eight wells.

^{b)} : Culture medium was used as vehicle.

Table 4 Chromosomal aberration of CHL/TU cells treated with AcPepA in continuous treatment

Treatment time	Concentration (µg/mL)	Relative cell growth (%)	Number of cells showing structural aberrations										Total (%)			Number of cells showing numerical aberrations			Final judgment	
			observed	gap	ctb	csb	cte	cse	others	total	-gap	+gap	observed	pol	end	Total (%)	SA	NA		
24 hr	0 ^{b)}	100	100	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	200	1	0	1			
			100	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	200	1	0	1			
			Total 200	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	400	2	0	2	(1.0)	(1.0)	(0.5)
	500	83.4		(not observed)																
	1000	81.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	0			
			100	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	200	4	0	4			
			Total 200	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	400	4	0	4	(0.5)	(0.5)	(1.0)
	2000	91.1	100	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	200	3	0	3			
			100	0	0	1	0	2	0	0	0	3	0	200	0	0	0			
			Total 200	0	0	1	1	2	0	0	4	4	0	400	3	0	3	(2.0)	(2.0)	(0.8)
4000	94.0	100	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	200	2	0	2				
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	1	1				
		Total 200	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	400	2	1	3	(0.5)	(0.5)	(0.8)	
MMC 0.05	-	100	1	20	1	27	2	0	0	37	0	0	200	1	0	1				
		100	0	14	0	19	0	2	2	29	0	0	200	0	0	0				
		Total 200	1	34	1	46	2	2	2	66	0	0	400	1	0	1	(33.0)	(33.0)	(0.3)	

^{b)}: Culture medium was used as vehicle.

MMC: Mitomycin C,

ctb: chromatid break, csb: chromosome break, cte: chromatid exchange, cse: chromosome exchange, others: multiple aberration, pol: polyploids, end: endoreduplication

SA: structural aberration, NA: numerical aberration

No significant difference was found between the negative control and AcPepA treated groups by χ^2 test (numerical aberration)


最終報告書

試験表題：AcPepA のラット小核試験

試験番号：FBM 09-8542

スギ生物科学研究所株式会社

試験責任者署名：

川口 恵未 
川口 恵未

2009 年 4 月 21 日

本報告書は表紙を含む 16 枚

目次

	(頁)
1. 試験表題.....	4
2. 試験番号.....	4
3. 試験目的.....	4
4. 試験施設.....	4
5. 試験委託者.....	4
6. 試験実施期間.....	4
7. 試験責任者.....	5
8. 担当責任者.....	5
9. 試験の基準及びガイドライン.....	5
10. 動物倫理.....	5
11. 試験関係資料の保存.....	5
12. 要約.....	6
13. 試験材料及び方法.....	7
13.1. 被験物質.....	7
13.2. 投与液.....	7
13.3. 陰性対照物質.....	7
13.4. 使用動物及び飼育環境.....	7
13.5. 個体及びケージの識別方法.....	8
13.6. 群分け.....	8
13.7. 群構成及び投与量.....	9
13.8. 投与量の設定理由.....	9
13.9. 被験物質及び媒体の投与.....	9
13.10. 骨髄塗抹標本作製.....	9
13.11. 観察及び測定.....	10
13.12. 試験成立条件.....	11
13.13. 統計学的処理.....	11
14. 試験結果.....	11
14.1. 生死及び一般状態.....	11
14.2. 体重.....	11
14.3. 骨髄塗抹標本観察.....	11
15. 考察及び結論.....	12