

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

④マウスを用いた強制経口投与による 2 年間発がん性試験

(参考資料 14-1)

米国 National Toxicity Program 報告書

試験機関: Frederick Cancer Research Center

報告書作成年: 1985 年

検体の純度: 92% (シス体 45%、トランス体 47%)

(Epichlorohydrin 1.0%及び 1,2-dichloropropane 2.5%含む)

供試動物: B6C3F₁ マウス、1 群雌雄各 50 匹

投与開始時 6~10 週齢、平均体重; 雄 21.0 g、雌 16.3 g

投与期間: 2 年間 (1978 年 7 月 7 日~1980 年 7 月 2 日)

投与方法: 検体をコーンオイルに溶解し、0、50 及び 100 mg/kg の用量を 5.0 mL/kg の容量で 1 週間に 3 回、104 週間にわたり強制経口投与した。投与液は投与日に調製した。

投与量設定根拠:

初期の短期試験結果の主に体重減少の影響に基づいて設定した。

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び生存率; 一般状態及び生死を 1 日 2 回観察し、触診を週 1 回実施した。

試験終了時の生存率を下表に示す。

性別	雄			雌		
	0	50	100	0	50	100
投与量 (mg/kg)	0	50	100	0	50	100
供試動物数	50	50	50	50	50	50
最終屠殺以前の死亡数 (切迫殺含み) a	42	22	19	4	5	14
事故死亡数	0	1	0	0	3	1
最終屠殺期間中死亡数	4	0	2	0	3	1
最終屠殺数	4	28	29	46	42	35
生存率 (P 値) b	<0.001	<0.001	<0.001	0.006	0.991	0.015 ↑

a: 最終屠殺は、雄で 105~107 週に、雌で 106~107 週に実施した。

b: Tarone 生命表 (一対比較) ↑: p < 0.05

溶媒対照群雄動物 39 例が心筋炎 (化膿性炎症) で死亡 (25 例は投与 48~51 週に死亡) し、試験終了時まで 42 例が死亡したことから、雄マウスの試験は不適切と判断された。細菌感染が原因と推測されるが、原因は不明であった。

50 mg/kg 群雄 13 例、100 mg/kg 群雄 5 例が心筋炎で死亡した。

100 mg/kg 群雌の死亡率が溶媒対照群と比較して有意に高値であったが、心筋炎の動物はなかった。

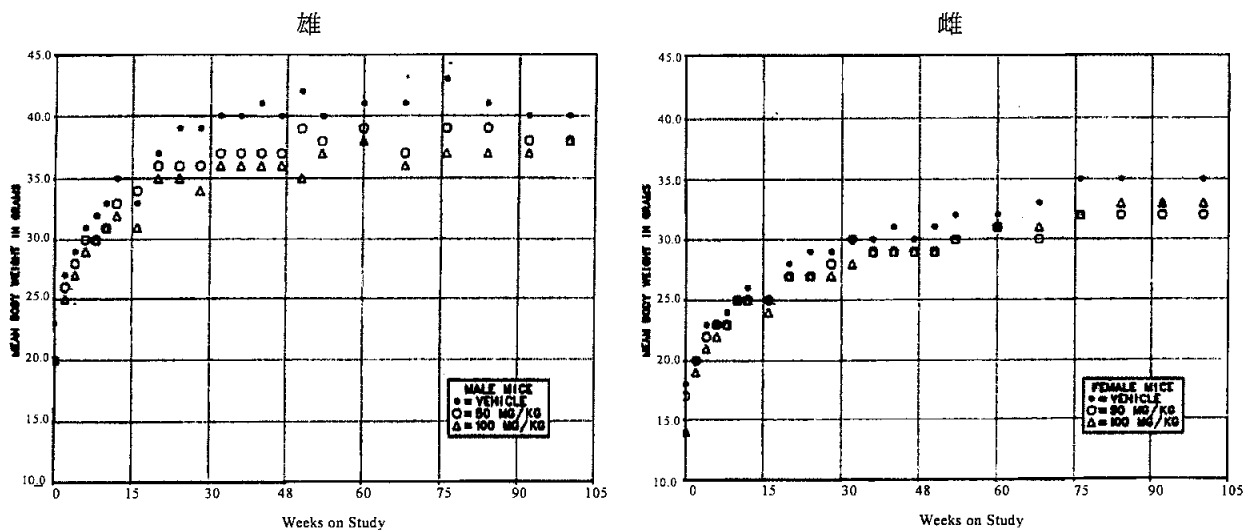
一般状態に顕著な変化は認められなかった。

体重変化；体重を週 1 回測定した。

無作為化の失敗により、投与群の初期体重の平均値が溶媒対照群より 6~22%低値であった。検体投与群は試験期間を通じ溶媒対照群より低値を示し、最終体重は溶媒対照群と比較して 5%低値（50 mg/kg 群雌は 9%低値）であった。

この不一致は試験の結論を損なわないと考えられた。

体重変化のグラフを次に示す。



病理組織学的検査；途中死亡動物、切迫屠殺及び試験終了時の全生存例につき剖検を行い、次の臓器及び組織について、病理組織学的検査を行った。

脳（大脳及び小脳）、下垂体、唾液腺、甲状腺、上皮小体、胸腺、心臓、気管、肝臓、胆嚢、腎臓、肺及び気管支、脾臓、副腎、膵臓、食道、胃、小腸（1切片）、結腸、膀胱、前立腺/精巣、卵巣/子宮、乳腺、リンパ節（下顎、腸間膜）、大腿骨（骨髄を含む）、皮膚

[非腫瘍性病変]

認められた主要な非腫瘍性病変を表 1 に示す。

検体投与群において雌に前胃の上皮過形成が、さらに雌雄に膀胱粘膜上皮過形成の用量依存的な増加が認められた。

また、検体投与群雌で水腎症が用量依存的に増加したが、雄では対照群 1 例に見られたのみであった。

100 mg/kg 群雌に見られた水腎症 14 例の内 8 例に膀胱の移行上皮がん、他の水腎症 6 例の内 3 例に膀胱上皮過形成が見られたことから、水腎症は膀胱の障害による二次的なものと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

性別		雄			雌		
臓器	所見/投与群 (mg/kg)	0	50	100	0	50	100
前胃	上皮過形成	0/50	0/50	4/50	1/50	1/50	21/50
膀胱	上皮過形成	0/50	9/50	18/50	2/50	15/50	19/48
腎臓	水腎症	1/50	0/50	0/50	0/50	2/50	14/50

統計解析は実施しなかった。

[腫瘍性病変]

認められた全ての腫瘍性病変を表 2 に示す。

検体投与群雌で膀胱の移行上皮がんの発生が、用量依存的に有意に増加した。この膀胱移行上皮がんはマウスではまれ（背景対照値；雄：0/1033、雌：0/1025）で、100 mg/kg 群雄 2 例にも見られ、膀胱上皮過形成も増加していることから、検体投与に関連したものであることを示唆している。

100 mg/kg 投与群雌で肺胞/細気管支腺腫が有意に増加した。検体投与群雄も増加を示したが、この腫瘍は遅発性で溶媒対照群の多数が早期死亡しており、対照群との比較ができなかった。

検体投与群雌雄の胃の扁平上皮乳頭腫が、背景データ（雄雌それぞれ 7/1055、4/1077）より高頻度であり、検体と胃の扁平上皮との相互作用によるものと思われた。

50 mg/kg 群雌で肝細胞腺腫又は肝細胞がんが対照群と比較して有意に増加したが、100 mg/kg 群では増加していないので検体投与関連ではないと考えられた。

性別		雄			雌		
臓器	所見/投与群 (mg/kg)	0	50	100	0	50	100
膀胱	移行上皮がん	0/50	0/50	2/50	0/50	↑8/50	↑↑21/48
肺	肺胞/細気管支腺腫	1/50	11/50	9/50	0/50	3/50	↑8/50
	肺胞/細気管支腺がん	0/50	2/50	3/50	2/50	1/50	0/50
	肺胞/細気管支腺腫+がん	1/50	13/50	12/50	2/50	4/50	↑8/50
胃 + 前胃	扁平上皮乳頭腫	0/50	2/50	3/50	0/50	1/50	2/50
	扁平上皮がん	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	2/50
	扁平上皮乳頭腫+がん	0/50	2/50	3/50	0/50	1/50	4/50
肝臓	肝細胞腺腫	1/50	1/50	3/50	0/50	↑5/50	3/50
	肝細胞がん	4/50	6/50	10/50	1/50	3/50	0/50
	肝細胞腺腫+がん	5/50	7/50	13/50	1/50	↑8/50	3/50

雌のみ Fisher の正確確率検定 ↑ : p<0.05、↑↑ : p<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

以上の結果より、本試験における検体のマウスに対する強制経口投与による 2 年間慢性毒性及び発がん性試験における影響として、雌に胃及び膀胱の上皮過形成の用量依存的な増加、膀胱移行上皮がん、胃の扁平上皮乳頭腫又は扁平上皮がん及び肺の肺胞/細気管支腺腫/がんが増加し、いずれも検体投与によるものと思われた。

本試験では試験終了時まで雄の溶媒対照群 42 例が死亡したため、雄マウスの試験は不適切と判断されたが、ピアレビューにより過半数の承認が得られたことから、膀胱移行上皮がん、胃の扁平上皮乳頭腫並びに肺の肺胞/細気管支腺腫/がんの増加が検体投与に関連した徴候であると結論づけた。

考察 (補足)

1,2-dichloropropane 及び epichlorohydrin の潜在的影響 :

本検体中には、1,2-dichloropropane 及び epichlorohydrin が、それぞれ 2.5%及び 1.0%含まれていた。この両物質は発がん性を有することが知られている (Laskin ら, 1980 ; Konishi ら, 1980 : NTP, 1985) 。

変異原性 :

本検体により S9 存在下及び非存在下で *Salmonella* TA100、TA1535 及び TA1978 菌株で変異原性が認められた (De Lorenzo et al., 1977) 。

一方、Talcott and King (1984)により、本検体の有効成分である 1,3-dichloropropene の精製物を検体として *Salmonella typhimurium* TA100 株を用いて変異原性試験を実施したところ、変異原性は認められなかった。極性不純物である epichlorohydrin では、*Salmonella* で変異原性が認められた (McCann et al., 1975; Stolzenberg and Hine, 1980) 。

これらの結果から 1,3-dichloropropene 製剤の変異原性は 1,3-dichloropropene によるものではなく、不純物によることを示唆している。

構造/活性との関連 :

Chu and Milman (1981)が vinyl chloride (1,3-dichloropropene の構造類似体)、epichlorohydrin などを用いた発がん性データを再調査したところ、少なくとも 1 試験で発がん性が認められた。これら化学物質の発がん性については議論があるが、いずれも構造的に炭素鎖の短い小分子であり、塩素化されている。Epichlorohydrin は直接作用化合物で、強制経口投与により前胃に腫瘍が生じる。1,3-dichloropropene は反応性のあるアリル炭素を有し、前胃の腫瘍を誘発する原因となりうる。さらに、炭素-炭素間の二重結合で代謝活性化が生じる。適用場所から離れた部位での腫瘍発生は反応中間体の形成と関連している可能性がある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

表 1 非腫瘍性病変

検査時期	性別		雄			雌			
	投与群 (mg/kg)		0	50	100	0	50	100	
全動物	臓器	所見\検査動物数	50	50	50	50	50	50	
	心臓	化膿性炎症	39	13	5	0	0	0	
		壊死	21	10	6	0	0	0	
		出血	4	7	6	0	0	0	
	肝臓	中心壊死	22	9	5	1	0	1	
	胃	上皮過形成	0	0	4	1	1	21	
	腎臓	水腎症	1	0	0	0	2	14	
		慢性炎症	3	12	3	16	9	13	
		腎盂化膿性炎症	0	0	1	0	0	0	
		腎盂壊死性炎症	0	0	0	0	0	1	
	脳	鉍質沈着	8	21	25	30	18	17	
		出血	11	2	1	0	0	1	
	骨髄	骨髄線維症	0	0	0	46	48	39	
	腸間膜リンパ節	出血	0	2	7	0	0	0	
	物	臓器	所見\検査動物数	50	50	50	50	50	48
		膀胱	上皮過形成	0	9	18	2	15	19
			慢性炎症	0	0	1	15	15	1
			化膿性炎症	1	0	2	0	1	1
		臓器	所見\検査動物数	50	50	50	48	50	50
		唾液腺	慢性炎症	14	28	21	31	28	28
		臓器	所見\検査動物数	-	-	-	50	50	49
		子宮	内膜嚢胞状過形成	-	-	-	23	28	25
			過形成	-	-	-	4	3	9
		臓器	所見\検査動物数	-	-	-	50	50	48
	卵巣	卵嚢胞	-	-	-	5	2	6	

統計解析は実施しなかった。

-: 対象臓器なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

表 2 腫瘍性病変

検査時期	性 別		雄			雌		
	投与群 (mg/kg)		0	50	100	0	50	100
死 ・ 切 迫 殺	臓器	所見\検査動物数	42	22	19	4	5	14
	皮下組織	平滑筋肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0
		骨肉腫 (M)	0	0	0	1	0	0
	肺	腺がん (M)	0	0	1	0	0	0
		肺胞/細気管支腺腫 (B)	1	4	3	0	0	1
		肺胞/細気管支腺がん (M)	0	0	2	0	0	0
	造血系 多臓器	悪性リンパ腫 (M)	0	1	0	0	3	2
		組織球性リンパ腫 (M)	0	0	0	1	0	0
	リンパ節	悪性リンパ腫 (M)	0	1	0	0	0	0
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)	1	0	1	0	1	1
		肝細胞がん (M)	3	1	3	0	0	0
		血管肉腫 (M)	0	0	0	1	0	0
	臓器	所見\検査動物数	42	22	19	4	5	13
	膵臓	島細胞腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0
	胃	扁平上皮乳頭腫 (B)	0	1	2	0	0	0
		扁平上皮がん (M)	0	0	0	0	0	1
	膀胱	移行上皮がん (M)	0	0	1	0	1	2
	臓器	所見\検査動物数	41	21	17	4	4	13
	胸腺	血管肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0
	臓器	所見\検査動物数	42	21	19	4	5	14
	脾臓	悪性リンパ腫 (M)	0	1	0	0	0	0
		血管肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0
	臓器	所見\検査動物数	42	22	18	4	5	14
	副腎	皮質腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0
	乳腺	線維腺腫 (B)	0	0	0	0	1	0
	臓器	所見\検査動物数	-	-	-	4	5	13
	子宮	肉腫 (M)	-	-	-	0	0	1
平滑筋肉腫 (M)		-	-	-	0	1	0	
臓器	所見\検査動物数	-	-	-	4	5	12	
卵巣	血管腫 (B)	-	-	-	0	0	1	
	血管肉腫 (M)	-	-	-	0	0	1	
	奇形腫 (M/B)	-	-	-	0	0	1	

注) (B) : 良性腫瘍
(M) : 悪性腫瘍
- : 対象臓器なし

全動物雌のみ Fisher の正確確率検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、1,3-D 技術協議会にある。

表2 腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性 別		雄			雌		
	投与群 (mg/kg)		0	50	100	0	50	100
最終屠殺 (終了期死亡動物を含む)	臓器	所見\検査動物数	8	28	31	46	45	36
	肺	肺胞/細気管支腺腫 (B)	0	7	6	0	3	7
		肺胞/細気管支腺がん (M)	0	2	1	2	1	0
	造血系多臓器	悪性リンパ腫 (M)	0	1	2	0	5	7
		組織球性リンパ腫 (M)	0	0	0	1	0	0
	リンパ節	悪性リンパ腫 (M)	0	0	0	2	1	0
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)	0	1	2	0	4	2
		肝細胞がん (M)	1	5	7	1	3	0
		悪性リンパ球性リンパ腫 (M)	0	0	0	1	0	0
		血管肉腫 (M)	0	0	0	1	1	1
	胃	扁平上皮乳頭腫 (B)	0	1	1	0	1	2
		扁平上皮がん (M)	0	0	0	0	0	1
	涙腺	腺腫 (B)	0	0	1	0	0	0
	臓器	所見\検査動物数	8	28	31	46	45	36
	骨髄	血管肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0
	臓器	所見\検査動物数	8	28	31	46	45	35
	膀胱	移行上皮がん (M)	0	0	1	0	7	19
	臓器	所見\検査動物数	8	28	30	46	45	36
	脾臓	悪性リンパ腫 (M)	0	1	2	0	1	0
		血管腫 (B)	0	3	0	0	1	0
		血管肉腫 (M)	1	2	0	1	0	2
	臓器	所見\検査動物数	6	28	28	44	43	32
	下垂体	色素嫌性細胞腺腫 (B)	0	1	0	4	6	2
	臓器	所見\検査動物数	8	28	30	46	45	36
	副腎	皮質腺腫 (B)	0	0	2	0	1	0
		褐色細胞腫 (B)	0	0	0	1	1	1
	乳腺	腺がん (M)	0	0	0	2	1	1
		線維腺腫 (B)	0	0	0	0	1	0
臓器	所見\検査動物数	8	28	30	46	45	36	
子宮	血管腫 (B)	-	-	-	0	1	0	
臓器	所見\検査動物数	-	-	-	46	45	36	
卵巣	血管腫 (B)	-	-	-	0	1	0	
	腺がん (M)	-	-	-	0	0	1	

注) (B) : 良性腫瘍
(M) : 悪性腫瘍
- : 対象臓器なし

全動物雌のみ Fisher の正確確率検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

表 2 腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性 別		雄			雌		
	投与群 (mg/kg)		0	50	100	0	50	100
全動物	臓器	所見\検査動物数	50	50	50	50	50	50
	皮下組織	平滑筋肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0
		骨肉腫 (M)	0	0	0	1	0	0
	肺	腺がん (M)	0	0	1	0	0	0
		肺胞/細気管支腺腫 (B)	1	11	9	0	3	↑8
		肺胞/細気管支腺がん (M)	0	2	3	2	1	0
	造血系多臓器	悪性リンパ腫 (M)	0	2	2	0	8	9
		組織球性リンパ腫 (M)	0	0	0	2	0	0
	リンパ節	悪性リンパ腫 (M)	0	1	0	2	1	0
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)	1	1	3	0	↑5	3
		肝細胞がん (M)	4	6	10	1	3	0
		悪性リンパ球性リンパ腫 (M)	0	0	0	1	0	0
		血管肉腫 (M)	0	0	0	2	1	1
	胃	扁平上皮乳頭腫 (B)	0	2	3	0	1	2
		扁平上皮がん (M)	0	0	0	0	0	2
	臓器	所見\検査動物数	50	50	50	50	50	49
	膵臓	島細胞腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0
	涙腺	腺腫 (B)	0	0	1	0	0	0
	臓器	所見\検査動物数	49	48	47	50	47	48
	胸腺	血管肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0
	臓器	所見\検査動物数	49	49	50	50	50	50
	骨髓	血管肉腫 (M)	0	1	0	0	0	0
	臓器	所見\検査動物数	50	50	50	50	50	48
	膀胱	移行上皮がん (M)	0	0	2	0	↑8	↑↑21
	臓器	所見\検査動物数	50	49	49	50	50	50
	脾臓	悪性リンパ腫 (M)	0	2	2	0	1	0
		血管腫 (B)	0	3	0	0	1	0
		血管肉腫 (M)	1	2	1	1	0	2
臓器	所見\検査動物数	42	48	45	48	48	41	
下垂体	色素嫌性細胞腺腫 (B)	0	1	0	4	6	2	
臓器	所見\検査動物数	50	50	48	50	50	50	
副腎	皮質腺腫 (B)	1	0	2	0	1	0	
	褐色細胞腫 (B)	0	0	0	1	1	1	

注) (B) : 良性腫瘍

(M) : 悪性腫瘍

雌のみ Fisher の正確確率検定 ↑ : p<0.05、↑↑ : p<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1, 3-D 技術協議会にある。

表 2 腫瘍性病変 (続き)

検査時期	性 別		雄			雌		
	投与群 (mg/kg)		0	50	100	0	50	100
全動物	臓器	所見\検査動物数	50	50	50	50	50	50
	乳腺	腺がん (M)	0	0	0	2	1	1
		線維腺腫 (B)	0	0	0	0	2	0
全動物	臓器	所見\検査動物数	-	-	-	50	50	49
	子宮	血管腫 (B)	-	-	-	0	1	0
		肉腫 (M)	-	-	-	0	0	1
		平滑筋肉腫 (M)	-	-	-	0	1	0
全動物	臓器	所見\検査動物数	-	-	-	50	50	48
	卵巣	血管腫 (B)	-	-	-	0	1	1
		血管肉腫 (M)	-	-	-	0	0	1
		腺がん (M)	-	-	-	0	0	1
		奇形腫 (M/B)	-	-	-	0	0	1
合計	検査動物数		50	50	50	50	50	50
	腫瘍数	良性	4	18	18	5	22	17
		悪性	5	18	20	14	25	39
		良性/悪性不明	0	0	0	0	0	1
		原発/転移性不明	0	0	1	0	0	0
	腫瘍総数		9	36	39	19	47	57
	担腫瘍動物数	良性	4	15	17	5	17	13
		悪性	5	17	16	13	22	29
		良性/悪性不明	0	0	0	0	0	1
	担腫瘍動物数		8	28	30	16	33	34

注) (B) : 良性腫瘍
(M) : 悪性腫瘍
- : 対象臓器なし

雌のみ Fisher の正確確率検定 $p \geq 0.05$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、1,3-D 技術協議会にある。

(10) 繁殖毒性及び催奇形性

1) 繁殖毒性

①ラットを用いた繁殖試験

(資料 No. A-11)

試験機関

報告書作成年 1981 年

検体の純度 :

試験動物 : SD 系ラット 1 群雌雄各 6 匹

投与期間 : 親動物(F₀)に対し交配前 21 日から F₁ 児動物離乳時まで投与。

投与方法 : 検体 10 mg をコーンオイル 1 ml に溶かして原液の調製を毎週行い、この原液をさらにコーンオイルで希釈し、毎日、投与液を調製した。投与量は 10、30、60、100 mg/kg/day とし、強制経口投与した。

方法及び試験項目 : 概要を次頁の表にまとめた。

一般状態及び死亡率 ; 全検査期間を通して全動物の一般状態及び生死を毎日観察した。

死亡したラットについては剖検を行った。

交配及び妊娠の確認 ; 同群の雄と雌を 1 対 1 で同居させ、毎朝全ての雌の膣垢中の精子を調べた。精子の有無及び膣栓により交尾を確認した。

繁殖性に関する指標 ; 交配、妊娠及び哺育時期の観察に基づき、次の指標を算出した。

$$\text{交尾率} = \frac{\text{妊娠動物数}}{\text{同居させた雌の数}} \times 100$$

$$\text{妊娠率} = \frac{\text{妊娠動物数}}{\text{交尾した雌の数}} \times 100$$

$$\text{新生児生存率} = \frac{\text{生後 24 時間での生存児数}}{\text{総生産児数}} \times 100$$

$$\text{哺育児生存率} = \frac{\text{調査日における生存哺育児数}}{\text{生後 24 時間での生存児数}} \times 100$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

肉眼的病理検査； 出産後 21 日ですべての母動物と児の剖検を行った。組織病理学的検査は実施しなかった。

(方法及び試験項目概要)

	期間(週間)	作業手順	試験項目
F ₀	生育(3 週間)		体重、飼料摂餌量、飲水量を毎週記録。
	交配 (最高 3 週間)	雄雌 1 対 1 で同居。 交尾は膣垢中の精子、膣栓で確認(妊娠 1 日) 7 日以内に交尾確認できなかった場合、雄を換えて同居。 最高雄 3 匹まで。	交配状況を観察。同居開始から交尾確認までの期間を記録。 雄は週 1 回、雌は週 2 回体重測定
	妊娠(3 週間)		妊娠 1、4、7、11、14、18、20 日に体重測定。 出産状況の観察
F ₁	出産		腹当りの児数と生存数、新生児体重測定、性比、外表異常の観察。
	哺育(3 週間)		F ₀ 雄を屠殺し、剖検。 哺育児発育状況の観察。 哺育児生存率、性比の算出。 体重は生後 1、4、7、11、14、18、21 日に測定。 出産後 21 日で全ての母動物及び児を屠殺し、剖検。 F ₀ 雌につき着床数の記録。 交尾後 26 日までに出産しなかった雌及び出産後 21 日までに児が死亡した母動物も同様剖検。 児死亡母動物については、乳腺組織の状態を記録。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は1,3-D技術協議会にある。

結果：

世 代		親：F ₀			児：F ₁		
投 与 量 (mg/kg)		対照群	10	30	60	100	
動 物 数	雄	6	6	6	6	6	
	雌	6	6	6	6	6	
親 動 物	一 般 状 態			食毛	食毛	食毛	食毛
	死 亡 率 (%)		16.7	0	0	0	33.3
	体 重 変 化	雄					体重増加抑制
		雌					体重増加抑制
	摂 餌 量	雄				交配前 やや高	交配前 やや高
		雌				交配前 やや高	交配前 やや高
	飲 水 量	雄					交配前 やや高
		雌					交配前 やや高
	剖 検 所 見						
	交尾に要した期間						
	交 尾 率 (%)		83	100	100	100	100
	妊 娠 率 (%)		100	100	100	100	100
	妊 娠 期 間			← やや延長気味 →			
	生 存 児 数		52	69	64	73	48
外 表 異 常							
新 生 児 生 存 率 (%)		96.2	95.7	100.0	97.3	66.7	
児 動 物	哺 育 児 生 存 率 (%)	4 日	78.0	72.7	95.3	78.9	43.8
		7 日	74.0	66.7	90.6	71.8	31.8
		11 日	54.0	63.6	79.7	63.4	31.3
		14 日	42.0	62.1	78.1	57.7	28.1
		18 日	38.0	62.1	78.1	57.7	28.1
		21 日	38.0	62.1	78.1	57.7	28.1
生 存 児 平 均 体 重 (g)	1 日	6.1	5.2	6.1	5.5	5.3	
	4 日	7.8	6.7	8.0	6.1	6.5	
	7 日	10.7	11.5	11.6	8.5	12.4	
	11 日	17.0	17.2	18.9	13.5	17.6	
	14 日	23.9	22.0	24.9	18.0	23.6	
	18 日	32.1	29.4	33.0	24.3	29.7	
生 存 児 性 比 (雄/雌)	出 産 時	26/26	32/37	34/30	34/39	28/20	
	1 日	24/26	31/35	34/30	32/39	17/15	
	21 日	12/ 7	19/22	27/23	16/25	7/ 2	
剖 検 所 見							

空欄：特記すべき変化はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

親動物のすべての投与群で食毛が投与開始後 3 時間に観察された。対照群の 1 匹及び 100 mg/kg 投与群の 2 匹の計 3 匹の母動物が出産前または出産中に死亡したが、これは検体投与に起因するものでないとされた。100 mg/kg 投与群では親動物雌雄に体重増加抑制がみられた。摂餌量、飲水量が 60、100 mg/kg 投与群で交配前にやや高かったが、検体投与との関係を明確にはできなかった。妊娠期間が投与群でやや延長される様であったが、明確な用量反応関係は得られなかった。

生産児数は対照群に比して大きな減少はなかったが、新生児生存率は 100 mg/kg 投与群において減少した。また、哺育児生存率は対照群及び 100 mg/kg で低かった。対照群のそれは揮発性の検体及びその代謝物の吸入によると推定された（申請者注：他の投与群も吸入については同様と考えられ、対照群での低下の理由にするには難があると考え。よって、この理由については不明と考える。）。100 mg/kg 投与群では他の群と比較して児の生存力が抑制されたと考えられた。哺育児の体重は 60 mg/kg 投与群で抑制されていたが、用量反応関係は得られなかった。

性比は 100 mg/kg 投与群の 21 日を除いてほぼ同じと考えられた。100 mg/kg 投与群の 21 日の性比データは哺育児がほとんど生存せず意味があるとは考えられなかった。

親動物及び哺育児の剖検では検体投与に起因すると思われる肉眼的異常はみられなかった。哺育児が全て死亡した母動物の乳腺組織は非機能的あるいは未発達であった。死亡した哺育児の大部分は、胃にミルクがほとんどまたは全く無かった。

以上より、本剤の 100 mg/kg 投与群において新生児生存率並びに哺育児生存率は低下が認められることから最大無作用量は 60 mg/kg（申請者判断による）と判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

②ラットを用いた繁殖試験

(資料 No. C-23, B-19)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1987年

検体の純度:

試験動物: Fischer 344 ラット、1群雌雄各30匹、投与開始時6週令
体重; 雄 114.3~116.1g, 雌 91.2~92.9g

暴露期間: P世代; 交配前は、1日6時間、1週間に5日間で10週間、また交配、
妊娠及び哺乳期間は1日6時間、週7日で6週間、その後は屠
殺時まで週5日間吸入暴露した。

F1世代; 離乳時から約12週間(5日/週)、交配、妊娠及び哺乳期間は
1日6時間、週7日、その後は屠殺時まで週5日間吸入暴露した。

F2世代; 離乳後からP, F1世代と同様に屠殺時まで吸入暴露した。

暴露方法: 吸入暴露は14m³のチャンバーを用い、通気量25000/秒で行った。

検体はJ型管に計測して注入し、開始後7日間は、0, 5, 20及び60ppm
の濃度で8日目からは、0, 10, 30及び90ppmの濃度で動物に全身暴露した。
この変更は、最高濃度が60ppmでは成熟動物に毒性を発現させることはで
きないと考えられたために行った。暴露時間は、交配前で、1日6時間、1
週間に5日間、その後、交配・妊娠・哺育期間は1日6時間、1週間に7日間
とした。

方法及び試験項目:

一般状態及び死亡率; 全動物の全検査期間に一般状態及び生死を毎日観察した。
交配及び妊娠の確認; 交配は、雌雄1対1で同居させ、翌日膣スメアを調べ、精
子が確認された日を妊娠0日とした。

繁殖性に関する指標; 交配、妊娠及び出産時期の観察に基づき、次の指標を算出
した。

雌交尾率 = 交尾した雌動物数 / 使用した雌動物数

雌受精率 = 膣スメアに精子が確認された雌動物数 / 交尾した雌動物数

雌妊娠率 = 出産雌動物数 / 膣スメアに精子が確認された雌動物数

雄交尾率 = 交尾した雄動物数 / 使用した雄動物数

雄受精率 = 精子が膣スメアに確認された雄動物 / 交尾した雄動物数

雄妊娠率 = 出産させた雄動物数 / 精子が膣スメアに確認された雄動物数

出産率 = 生存同腹を出産した動物数 / 出産動物数

生存出産率 = 出産時の生存胎児の割合 (%)

1, 4, 7, 14, 21 および28日目の生存率 (%)

性比 = 雄 / 雌

妊娠期間 (日)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目	
P	生育(10)		1日6時間、1週間に5日間吸入暴露し、週1回体重を測定した。	
	交配(3)	雄1対雌1で交配し、交尾は膣スメアの精子を確認した日を妊娠0日目とした。 (F1aの離乳1週間後に、再交配させ、F1bを得る。)	1日6時間、1週間に7日間吸入暴露した。週1回体重を測定した。 交配状況の観察。	
	妊娠(3)		全雌動物は妊娠20日以降出産後4日まで暴露を中断した。妊娠後1, 4, 7, 14及び21日目に体重を測定した。	
	出産		出産状況の観察 繁殖性に関する指標及び外表異常の観察。	
	F1	哺育(4)	出産後4日目に、各同腹児数を雄4匹、雌4匹に調整	出産後1, 4, 7, 14, 21及び28日目に親動物の体重を測定した。 出産後1, 4, 7, 14, 21及び28日目に児動物の体重を測定した。
		離乳	F1b各群から同一群内でできるだけ同腹から雌雄各1匹を無作為抽出し、F2世代の親動物とした。同一群内で30腹未満の場合は、別の児動物を無作為抽出し、雌雄各30匹とした。	週5日間吸入暴露。 F1a世代を屠殺し、肉眼的病理検査 P世代はF1b離乳後5日間吸入暴露を行ってから屠殺し肉眼的病理検査 0及び90ppm投与群について標的組織及び生殖組織の病理組織学的検査 また、鼻、胃に関しては10及び30ppm群についても検査
		生育(10)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
		交配(3)	(F2aの離乳1週間後に、再交配させF2bを得る) (P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	F2	妊娠(3)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
		出産	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
哺育(4)			(P世代に準ずる)	
離乳			F1b及びF2b児動物の離乳時に全群雌雄各10匹を無作為抽出し、全身の解剖検査	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は1,3-D技術協議会にある。

結 果 (1) :

世 代		親 : P 児 : F 1 a, 1 b							
暴露量 (ppm)		0		10		30		90	
動物数		雄30, 雌30		雄30, 雌30		雄30, 雌30		雄30, 雌30	
親	一般状態	-							
	死亡数	雄0, 雌0		雄1, 雌0		雄0, 雌0		雄0, 雌0	
	体重 (g)	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	3日	114.8	91.2	114.3	92.2	116.1	92.9	115.2	91.4
	73日	295.3	171.8	291.5	169.9	290.7	167.8	281.0↓	168.7
	F 1 a 妊娠0日	-	170.0	-	166.9	-	164.2	-	165.7
	21日	-	251.6	-	244.3	-	249.1	-	249.3
	哺育1日	-	187.2	-	185.0	-	183.9	-	180.0
	28日	-	193.6	-	193.4	-	194.7	-	189.1
	27週	355.7	-	359.0	-	347.7	-	341.6↓	-
F 1 b 妊娠0日	-	193.4	-	192.8	-	191.0	-	190.3	
21日	-	267.9	-	260.1	-	266.4	-	265.6	
哺育1日	-	207.9	-	205.0	-	206.8	-	204.1	
28日	-	211.1	-	211.8	-	207.3	-	208.4	
動物	体重変化 (g)								
	F 1 a 妊娠1-4日	4.2		4.7		4.9		4.8	
	1-21日	81.6		77.5		85.2		83.6	
	哺育1-4日	0.9		2.1		3.8↑		3.3	
	1-28日	6.4		8.4		10.7		9.1	
	F 1 b 妊娠1-4日	4.4		3.3		4.7		3.9	
	1-21日	74.3		65.3		79.3		74.7	
	哺育1-4日	4.9		4.2		4.5		4.9	
1-28日	3.3		7.6		0.4		4.3		
(P)	実際暴露量 (ppm)	-		10.1		30.1		90.1	
	交尾率 (%)	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	F 1 a	93.3	100.0	76.7	96.7	80.0	90.0	83.3	96.7
	F 1 b	80.0	96.7	90.0	100.0	76.7	90.0	86.7	96.7
	妊娠率 (%)	F 1 a 100.0		100.0		100.0		100.0	
	F 1 b	96.0		100.0		100.0		100.0	
	受精率 (%)	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	F 1 a	78.6	73.3	78.3	75.9	83.3	81.5	92.0	89.7
	F 1 b	95.8	86.2	85.2	80.0	95.7	85.2	92.3	86.2
	出産率 (%)	F 1 a 99.1		99.5		100.0		99.7	
F 1 b	98.1		99.6		99.3		100.0		
妊娠期間 (日)	F 1 a 22.0		22.0		21.9		22.0		
F 1 b	21.7		21.6		21.3↓		21.8		
肉眼的病理所見・ 病理組織学的所見	-		検体暴露に関連した異常は認められなかった。				胃潰瘍 (雌のみ) 鼻上皮増生・変性		

Dunnett の検定 ↑ ↓ : p<0.05 空欄は検査せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

結 果 (2) :

世 代		親 : P 児 : F 1 a , 1 b									
暴露量 (ppm)		0		10		30		90			
(F 1 a)	一般状態	— 検体暴露に関連した異常は認められなかった。									
	生産児数	10.3±1.8		9.8±3.2		10.7± 1.9		11.4± 2.0			
	性比 (雄 : 雌)	45 : 55		49 : 51		54 : 46		49 : 51			
	生存児数	哺育 1 日	10.3		9.8		10.7		11.4		
		4 日	7.9		7.4		7.9		7.9		
		28 日	7.8		7.3		7.9		7.6		
	動物	体重 (g)	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
			哺育 1 日	5.5		5.4		5.5		5.3	
			4 日	8.1		7.9		7.9		7.8	
			7 日	10.1		9.9		10.0		9.9	
14 日			17.6		17.1		16.9		17.1		
28 日			50.7	48.3	49.1	47.5	49.7	47.2	50.4	48.3	
肉眼的病理所見 (4 日齢哺育児と離乳児)		— 検体暴露に関連した異常は認められなかった。									
(F 1 b)	一般状態	— 検体暴露に関連した異常は認められなかった。									
	生産児数	10.4± 3.7		10.2± 3.8		11.7± 2.0		10.9± 3.2			
	性比 (雄 : 雌)	54 : 46		52 : 48		49 : 51		51 : 49			
	生存児数	哺育 1 日	10.4		10.0		11.7		10.9		
		4 日	7.3		7.1		8.0		7.5		
		21 日	7.2		6.9		8.0		7.4		
	動物	体重 (g)	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
			哺育 1 日	5.2		5.1		5.1		5.2	
			4 日	7.7		7.3		7.3		7.5	
			7 日	10.2		9.3 ↓		9.8		10.1	
14 日			18.5		17.0		18.0		18.0		
28 日			51.7	49.6	49.8	47.1	51.0	48.3	51.0	48.6	
肉眼的病理所見 (4 日齢哺育児と離乳児)		— 検体暴露に関連した異常は認められなかった。									

Dunnett の検定 ↓ : p<0.05

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

結 果 (3) :

世 代		親 : F 1 児 : F 2 a, 2 b							
暴露量 (p p m)		0		10		30		90	
動物数		雄30, 雌30		雄30, 雌30		雄30, 雌30		雄30, 雌30	
親	一般状態	— 検体暴露に関連した異常は認められなかった。							
	死亡数	雄0, 雌0		雄1, 雌1		雄0, 雌0		雄0, 雌1	
	体重 (g)	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	3日	168.1	128.1	163.0	126.0	179.2	128.1	169.4	123.2
	73日	297.1	179.5	290.3	176.7	303.8	181.0	281.5↓	174.1
	F 1 a 妊娠0日	—	181.1	—	176.1	—	179.6	—	172.0↓
	21日	—	241.8	—	251.7	—	256.8	—	250.2
	哺育1日	—	192.3	—	192.9	—	195.7	—	185.0
	28日	—	202.5	—	195.7	—	203.5	—	191.0↓
	27週	346.3	—	347.7	—	359.6	—	331.4↓	—
	F 1 b 妊娠0日	—	200.0	—	197.1	—	205.1	—	195.7
	21日	—	261.6	—	253.5	—	279.9	—	272.5
	哺育1日	—	206.9	—	209.6	—	218.0	—	207.1
28日	—	214.8	—	212.5	—	221.7	—	208.5	
動物	体重変化 (g)								
	F 1 a 妊娠1-4日		4.0		4.0		5.2		4.5
	1-21日		62.3		77.6		72.8		72.3
	哺育1-4日		1.4		2.1		9.3↑		7.1↑
	1-28日		9.8		2.8↓		7.7		6.5
	F 1 b 妊娠1-4日		3.5		2.7		3.3		4.3
	1-21日		59.5		61.0		73.2		75.9↑
	哺育1-4日		7.1		5.2		8.1		7.4
	1-28日		9.0		2.9↓		3.7		-0.5↓
	実際暴露量 (p p m)	—		10.1		30.1		90.1	
(F 1)	交尾率 (%)	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	F 2 a	76.7	93.3	80.0	96.7	66.7	90.0	90.0	96.7
	F 2 b	76.7	90.0	72.4	93.1	63.3	83.3	83.3	100.0
	妊娠率 (%) F 2 a	100.0		100.0		100.0		100.0	
	F 2 b	95.7		100.0		100.0		100.0	
	受精率 (%) F 2 a	91.3	85.7	83.3	79.3	75.0	70.4	92.6	93.1
	F 2 b	87.0	85.2	95.2	92.6	84.2	80.0	92.0	86.2
	出産率 (%) F 2 a	100.0		98.8		100.0		99.6	
	F 2 b	92.8		99.1		100.0		98.8	
	妊娠期間 (日) F 2 a	21.5		21.4		21.3		21.4	
F 2 b	21.5		21.3		21.6		21.7		
肉眼的病理所見・ 病理組織学的所見	—		検体暴露に関連した異常は認められなかった。				胃潰瘍 (雌のみ) 鼻上皮増生・変性		

Dunnett の検定 ↑ ↓ : p<0.05 空欄は検査せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

結 果 (4) :

世代		親 : F 1 児 : F 2 a, 2 b								
暴露量 (ppm)		0		10		30		90		
児 動 物 (F 2 a)	一般状態	—		検体暴露に関連した異常は認められなかった。						
	生産児数	8.9 ± 3.7		10.7 ± 2.3		11.4 ± 2.9 ↑		10.3 ± 2.6		
	性比 (雄 : 雌)	47 : 53		50 : 50		56 : 44		47 : 53		
	生存児数	哺育 1 日	8.9		10.6		11.3 ↑		10.3	
		4 日	6.8		7.7		7.6		7.6	
		28 日	6.7		7.7		7.6		7.5	
	体重 (g)	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
		哺育 1 日	5.3		5.1		5.0		5.0	
		4 日	7.5		7.3		7.4		7.4	
		7 日	9.6		9.6		9.8		9.5	
	14 日	16.1		16.3		17.0		16.3		
	28 日	44.9	43.3	46.4	43.7	47.7	46.3	45.5	43.4	
	肉眼的病理所見 (4 日齢哺育児と離乳児)	—		検体暴露に関連した異常は認められなかった。						
(F 2 b)	一般状態	—		検体暴露に関連した異常は認められなかった。						
	生産児数	9.5 ± 4.1		9.1 ± 3.2		9.8 ± 3.8		9.9 ± 3.8		
	性比 (雄 : 雌)	55 : 45		47 : 53		51 : 49		51 : 49		
	生存児数	哺育 1 日	9.9		9.0		9.5		9.9	
		4 日	7.2		7.2		6.6		7.0	
		21 日	7.1		7.1		6.2		7.2	
	体重 (g)	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
		哺育 1 日	5.2		5.2		5.2		5.1	
		4 日	7.5		8.1		7.5		7.4	
		7 日	9.6		10.5		9.8		9.8	
	14 日	17.7		18.9 ↑		17.5		17.7		
	28 日	50.6	47.8	54.8 ↑	51.7 ↑	49.2	46.3	48.8	47.6	
	肉眼的病理所見 (4 日齢哺育児と離乳児)	—		検体暴露に関連した異常は認められなかった。						

Dunnett の検定 ↑ : p<0.05

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

親動物に関しては、90ppm 投与群で P, F₁ 世代の体重値が対照群と比べて減少した。病理組織学検査では、90ppm 投与群の P, F₁ 親動物に胃潰瘍及び鼻上皮増生・変性がみられた。

親動物の交配能力及び繁殖能力では各世代で検体による影響は認められなかった。

児動物に関しては、生存児数、体重、外表異常等を観察したが、検体暴露による影響はみられなかった。

以上の結果より、2 世代にわたって本剤を吸入暴露した場合、90ppm 投与群の親動物に体重減少および鼻上皮の増生・変性がみられたが、繁殖能及び児動物に対してはいずれの暴露群においても何ら影響がみられなかった。

ゆえに、児動物及び生殖能に関する最大無作用量は90ppm、親動物に対する最大無作用量は30ppm と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、I, 3-D 技術協議会にある。

2) 催奇形性

①ラットにおける催奇形性試験

(資料 No. A-12)

試験機関

報告書作成年 1982 年

検体の純度 :

試験動物 : SD 系妊娠ラット (14 週令以上)
1 群 27 匹 (末期開腹群のみ)

試験期間 : 1982 年 6 月～1982 年 9 月 投与期間 10 日間 (妊娠 6 日から 15 日まで)
なお、産垢中に精子が確認された日を妊娠 0 日とした。

方 法 :

設定予定濃度 (ppm)	10	30	90
平均実測濃度 (ppm)	10.9	30.5	90.6

暴露条件 ; チャンバー容積 1.7 m³ 換気回数 12 回/時

検体を加温により気化させ、発生した気体を清浄空気希釈し、上部よりチャンバー内に導入し下部より排出する one pass 方式で供給した。暴露は 1 日 6 時間、10 日間 (妊娠 6 日から 15 日まで) の全身暴露とした。なお、チャンバー内対照群の他に無処理対照群を設けた。

試験項目 :

母 体 ; 一般状態及び生死の観察、体重、摂餌量、摂水量の測定と、妊娠 20 日目に帝王切開し、黄体数、胎盤数、胎盤遺残、着床数、生存児数および死亡胚数を検査した。

生存胎児 ; 性別、体重、外表異常、体長、尾長、内臓および骨格検査を行った。各同腹児群の約 1/2 の胎児については骨格標本を作成し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については内臓異常の有無を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

試験結果：

薬剤濃度 ppm		無処 対照 群	チャンパー 内対照群	10	30	90	
1群当り動物数		27	27	27	27	27	
親動物	一般状態					筋緊張の低下、流涎痕、鼻出血痕	
	死亡率	0	0	0	0	0	
	体重変化					増加抑制	
	摂餌量					抑制	
	摂水量					一過性減退	
	着床所見	妊娠動物数	26	26	27	27	26※
		検査動物数	26	26	27	27	25
		黄体数 (平均)	18.7	16.8	18.1	17.4	17.8
		総着床数 (平均)	14.9	14.8	15.3	14.0	15.8
		生存胎児数 (平均)	14.2	13.8	15.0	13.4	14.7
		死亡胚数 (平均)	0.7	1.0	0.4	0.6	1.0
		(早期死亡胚数)	0.7	1.0	0.4	0.6	1.0
		(後期死亡胚数)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
未着床卵数 (率)		18.5 %	11.5 %	14.1 %	18.0 %	8.6 %	
着床後死亡胚数 (率)		4.5 %	6.5 %	2.3 %	4.8 %	6.6 %	
全死亡胚数 (率)	22.0 %	16.8 %	16.2 %	21.7 %	14.3 %		
胎児動物	性比 (♂/♀)		1.10	0.97	0.89	0.88	0.99
		体重	♂ 3.4 g	♂ 3.5 g	♂ 3.4 g	♂ 3.5 g	♂ 3.3 g**
		♀ 3.2 g	♀ 3.3 g	♀ 3.3 g	♀ 3.3 g	♀ 3.2 g	
	体長	♂	46.3 mm	46.4 mm	46.0 mm	46.2 mm	45.2 mm
		♀	45.6 mm	45.1 mm	45.3 mm	45.6 mm	44.7 mm
	尾長	♂	12.3 mm	12.6 mm	12.4 mm	12.3 mm	12.3 mm
		♀	12.6 mm	12.8 mm	12.5 mm	12.6 mm	12.6 mm
	外形異常	検査動物数	370	359	404	363	382
		検査所見				斜顔面裂 (1例)	頭蓋裂 (1例) 鎖肛・尾位置異常 (1例)
	内臓異常	検査動物数	177	175	195	172	177
		検査所見	鎖骨下静脈起始部異常 (1例)	鎖骨下静脈起始部異常 (1例)		無眼球症 (1例) 無眼・小眼球症 (1例)	
	骨格異常	検査動物数	193	184	209	191	205
		検査所見	肋横突孔閉鎖 (6例) 14肋骨 (5例) 波状肋骨 (1例)	肋横突孔閉鎖 (7例) 14肋骨 (11例)	肋横突孔閉鎖 (5例) 14肋骨 (12例)	肋横突孔閉鎖 (4例) 14肋骨 (4例) 前蝶形骨欠損 (1例)	肋横突孔閉鎖 (10例) 14肋骨 (5例) 波状肋骨 (1例) 13肋骨の萎小化 (2例)

※ 1 動物の妊娠 0 日目の判定を誤り予定日外に帝王切開してしまったため、この動物のデータは全て削除した。

** : p<0.01 t 検定、Fisher の直接確率法あるいは Mann-Whitney の u 検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

90 ppm 群において、親動物の体重増加抑制、摂餌、摂水量の抑制および胎児動物体重の減少が認められた以外異常は認められなかった。

奇形発生率は群間に差異は認められず、発生は基礎（バックグラウンド）データの範囲内であった。

以上の結果から、本剤の母獣における最高無作用濃度は 30 ppm であると判断され、奇形発生においては本試験の最高濃度の 90 ppm においても影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は I, 3-D 技術協議会にある。

②ラットにおける吸入暴露催奇形性試験

(資料 No. C-24, B-20)

試験機関:

報告書作成年: 1983年

検体の純度:

試験動物: フィッシャー 344妊娠ラット、体重160 ~ 220g、1群30匹

試験期間: 妊娠6 ~ 15日目暴露

方法:
設定濃度;

吸入暴露量は20, 60及び120ppm

とした。

実際濃度; 20±2、63±3及び120 ± 3 ppm

可変フィルター赤外線分光装置を用いて1時間に1回測定。

暴露条件; チャンバー容積 43m³、通気量 8000ℓ/分

検体を蒸発用ガラス管を用いて所定濃度に気化させ1日6時間、妊娠6日から15日まで全身暴露させた。

試験項目:

親動物: 一般状態および生死を毎日観察し、妊娠6, 9, 12, 16, 21日目に体重測定し、摂餌量及び摂水量を妊娠6日目から3日おきに記録した。なお、膣スメアに精子が発見された日を妊娠0日とした。妊娠21日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡、吸収胎児数を検査した。

生存胎児: 性別、体重、身長及び外表異常の観察を行った。

全胎児について骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査し、約半数の胎児で内臓検査を、またその残りの胎児で頭蓋骨検査を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、1,3-D 技術協議会にある。

試験結果：母動物の全暴露群で体重増加率が有意に低下した。また、肝の絶対重量が全暴露群で低下し120ppm群で腎の相対重量が増加した。

これら臓器重量変化は、体重減少や摂餌量の減少が影響しているものと思われる。

60ppm群でのみ妊娠率が対照群と比べ統計学的に有意に低下した他に黄体数、着床率、吸収胚率などの繁殖性に関する項目に検体暴露の影響は認められなかった。この妊娠率の低下は、最高用量群では有意差が認められず、また、平均値は70%であり当研究所の背景データ（70～97%）の範囲内であった。本群では母動物の毒性もみられた。

以上を考慮すると、この有意差は、検体の妊娠に対する影響ではなく、生理学的変動の範囲内の変化と考えられる。

胎児動物の検査においては、120ppm群で小眼球症及び大動脈狭窄が胎児1例で認められた。60, 20ppm群及び対照群では、脳室拡張が各群1例ずつでみられた。対照群では、小眼球症、尿管・腎盂拡張脳室拡張及び右鎖骨下動脈食道後方配置の複合奇形が1例の胎児で認められた。以上、奇形学的検査で検体暴露の影響は認められなかった。

変異に関しても検査したが、120ppm群で椎骨中心の化骨遅延の発生頻度が対照群と比べ有意に増加した他に、変化は認められなかった。他の骨格異常及び奇形発生に影響は認められず、また、本群の母動物に対する毒性を考慮すると、この化骨遅延の発生頻度の増加は、検体暴露による児への直接的な影響ではなく、母動物を介した影響と考えられる。

また、20ppm群で児動物の体重が対照群に比べて有意に減少したが、それより高用量群では対照群と同程度の値であったことを考えると、この変化は、検体による影響ではないと考えられる。

以上の結果より、全暴露群で母動物の体重抑制及び肝重量が増加したことより、本剤を妊娠ラットに投与したときの母体における最大無作用量は20ppm以下と考えられる。

また、最高投与量120ppmでも胎児に対して催奇形性及び致死作用を及ぼさないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、1,3-D 技術協議会にある。

結果：

投与量 (ppm)		対 照	20	60	120
1 群 当 り 動 物		30	30	30	30
親 動 物	一 般 状 態	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
	死 亡 数 (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	体 重 変 化 ^{a)}				
	妊 娠 6~8 日	4±4	1±4↓	-3±4↓	-10±5↓
	9~11 日	10±3	8±3	6±3↓	2±3↓
	12~15 日	13±6	12±1	11±3	10±3
	16~20 日	40±8	38±6	41±8	46±9↑
	6~15 日	27±6	21±5↓	15±5↓	2±5↓
	6~20 日	66±8	59±10↓	55±11↓	48±11↓
	妊 娠 数 ^{b)} (%)	28 (93)	25 (83)	21 (70)↓	24 (80)
	肝 絶 対 重 量 ^{a)}	9.84±0.41	9.29±0.71↓	9.41±0.76↓	9.05±0.85↓
	肝 相 対 重 量 ^{a)}	3.91±0.14	3.83±0.24	3.89±0.31	3.88±0.29
	腎 相 対 重 量 ^{a)}	1.40±0.12	1.38±0.14	1.32±0.11	1.38±0.14
	腎 相 対 重 量 ^{a)}	0.56±0.05	0.57±0.06	0.55±0.04	0.59±0.06↑
	検 査 親 動 物 数	27	25	20	24
着 床 所 見	黄 体 数 / 動 物 ^{b)}	11±1	11±1	11±1	11±1
	着 床 前 死 亡 胚 率 %	8±13	9±15	12±17	11±21
	着 床 数 / 動 物 ^{b)}	10±2	11±2	10±2	10±3
	生 存 胎 児 数 / 腹 ^{b)}	10±2	10±2	9±2	9±3
	吸 収 胎 児 数 / 腹	0.3±0.6	0.6±0.8	0.5±0.5	0.5±0.8
	着 床 吸 収 率 %	3(9/273)	6(17/262)	6(11/197)	5(13/234)
	吸 収 発 生 腹 率 %	30(8/27)	44(11/25)	55(11/20)	33(8/24)
	全 吸 収 発 生 腹 数	0	0	0	0
吸 収 数 / 吸 収 発 生 腹 数	1.1(9/8)	1.4(15/11)	1.0(11/11)	1.4(11/8)	
胎 児	検 査 胎 児 数	264	245	186	221
	死 亡 胎 児 数	0	0	0	0
	性 比 ♂ / ♀ ^{d)}	53 : 47	48 : 52	52 : 48	43 : 57
	体 長 mm ^{a)}	43.4±2.1	44.9±2.9	44.0±3.2	44.0±3.0
体 重 g ^{a)}	4.38±0.17	4.26±0.14↓	4.36±0.17	4.36±0.27	
動 物	検 査 胎 児 数	264	245	186	221
	外 表 奇 形 (数) ^{b)}				
	小 眼 球 症	1	0	0	1
	検 査 胎 児 数	264	245	186	221
	骨 格 異 常 (数) ^{b)}				
	化 骨 遅 延				
	椎 骨 中 心	8	8	10	14 ↑ ^{b)}
	椎 骨 他	1	0	0	0
	胸 骨	107	98	79	93
	変 異				
頸 椎 棘 突 起	1	0	0	0	
胸 骨 異 常	2	2	4	6	
胸 骨 軟 骨 不 均 一	1	0	1	3	
胸 骨 不 整	2	0	0	1	
頭 蓋 骨 検 査 胎 児 数	125	115	88	102	
異 常 (数) ^{b)}	0	0	0	0	
検 査 胎 児 数	138	129	98	119	
内 臓 奇 形 (数) ^{b)}					
尿 管 拡 張	1	0	0	0	
腎 盂 拡 張	1	0	0	0	
側 方 脳 室 拡 張	1	1	1	0	
右 鎖 骨 下 動 脈 食 道 後 方 配 置	1	0	0	0	
大 動 脈 狭 窄	0	0	0	1	
一 側 性 精 巢 形 成 不 全	0	1	0	0	
内 臓 異 常 (数) ^{b)}					
の う 胞 性 胆 管	0	1	0	0	
肝 出 血	0	1	0	0	
精 巢 出 血	0	0	1	0	
大 動 脈 狭 窄	0	0	0	1	

a) Dunnett 又は Wilcoxon の検定

↑) p<0.05 Wilcoxon検定

b) Wilcoxon検定

↓) p<0.05 Dunnett 又は Wilcoxon の検定

c) Bonferroniフィッシャ確率テスト

d) 二項分布テスト

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は I, 3-D 技術協議会にある。

③ウサギにおける吸入暴露催奇形性試験

(資料 No. C-24, B-21)

試験機関:

報告書作成年: 1983年

検体の純度:

試験動物: ニュージーランド白色ウサギ、体重3.5 ~ 4.5kg、1群25~31匹

試験期間: 妊娠6~18日目暴露

方法:
設定濃度;

吸入暴露量は20, 60及び120ppmとした。

実際濃度; 20±2、63±3及び120 ± 3 ppm
可変フィルター赤外線分光装置を用いて1時間に1回測定。

暴露条件: ; チャンバー容積 43m³、通気量 800ℓ/分
検体を蒸発用ガラス管を用いて所定濃度に気化させ1日6時間、妊娠6日から18日まで全身暴露させた。

試験項目:

親動物: 一般状態および生死を毎日観察し、妊娠6, 9, 12, 15, 19及び29日目に体重を測定し、摂餌量及び摂水量を妊娠6日目から3日おきに記録した。なお、動物は人工受精させ、その日を妊娠0日とした。
妊娠29日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡、吸収胎児数を検査した。

生存胎児: 性別、体重、身長及び外表異常の観察を行った。
全胎児について骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査し、約半数の胎児について内臓検査をおこなった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

試験結果：試験期間中に、対照グループ及び60ppm暴露群各1匹が肺炎で死亡した。120ppm暴露群で妊娠10日目に1匹が死亡し、肉眼的病理検査をおこなったが、死因は明らかではなかった。全体に一般症状や行動に異常は認められなかった。60及び120ppm群で、暴露期間（6～18日）に、母動物の体重が統計学的に有意に減少した。総増加量（6～28日）では対照群よりわずかに少値であったものの統計的には有意差は認められなかった。肝では相対重量が60ppm群で、及び腎重量が20ppm群で有意に減少したが、最高用量群含め、他の暴露群では値は対照群と同程度であったため、検体暴露の影響ではないと考えられた。黄体数、着床率、胚吸収率及び妊娠率など繁殖性に関する項目に検体暴露の影響はなかった。胎児動物の検査においては、120ppm群の一例に小眼球症、水頭症、大動脈狭窄症及び食道後部右鎖骨下動脈からなる複合奇形が1例に認められた。また軽度の前脚彎曲も同胎児にみられた。60ppm群の1例に大動脈肥大を伴う心室中隔欠損症が認められた。20ppm群では臍ヘルニア1例及び脳露出及び精巢不下降の1例が認められた。これらの奇形は、当研究所の背景データでも低頻度（1%以下）で認められている。以上、奇形学的検査で検体暴露の影響は認められなかった。また、骨格及び内臓異常に関しては、発生頻度が統計学的に有意に減少したものはあったが、増加したものはなく、検体暴露の影響はないものと考えられた。

以上から、体重増加抑制が60及び120ppm群で認められたことより、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母体における最大無作用量は20ppmと判断された。また、最高投与量120ppmでも胎児に対して致死作用や催奇形性を及ぼさないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は I, 3-D 技術協議会にある。

結 果 :

投与量 (ppm)		対 照	20	60	120
1 群 当 り 動 物 数		29	25	31	25
親 動 物	一 般 状 態 数	変化なし 1	変化なし 0	変化なし 1	変化なし 1
	死 亡 数				
	体 重 変 化 ^{a)}				
	妊 娠 6~8 日	36±102	12±91	-37±61 ↓	-67±375
	9~11 日	54±81	35±91	61±55	113±287
	12~14 日	80±66	107±135	56±169	-16±213
	15~18 日	43±53	14±124	3±157	36±229
	19~28 日	103±195	110±128	137±109	242±256 ↑
	6~18 日	220±121	168±142	82±93 ↓	67±273 ↓
	6~28 日	319±206	278±200	218±138	309±235
	妊 娠 数 ^{b)} (%)	25 (86)	18 (72)	21 (68)	22 (88)
	同 腹 仔 数	24	18	17	21
	肝 絶 対 重 量 ^{a)}	119.94±12.85	100.59±14.40	100.77±17.23	111.38±17.72
	肝 相 対 重 量 ^{a)}	2.61±0.29	2.48±0.21	2.36±0.42 ↓	2.63±0.34
	腎 絶 対 重 量 ^{a)}	17.17±1.38	15.88±1.40 ↓	16.67±1.07	17.41±1.88
腎 相 対 重 量 ^{a)}	0.40±0.05	0.39±0.03	0.39±0.04	0.41±0.03	
着 床 所 見	黄 体 数 / 動 物 ^{b)}	10±2	10±2	10±2	10±2
	着 床 前 死 亡 胚 率 %	10±18	16±20	17±18	18±24
	着 床 数 / 動 物 ^{b)}	9±3	8±3	8±3	8±3
	生 存 胎 児 数 / 腹	8±2	8±3	7±3	8±3
	吸 収 胚 数 / 腹	0.8±0.8	0.6±0.9	0.8±1.1	0.7±1.3
	着 床 吸 収 率 %	8 (17/218)	7 (10/147)	10 (14/135)	9 (15/174)
	吸 収 発 生 腹 率 %	50 (12/24)	39 (7/18)	53 (9/17)	43 (9/21)
	全 吸 収 発 生 腹 数	0	0	1	0
	吸 収 数 / 吸 収 発 生 腹 数	1.5 (18/12)	1.4 (10/7)	1.6 (14/9)	1.7 (15/9)
	胎 児	検 査 胎 児 数	201	137	127
死 亡 胎 児 数		0	0	0	0
性 比 ♂ / ♀ ^{d)}		54 : 46	56 : 44	45 : 55	49 : 51
体 長 mm ^{a)}		96.88±5.04	95.65±5.62	96.22±6.34	94.95±6.72
体 重 g ^{a)}		37.13±5.02	37.65±4.97	36.69±4.60	36.10±6.86
動 物	検 査 胎 児 数	201	137	121	159
	外 表 奇 形 (数) ^{b)}				
	小 眼 球 症・水 頭 症	0	0	0	1
	臍 ヘルニア	0	1	0	0
	脳 脱	0	1	0	0
外 表 異 常 (数) ^{b)}					
前 脚 彎 曲	1	0	0	2	
動 物	検 査 胎 児 数	198	130	105	153
	骨 格 異 常 (数) ^{b)}				
	化 骨 遅 延				
	頭 蓋	0	0	0	1
	舌 骨	46	22	17	22 ↓
	脊 柱	1	0	0	0
	椎 骨 中 心	1	0	0	0
	胸 骨 分 節	116	56	37	79
	中 手 骨 も し く は 指 骨 変 異 (数) ^{b)}	0	0	1	3
	頭 蓋 孔	0	0	0	1
	舌 骨 屈 曲	0	1	0	0
	椎 骨 不 整 列	0	0	0	1
	頸 椎 棘 突 起	9	0 ↓	1	0 ↓
	腰 椎 棘 突 起	5	3	6	3
	肋 骨	0	2	0	0
胸 骨 分 節 融 合	1	0	1	0	

- a) Dunnet 又は Wilcoxon の検定
 b) 修正 Wilcoxon ランク-加算テスト
 c) Bonferroni フィッシャ 確率テスト
 d) 二項分布テスト
 ↑ ↓) p<0.05 Dunnet 又は Wilcoxon の検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

投与量 (ppm)		対 照	20	60	120
1 群当り動物数		29	25	31	25
胎 児 動 物	検査胎児数	109	76	65	88
	内臓奇形 (数) ^{b)}				
	水頭症	0	0	0	1
	心室中隔欠損症	0	0	1	0
	精巣下降不全	0	1	0	0
	内臓異常 (数) ^{b)}				
	散在性角膜混濁	0	0	0	1
	開存性動脈管	0	0	1	0
	右鎖骨下動脈食道後方配置	0	0	1	0
	大動脈狭窄症	0	0	0	1
		0	0	0	1
	管外大動脈	0	0	0	1
	回旋尿管	2	0	1	3
青白色脾	0	0	0	1	

b) 修正Wilcoxonランク-加算テスト

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、1,3-D 技術協議会にある。

(11) 変異原性

(資料No. A-13)

試験機関:

報告書作成年: 1980年

検体の純度 :

方 法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA100、TA1537、TA1538、TA98) トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP 2 hcr) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法により変異原性を検定した。

なお、検体はDMSOで希釈した。

結 果 : 結果を次頁の表に示した。

検体はS-9の有無にかかわらずTA1535、TA100、*E. coli* WP 2 hcr で復帰変異コロニー数の増加がみとめられた。

一方、陽性対照として用いた AF-2、 β -propiolactone、9-aminoacridine、2-nitrofluorene、2-aminoanthracene では明らかな復帰変異コロニーの増加があった。

以上の結果より、本剤は塩基置換型の変異を誘起すると考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

(結 果)

薬 物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix	復帰変異 colony 数/plate					
			base-change 型			frameshift 型		
			WP2hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
対 照 (DMSO)		-	14	9	128	2	15	22
			24	23	125	4	15	17
検 体	10	-	22	9	140	5	7	12
			21	8	129	2	11	9
	50	-	19	20	140	3	13	23
			20	21	154	5	7	14
	100	-	15	34	117	5	8	26
			24	23	162	5	9	14
	500	-	29	84	246	4	8	22
			37	83	211	3	11	28
	1000	-	43	139	311	4	11	26
			29	140	350	6	7	32
2000	-	43	273	501	6	8	36	
		68	233	507	6	10	21	
5000	-	※	※	※	※	※	※	
対 照 (DMSO)		+	15	18	135	4	13	24
			16	6	131	6	14	20
検 体	10	+	9	7	111	0	15	15
			7	11	151	4	14	23
	50	+	19	11	133	5	9	19
			16	20	138	2	17	24
	100	+	12	11	159	5	14	26
			17	11	161	6	9	18
	500	+	16	49	188	4	12	22
			14	26	198	7	13	14
	1000	+	37	51	307	5	19	23
			25	70	265	2	11	25
2000	+	31	91	439	6	17	25	
		28	104	336	2	14	35	
5000	+	21※	140※	291※	1※	20※	10※	
			33※	122※	63※	1※	3※	4※
2-amino- anthracene	10	+	14	18	183	11	25	44
			16	11	183	14	18	44
	10	-	56	378	>3000	202	>2000	>3000
			66	358	>3000	246	>2000	>3000
陽 性 対 照		-	1330 ^{a)}	974 ^{b)}	174 ^{c)}	>10000 ^{d)}	>3000 ^{e)}	394 ^{f)}
			1340	1370	1218	>10000	>3000	425

※菌株の生育阻止を認める

a) 0.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ AP-2

c) 0.05 $\mu\text{g}/\text{plate}$ AP-2

e) 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 2-nitrofluorene

b) 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ β -propiolactone

d) 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 9-aminoacridine

f) 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ AP-2

② 細菌を用いたDNA修復試験

(資料 No. A-15)

試験機関

報告書作成年 1980年

検体の純度 :

方法 : 枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換え修復機構保持株(H-17)と欠損株(M-45)を用い、DNA 損傷の誘発性を検定した。
検体を希釈するためDMSOを用いた。

結果 :

薬物	濃度 (% v/v)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M 45	H 17	
対照 (DMSO)		0	0	0
検体	5	0	0	0
	10	0	0	0
	25	0	0	0
	50	1.5	1	0.5
	75	2	2	0
	100	3	3	0
陰性対照 (Kanamycin)	10 μ g/disk	5	4.5	0.5
陽性対照 (Mitomycin C)	0.1 μ g/disk	7	1	6

検体は陰性対照のKanamycin 同様、両株に同程度の生育阻止帯を示した。
一方、陽性対照のMitomycin C ではH17 に比べM45 で著名な生育阻止帯を生じた。

以上の結果より、本剤はDNA 損傷の誘発性がないものと判断した。

③ 細菌を用いた復帰変異原性試験

(資料 No. B-8)

試験機関:

報告書作成年: 1981年

検体の純度 :

方法 : ヒスチジン要求性サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537 及びTA1538) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 hcr (uvrA) 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で Amesらの方法で、プレインキュベーション法により変異原性を検討した。

検体を溶解させるため、DMSOを用いた。最高濃度は 5,000 μg /プレートとした。濃度の設定については、予備試験は実施せず7濃度試験した。その結果抗菌作用が強かった場合には、適宜濃度をさげて再試験した。

結果 : 次頁に示した。

検体は、TA100 及びTA1535株に対して、500 μg /プレートで、S-9 mix 添加により突然変異原性が弱くなるが、復帰突然変異コロニー数の増がみられた。

また、最高投与量5,000 μg /プレートでは、S-9 mix 添加の有無にかかわらず、供試したすべての検定菌株に抑制作用が認められた。

以上の結果より、検体の塩基対置換型の変異原性物質であると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、1,3-D 技術協議会にある。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix の有無	復帰突然変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	TA1538
対照 (DMSO)		-	164	4	19	35	7	16
D-D	5	-	155	5	17	32	7	12
	10	-	171	4	19	21	7	10
	50	-	244	9	19	34	10	22
	100	-	393	16	24	40	6	16
	500	-	1288	105	28	68	6	15
	1000	-	270	60	34	32	4	9
	5000	-	-	-	2	-	-	-
対照 (DMSO)		+	143	4	19	44	13	32
D-D	5	+	146	6	13	58	11	36
	10	+	160	6	22	54	8	34
	50	+	182	15	17	53	12	45
	100	+	206	16	17	54	16	41
	500	+	388	64	34	78	13	43
	1000	+	169	79	39	38	8	28
	5000	+	-	-	-	5	-	-
陽性 対照	S-9 Mix を 必要としない もの	薬物	AF-2	ENNG	AF-2	AF-2	ACR	2-NF
		$\mu\text{g}/\text{プレート}$	0.01	5	0.01	0.1	80	2
対照	S-9 Mix を 必要とする もの	薬物	B(a)P	2-AT	2-AT	B(a)P	B(a)P	B(a)P
		$\mu\text{g}/\text{プレート}$	5	4	40	5	5	5
		コロニー数/プレート	625	334	423	885	627	224
		コロニー数/プレート	821	181	1258	548	109	186

(略語) DMSO : ジメチルスルホキシド

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(3-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

ENNG : 1-エチル-2-ニトロ-3-ニトロソグアニジン

ACR : 9-アミノアクリジン

2-NF : 2-ニトロフルオレン

B(a)P : 3,4-ベンツピレン

2-AT : 2-アミノアントラセン

④ 細菌を用いたDNA修復試験

(資料 No. B-9)

試験機関:

報告書作成年: 1981年

検体の純度 :

方 法 : 枯草菌*Bacillus subtilis* の組換修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、非活性化法によりDNAの損傷の誘発性を検定した。

被験物質を溶解させるためDMSOを用いた。なお最高濃度は10,000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ とした。

試験結果 : 以下に示した。

薬 物	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
対照 (DMSO)	0	0	0	0
D-D	500	0	0	0
	1,000	0	0	0
	5,000	0	0	0
	10,000	1	1	0
陰性対照 (Kanamycin)	10	14	14	0
陽性対照 (MitomycinC)	0.1	14	1	13

検体投与群では、最高投与濃度の10,000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ において両菌株とも生育阻止が認められなかった。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシンCでは両菌株間に明らかな生育阻止の差がみられた。

以上の結果より、本検体のDNA損傷の誘発性は陰性であると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、I, 3-D 技術協議会にある。

⑤細菌を用いた突然変異誘起性試験

(資料No. C-25)

試験機関:

報告書作成年: 1978年

検体の純度:

方法:

(1) DNA修復試験 (Rec-assay 法);

枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換修復保持株 (H17) と欠損株 (M45) を用い、DNA の損傷の誘起性を検定した。検体を dimethyl-sulfoxide (DMSO) に溶解し、50 μ l を H17 及び M45 を放射状に接種した寒天栽培地に入れ、37°C で一夜培養し、阻止帯の長さを測定した。1250 μ g/well を最高投与量とした。陰性対照として、塩酸及びカナマイシン、陽性対照として、2-(2-furyl)-3-(5-intro-2-furyl)acrylamide (AF-2) を用いた。

(2) 復帰変異試験 (Ames法);

(2)-1

トリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* B/r wp2Try 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9) の存在下及び非存在下で復帰変異原性を検定した。検体を溶解するため、DMSO を用いた。また、対照には溶媒 (DMSO) 及び陽性対照として、AF-2 を用いた。

(2)-2 ヒスチジン及びビオチン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella*

typhimurium G46, TA1535, TA100, TA1357, TA1538 及び TA98 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9) の存在下及び非存在下で復帰変異原性を検定した。検体を溶解するため、DMSO を用いた。また、対照には溶媒 (DMSO) 及び陽性対照として、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)、 β -propiolactone (β -PL)、2-aminoanthracene (2AA)、2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)、9-aminoacridine (9AC) 及び 2-nitrofluorene (2NF) を用いた。

(3) 宿主経路試験;

ICR 系マウスを用い Legator 法により宿主経路試験を行った。

投与量は LD50 値をもとに 60mg/kg, 30mg/kg 投与群とし、Corn oil に溶解し、胃ゾンデを用いて 0.2ml/10g 体重を強制経口投与した。

陰性対照として溶媒 (DMSO) を、陽性対照としてジメチルニトロソアミン (DMNA) 50mg/kg を用いた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は1,3-D技術協議会にある。

結 果：(1)DNA修復試験 (Rec-assay)

薬 物	濃 度 (mg/ ml)	(μg/ well)	阻止帯の径(mm)		差 (mm)
			H17	M45	
対 照 (H ₂ O)			0	0	0
(DMSO)			0	0	0
(HCl)	2 N		22	23	1
(カナマイシン)	1	50	21	20.5	0.5
			8	10	2
			8.5	10	1.5
検 体 (1,3-	1	50	0	0	0
ジクロロ	2.5	125	0	0	0
プロペン)	10	500	0	1	1
			0	2	2
	25	1250	0	4	4
			0	—*	
			2	6	4
			1	7	6
陽性対照 (AF-2)	0.1	5	10	22	12
			9	20.5	11.5

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

*: M45の阻止帯なし

陰性対照では阻止帯の差はほとんど認められず、陽性対照群の AF-2 では著しい生育阻止が認められた。本剤 1,3-ジクロロプロペンにおいては、H17及びM45において4~5mmの阻止の差が認められ陽性と判定された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

(2)-1 E. Coli を用いた復帰変異試験

薬物	濃度 (mg/ml)	μg/ plate	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー /Plate
対照 (DMSO)	0	0	—	69
検体 (1,3-ジクロロ プロペン)	0.25	25	—	53
	1	100	—	51
	2.5	250	—	78
	5	500	—	46
	10	1000	—	0
	25	2500	—	0
	50	5000	—	0
対照 (DMSO)	0	0	+	70
検体 (1,3-ジクロロ プロペン)	0.25	25	+	71
	1	100	+	91
	2.5	250	+	101
	5	500	+	98
	10	1000	+	50
	25	2500	+	0
	50	5000	+	0
陽性対照 (AF-2)	0 (DMSO)		—	69
	0.002	0.2	—	744

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

陽性対照は、いずれも対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加を認めた。

本剤においては、いずれの濃度でも、また薬物代謝酵素系を含むS-9 Mix 添加及び無添加いずれの場合でも復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、1,3-ジクロロプロペンは本試験条件下で復帰変異誘発性は陰性と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は1,3-D技術協議会にある。

(2)-2 *S. typhimurium* を用いた復帰変異試験

薬物	濃度 (mg/ml)	μg/ plate	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/Plate					
				塩基置換型			フレームシフト型		
				G46	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
検体 (1,3- ジクロロ プロペン)	0 (DMSO)	0	—			20			
	0.02	2	—			20			
	0.05	5	—			32			
	0 (DMSO)	0	—	6	16	17	7	11	11
	0.1	10	—	8	24	38	4	10	9
	0.25	25	—	7	35	46	4	11	21
	1.0	100	—	9	92	210	3	11	29
	2.5	250	—	11	168	210	0	0	37
	5	500	—	15	337	402	0	0	0
	10	1000	—	18	274	0	0	0	0
	0 (DMSO)	0	+			89			
	0.02	2	+			79			
	0.05	5	+			88			
	0 (DMSO)	0	+	14	58	102	10	19	28
	2.5	250	+	14	83	173	20	28	32
	5.0	500	+	19	194	108	16	20	27
	10	1000	+	29	221	173	15	29	28
	25	2500	+	27	768	580	17	40	37
	50	5000	+	39	1440	452	14	36	49
	100	10000	+	22	288	571	2	147	74
	0 (DMSO)	0	+			89			43
	25	2500	+			944			27
	50	5000	+			1230			14
陽性対照 MNNG	0 (水)		—	9					
	0.02	2	—	4285					
β-PL	0 (水)		—		13				
	0.02	2	—		101				
2AA	0 (DMSO)		—		16				
	0.02	20	—		19				
	0 (DMSO)		+		58				
	0.02	20	+		432				
	0 (DMSO)		—			20			
	0.05	5	—			44			
	0 (DMSO)		+			89			
0.05	5	+			709				
AF-2	0 (DMSO)		—			20			11
	0.001	0.1	—			138			100
	0 (DMSO)		+			89			
	0.001	0.1	+			281			
9AC	0 (DMSO)		—				7		
	3	300	—				>3000		
2AA	0 (DMSO)		+				10	19	43
	0.1	10	+				453	>3000	1982
	0 (DMSO)		—					11	11
2FA	0.1	10	—					9	34
	0 (DMSO)		—					11	
2FA	0.5	50	—					1515	

空欄は検査せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

G46 及び TA98 においては S-9 Mixの有無にかかわらず、また TA1537 及び TA1538では S-9 Mix添加においてのみ陽性と認められたが、対照群に比し著しいものではなかった。

TA1535及びTA100 においては顕著な復帰変異誘起性が認められ、陽性と判断された。陽性対照の MNNG, β -PL, 2AA, 9AC, AF-2 及び2FA は明らかなコロニー数の増加を認めた。

(3) 宿主経由試験

薬物	投与量 (mg/kg)	復帰変異 菌数/m ℓ	生存菌数/ m ℓ $\times 10^{-9}$	復帰変異菌数/ $10^{-9} \times$ 生存菌数	平均 \pm 標準偏差
対 照 (Corn oil)	0	7.50	1.47	5.10	3.01 \pm 1.67/10 ⁹
		7.50	2.18	3.44	
		10.00	2.10	4.76	
		3.75	1.93	1.96	
		3.75	2.34	1.60	
		2.50	2.09	1.20	
		2.50	2.09	1.20	
検 体 (1,3- ジクロロ プロペン)	30 \times 3	3.75	2.76	1.36	3.20 \pm 1.67/10 ⁹
		3.75	1.55	2.42	
		3.75	2.93	1.28	
		16.25	2.80	5.80	
		18.75	2.64	7.10	
		2.50	2.00	1.25	
		2.50	2.00	1.25	
	60 \times 3	12.50	2.40	5.21	4.85 \pm 2.10/10 ⁹
		5.00	2.93	1.71	
		6.25	2.05	3.05	
		18.75	2.82	6.65	
		17.50	2.43	7.20	
		13.75	2.62	5.25	
		13.75	2.62	5.25	
陽性対照 (DMNA)	50 \times 3	750	3.24	231	344 \pm 106**/10 ⁹
		1625	3.41	477	
		463	2.24	207	
		613	1.63	376	
		888	2.53	351	
		1050	2.50	420	

DMNA : dimethylnitrosamine ** 対照群に比べて有意差有り (P<0.01)

検体の高用量群及び低用量群におけるコロニー数は、対照群と比べ有意差は認められず陰性と判定された。陽性対照のDMNAは顕著な復帰変異誘起性を示した。

以上の結果、検体 1,3-ジクロロプロペンは、これらの変異原性試験において、E. coli を用いた復帰変異試験及び宿主経由試験において陰性と判定された。また、Rec-assay 試験及び S. typhimurium を用いた復帰変異試験においては、陽性と判定された。これらのことから本剤 1,3-ジクロロプロペンは変異原性が誘発されることが示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

⑥細菌(TA100 株)を用いた復帰突然変異試験

薬物代謝酵素系にマウス S9 肺ホモジネートを用いた試験

(資料 No.C-41)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1996 年

検体純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ 菌 *Salmonella typhimurium* (TA100 株)を用い、マウス肺から調製した薬物代謝酵素系(S-9 mix、4 種)の存在下及び非存在下で Ames らの方法により、プレインキュベーション法で変異原性を検索した。溶媒にはエタノールを用い、用量設定試験の結果に基づいて 75.0~1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (S-9 mix 存在下)あるいは 100~450 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (S-9 mix 非存在下)の範囲の各 5 濃度で実施した。試験は 3 連制とした。薬物代謝酵素系は、Guengerich (1982)の方法により、無処理 B₆C₃F₁ 雄マウス[MLu-C]及び検体を吸入(気中濃度 63 \pm 7 ppm、5 日/週の頻度で 2.5 週間暴露)した同系統雄マウス[MLu-T]の S9 肺ホモジネートを用い、グルタチオン添加の有無により以下の 4 種を調製した。

S-9 mix の種類及び組成(mL)

成分		MLu-C	MLu-C+GSH	MLu-T	MLu-T+GSH
S9 肺ホモジネート	MLu-C	0.10	0.10	-	-
	MLu-T	-	-	0.10	0.10
水		0.70	0.69	0.70	0.69
1M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄		0.10	0.10	0.10	0.10
0.25M Glucose-6-phosphate		0.02	0.02	0.02	0.02
0.10M NADP		0.04	0.04	0.04	0.04
0.825M KCl/0.2M MgCl ₂		0.04	0.04	0.04	0.04
0.20 Glutathione		0.00	0.01	0.00	0.01
合計		1.00	1.00	1.00	1.00

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

これらの S-9 mix について、変異原性物質の前駆体から変異原性物質に代謝する作用を有することを確認する試験を実施した。ラット肝 S-9 mix の存在下で復帰変異誘発性を示すことが知られている benzo(a)pyrene(BP)及び 2-aminoanthracene (2AA)を用い、陰性対照(DMSO)、BPあるいは2AAを添加した培地で、マウス肺 S-9 mix (MLu-C、MLu-T)の存在下と、ラット肝 S-9 mix の存在下における供試菌株の復帰変異コロニー数を比較した。結果を表 1 に示す。BP では MLu-C 及び MLu-T いずれの存在下においても、コロニー数の増加は認められなかったが、2-AA は MLu-C 処理により溶媒対照と比較して復帰変異コロニー数が明らかに増加し、S-9 mix の活性が認められた(MLu-T は試料量の不足により実施しなかった)。

用量設定根拠；S-9 mix は、無処理マウス肺の MLu-C を用い、3.24 - 108 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の 4 濃度についてプレインキュベーション法で試験した。これらの濃度における復帰変異コロニー数は溶媒対照と同等で、また、最高濃度においても背景細菌叢は正常で、細胞毒性は認められなかった。

代謝活性化の非存在下では、初回、3.24~108 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の 4 濃度についてプレインキュベーション法で試験したところ、最高濃度においても背景細菌叢は正常で、細胞毒性は認められず、次いで実施した 667~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の 4 濃度ではすべての濃度で強い細胞毒性が認められ、さらに 150~600 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の 4 濃度では、300 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で復帰変異コロニー数は溶媒対照と同等であった。これにより本試験では、100~450 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を設定した。結果を表 2 に示す。

試験結果：表 3 に結果を示す。検体は S-9 mix の有無にかかわらず、すべての条件下で試験菌株 TA100 に復帰変異コロニー数を増加させなかった。一方、陽性対照として用いた Sodium azide 及び 2-aminoanthracene (2AA)は明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、*Salmonella typhimurium* (TA100)において、マウス肺ホモジェネートを用いた代謝活性化の存在下で、検体は復帰変異誘発性を有さないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

表 1. マウス肺 S-9 mix の薬物代謝能(ラット肝 S-9 mix との比較)

S-9 mix の種類	薬物及び 濃度(μg/プレート)	復帰変異コロニー数/プレート			
		10%*		20%*	
		プレート 1	プレート 2	プレート 1	プレート 2
MLu-C (無処理マウス肺)	対照(DMSO)	84	99	98	104
	BP 1.0	101	82	86	80
	BP 10.0	97	98	100	88
MLu-T (検体処理マウス肺)	対照(DMSO)	72	83	95	90
	BP 1.0	87	94	82	91
	BP 10.0	85	98	92	110
ラット肝 S-9 mix	対照(DMSO)	103	98	108	115
	BP 1.0	269	339	190	202
	BP 10.0	932	1030	710	726
MLu-C (無処理マウス肺)	対照(DMSO)	62	69	58	61
	2AA 0.5	314	319	556	578
	2AA 2.5	464	501	662	688
ラット肝 S-9 mix	対照(DMSO)	77	72	74	73
	2AA 0.5	326	287	190	160
	2AA 2.5	1059	1070	556	570

* : S-9 mix 中、S-9 ホモジェネートの割合

BP : benzo(a)pyrene、2AA : 2-aminoanthracene

S-9 mix 非存在下 DMSO の変異コロニー数は BP 1.0 及び 10.0 μg/プレートでそれぞれ 85 及び 80、2AA 0.5 及び 2.5 μg/プレートは 66 及び 60 であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

表 2. 用量設定試験の結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	試験 実施 順序	肺由 来 S- 9mix の有無	復帰変異コロニー数/ プレート TA100		背景細菌叢
				プレート別	平均 \pm sd	
対照(エタノール)	—	1	—	70、 60、 62	64 \pm 5	正常
検体	3.24		—	64、 75、 57	65 \pm 9	正常
	10.8		—	72、 65、 73	70 \pm 4	正常
	32.4		—	74、 76、 60	70 \pm 9	正常
	108		—	92、 88、 105	95 \pm 9	正常
陽性対照 Sodium azide	2.0		—	598、 698、 704	667 \pm 60	正常
対照(エタノール)	—		+	82、 70、 55	69 \pm 14	正常
検体	3.24		+	102、 65、 48	72 \pm 28	正常
	10.8		+	85、 53、 58	65 \pm 17	正常
	32.4		+	69、 69、 82	73 \pm 8	正常
	108		+	83、 72、 76	77 \pm 6	正常
陽性対照 2AA	2.5		+	860、 897、 363	707 \pm 298	正常
対照(エタノール)	—	2	—	80、 85、 73	79 \pm 6	正常
検体	667		—	0、 0、 0	0	顕著な減少
	1000		—	0、 0、 0	0	細菌叢なし
	3330		—	0、 0、 0	0	細菌叢なし
	5000		—	0、 0、 0	0	細菌叢なし
陽性対照 Sodium azide	2.0		—	574、 609、 608	597 \pm 20	正常
対照(エタノール)	—	3	—	70、 88、 129	96 \pm 30	正常
検体	150		—	190、 194、 189	191 \pm 3	正常
	300		—	90、 100、 91	94 \pm 6	軽度な減少
	450		—	0、 0、 0	0	顕著な減少
	600		—	0、 0、 0	0	細菌叢なし
陽性対照 Sodium azide	2.0		—	634、 578、 589	600 \pm 30	正常

sd : 標準偏差、2AA : 2-aminoanthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

表 3. 復帰変異原性試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix		復帰変異コロニー数/ プレート TA100		背景細菌叢	
		種類*	有無	プレート別	平均 \pm sd		
対照(エタノール)	—	—	—	89、 75、 98	87 \pm 12	正常	
検体	100	—	—	124、 116、 116	119 \pm 5	正常	
	150	—	—	137、 141、 144	141 \pm 4	正常	
	225	—	—	123、 150、 132	135 \pm 14	軽度な減少	
	300	—	—	127、 142、 129	133 \pm 8	軽度な減少	
	450	—	—	28、 26、 41	32 \pm 8	顕著な減少	
対照(エタノール)	—	MLu-C	+	88、 81、 97	89 \pm 8	正常	
検体	75.0	MLu-C	+	108、 112、 97	106 \pm 8	正常	
	150		+	102、 127、 145	125 \pm 22	正常	
	300		+	93、 79、 80	84 \pm 8	軽度な減少	
	600		+	0、 0、 0	0	細菌叢なし	
	1000		+	0、 0、 0	0	細菌叢なし	
対照(エタノール)	—	MLu-C+GSH	+	102、 82、 101	95 \pm 11	正常	
検体	75.0	MLu-C+GSH	+	---	---	正常	
	150		+	82、 98、 104	95 \pm 11	正常	
	300		+	76、 87、 85	83 \pm 6	軽度な減少	
	600		+	0、 0、 0	0	細菌叢なし	
	1000		+	0、 0、 0	0	細菌叢なし	
対照(エタノール)	—	MLu-T	+	98、 112、 98	103 \pm 8	正常	
検体	75.0	MLu-T	+	92、 108、 103	101 \pm 8	正常	
	150		+	113、 107、 86	102 \pm 14	正常	
	300		+	70、 56、 77	68 \pm 11	軽度な減少	
	600		+	0、 0、 0	0	細菌叢なし	
	1000		+	0、 0、 0	0	細菌叢なし	
対照(エタノール)	—	MLu-T+GSH	+	71、 81、 96	83 \pm 13	正常	
検体	75.0	MLu-T+GSH	+	92、 84、 58	78 \pm 18	正常	
	150		+	77、 79、 71	76 \pm 4	正常	
	300		+	69、 56、 60	62 \pm 7	軽度な減少	
	600		+	0、 0	0	細菌叢なし	
	1000		+	0、 0	0	細菌叢なし	
陽性対照	Sodium azide 2.0		—	—	637、 745、 768	717 \pm 70	正常
	2AA	2.5	MLu-C	+	1111、 1121、 871	1034 \pm 14 2	正常
			MLu-C+GSH	+	710、 801、 565	692 \pm 119	正常
			MLu-T	+	766、 1109、 756	877 \pm 201	正常
			MLu-T+GSH	+	593、 716、 169	493 \pm 287	正常

* : S-9 mix の組成は第 1 ページの表に示した。

sd : 標準偏差

--- : 試料の不足により、試験しなかった。

2AA : 2-aminoanthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

⑦細菌を用いた復帰変異試験

(資料No. C-31)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1997年

検体の純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ Salmonella typhimurium (TA1535, TA 100)を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9)の存在下及び非存在下、インキュベーション法で確認試験も含めて変異原性を検索した。検体を溶解させるため、エタノールを用いた。検体の濃度は、検体に関する既存のデータに基づいて決定し、8用量を用いた。陽性対照として非代謝活性化法でアジド化ナトリウムを用い、代謝活性化法で2AAを用いた。なお、試験は1,3-ジクロロプロペンと1,3-ジクロロプロペンに1.46%のエピクロロヒドリンを加えた検体で行った。

結果: 結果を次頁以降の表に示した。

1,3-ジクロロプロペン単独の試験では、TA1535を用いた1000 μ g/plateの濃度で代謝活性化法では約3~3.8倍の増加が、用量相関性なしでみられた他に、代謝活性化法および非代謝活性化法で陽性の判定基準を示した結果はみられなかった。

一方、エピクロロヒドリン1.46%含有した検体では、TA1535を用いた試験では、用量相関的に最高6.0倍のコロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、エピクロロヒドリン添加により、1,3-ジクロロプロペンの復帰変異原性は増強されると考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

試験 1. 1,3-ジクロロプロペン単独 (18035-B1, C1, D1)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix の 有無	復帰変異コロニー数/Plate ^a					
			TA100			TA1535		
対照 エタノール	50	+	131 \pm 15	98 \pm 3	84 \pm 14	13 \pm 4	19 \pm 6	16 \pm 2
検体	10.0	+	135 \pm 13	95 \pm 9	NC	13 \pm 2	14 \pm 3	18 \pm 6
	33.3	+	137 \pm 16	110 \pm 16	92 \pm 8	19 \pm 2	15 \pm 2	21 \pm 5
	66.7	+	162 \pm 7	102 \pm 5	112 \pm 3	15 \pm 3	20 \pm 9	18 \pm 7
	100	+	173 \pm 11	113 \pm 15	109 \pm 17	20 \pm 3	19 \pm 5	28 \pm 1
	333	+	218 \pm 4	160 \pm 17	172 \pm 14	32 \pm 3	26 \pm 9	48 \pm 6
	667	+	178 \pm 41	171 \pm 20	111 \pm 15	38 \pm 4	24 \pm 5	37 \pm 5
	1000	+	98 \pm 82*	151 \pm 105	0 \pm 0	49 \pm 11	11 \pm 20	11 \pm 10*
	2000	+	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
陽性対照 2AA ^d	2.5	+	215 \pm 20	1129 \pm 22	1129 \pm 22	143 \pm 13	173 \pm 5	143 \pm 17
対照 エタノール	50	-	132 \pm 20	79 \pm 4	/	12 \pm 4	14 \pm 3	/
検体	10.0	-	102 \pm 19	86 \pm 4		9 \pm 1	11 \pm 0	
	33.3	-	116 \pm 19	63 \pm 5		15 \pm 2	16 \pm 1	
	66.7	-	133 \pm 37	66 \pm 14		13 \pm 1	13 \pm 2	
	100	-	120 \pm 10	69 \pm 5		18 \pm 6	14 \pm 1	
	333	-	123 \pm 10	78 \pm 17		25 \pm 7	16 \pm 8	
	667	-	56 \pm 5	58 \pm 4		9 \pm 8	7 \pm 4	
	1000	-	0 \pm 0	18 \pm 32		0 \pm 0	4 \pm 7	
2000	-	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0			
陽性対照 SA ^d	2.0	-	875 \pm 31	946 \pm 32	757 \pm 17	778 \pm 53		

注) a: 3枚のプレートの平均 \pm 標準偏差

d: 陽性対照物質

2AA=2-aminoanthracene

SA= ジアゾ化ナトリウム

*: バックグラウンドの菌の数が極めて減少していた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

試験 2. 1,3-ジクロロプロペン+エピクロロヒドリン (18036-B1, C1)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ plate)	S-9 Mix の 有無	復帰変異コロニー数/Plate ^a			
			TA100		TA1535	
対照 エタノール	50	+	136 \pm 18	96 \pm 8	11 \pm 5	13 \pm 6
検体	10.0	+	156 \pm 16	79 \pm 13	9 \pm 5	14 \pm 4
	33.3	+	162 \pm 15	80 \pm 8	16 \pm 4	12 \pm 3
	66.7	+	172 \pm 8	93 \pm 12	22 \pm 2	11 \pm 4
	100	+	196 \pm 10	102 \pm 3	27 \pm 8	12 \pm 1
	333	+	138 \pm 36	104 \pm 9	38 \pm 9	18 \pm 3
	667	+	0 \pm 0	110 \pm 15	0 \pm 0	19 \pm 6
	1000	+	0 \pm 0	144 \pm 6	0 \pm 0	33 \pm 6
2000	+	0 \pm 0	181 \pm 16	0 \pm 0	22 \pm 24	
陽性対照 2AA ^d	2.5	+	1068 \pm 104	1107 \pm 86	153 \pm 15	151 \pm 12
対照 エタノール	50	-	90 \pm 8	67 \pm 5	7 \pm 1	15 \pm 4
検体	10.0	-	135 \pm 39	80 \pm 6	7 \pm 2	11 \pm 3
	33.3	-	108 \pm 21	70 \pm 3	20 \pm 4	12 \pm 3
	66.7	-	124 \pm 14	70 \pm 4	32 \pm 10	13 \pm 4
	100	-	135 \pm 6	90 \pm 13	37 \pm 11	12 \pm 2
	333	-	25 \pm 25	102 \pm 16	38 \pm 16	22 \pm 3
	667	-	0 \pm 0	104 \pm 12	0 \pm 0	30 \pm 8
	1000	-	0 \pm 0	130 \pm 3	0 \pm 0	53 \pm 27
2000	-	0 \pm 0	90 \pm 46	0 \pm 0	90 \pm 19	
陽性対照 SA ^d	2.0	-	900 \pm 17	845 \pm 33	757 \pm 17	722 \pm 38

注) a: 3枚のプレートの平均 \pm 標準偏差

d: 陽性対照物質

2AA=2-aminoanthracene

SA= ジアゾ化ナトリウム

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、1,3-D 技術協議会にある。

③細菌(TA1535 株)を用いた復帰突然変異試験

ラット、マウス及びヒトの肝ミクロソーム及び肝 S100 画分の影響

(資料 No.C-42)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

検体純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535 株)を用い、市販のラット(雄、Sprague-Dawley)、マウス(雄、CD1)あるいはヒトの肝ミクロソーム精製品から調製した薬物代謝酵素系(S-9 mix)の存在下及び非存在下で Ames らの方法により、プレインキュベーション法で変異原性を検索した。また、市販のラット、マウスあるいはヒトの肝 S100 画分及びグルタチオン(GSH)を加えた S-9 mix、さらに、各肝ミクロソーム、各肝 S100 画分及び GSH を加えた S-9 mix の存在下合計 10 条件を設定し、試験菌株 TA1535 に対する復帰変異誘発性について、3 動物間の種差を検討した。各試験条件を以下の表に示す。

溶媒にはエタノールを用い、10.0~2000 µg/プレート の範囲の 8 濃度で実施した。試験は 3 連制とした。

少なくとも 1 濃度において、復帰変異コロニー数の平均値が溶媒対照の 3 倍以上となり、且つ、用量相関性がみられる場合、陽性と判定した。

動物種	① 代謝活性化非存在下		
	②~⑩ 代謝活性化 プレインキュベーション時に基礎 S-9 mix*に加える成分**		
ラット	② 肝ミクロソーム	③ 肝 S100 画分 +GSH	④ 肝ミクロソーム+肝 S100 画分 +GSH
マウス	⑤ 肝ミクロソーム	⑥ 肝 S100 画分 +GSH	⑦ 肝ミクロソーム+肝 S100 画分 +GSH
ヒト	⑧ 肝ミクロソーム	⑨ 肝 S100 画分 +GSH	⑩ 肝ミクロソーム+肝 S100 画分 +GSH

*: 基礎 S-9 mix の組成

0.031 M NADP 10 mL、0.33 M Glucose-6-phosphate 10 mL、0.52 M MgCl₂ 2 mL
及び 0.1 M Potassium phosphate (pH 7.4) 2.5 mL

** : 肝ミクロソーム 12 mL、0.176 µL (ラット及びマウス)、0.189 µL (ヒト)、GSH
0.25 mL

試験結果：復帰突然変異誘発性の判定結果を表 1 に、各試験条件における復帰変異コロニー数を表 2、3 及び 4 に示す。

代謝活性化の非存在下では、試験菌株 TA1535 の復帰変異コロニー数は、溶媒対照の最大 7.3 倍であった。ラット、マウス及びヒトの肝ミクロソーム存在下では、復帰変異コロニー数が、溶媒対照のそれぞれ、6.3、8.3 及び 6.1 倍であった。しかし、肝 S100 画分及びグルタチオン存在下では、いずれの動物種についても復帰変異コロニー数は溶媒対照の 1.1~1.2 倍、また、肝ミクロソーム、肝 S100 画分及びグルタチオンの存在下においても溶媒対照の 3 倍未満で、陰性と判定された。一方、陽性対照として用いた Sodium azide (SA) 及び 2-aminoanthracene (2AA) は明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化の非存在下及びラット、マウス及びヒトの肝ミクロソーム存在下で、復帰変異誘発性が示された。肝 S100 画分及びグルタチオンの存在下では、いずれの動物種についても、肝ミクロソームの有無にかかわらず、復帰変異誘発性は認められなかった。本試験において種差は明らかでなかった。

表 1. 判定結果

溶媒対照の変異コロニー数に対する検体処理変異コロニー数の最大倍率及び判定

動物種	代謝活性化なし	代謝活性化 基礎 S-9 mix に加える成分			
		肝ミクロソーム	肝 S100 画分 +GSH	肝ミクロソーム +肝 S100 画分 +GSH	
-	① 陽性 7.3 倍				
ラット		6.3 倍 陽性	1.2 倍 陰性	1.4 倍 陰性	
マウス		8.3 倍 陽性	1.2 倍 陰性	2.6 倍 陰性	
ヒト		6.1 倍 陽性	1.1 倍 陰性	1.8 倍 陰性	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、1,3-D 技術協議会にある。

表 2. 復帰変異原性試験 代謝活性化非存在下及び肝ミクロソーム存在下

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 mix*		復帰変異コロニー数/プレート		背景 細菌叢
		基礎 S-9 mix に加える成分	有 無	TA1535		
				プレート別	平均 \pm sd.	
対照(エタノール)	—	—	—	16, 8, 10	11 \pm 4	正常
検体	10.0		—	5, 8, 8	7 \pm 2	正常
	33.3		—	10, 12, 16	13 \pm 3	正常
	66.7		—	6, 16, 17	13 \pm 6	正常
	100		—	11, 18, 9	13 \pm 5	正常
	333		—	49, 37, 38	41 \pm 7	正常
	667		—	79, 80, 60	73 \pm 11	正常
	1000		—	79, 60, 100	80 \pm 20	正常
	2000		—	0, 0, 0	0 \pm 0	なし
対照(エタノール)	—		ラット 肝ミクロソーム	+	15, 17, 17	16 \pm 1
検体	10.0	+		13, 21, 24	19 \pm 6	正常
	33.3	+		20, 22, 15	19 \pm 4	正常
	66.7	+		13, 21, 18	17 \pm 4	正常
	100	+		20, 17, 25	21 \pm 4	正常
	333	+		47, 41, 37	42 \pm 5	正常
	667	+		68, 57, 73	66 \pm 8	正常
	1000	+		102, 99, 100	100 \pm 2	正常
	2000	+		10, 19, 20	16 \pm 6	中程度減少
対照(エタノール)	—	マウス 肝ミクロソーム		+	16, 10, 15	14 \pm 3
検体	10.0		+	16, 10, 10	12 \pm 3	正常
	33.3		+	14, 12, 14	13 \pm 1	正常
	66.7		+	25, 15, 20	20 \pm 5	正常
	100		+	25, 20, 21	22 \pm 3	正常
	333		+	36, 33, 37	35 \pm 2	正常
	667		+	69, 78, 61	69 \pm 9	正常
	1000		+	117, 103, 127	116 \pm 12	正常
	2000		+	40, 34, 44	39 \pm 5	軽度な減少
対照(エタノール)	—		ヒト 肝ミクロソーム	+	11, 14, 17	14 \pm 3
検体	10.0	+		12, 13, 9	11 \pm 2	正常
	33.3	+		11, 17, 13	14 \pm 3	正常
	66.7	+		22, 21, 14	19 \pm 4	正常
	100	+		15, 16, 22	18 \pm 4	正常
	333	+		33, 31, 41	35 \pm 5	正常
	667	+		73, 65, 58	65 \pm 8	正常
	1000	+		88, 92, 77	86 \pm 8	正常
	2000	+		0, 0, 0	0 \pm 0	なし
陽性 対照	Sodium azide 2.0	—		—	692, 684, 615	664 \pm 42
	2-aminoanthracene 3.33	ラット 肝ミクロソーム	+	261, 264, 232	252 \pm 18	正常
		マウス 肝ミクロソーム	+	457, 378, 328	388 \pm 65	正常
		ヒト肝ミクロソーム	+	383, 354, 222	320 \pm 86	正常

sd : 標準偏差

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

表 3. 復帰変異原性試験 [S100 画分+グルタチオン]存在下

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 mix*		復帰変異コロニー数 /プレート TA1535		背景 細菌叢
		基礎 S-9 mix に加える成分	有 無	プレート別		
				プレート別	平均 \pm sd.	
対照(エタノール)	—	ラット肝 S100 画分 及び グルタチオン	+	18, 11, 12	14 \pm 4	正常
検体	10.0		+	14, 10, 14	13 \pm 2	正常
	33.3		+	13, 15, 5	11 \pm 5	正常
	66.7		+	9, 7, 8	8 \pm 1	正常
	100		+	12, 14, 21	16 \pm 5	正常
	333		+	17, 14, 10	14 \pm 4	正常
	667		+	18, 17, 15	17 \pm 2	正常
	1000		+	11, 11, 15	12 \pm 2	正常
	2000		+	0, -, 0	0 \pm 0	顕著な減少
	対照(エタノール)		—	マウス肝 S100 画分 及び グルタチオン	+	7, 16, 10
検体	10.0	+	4, 12, 10		9 \pm 4	正常
	33.3	+	10, 6, 10		9 \pm 2	正常
	66.7	+	12, 10, 12		11 \pm 1	正常
	100	+	20, 11, 7		13 \pm 7	正常
	333	+	12, 5, 19		12 \pm 7	正常
	667	+	9, 11, 14		11 \pm 3	正常
	1000	+	16, 8, 8		11 \pm 5	正常
	2000	+	6, 13, 11		10 \pm 4	軽度な減少
	対照(エタノール)	—	ヒト肝 S100 画分 及び グルタチオン		+	17, 15, 10
検体	10.0	+		10, 14, 20	15 \pm 5	正常
	33.3	+		14, 18, 10	14 \pm 4	正常
	66.7	+		4, 11, 16	10 \pm 6	正常
	100	+		14, 11, 7	11 \pm 4	正常
	333	+		15, 8, 12	12 \pm 4	正常
	667	+		8, 14, 11	11 \pm 3	正常
	1000	+		14, 8, 10	11 \pm 3	正常
	2000	+		0, 0, 0	0 \pm 0	なし
	陽性 対照	2- aminoanthracene 3.33		ラット肝 S100 画分 及びグルタチオン	+	81, 103, 116
マウス肝 S100 画分 及びグルタチオン			+	19, 12, 13	15 \pm 4	正常
ヒト肝 S100 画分 及びグルタチオン			+	35, 28, 40	34 \pm 6	正常

sd : 標準偏差 - : コンタミのため、計数できず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は 1,3-D 技術協議会にある。

表 4. 復帰変異原性試験 [肝ミクロソーム+S100 画分+グルタチオン]存在下

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 mix*		復帰変異コロニー数/プレート TA1535		背景 細菌叢
		基礎 S-9 mix に加える成分	有 無	プレート別		
				プレート別	平均 \pm sd.	
対照(エタノール)	—	ラット肝 ミクロソーム、 ラット肝 S100 画分 及び グルタチオン	+	15, 13, 14	14 \pm 1	正常
検体	10.0		+	7, 15, 10	11 \pm 4	正常
	33.3		+	8, 14, 14	12 \pm 3	正常
	66.7		+	21, 14, 9	15 \pm 6	正常
	100		+	18, 13, 8	13 \pm 5	正常
	333		+	10, 15, 9	11 \pm 3	正常
	667		+	24, 17, 22	21 \pm 4	正常
	1000		+	19, 18, 23	20 \pm 3	正常
	2000		+	14, 18, 6	13 \pm 6	軽度な減少
対照(エタノール)	—		マウス肝 ミクロソーム マウス肝 S100 画分 及び グルタチオン	+	7, 6, 12	8 \pm 3
検体	10.0	+		12, 9, 10	10 \pm 2	正常
	33.3	+		7, 5, 9	7 \pm 2	正常
	66.7	+		11, 11, 10	11 \pm 1	正常
	100	+		9, 13, 8	10 \pm 3	正常
	333	+		6, 13, 8	9 \pm 4	正常
	667	+		12, 7, 8	9 \pm 3	正常
	1000	+		20, 17, 27	21 \pm 5	正常
	2000	+		22, 13, 20	18 \pm 5	軽度な減少
対照(エタノール)	—	ヒト肝 ミクロソーム、 ヒト肝 S100 画分 及び グルタチオン		+	12, 4, 16	11 \pm 6
検体	10.0		+	11, 7, 17	12 \pm 5	正常
	33.3		+	16, 12, 13	14 \pm 2	正常
	66.7		+	11, 12, 7	10 \pm 3	正常
	100		+	11, 9, 14	11 \pm 3	正常
	333		+	12, 14, 10	12 \pm 2	正常
	667		+	16, 21, 24	20 \pm 4	正常
	1000		+	19, 16, 9	15 \pm 5	正常
	2000		+	0, 0, 0	0 \pm 0	顕著な減少
陽性 対照	2- aminoanthracene 3.33		ラット肝 ミクロソーム、 ラット S100 画分 及び グルタチオン	+	207, 274, 252	244 \pm 34
		マウス肝 ミクロソーム マウス S100 画分 及び グルタチオン	+	139, 159, 148	149 \pm 10	正常
		ヒト 肝ミクロソーム、 ヒト S100 画分 及び グルタチオン	+	14, 21, 43	26 \pm 15	正常

sd : 標準偏差