

(12) 繁殖性に及ぼす影響

① ラットを用いた2世代繁殖毒性試験

(資料No. VI-1)

試験機関 : Hazleton Laboratories America, Inc. (GLP 対応)

報告書作成年 : 1988 年

検体の純度 : %

供試動物 : SD(Cr1 : CD BR)系ラット、1 群雌雄各 26 匹 (F_0 世代) / 各 30 匹 (F_1 世代)、
開始時約 7 週齢、開始時体重範囲 : 雄 189.7-258.0g、雌 145.4-185.6g

投与期間 : F_0 世代 ; 投与開始から F_1 児離乳時までの 19 週間
 F_1 世代 ; 離乳時から F_2 児離乳時までの 23 週間
(1985 年 12 月 7 日-1986 年 10 月 21 日)

投与方法 : 検体を 0、3、15、75ppm の濃度で飼料に混入し、自由に摂食させた。検体を混入した飼料は、毎週 1 回調製した。

観察・検査項目 : 概要を表-1 にまとめた。

一般状態及び死亡率 ; 全動物を対象に、一般状態は 1 日 1 回、死亡は 1 日 2 回観察した。加えて、体重測定時に詳細な状態観察を行った。

体重変化 ; 投与開始時及び解剖時の測定に加え、 F_0 及び F_1 親世代の雄は、試験期間を通じて週 1 回測定し、 F_0 及び F_1 親世代の雌は、生育及び交配期間には週 1 回、交配後は妊娠 0、7、14 及び 20 日、分娩後 0、4、7、14 及び 21 日に測定した。

摂餌量 ; F_0 及び F_1 親世代の雄は、試験期間を通じて週 1 回測定した。 F_0 及び F_1 親世代の雌は、生育期間には週 1 回、交配後は妊娠 7、14 及び 20 日、分娩後 4、7 及び 14 日に測定した。ただし、交配期間中は測定しなかった。

交配及び交尾・妊娠の確認 ; 雌雄 1 対 1 で最高 21 日間同居させ、膣栓あるいは精子の存在により交尾を確認した。交尾確認日を妊娠 0 日とした。剖検時、着床が確認された場合妊娠とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

繁殖性に関する指標； F_0 及び F_1 親世代の妊娠雌は自然分娩させ、各個体毎に交配に要した期間及び妊娠期間を算出した。また、交配、妊娠、出産及び哺育期間の観察に基づき、次の指標を算出した。

$$\text{交尾率} = (\text{交尾雌動物数} / \text{交配雌動物数}) \times 100$$

$$\text{妊娠率} = (\text{妊娠雌動物数} / \text{交配雌動物数}) \times 100$$

$$\text{授胎率} = (\text{授胎確認雄動物数} / \text{交尾雄動物数}) \times 100$$

$$\text{受胎率} = (\text{妊娠雌動物数} / \text{交尾雌動物数}) \times 100$$

$$\text{出産率} = (\text{生存児分娩腹数} / \text{妊娠雌動物数}) \times 100$$

児動物の体重及び観察； F_1 及び F_2 児世代については、生後0、4、7、14、21日に各腹、各性毎に生存/死亡児動物数を調べ、全生存児動物の体重を測定し、一般状態を記録した。生後4日に、1腹8匹（雌雄各4匹）となるように児動物数を調整した。離乳は生後21日に行い、 F_1 親世代動物の選抜を行った。以下の指標を算出した。

$$4\text{日生存率} = (4\text{日生存児数} / \text{新生児数}) \times 100$$

$$\text{離乳率} = (21\text{日生存児数} / 4\text{日調整後生存児数}) \times 100$$

肉眼的病理検査； F_1 児動物の分娩後に F_0 雄を、離乳後に F_0 雌を屠殺した。 F_2 児動物の離乳後に F_1 雌雄を屠殺し、肉眼的に詳細な検査を実施した。臓器重量は測定しなかった。

病理組織学的検査；対照群及び75ppm群の F_0 及び F_1 親世代の全動物を対象とし、膣、子宮、卵巣、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、肉眼的病変について病理標本作製し、鏡検した。肉眼的病変部は、全群全動物について検査した。

表-1 観察・検査項目概要

世代	期間 (週間)	作業手順	観察・検査項目
F ₀	生育 (10週)	雌雄1対1で交配 交尾は膣栓、精子の存在 で確認 (妊娠0日)	症状、生死観察：毎日 体重、摂餌量測定：週1回
	交配 (3週)		交配状況観察 体重測定：週1回
	妊娠 (3週)		体重測定：妊娠0、7、14、20日 摂餌量測定：妊娠7、14、20日
F ₁	F ₁ 出産	生後4日目に同腹児数を 8匹に調整	妊娠期間算出、出産状況の観察、 生存児数、死産児数、外表異常、性別及 び生存児の体重測定
	F ₁ 哺育 (3週)		F ₀ 雄：剖検、対照群と最高投与群につい て病理組織学的検査 F ₀ 雌：分娩後0、4、7、14、21日に体重 測定、4、7、14日に摂餌量測定 F ₁ ：生後4、7、14、21日に生存児数、死 亡児数、外表異常、性別、体重測定
	F ₁ 離乳 (生後21日)		継代用の雌雄各30匹を可 能な限り各腹から選抜
F ₁	生育 (14週)	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)
	交配 (3週)		
	妊娠 (3週)		
F ₂	F ₂ 出産	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)
	F ₂ 哺育 (3週)		(F ₀ 世代に準ずる)
	F ₂ 離乳		F ₁ ：剖検、対照群と最高投与群につい て病理組織学的検査
F ₂			F ₂ ：剖検

結果 : 概要を表-2 に示した。

親動物 : 検体投与に起因する死亡は、 F_0 及び F_1 世代いずれにおいても認められなかった。検体投与による症状として、 F_1 生育期の 75ppm 群で、脱毛(雌)、振戦及び被毛の汚れが認められた。振戦は、 F_1 の 15ppm 群雌でも認められたが、少数例における一過性の発現であり、検体投与による影響とは考えられなかった。

体重及び体重増加量について、生育及び妊娠期間中は F_0 及び F_1 の 75ppm 群雌で有意に減少し、また F_1 の 75ppm 群雄でも有意に減少した。 F_0 及び F_1 の 15ppm 群雌では体重減少は認められたが、増加量に有意な影響は認められなかった。哺育期間中は F_0 及び F_1 の 15ppm 群以上で有意な体重減少が認められたが、増加量に有意な影響は認められなかった。

摂餌量に対する影響は認められなかった。

肉眼的病理検査では、 F_0 の検体投与群雌で 4 ないし 5 例に子宮腔内液体貯留が認められ、病理組織学的検査では、 F_0 の 75ppm 群雌に黄体減少、卵胞増加、子宮拡張及び子宮内膜上皮肥大が認められたが、 F_1 雌に検体の影響を示唆する変化が全く認められなかったことから、生物学的変動によるものと考えられた。

繁殖性に関しては、 F_0 の 15 及び 75ppm 群で妊娠率がやや低かったが、 F_1 でこのような変化は認められず、検体影響とは考えられなかった。また、雄の交尾までの日数及び雌の妊娠期間にも何ら影響は認められなかった。

児動物 : 出生時の新生児数及び体重について、検体投与による影響は認められなかった。

F_1 の 75ppm 群で、生後 14 及び 21 日の雄体重、並びに生後 7、14 及び 21 日の雌体重は有意な低値を示した。また、 F_2 の 75ppm 群では、生後 21 日の雄体重、並びに生後 14 及び 21 日の雌体重が有意な低値を示した。

4 日生存率は、 F_1 及び F_2 の 75ppm 群で低下した。しかし離乳率に変化は認められなかった。

以上の通り、ラットに 2 世代にわたって本剤を混餌投与した場合、親動物では 75ppm 群の F_1 雌で振戦等の症状、 F_1 雄、 F_0 及び F_1 雌で体重増加抑制、15ppm 群の F_0 及び F_1 雌で低体重が認められた。児動物では、75ppm 群の F_1 及び F_2 生存率の低下、体重増加抑制が認められた。従って、本試験における親及び児動物に対する無毒性量は雄 15ppm (F_0 : 1.0、 F_1 : 1.0mg/kg/日)、雌 3ppm (F_0 : 0.2、 F_1 : 0.3mg/kg/日)と考えられた。繁殖については、最高投与量の 75ppm 群で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日産化学工業株式会社にある。

表-2 試験結果

世代		親 : F ₀ 児 : F ₁				親 : F ₁ 児 : F ₂					
投与量 (ppm)		0	3	15	75	0	3	15	75		
供試動物数	雄	26	26	26	26	30	30	30	30		
	雌	26	26	26	26	30	30	30	30		
検体摂取量* (mg/kg/日)	雄		0.2	1.0	5.0		0.2	1.0	5.6		
	雌		0.2	1.2	6.7		0.3	1.4	8.2		
一般状態								一過性の 振戦(雌)	脱毛(雌)、 振戦、被毛 の汚れ		
死亡率 (%)	雄	0	0	0	0	0	0	3.3	0		
	雌	0	0	0	3.8	0	0	0	0		
親動物	生育期最終	雄	507.5	498.2 (98)	519.7 (102)	524.1 (103)	533.0	511.9 (96)	525.4 (99)	479.1 ↓ (90)	
		雌	293.9	284.4 (97)	281.8 ↓ (96)	275.3 ↓ (94)	297.4	285.2 (96)	277.5 ↓ (93)	247.1 ↓ (83)	
	妊娠 20 日	雄	415	400 (96)	397 ↓ (96)	381 ↓ (92)	424	402 (95)	390 ↓ (92)	350 ↓ (83)	
		雌	337.6	330.2 (98)	315.0 ↓ (93)	303.5 ↓ (90)	337.5	326.3 (97)	317.5 ↓ (94)	279.5 ↓ (83)	
	増 加 量	雄	270.7	267.9 (99)	287.7 (106)	288.8 (107)	456.8	439.0 (96)	451.6 (99)	426.2 ↓ (93)	
		雌	127.0	118.1 (93)	120.9 (95)	109.2 ↓ (86)	222.1	216.2 (97)	209.7 (94)	200.1 ↓ (90)	
	妊 娠 期	雄	124	121 (98)	117 (94)	111 ↓ (90)	116	113 (97)	109 (94)	96 ↓ (83)	
		雌	10.5	18.5 (176)	1.8 (17)	5.4 (51)	-1.1	10.1	7.5	-0.2	
	哺 育 期**	雄	190.6	194.0 (102)	194.5 (102)	195.2 (102)	192.0	191.9 (100)	188.2 (98)	186.2 (97)	
		雌	141.4	137.7 (97)	139.3 (98)	143.1 (101)	163.3	154.9 (95)	148.8 (91)	154.7 (95)	
	摂 餌 量 (g)	妊 娠 期	0-7 日	186	166 ↓ (89)	176 (95)	179 (96)	185	183 (99)	183 (99)	174 (94)
			7-14 日	190	171 ↓ (90)	179 ↓ (94)	189 (99)	191	188 (98)	190 (99)	190 (99)
14-20 日			171	155 ↓ (91)	163 (95)	165 (96)	169	162 (96)	166 (98)	155 ↓ (92)	
哺 育 期		0-4 日	128.3	115.7 (90)	118.6 (92)	113.7 (89)	128.5	140.8 (110)	141.0 (110)	104.1 (81)	
		4-7 日	133.6	126.0 (94)	117.1 (88)	130.9 (98)	117.9	141.4 (120)	131.6 (112)	104.8 (89)	
		7-14 日 ***	-	-	-	105.9 (-)	-	-	-	-	

Dunnett 法 ↑ ↓ : P<0.05

() : 対照群に対する変動率(%)を表す。 空欄は変化なし

* : 生育期の平均値。申請者が算出した。

** : F₁については対照群で増加量が負の為算出せず。

*** : 餌こぼしにより測定不能。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

表-2 試験結果 (続き)

世代		親 : F ₀ 児 : F ₁				親 : F ₁ 児 : F ₂				
投与量 (ppm)		0	3	15	75	0	3	15	75	
親動物	肉眼的病理所見 (雌)	子宮腔内液体貯留	0/26	5/26	4/26	4/25	2/30	4/30	3/30	1/30
		子宮拡張	0/26	0/26	1/26	2/25	2/30	4/30	3/30	1/30
		子宮壁肥厚	0/26	0/26	0/26	1/25				
	病理組織学的所見 (雌)	成熟黄体	26/26	0/1	—	22/25	28/30	—	—	28/30
		卵胞増加	1/26	0/1	—	19/25	7/30	—	—	8/30
		子宮拡張	3/26	5/5	3/4	7/25	3/30	4/4	2/3	4/30
		子宮内膜上皮肥大	5/26	0/5	0/4	11/25				
	交尾率 (%)		100	100	100	100	90	93	97	90
	妊娠率 (%)		100	88	77	81	77	73	80	80
	授胎率 (%)		100	88	77	81	85	79	83	89
	受胎率 (%)		100	88	77	81	85	79	83	89
	出産率 (%)		100	100	100	100	100	95	96	96
	交尾までの日数		3.3	3.1	2.5	3.2	5.2	3.8	3.6	4.3
	妊娠期間 (日)		21.8	21.8	21.7	21.9	22.0	21.9	22.0	22.1
死産児数/腹		0.4	0.6	0.4	0.3	0.5	0.1	0.5	0.5	
新生児数/腹 (分娩後 0 日)	雄	6.5	7.3	6.9	6.2	6.0	6.4	6.4	5.3	
	雌	6.4	6.2	6.5	6.4	5.7	6.4	6.6	5.5	
	計	12.9	13.5	13.4	12.6	11.7	12.8	13.0	10.8	
生存率 (%)	0 日	97	96	97	98	95	99	97	96	
	4 日 (調整前)	96	92	94	84	93	91	89	59	
	7 日	98	98	98	95	92	89	89	98	
	14 日	98	97	96	86	89	76	88	87	
	21 日 (離乳率)	98	97	96	90	89	75	88	83	
児動物	0 日	雄	6.2	6.1	6.1	6.0	6.3	6.4	6.5	6.2
		雌	5.9	5.8	5.8	5.7	5.9	6.1	6.1	5.9
	4 日	雄	8.9	8.5	8.5	8.4	8.3	7.6	7.9	8.5
		雌	8.6	8.0	8.3	7.6	7.9	7.0	7.6	7.9
	7 日	雄	13.9	13.2	13.1	12.3	12.6	10.7	12.2	12.0
		雌	13.4	12.2	13.2	11.0 ↓ (82)	12.1	9.9 ↓ (82)	11.8	11.0
	14 日	雄	27.9	27.4	27.5	23.5 ↓ (84)	26.5	24.4	24.9	23.0
		雌	26.9	25.9	27.2	21.0 ↓ (78)	25.4	22.9	25.0	20.8 ↓ (82)
	21 日	雄	44.8	44.5	45.1	36.2 ↓ (81)	44.2	39.4	40.6	35.6 ↓ (81)
		雌	43.6	41.8	43.6	33.0 ↓ (76)	41.2	37.2	40.8	32.8 ↓ (80)
肉眼的病理所見		特記すべき変化なし				特記すべき変化なし				

Dunnett 法 ↑ ↓ : P<0.05

()内は対照群に対する変動率 (%) を表す。 — : 検査せず

空欄は「0」を示す。

② ラットにおける発達神経毒性試験

(資料No. VI-2)

試験機関 : Huntingdon Life Sciences Ltd. (GLP 対応)
報告書作成年 : 1995 年

試験の目的 : 雌ラットに検体を妊娠 6 日から哺育 10 日まで連続投与した際の、新生児神経系への機能的及び形態的变化の可能性を明らかにするため、米国 EPA のガイドライン (Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision F, Series 83-6, 1991) に従って実施した。

検体の純度 : %

供試動物 : SD (Cr1:CD) 系ラット、1 群雌 22 匹 (雄はストック動物を使用)、
試験開始時 10-11 週齢 (雌)、試験開始時体重 : 238-315g (雌)

妊娠動物の作出 : 雌は、同系統、同繁殖場の種雄と 1:1 で交配させた。同居の翌日膣栓を調べ、膣垢標本中に精子の存在を確認したものを妊娠動物とした。膣栓確認日を妊娠 0 日とした。

試験期間 : 出産後 60 日まで観察 (1995 年 3 月 27 日-1995 年 7 月 16 日)

投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、胃管を用い、妊娠 6 日から哺育 10 日まで毎日強制経口投与した。投与容量は 5ml/kg とした。対照群にはコーン油のみを同様に投与した。分娩中は投与しなかった。

群 No*		投与量 (mg/kg/日)	使用雌動物数
4	対照群	0	22
3	検体	0.5	22
1	検体	1.4	22
2	検体	4.0	22

* : 群番号から投与量が推察できないようにランダム化した。

観察・検査項目概要

世代	期間(週間)	作業手順	観察・検査項目
P (親)	入荷	9-10 週齢	
	馴化	5 日間	
	交配	雌は、同系統、同繁殖場の種雄と 1:1 で交配 交尾は膣栓、精子の存在で確認 (妊娠 0 日)	交配状況の観察 交配終了後の雄：検査対象外
	妊娠	妊娠 6 日より投与開始	症状観察：毎日 体重測定：妊娠 0、6、10、14、18、20 日
	分娩	自然分娩、自然哺育	妊娠期間算出 分娩状況 (分娩開始、進行、終了) の観察
F1 (児)	哺育	哺育 10 日まで投与 生後 1 日に産児観察 生後 4 日に同腹児数を 8 匹 (雄 4、雌 4) に調整 調整もれ産児は廃棄	総産児数 (生存及び死亡)、生存児の体重測定、性別及び産児の観察 P：母性行動観察；毎日 体重測定；哺育 1、4、11、17、21 日 視覚機能観察；哺育 10 日 F1：外表及び行動異常の観察；毎日 産児数 (生存及び死亡) 計数；毎日 体重測定；生後 4、11、17、21 日 性比；生後 4、11、21 日 身体発育指標の観察 自発運動量測定；生後 13、17、21 日 脳神経系病理組織学検査及び剖検； 生後 11 日
	離乳		P：剖検
	生育		F1：体重測定；毎週 身体発育指標の観察 自発運動量測定；生後 60 (±2) 日 聴覚による驚愕反応、学習記憶能力； 生後 22/23、60 (±2) 日 脳神経系病理組織学検査及び剖検； 生後 60 (±2) 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日産化学工業株式会社にある。

統計学的評価法：

- ①自発運動量のスコア；等分散及び正規性について各々Bartlett の検定及び Shapiro-Wilk 統計量により確認した。
 - A. いずれかの検定が 0.05 水準で有意なとき、群間の差について Kruskal-Wallis 検定により確認した。0.05 水準で有意ならば対照群との間で Mann-Whitney 検定により対比較を行う。
 - B. Bartlett 検定及び Shapiro-Wilk 統計量がいずれも有意でないならば群間の比較を一元配置分散分析 (ANOVA) により確認した。0.05 水準で有意ならば対照群との比較を Dunnett の検定により行った。
- ②学習能力、体重、体重増加；群間の比較を一元配置分散分析 (ANOVA) により評価した。有意ならば t 検定により対照群と比較した。
- ③聴覚による驚愕反応；
 - A. 順応；残差の正規性のための Shapiro-Wilk 統計量に指示されているように解析前に全てのデータを $\text{Log}(X+1)$ 変換した。22 日齢のデータは全てこれを考慮して解析した。以下のように 2 つの解析を実施した。
 - 1) 繰り返しのある構造内で、群と時間の相互作用を時間に関してパターンが同様かどうかを見ることにより検定した。
 - a) 0.05 水準で有意ならば(繰り返しのある構造内で)時間に関するパターンを対照群と投与群間で比較した。
 - b) 有意でないならば(繰り返しのある構造内で)群の効果を特定の群が他群と異なるかどうかを確認した。
 - 2) 群間の差の有意性について 5 つのデータ区分毎に ANOVA により確認した。ANOVA で有意でないならばそれ以上の解析は行わなかった。有意ならば t 検定あるいは Dunnett の検定により対照群と比較した。
 - B. 前置パルス制御；制御百分率の計算を除き解析前にすべてのデータを $\text{Log}(X+1)$ 変換した。22 日齢のデータは検査箱による違いも含めて解析した。2 種の試行型及び制御百分率について一元配置の ANOVA により評価した。
0.05 水準で有意ならば対照群との差を t 検定あるいは Dunnett の検定により対比較した。
- ④1 腹の産児数、産児の生存率、産児の発育；Mann-Whitney の検定により対照群との間で対比較した。
- ⑤臓器重量；Bartlett の検定により等分散性を確認した。統計学的に有意ならば Behrens-Fisher 検定により対比較し、有意でないならば Dunnett 検定を用いた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

データの取扱：

- ①妊娠期間；交配日を1日とし、最初の産児を観察した日までを含む妊娠日数として計算した。
夜間に分娩を開始した時はこの値から1/2を差し引いた。

②出産率；
$$\frac{\text{生存児を分娩した腹数}}{\text{妊娠動物数}}$$

③生存率；

$$\text{着床後生存率} = \frac{\text{生後1日の総産児数}}{\text{子宮内の総着床数}} \times 100$$

$$\text{出生率} = \frac{\text{生後1日の総生存児数}}{\text{生後1日の総産児数}} \times 100$$

$$\text{4日/11日生存率} = \frac{\text{生後4日あるいは11日の調整前の総生存児数}}{\text{生後1日あるいは4日（調整後）の総生存児数}} \times 100$$

$$\text{17及び21日の哺育率} = \frac{\text{検査日の総生存児数}}{\text{生後11日の総生存児数}} \times 100$$

- ④性比；各群につき生後1日の雄産児数に対する雌産児数の比を求め、さらに生後1日、4日（調整前、調整後）及び21日に生存胎児についてその比を求めた。
- ⑤産児の発育時期；離乳前の児指標については、連続性の補正のため、夜間生まれた腹の日齢（哺育日）から1/2を差し引いた。離乳後の指標については、連続性の補正を行わず、完了日の体重と日齢とを関連づけた。
- ⑥自発運動量スコアの平均値及びSDは各性、各検査間隔及び総検査期間について以下の式より求めた。

$$\frac{\text{産児の個体別スコアの総計}}{\text{産児数}}$$

- ⑦驚愕反応強度の平均値とSDは順応検査では個体毎に10試行のブロックそれぞれの平均値を個体毎に求めた。群の平均値は産児個体毎の平均値から性毎に求めた。
- ⑧遊泳時間の群の平均値及びSDは以下のように求めた。

$$\frac{\text{産児毎の遊泳時間の総和}}{\text{産児数}}$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

産児の各検査への配分：産児調整後、各腹の産児を以下の各種検査へ無作為に配分した。

①自発運動量及び聴覚による驚愕反応前置パルス制御評価：各腹雌雄 1 匹

計画数 1 群 22 腹、両性で 44 匹、総計 176 匹。

②聴覚による驚愕反応の順応評価：各腹雌雄 1 匹、

計画数 1 群 22 腹、両性で 44 匹、総計 176 匹。

③学習・記憶能力評価：各腹雌雄 1 匹

計画数 1 群 22 腹、両性で 44 匹、総計 176 匹。

④生後 11 日目脳検査：各腹雄あるいは雌 1 匹

計画数 1 群 22 腹、両性で 22 匹、総計 88 匹。

⑤生後 60(±2)日脳検査：雄あるいは雌 1 匹 (11 齢で選抜した産児の反対の性)

計画数 1 群 22 腹、両性で 22 匹、総計 88 匹。

上記①②③の検査後の産児の中から各群雌雄 6 匹を無作為に生後 60(±2)日に屠殺し神経病理学的検査を実施した。

計画数 1 群雌雄各 6 匹で 12 匹、総計 48 匹。

試験項目及び結果：

《分娩前観察(母動物)》

一般状態及び生死；妊娠期間中毎日観察した。

結果を下表に示した。

投与量 (mg/kg/日)	0	0.5	1.4	4.0	
母動物数	22	22	22	22	
症状発現動物数	1	1	0	6	
症状	振戦—軽度	0	0	0	3
	振戦—中等度	0	0	0	3
	眼瞼部分閉鎖	0	0	0	1
	異常呼吸	0	0	0	1
	呼吸速迫	0	0	0	1
	立毛	0	1	0	2
	流涎	1	0	0	0

4mg/kg/日群で妊娠末期にかけて散発的な振戦が観察され、投与に関連する所見と考えられた。4mg/kg/日群で認められたその他の症状は、眼瞼部分閉鎖、異常呼吸、呼吸速迫、立毛であったが、単発的でいずれも投与との関連性ははっきりしなかった。

死亡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日産化学工業株式会社にある。

母体重 ; 妊娠 0、6、10、14、18 及び 20 日、哺育 1、4、11、17 及び 21 日に測定した。
結果を下表に示した。

投与量 (mg/kg/日)	妊娠期間 (日)						哺育期間 (日)				
	0	6	10	14	18	20	1	4	11	17	21
0.5	99.6	99.4	99.1	99.2	98.6	99.1	99.7	99.2	98.5	99.2	100.0
1.4	98.5	98.4	98.5	98.6	98.8	98.5	99.4	99.2	99.0	98.7	98.7
4.0	98.9	98.1	97.9	97.8	98.3	97.2	96.0	95.7↓	96.2↓	98.0	99.2

t検定 ↑ ↓ : p<0.05

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

4mg/kg/日群の平均体重は妊娠末期にかけてわずかに低かったが統計学的に有意ではなかった。この結果、哺育期間前半の同群の平均体重がわずかに低値を示した。しかし哺育 21 日までには対照群とほぼ同等となった。

《分娩後観察(母動物)》

妊娠期間、分娩状況、母性行動の観察 ; 自然分娩、自然哺育させた。交配後 20 日以降は毎日 3 回、週末は毎日 2 回観察した。母性行動は毎日観察した。

結果を下表に示した。

投与量 (mg/kg/日)	妊娠 動物数	妊娠期間(日)				生存児を出産 した動物数	出産率 (%)
		22	22 1/2	23	23 1/2		
0	22	2 (9)	10 (45)	8 (36)	2 (9)	22	100
0.5	22	4 (18)	12 (55)	4 (18)	2 (9)	22	100
1.4	22	4 (18)	11 (50)	7 (32)	0	22	100
4.0	21	5 (24)	11 (52)	3 (14)	2 (10)	21	100

上段:実数、下段:分布百分率(妊娠期間は交配の確認から分娩の開始までの所要時間)

全ての動物が予想妊娠期間である 22~23 1/2 日の範囲内であった。出産率に投与の影響は受けず、難産の兆候もなかった。

視覚機能 ; 哺育 10 日目に点光源による瞳孔縮小反応観察により評価した。

全ての雌が正常な瞳孔縮小反応を示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

《分娩後観察(児動物)》

一般状態；全産児について外表及び行動異常を毎日観察した。

離乳前及び離乳後の一般状態は全群で同様であった。

産児数(哺育期間中の推移)；産児数を毎日記録し、死亡児については可能な限り外表及び内臓検査を実施した。生後4日には、産児数が8匹以上の腹について、無作為に8匹、可能な限り各腹とも雄4匹雌4匹に調整し、個体識別した。

結果を下表に示した。

投与量 (mg/kg/日)	着床数	哺育期間の産児数							
		総産児数	1日	4日		11日		17日	21日
				調整前	調整後	調整前	調整後		
0	16.6	15.3	15.2	15.1	8.0	8.0	7.0	7.0	7.0
	22	22	22	22	22	22	22	22	22
0.5	16.4	14.7	14.7	14.5	8.0	8.0	7.0	7.0	7.0
	22	22	22	22	22	22	22	22	22
1.4	16.8	15.4	15.4	15.0	8.0	8.0	7.0	7.0	7.0
	22	22	22	22	22	22	22	22	22
4.0	17.3	16.0	15.5	14.8	7.9	7.9	6.9	6.9	6.9
	21	21	21	20*	20	20	20	20	20

上段：平均同腹児数 下段：腹数

*：1腹を、小型、蒼白脆弱及び無哺乳の理由より、3日に人道的屠殺した。

投与による影響は認められなかった。

生存率、哺育率、離乳率；結果を下表に示した。

投与量 (mg/kg/日)	着床後生存率 (%)	出生率 (%)	生存率 (%)		哺育率 (%)	
			4日	11日	17日	21日
0	91	99	99	99	100	100
0.5	90	100	99	100	100	100
1.4	92	100	98	99	100	100
4.0	92	96	91↓	99	100	100

Mann-Whitney 検定 ↑ ↓ : p<0.05

4.0mg/kg/日群では、生後3日に1腹を小型、蒼白脆弱及び無哺乳の理由により人道的屠殺したため、4日生存率が軽度ではあるが有意に低下した。産児数調整後、生存率に変化は認められなかった。検体投与の影響は認められなかった。

性比；産児の性比(雄：雌)を生後1日に総産児数から、さらに生後1,4(調整前及び調整後)、11(調整前及び調整後)及び21日に生存産児数から求めた。

結果を下表に示した。

投与量 (mg/kg/日)	総産児		生存産児				
	1日	1日	4日		11日		21日
			調整前	調整後	調整前	調整後	
0	1:0.78	1:0.78	1:0.78	1:0.96	1:0.94	1:0.94	1:0.94
0.5	1:0.80	1:0.79	1:0.79	1:0.96	1:0.96	1:0.95	1:0.95
1.4	1:1.02	1:1.02	1:1.01	1:1.00	1:1.01	1:1.01	1:1.01
4.0	1:0.98	1:0.98	1:0.92	1:0.88	1:0.89	1:0.88	1:0.88

投与による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日産化学工業株式会社にある。

体重 ; 産児の体重を、生後 1、4(調整前及び調整後)、11(調整前及び調整後)、17 及び 21 日に個別に測定、その後は毎週測定した。体重増加量も算出した。結果を下表に示した。

平均体重 【雄】

投与量 (mg/kg /日)	1 日	4 日		11 日		17 日	21 日	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週
		調整前	調整後	調整前	調整後							
0.5	97.1	95.1	93.3	95.5	95.2	95.2	94.7	94.4	95.3	95.9	95.9	97.4
1.4	98.6	94.1	92.4	94.5	93.8	94.7	93.4	97.2	97.7	98.8	99.1	98.7
4.0	94.3↓	86.3⇩	84.8⇩	90.3↓	89.7↓	92.5↓	91.5↓	91.7↓	90.6↓	93.0↓	93.7↓	95.6

t 検定 ↑↓ : p<0.05 ⇩⇩ : p<0.01 ⇩⇩ : p<0.001

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

平均体重 【雌】

投与量 (mg/kg /日)	1 日	4 日		11 日		17 日	21 日	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週
		調整前	調整後	調整前	調整後							
0.5	97.0	95.8	93.9	94.2	94.2	95.7	94.3	95.8	96.5	97.3	98.2	98.8
1.4	98.5	94.8	92.9	96.0	96.4	98.1	96.8	99.0	100.7	100.5	102.3	102.0
4.0	93.9↓	89.6↓	88.9⇩	93.9	93.9	97.4	95.3	97.9	97.9	98.4	100.0	102.4

t 検定 ↑↓ : p<0.05 ⇩⇩ : p<0.01

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

体重増加量 (申請者が作成)

投与量 (mg/kg/日)	雄		雌	
	4-21 日	4-8 週	4-21 日	4-8 週
0.5	94.7	98.6	94.4	100.7
1.4	93.6	99.3	97.5	104.0
4.0	92.7↓	97.1	96.5	105.3

t 検定 ↑↓ : p<0.05

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

平均体重が、4mg/kg/日群の生後 1 及び 4 日の雌雄で、わずかではあるが対照群の産児に較べて統計学的に有意に低下した。また、離乳前の生後 4 から 21 日までの総体重増加量は、雄産児において統計学的に有意に減少した。以上の変化は検体投与による影響と考えられた。

同群雄では、離乳後体重の有意な低下が認められたが、体重増加量に差がなかったことから、離乳前の低体重による影響と考えられた。

身体の発育 ; 下記の指標について開始日と完了日を記録し評価した。

離乳前の指標 a)~d)については、腹毎に評価し、離乳後の指標 e)及び f)については個体毎に評価した。

- a) 耳介の開展
- b) 毛生
- c) 切歯萌出
- d) 眼瞼開裂
- e) 包皮分離
- f) 臍開口

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

結果を下表に示した。

投与量 (mg/kg/日)	耳介の開展		毛生		切歯萌出		眼瞼開裂	
	開始日	完了日	開始日	完了日	開始日	完了日	開始日	完了日
0	2.5 (22)	3.5 (22)	2.4 (22)	3.4 (22)	8.5 (22)	10.5 (22)	13.4 (22)	15.0 (22)
0.5	2.5 (22)	3.7 (22)	2.3 (22)	3.3 (22)	8.9 (22)	11.1 (22)	13.6 (22)	15.3 (22)
1.4	2.6 (22)	3.6 (22)	2.5 (22)	3.4 (22)	8.8 (22)	11.1 (21)	13.8 (22)	15.4 (22)
4.0	2.7 (20)	3.6 (20)	2.4 (20)	3.5 (20)	8.9 (20)	11.3 (20)	13.3 (20)	15.2 (20)

下段()内は観察腹数

投与量 (mg/kg/日)	観察腹数	包皮分離	臆開口
0	22	43 (41-47)	34 (30-38)
0.5	22	45 (40-51)	34 (31-37)
1.4	22	44 (40-59)	34 (31-41)
4.0	20	45 (41-49)	34 (31-41)

下段()内は range

身体の発育速度は母動物への投与により影響されなかった。切歯萌出が検体投与群においてやや遅延する傾向が認められ、ごく軽微な低体重との関係が示唆されたが、検体による明らかな影響とは考えられなかった。

自発運動量；各腹雄1雌1匹について、生後13、17、21及び60(±2)日に個体別に測定した。高位置及び低位置に赤外線ビームの通った透明ケージに動物を入れ、10分間隔で1時間連続的に、立ち上がり回数及び水平運動を記録した。

結果を下表に示した。

投与量 (mg/kg/日)	ビーム レベル	雄				雌			
		13日	17日	21日	60±2日	13日	17日	21日	60±2日
0	高	0.0	16.1	26.5	421.9	0.4	21.2	32.8	444.5
	低	300.0	621.9	439.1	724.0	195.6	628.7	409.5	808.5
	観察数	22	22	22	22	22	22	22	22
0.5	高	0.0	10.7	35.1	359.5	0.0	6.6↓	27.0	351.1
	低	276.8	761.2	504.0	739.3	208.3	563.6	427.5	793.2
	観察数	22	22	22	22	22	22	22	22
1.4	高	0.4	5.3	29.8	343.9	0.0	6.5	22.9	427.6
	低	198.9	418.2	456.8	617.0	234.0	537.1	418.5	724.4
	観察数	21	21	21	21	22	22	22	22
4.0	高	0.3	15.1	29.9	387.3	0.0	17.7	24.3	430.1
	低	210.8	763.5	450.9	723.6	198.9	839.2	433.7	826.1
	観察数	20	20	20	20	19	19	19	18

Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Dunnett 検定 ↑ ↓ : p<0.05

用量あるいは投与に関連した一貫した傾向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日産化学工業株式会社にある。

学習・記憶能力；各腹雄 1 雌 1 匹について、生後 22-23 及び 60(±2) 日に実施した。Y 型水迷路を使用して評価した。連続した 6 試行において迷路を泳ぎ切るのに要した時間を記録した。短期間の記憶を 24 時間後に連続した 2 試行のゴール到達に要した時間を計測記録した。各試行は 60 秒間に制限し超過したものは検査不成功とした。結果を下表に示した。

《22/23 日の検査》

性	投与量 (mg/kg/日)	検査 動物数	連続 6 試行						記憶後 2 試行	
			1	2	3	4	5	6	1	2
雄	0	22	17.9	6.8	5.3	4.6	3.9	4.3	7.6	4.7
	0.5	22	16.0	8.3	5.3	4.9	3.6	3.6	6.9	4.0
	1.4	22	19.1	7.5	5.5	4.7	4.6	5.2	7.0	4.0
	4.0	20	21.0	6.8	5.7	4.2	4.4	4.3	8.8	3.2
雌	0	22	17.2	8.6	4.3	3.9	4.1	4.1	7.9	3.5
	0.5	21	15.6	7.6	5.2	4.4	4.2	3.2	6.8	3.7
	1.4	22	19.6	7.8	7.5	5.4	4.0	4.6	8.2	3.8
	4.0	19	16.4	8.1	7.3	3.7	3.4	3.7	8.3	4.1

《60±2 日の検査》

性	投与量 (mg/kg/日)	検査 動物数	連続 6 試行						記憶後 2 試行	
			1	2	3	4	5	6	1	2
雄	0	22	14.6	9.2	8.8	10.9	10.5	9.5	9.6	9.7
	0.5	22	15.1	8.6	8.3	8.5	8.2	10.6	7.9	7.5
	1.4	22	18.2	9.5	10.2	9.6	11.6	8.7	9.0	7.7
	4.0	20	17.8	9.1	10.0	7.7	8.6	8.8	9.2	7.7
雌	0	22 ^{a)}	15.9	8.5	7.7	9.2	8.8	8.5	9.4	9.3
	0.5	21	12.6	9.3	7.8	8.7	8.9	7.8	8.4	6.2
	1.4	22	14.1	8.6	7.5	8.5	7.7	8.4	9.0	8.3
	4.0	19	13.7	9.8	8.0	8.1	10.1	9.1	6.6	9.3

a) : 21 匹で計算 (不成功による除外)

投与による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日産化学工業株式会社にある。

聴覚による驚愕反応；

A：順応検査；各腹雄1雌1匹について、生後22及び60(±2)日に聴覚による驚愕反応の順応検査をした。検査では10試行からなる試験区を5回連続して実施し、その驚愕反応強度を記録した。驚愕刺激は50ミリ秒長の720units(約120dB)の白色雑音のバーストで、背景雑音レベル360units、試行間隔は15、10、12及び18秒の繰り返しである。

結果を下表に示した。

《22日の検査》

性	投与量 (mg/kg/日)	検査 動物数	10試行				
			1	2	3	4	5
雄	0	22	79.5	66.8	66.8	67.1	67.3
	0.5	21	95.9	70.3	70.2	64.9	61.2
	1.4	21	95.0	68.2	69.5	62.7	65.7
	4.0	20	80.2	64.2	59.8	60.6	61.7
雌	0	22	89.4	63.2	67.7	66.7	70.8
	0.5	21	88.7	70.3	61.7	62.2	58.2↓
	1.4	21	82.2	65.7	62.7	60.2	61.4↓
	4.0	19	87.2	70.5	70.5	71.1	71.6

t検定 ↑ ↓ : p<0.05

《60±2日の検査》

性	投与量 (mg/kg/日)	検査 動物数	10試行				
			1	2	3	4	5
雄	0	22	273.0	168.3	165.4	147.6	157.8
	0.5	22	266.5	194.3	178.2	161.4	159.3
	1.4	22	314.6	225.7	218.7	180.6	169.7
	4.0	20	288.0	179.1	174.8	196.2	200.4
雌	0	22	193.8	146.5	155.2	145.9	142.7
	0.5	22	249.4	157.6	138.5	132.2	144.1
	1.4	22	215.9	155.7	151.4	135.2	140.9
	4.0	19	240.9	165.5	169.6	150.7	165.0

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

B: 前置パルス制御; 生後 22 及び 60(±2) 日に自発運動量の測定に使用した動物を用いて実施した。

前置パルスを伴う 12 試行と、伴わない 15 試行での平均驚愕反応強度を記録した。驚愕刺激は順応検査で使用したものと同一で、前置パルスは 50 ミ秒の雑音バースト(480units)で、50 ミ秒の驚愕刺激の直前に与えた。試行には対照のための無刺激(背景雑音のみ)あるいは前置パルスのみも含めた。4種の刺激型は刺激間隔10、15、8及び12秒の繰り返しを用いた。

測定は全て、自動驚愕反応システム(San Diego Instrument Inc.)により3分間の背景雑音への順化期間を置いて実施した。この背景雑音は検査前に一定レベルに調整し、各箱のプラットホームの感度は試験日毎に校正した。

結果を下表に示した。

《22日の検査》

性	投与量 (mg/kg/日)	検査 動物数	前置パルス を伴わない	前置パルス を伴う	制御率
雄	0	22	99.4	48.2	53.6
	0.5	22	81.1	33.1	60.3
	1.4	21	79.1	32.3	60.3
	4.0	20	76.3	30.4	61.1
雌	0	22	82.4	32.0	62.1
	0.5	22	73.3	30.8	59.4
	1.4	22	72.0	28.1	61.5
	4.0	19	78.7	30.7	61.3

《60±2日の検査》

性	投与量 (mg/kg/日)	検査 動物数	前置パルス を伴わない	前置パルス を伴う	制御率
雄	0	22	275.3	118.7	59.3
	0.5	22	240.8	81.3	63.7
	1.4	21	233.8	82.0	66.0
	4.0	20	225.9	91.1	62.3
雌	0	22	163.8	61.2	60.6
	0.5	22	161.5	66.3	58.9
	1.4	22	187.7	60.0	65.7
	4.0	18	153.8	62.9	55.4

驚愕反射への順応及びパルス制御は群間で多少のばらつきがあったものの、投与によるものとは考えられなかった。

《最終検査》

母動物 ; 離乳後あるいは産児が全て死亡した後に屠殺した。外表及び内臓肉眼解剖、子宮内の着床数を記録した。腹児が離乳前に死亡した時は、乳腺の検査をした。

11日齢産児 ; 生後11日に、各腹から雄あるいは雌1匹を選抜、屠殺後、脳を分離秤量し、4%中性緩衝ホルムアルデヒド溶液で浸漬固定した。屍体は解剖し、異常組織は保存した。これらの動物のうち各群雌雄6匹を選抜し神経病理学検査を実施した。

主な脳部位を全て処理した。嗅球、大脳皮質、海馬、大脳基底核、視床、視床下部、中脳(蓋、被蓋、大脳脚)、脳幹及び小脳をパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。

60日齢産児 ; 生後60±2日に、生後11日検査で選抜した動物とは反対の性の動物を各腹児から取り出し、屠殺した。屠殺後、脳を分離秤量し、4%中性緩衝ホルムアルデヒド溶液で浸漬固定した。

加えて、各群雌雄6匹を選抜し神経病理学的検索を実施した。これらの産児にはペンタバルビタール・ナトリウムを投与し、深麻酔に誘導した。心臓を露出して屠殺し、アルデヒド系のKarnovskyの固定液で大動脈を経由し灌流した。屍体は解剖し、異常組織は保存した。主な脳部位を全て処理した。嗅球、大脳皮質、海馬、大脳基底核、視床、視床下部、中脳(蓋、被蓋、大脳脚)、脳幹及び小脳をパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。加えて、頸部、胸部及び腰部脊髄の横断面切片についても検索した。左側の、坐骨、脛骨及び腓骨神経の縦断及び横断面の標本を樹脂包埋し、1ミクロンの薄切標本を作成し、トルイジンブルーで染色した。

臓器重量 ; 生後11及び60±2日の産児について、脳重量を測定し、対体重比を算出した。結果を下表に示す。

性		雄			雌		
		0.5	1.4	4.0	0.5	1.4	4.0
検査時期	投与量 (mg/kg/日)						
	絶対	93.8	92.9	88.5 ↓	95.3	98.1	104.7
11日	相対	96.4	101.0	100.1	104.5	101.0	107.3
	絶対	96.8	100.9	98.6	102.0	96.0	101.5
60±2日	相対	102.0	103.9	100.2	101.3	94.6	102.7

Dunnett 検定 ↑ ↓ : p<0.05

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

生後11日に屠殺した4mg/kg/日群の雄産児の脳絶対重量はわずかに軽量だった。しかし相対重量に影響は認められず、また生後60±2日では影響が認められなかったことから、検体投与による影響とは考えられなかった。

解剖所見 ; 哺育21日に母動物を剖検したが、検体投与に関連する変化は認められなかった。

生後11日及び60±2日の産児を剖検した結果、母動物への検体投与に関連する所見は認められなかった。

病理組織学的検査 ; 生後11日及び60±2日の産児について神経病理学的検査を実施したが、特記すべき所見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日産化学工業株式会社にある。

EPN を妊娠ラットに、妊娠 6 日から哺育 10 日まで強制経口投与した結果、4.0mg/kg/日群で母動物に一過性の散発的な振戦が観察され、妊娠末期に神経系に対する影響が僅かではあるが認められた。妊娠末期の母動物の僅かな体重増加抑制、産児の離乳前の体重及び生存率に対する影響は投与による毒性と考えられた。F₀ 雌の F₁ 離乳までの投与における産児の行動評価では、発達神経毒性を示す結果は得られなかった。4mg/kg/日群の雄産児では生後 11 日に脳絶対重量の低値が認められたが、相対重量に変化はなく、生後 60 日の検査では影響が認められなかったことから、EPN 投与に関連しない変化と考えられた。臓器重量、肉眼的及び神経組織学的検査では、EPN 投与に関連した変化は認められなかった。母動物に一時的かつ、一過性の神経学的影響が認められたが、その後完全に回復した事から、母動物に EPN を 4mg/kg/日以下の用量で妊娠及び哺乳期間中に投与しても、母動物及び産児に永続的な神経学的障害を生じないと考えられた。

以上、EPN を妊娠ラットに妊娠 6 日から哺育 10 日まで投与した場合、4.0mg/kg/日群では母動物に振戦等の形で軽度かつ一過性の神経学的影響、妊娠末期の体重増加抑制が認められたが、その後回復した。同群の産児では離乳前の体重増加抑制及び 4 日生存率低下等の毒性徴候が認められたが、病理組織学的変化がなく、脳重量に投与に関連した影響は認められなかった。従って本試験における無毒性量 (NOEL) は、母動物及び児動物共に 1.4mg/kg/日と考えられた。また、発達神経毒性はないと考えられた。

③ ラットにおける催奇形性試験

(資料No. VI-3)

試験機関 : Hazleton Laboratories America, Inc. (GLP 対応)

報告書作成年 : 1986 年

検体の純度 : %

供試動物 : SD(Cr1:CD BR)系ラット、1群雌 25 匹、開始時体重範囲 : 184~266g

投与期間 : 器官形成期 (妊娠 6-15 日) 10 日間 (1985 年 11 月 25 日-12 月 19 日)

投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、0.3、0.6、1.2、2.4mg/kg/日の投与レベルで妊娠 6 日から 15 日までの 10 日間、毎日 1 回強制経口投与した。投与容量は 1ml/kg とした。対照群にはコーン油のみを同様に投与した。

交尾は、雄 1 匹と雌 1 匹とを同居させて行った。妊娠の確認は、毎日雌の膣栓もしくは膣内における精子の有無を確認し、確認した日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目 :

母動物 ; 一般状態及び死亡の有無は毎日 2 回観察し、触診は体重測定時に実施した。体重及び摂餌量は妊娠 0、6、8、12、16 及び 20 日に個体別に測定した。妊娠 20 日に母動物を炭酸ガス吸入法によって安楽死させ、帝王切開及び肉眼的病理検査を行い、妊娠黄体数、着床数及び部位、生存胎児数、早期及び後期吸収胚数、死亡胎児 (浸軟児を含む) 数について観察した。

上記より以下の指標を求めた。

$$\text{胎児死亡率} = (\text{死亡胚} \cdot \text{死亡胎児数} / \text{着床数}) \times 100$$

$$\text{着床率} = (\text{着床数} / \text{妊娠黄体数}) \times 100$$

$$\text{性比} = \text{雄生存児数} / \text{全生存児数}$$

生存胎児 ; 性別、体重、外表異常の観察を行った後、同腹児の半数を骨格検査、残りの胎児を内臓検査に振り分けた。内臓検査用胎児についてはブアン固定し、Wilson 法で観察した。骨格検査用胎児は Dawson 法で骨格標本作製し、骨格の異常、骨化程度、骨の配列を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

結果 : 下表に示した。

投与量 (mg/kg/日)		0	0.3	0.6	1.2	2.4	
1 群当たりの動物数		25	25	25	25	25	
1 群当たりの妊娠動物数		21	25	24	25	22	
母 動 物	死亡数	0	0	0	0	0	
	一般状態	異常なし				振戦、虚脱、 着色尿、血性 痲皮、鼻汁、 流涙	
	体重増加量 (0-20 日)	(g)	136	137	129	133	127
		(%)		(101)	(95)	(98)	(93)
	体重増加量 (6-16 日)	(g)	48	52	48	53	40
		(%)		(109)	(101)	(112)	(83)
	摂餌量 (0-20 日)	(g)	443	440	424	453	432
		(%)		(99)	(96)	(102)	(98)
	妊娠 21 日生存率 (%)	100	100	100	100	100	
	妊娠率 (%)	84	100	96	100	88	
	剖検所見	検体投与に起因する所見は認められなかった。					
	着 床 所 見 … 腹 平 均	妊娠黄体数	16.1	15.1	15.3	14.8	15.7
		着床数	14.0	14.3	14.0	13.6	14.3
		着床率 (%)	86	92	91	86	90
		生存胎児数	13.4	13.9	13.3	12.1	13.7
死亡胎児数		0	0	0	0	0	
着 床 後 死 亡		胚死亡率 (%)	5.0	3.0	5.0	9.0	4.0
		前期死亡胚数	0.6	0.4	0.7	1.3	0.5
		後期死亡胚数	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
	総死亡胚数	0.7	0.4	0.7	1.4	0.5	

Dunnett の t 検定、Terpstra-Jonckhere の傾向検定、Cochran-Armitage の検定、
Fisher の直接確率法

() : 対照群に対する変動率 (%) を表す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

投与量 (mg/kg/日)		0	0.3	0.6	1.2	2.4	
1 群当たりの妊娠動物数		21	25	24	25	22	
平均生存胎児体重 (g)	雄	3.5	3.4 (97)	3.5 (100)	3.5 (100)	3.5 (100)	
	雌	3.3	3.3 (100)	3.4 (103)	3.4 (103)	3.3 (100)	
生存胎児の性比 (雄/全胎児)		0.43	0.52	0.46	0.49	0.52	
奇形胎児数 [腹]		0	0	1 [1] (0.3)	1 [1] (0.3)	0	
変異胎児数 [腹]		103 [21] (37)	154 [24] (44)	122 [22] (38)	127 [25] (42)	114 [22] (38)	
外表異常	検査胎児数		281	347	318	303	302
	外表奇形胎児数 [腹]		0	0	0	1 [1] (0.3)	0
	内訳	口唇部欠損	0	0	0	1 (0.3)	0
		下顎欠損	0	0	0	1 (0.3)	0
胎児内臓異常	検査胎児数		136	165	153	147	148
	内臓変異胎児数 [腹]		16 [9] (12)	29 [18] (18)	34 [17] (22)	30 [15] (20)	23 [11] (16)
	内訳	腎乳頭の萎縮	10 (7)	26 (16)	25 (16)	20 (14)	15 (10)
		尿管拡張*	7 (2)	4 (1)	10 (3)	9 (3)	8 (3)
		腎臓の位置異常*	0	0	0	1 (0.3)	0
	内臓奇形胎児数 [腹]		0	0	1 [1] (0.7)	0	0
	内訳	小眼球症	0	0	1 (0.7)	0	0
骨格異常	検査胎児数		145	182	165	156	154
	骨格変異胎児数 [腹]		88 [21] (61)	128 [24] (70)	94 [21] (57)	106 [25] (68)	93 [22] (60)
	内訳	波状肋骨	1 (0.7)	0	0	6 (4)	0
		頭蓋骨	8 (6)	17 (9)	7 (4)	17 (11)	11 (7)
		舌骨	24 (17)	40 (22)	19 (12)	29 (19)	25 (16)
		椎骨 (第4尾椎)	38 (26)	62 (34)	35 (21)	51 (33)	52 (34)
		胸骨 (第5)	40 (28)	90 (49)	56 (34)	69 (44)	46 (30)
		四肢 (中手骨)	0	0	0	4 (3)	0
		骨盤 (坐骨)	2 (1)	1 (0.5)	0	1 (0.6)	0
	骨格奇形胎児数 [腹]		0	0	0	1 [1] (0.6)	0
内訳	下顎骨形成異常	0	0	0	1 (0.6)	0	

Dunnett の t 検定、Terpstra-Jonckhere の傾向検定、Cochran-Armitage の検定、Fisher の直接確率法

* : 検査は全生存胎児を対象とした。

< > : 対照群に対する変動率 (%) を表す。

() : 検査胎児数に対する奇形あるいは変異胎児数 (%) を表す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

- 母動物 ; 一般状態では、2.4mg/kg/日群で振戦、虚脱、円背位、鼻汁、流涙などが認められたが、それ以外の群には検体による影響は認められなかった。
体重変化では、2.4mg/kg/日群で投与期間中に、有意な変化ではなかったが僅かな体重増加抑制（83%）が認められた。0.3及び0.6 mg/kg/日群では投与開始前に有意な体重増加抑制が認められたが、検体による影響とは考えられなかった。
摂餌量には、検体投与による影響は認められなかった。
剖検では、いずれの群においても検体に起因する所見は認められなかった。
- 胎児 ; 死亡、体重に検体投与の影響は認められなかった。外表検査では、変異は認められず、1.2mg/kg/日群の1匹に口唇部と下顎の欠損が認められた。内臓検査では、変異は腎臓に局限して認められ、奇形は0.6mg/kg/日群の1匹に認められた小眼球症のみであった。骨格検査では、変異は頭骨、舌骨、椎骨、胸骨、四肢及び骨盤の骨化遅延、肋骨変異などが認められ、奇形は1.2mg/kg/日群の1匹に下顎及び周辺骨の形成異常であった。奇形及び変異の発生頻度に検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、母動物については2.4mg/kg/日で検体投与による一般状態の変化（振戦）と僅かな体重増加抑制が認められたことから、無毒性量は1.2mg/kg/日と考えられた。胎児については、いずれの投与量でも異常が認められなかったことから、無毒性量は最高投与量の2.4mg/kg/日と考えられた。

また、最高投与量の2.4mg/kg/日でも催奇形性は認められなかった。

④ ウサギにおける催奇形性試験

(資料No. VI-4)

試験機関 : Hazelton Laboratories America, Inc. (GLP 対応)

報告書作成年 : 1986 年

検体の純度 : %

供試動物 : ニュージーランドホワイト種ウサギ、1 群雌 15 匹、開始時約 4 ヶ月齢、
開始時体重範囲 : 3.55-4.11kg

投与期間 : 器官形成期 (妊娠 7-19 日) 13 日間 [1986 年 1 月 13 日-1986 年 1 月 28 日]

投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、1、3、6、9mg/kg/日の投与レベルで妊娠 7 日目から 19 日目までの 13 日間、1 日 1 回強制経口投与した。投与用量は 1ml/kg とした。対照群にはコーン油のみを同様に投与した。試験にはヒト胎盤ゴナドトロピン(HCG)で誘起排卵させた雌に人工授精して得た交配済雌を用いた。人工授精実施日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目 :

母動物 ; 生死については 1 日 2 回観察した。一般状態は検体投与期間を通じ投与後約 1-2 時間に毎日観察した。体重及び摂餌量は、妊娠 7、9、11、15、20、24、及び 29 日に測定した。妊娠 29 日に全生存動物を屠殺し、肉眼的病理検査を行い、子宮を摘出して重量を測定後、着床数及び位置、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数を調べた。また、卵巣を摘出して妊娠黄体数を調べた。

生存胎児 ; 性別、体重、外表異常の観察を行った後、全生存胎児について内臓検査を行った。内臓検査終了後、95%エタノールで固定後、骨格標本作製し、骨格の異常、骨化程度、骨の配列を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

結果 : 下表に示した。

投与量 (mg/kg/日)			0	1	3	6	9
1 群当たりの動物数			15	15	15	15	15
1 群当たりの妊娠動物数			14	12	13	14	14
流産動物数			1	4	1	1	0
死亡動物数			0	0	0	2	12(3) ¹⁾
全胎児吸収動物数			0	0	0	0	0
生存胎児を有した動物数			13	8	12	12	3
一般状態					食欲不振	食欲不振	食欲不振、不活発、消瘦、振戦、虚脱、被毛の汚れ、流涎
体重 増加量*	7-20 日	(g) [%]	2 [100]	46 [2300]	-93 [#]	-199 ↓ [#]	-220 [#]
	7-29 日	(g) [%]	158 [100]	38 [24]	0.83 ↓ [0.5]	-61 ↓ [#]	-70 [#]
	0-29 日	(g) [%]	331 [100]	196 [59]	123 ↓ [37]	37 ↓ [11]	-10 ↓ [#]
胴体重量* ²⁾		(kg) [%]	3.76 [100]	3.65 [97]	3.48 ↓ [93]	3.46 ↓ [92]	3.46 [92]
実質体重 増加量* ³⁾		(g) [%]	-120 [100]	-167 [#]	-310 ↓ [#]	-376 ↓ [#]	-365 [#]
摂餌量*		(g) [%]	3808 [100]	3681 [97]	3325 [87]	2657 ↓ [70]	2844 ↓ [75]
妊娠率 (%)			93	80	87	93	93
剖検所見			検体投与に起因する変化は認められなかった。				
着床 所見 … 腹平均	妊娠黄体数		12.2	9.6	12.2	11.5	10.7
	着床数		6.5	6.0	7.6	7.6	7.3
	生存胎児数		6.0	5.1	6.3	6.3	6.3
	死亡胎児数		0.0	0.1	0.2	0.0	0.0
	着床 後 死亡	早期死亡胚数	0.4	0.5	0.6	0.5	1.0
後期死亡胚数		0.1	0.3	0.0	0.3	0.0	
死亡胚合計		0.5	0.8	0.6	0.8	1.0	

Dunnett の t 検定 ↓ ↑ : p < 0.05

Terpstra-Jonckhere の傾向検定 * : p < 0.05

1) : ()内は瀕死状態により屠殺した数

2) : 試験終了時体重から妊娠子宮重量を減じて算出した

3) : 胴体重量から妊娠0日の体重を減じて算出した

: マイナスにて算出せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

投与量 (mg/kg/日)		0	1	3	6	9		
1 群当たりの動物数		13	8	12	12	3		
平均生存胎児体重 (g)	雄	46.9	44.6	41.6	38.9	36.2		
	雌	45.3	45.4	42.1	37.2 ↓	37.0 ↓		
生存胎児の性比(雄/全胎児)*		0.61	0.51	0.46	0.44	0.30		
変異胎児数[腹] (胎児% / 腹%)		59[13] 75.6/100	33[8] 80.5/100	65[12] 77.4/100	69[12] 84.1/100	18[3] 94.7/100		
奇形胎児数[腹] (胎児% / 腹%)		2[2] 2.6/15.4	0 0.0/0.0	3[3] 4.0/25.0	3[3] 3.7/25.0	2[2] 10.5/66.7		
胎児 外表異常	検査胎児数		78	41	84	82	19	
	外表変異胎児数[腹] (腹%)		0 0.0	0 0.0	0 0.0	6[2] 16.7	0 0.0	
	内訳	頭頂部暗赤色	0	0	0	5(6.1)	0	
		前肢内反	0	0	0	1(1.2)	0	
	検査胎児数		78	41	84	82	19	
	外表奇形胎児数[腹] (腹%)		0 0.0	0 0.0	1[1] 8.3	1[1] 8.3	0 0.0	
	内訳	正中線縫合不全	0	0	1(1.3)	0	0	
		無頭蓋症 (部分的)	0	0	0	1(1.2)	0	
	胎児 内臓異常	検査胎児数		78	41	84	82	19
		内臓変異胎児数[腹] (腹%)		9[8] 61.5	3[2] 25.0	9[5] 41.7	4[3] 25.0	2[2] 66.7
内訳		肺中間葉無形成	8(10.3)	3(7.3)	9(12.0)	4(4.9)	2(10.5)	
		不定形心臓	0	0	1(1.3)	0	0	
		腎盂拡張	1(1.3)	0	0	0	0	
検査胎児数		78	41	84	82	19		
内臓奇形胎児数[腹] (腹%)		2[2] 15.4	0 0.0	1[1] 8.3	2[2] 16.7	0 0.0		
内訳		心臓/血管異常	1(1.3)	0	1(1.3)	1(1.2)	0	
		胆嚢欠損	0	0	0	1(1.2)	0	
		腎臓位置異常	1(1.3)	0	0	0	0	

Dunnett の t 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher の直接確率法 ↓ ↑ : p < 0.05
 Terpstra-Jonckhere の傾向検定 * : 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日産化学工業株式会社にある。

投与量 (mg/kg/日)		0	1	3	6	9		
1 群当たりの動物数		13	8	12	12	3		
胎 児 骨 格 異 常	検査胎児数	78	41	75	82	19		
	骨格変異胎児数[腹]	56[12]	31[8]	61[12]	68[12]	18[3]		
	(腹%)	92.3	100.0	100.0	100.0	100.0		
	内 訳	頭蓋骨の過剰骨	2(2.6)	0	4(5.3)	1(1.2)	0	
		舌骨翼	0	0	0	5(6.1)	0	
		舌骨体二分	6(7.7)	3(7.3)	3(4.0)	5(6.1)	3(15.8↑)	
		仙椎前 24 椎骨	0	0	1(1.3)	0	0	
		仙椎前 26 椎骨	11(14.1)	6(14.6)	11(14.7)	20(24.4)	7(36.8)	
		椎体骨化核二分	0	0	0	1(1.2)	0	
		第 5、6 胸骨二分	1(1.3)	0	1(1.3)	1(1.2)	0	
		完全第 13 肋骨*	31(39.7)	14(34.1)	36(48.0)	46(56.1↑)	14(73.7↑)	
		骨 化 遅 延	舌骨体骨化不全	1(1.3)	0	1(1.3)	4(4.9)	0
			総尾椎数 16 以下	0	2(4.9)	0	4(4.9)	1(5.3)
	第 5 胸骨未骨化		4(5.1)	5(12.2)	5(6.7)	6(7.3)	1(5.3)	
	第 6 胸骨未骨化*		1(1.3)	0	8(10.7↑)	5(6.1)	3(15.8↑)	
第 2 硬骨未骨化	0		0	1(1.3)	0	0		
検査胎児数	78	41	75	82	19			
骨格奇形胎児数[腹]	0	0	1[1]	0	2[2]			
(腹%)	0.0	0.0	8.3	0.0	66.7			
内訳	脊椎異常	0	0	1(1.3)	0	2(10.5)		

Cochran-Armitage 検定、Fisher の直接確率法 ↓ ↑ : p < 0.05
 Terpstra-Jonckhere の傾向検定 * : 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日産化学工業株式会社にある。

母動物 ; 投与期間中、9mg/kg/日群 12 例、6mg/kg/日群 2 例が死亡あるいは屠殺された。体重増加量は、3、6 及び 9mg/kg/日群で有意に減少した。胴体重量及び実質体重増加量は、3 及び 6mg/kg/日群で有意に減少した。摂餌量は 6 及び 9mg/kg/日群で有意に減少した。一般状態では、3、6 及び 9mg/kg/日群で食欲不振がやや高頻度に認められ、さらに 9mg/kg/日群では、不活発、消瘦、振戦、虚脱、被毛の汚れ、流涎等が認められた。剖検では、検体投与に起因する所見は認められなかった。妊娠率、胎児数、妊娠黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数などの生殖に関する指標に、検体投与の影響は認められなかった。1mg/kg/日群で流産の頻度が高かったが、用量との対応も認められないことから、検体の影響ではないと考えられた。雄性比は、対照群及び 6mg/kg/日群以下の投与群ではほぼ期待値 50%であったが、9mg/kg/日群では 30%であり、有意な減少傾向を示した。しかしながら、この値はわずか 3 腹からのデータであることから、生物学的意義に乏しい所見であると考えられた。

胎児 ; 体重は、6 及び 9mg/kg/日群で減少し、雌で有意であった。奇形・変異の発生頻度に検体投与の影響は認められなかった。対照群の奇形胎児発現率 2.6%に対して、9mg/kg/日群の奇形胎児の発現率は 10.5%と増加していたが、両群の奇形胎児数はいずれも 2 腹で 2 例であり、これは 9mg/kg/日群で母動物の高度死亡により 3 腹しか標本が得られなかったことによるものであった。他の投与群にも奇形が散見されたが、種類及び頻度に一定の傾向が認められなかったことから、いずれも検体投与に起因する奇形ではなかった。6 あるいは 9mg/kg/日群で、舌骨体二分、第 6 胸骨未化骨並びに完全第 13 肋骨等の骨格変異の発生頻度(%)が有意に増加した。これらは検体投与による影響と考えられたが、胎児に対する直接的影響ではなく、母動物毒性に関連した二次的変化と考えられた。他の群で認められた統計学的に有意な変化は、用量相関性が認められない、あるいは生物学的意義に乏しい所見であった。

以上の結果から、母動物については 3mg/kg/日群以上で検体投与による体重及び実質体重増加の抑制ならびに胴体重量の減少が認められたことから、無毒性量は 1mg/kg/日と考えられた。胎児については、6mg/kg/日群以上で検体投与による胎児体重の減少が認められたことから、無毒性量は 3mg/kg/日と考えられた。

また、最高投与量の 9mg/kg/日でも催奇形性は認められなかった。

(13) 変異原性

① 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料No. VII-1)

試験機関 : 残留農薬研究所
報告書作成年 : 1976年

検体の純度 : %

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌(*Salmonella typhimurium*) TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100株及びトリプトファン要求性の大腸菌(*Escherichia coli*) WP2hcr⁺、WP2hcr⁻株を用い、代謝活性化系(S-9Mix)の存在及び非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体はジメチルスルホオキシド(DMSO)に溶解し、予備試験結果に基づき、S-9Mix非存在下では、0、200、1000及び5000 μ g/プレートの用量で処理し、S-9Mix存在下では、0、100及び1000 μ g/プレートで処理した。各濃度2枚のプレートを用いた。

陽性対照として2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(AF-2)、 β -プロピオラクトン(BPL)、9-アミノアクリジン(9AA)、2-ニトロフルオレン(2NF)、2-アミノアントラセン(2AA)を用いた。

結果 : 結果を次表に示した。

検体はS-9Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても、またいずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照では全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において検体は代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

<S-9Mix 非存在下>

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート							
			塩基置換型			フレームシフト型			TA98	TA100
			WP2hcr ⁺	WP2hcr ⁻	TA1535	TA1537	TA1538			
溶媒対照 (DMSO)	(-)	-	17.5	20.0	26.5	7.5	12.5	24.5	101.0	
検体	200	-	15.5	20.0	24.5	3.5	15.5	11.0	97.0	
	1000		15.0	20.0	23.5	6.0	11.5	18.0	113.5	
	5000		14.5	17.0	20.0	5.0	10.5	14.5	119.0	
陽性対照	AF-2	0.05							1430.0	
		0.25		1234.0				146.0		
	5	290.5								
	BPL	50			1553.0					
	9AA	200				>10000				
	2NF	50					>3000			

表中の数値は2枚のプレートの平均値

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド BPL: β -プロピラクトン

9AA: 9-アミノアクリン 2NF: 2-ニトロフルオレン

<S-9Mix 存在下>

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート							
			塩基置換型			フレームシフト型			TA98	TA100
			WP2hcr ⁺	WP2hcr ⁻	TA1535	TA1537	TA1538			
溶媒対照 (DMSO)	(-)	-	17.5	20.0	26.5	7.5	12.5	24.5	101.0	
検体	100	-	12.5	16.0	24.5	4.5	10.5	17.5	133.0	
	1000		12	16.5	17.5	6.0	5.0	19.0	122.0	
溶媒対照 (DMSO)	(-)	+	14.5	8.5	9.0	6.0	12.0	15.5	149.5	
検体	100	+	17.0	12.5	12.5	7.5	15.5	20.0	147.0	
	1000		14.5	19.5	17.5	6.5	7.0	16.0	137.0	
陽性対照	2AA	20	/	/	29.5	8.5	8.0	39.5	189.5	
	AF-2	0.05	/	/	/	/	/		1558.0	
		0.10	/	/	/	/	/	564.5		
		0.25	/	1322.0	/	/	/			
		5	476.5	/	/	/	/			
2AA	20	+	/	/	374.5	154.0	1375.0	1086.0	1683.0	

表中の数値は2枚のプレートの平均値

2AA: 2-アミノアントラセン

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

② 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料No. VII-2)

試験機関 : Microtest Research Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1985 年

検体の純度 : %

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA1535, TA1537, TA98, TA100 株を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体はジメチルスルホオキシド (DMSO) に溶解し、S-9Mix 存在下及び非存在下において、0、4、20、100、500 及び 2500 µg/プレート の濃度で処理した。独立した 2 回の試験を行い、各濃度で 3 枚のプレートを用いた。陽性対照としてアジ化ナトリウム (SA)、9-アミノアクリジン (9AA)、2-ニトロフルオレン (2NF)、2-アミノアントラセン (2AA) を用いた。

結果 : 結果を次表に示した。

2 回目試験の S-9Mix 存在下において、TA98 株及び TA1537 株で用量に依存した復帰変異コロニー数の増加が認められたが、1 回目試験では認められず、またその値は背景データ内 (TA98 : 8.2-63.8、TA1537 : 0-15.6) にあったことから、生物学的に重要ではないと考えられた。

一方、陽性対照では全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において検体は代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

<第1回目試験>

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩基置換型		フレームシフト型	
			TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照 (DMSO)	(-)		30.6	111.0	15.6	18.0
検体	4	-	30.3	111.0	12.0	17.5
	20		24.7	108.3	14.3	19.0
	100		24.0	106.0	13.0	16.3
	500		27.3	98.0	11.0	15.7
	2500		28.3	105.0	12.0	28.0
陽性対照	SA	2	461.0 \uparrow	289.2 \uparrow		
	9AA	50			231.4 \uparrow	
	2NF	50				1640.8 \uparrow
溶媒対照 (DMSO)	(-)		26.8	177.6	12.0	28.2
検体	4	+	24.0	151.3	14.7	32.0
	20		27.0	148.3	11.0	25.3
	100		29.5	139.3	13.3	28.7
	500		24.7	125.0	15.7	21.0
	2500		21.0	131.7	13.0	25.7
陽性対照 (2AA)	5		321.8 \uparrow	1455.2 \uparrow	28.8 \uparrow	1119.0 \uparrow

F-検定 (分散分析)、student-t 検定 $\uparrow\downarrow$: $p < 0.001$

表中の数値は3枚のプレートの平均値

SA : アジ化ナトリウム 9AA : 9-アミノアクリジン

2NF : 2-ニトロフロレン 2AA : 2-アミノアントラセン

<第2回目試験>

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩基置換型		フレームシフト型	
			TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照 (DMSO)	(-)		14.0	99.6	10.0	12.8
検体	4	-	12.0	78.7	7.0	14.3
	20		13.0	77.5	7.0	12.0
	100		13.0	71.3	7.5	13.0
	500		16.3	67.5	6.0	13.0
	2500		13.5	72.0	7.0	16.7
陽性対照	SA	2	397.8 \uparrow	268.4 \uparrow		
	9AA	50			240.6 \uparrow	
	2NF	50				857.4 \uparrow
溶媒対照 (DMSO)	(-)		13.0	112.4	12.2	45.4
検体	4	+	14.0	144.7	9.3	55.0
	20		16.7	133.3	8.7	49.7
	100		15.0	140.3	14.3	38.3
	500		15.3	141.3	11.7	40.7
	2500		16.0	106.3	7.7	59.7
陽性対照 (2AA)	5		359.6 \uparrow	1133.6 \uparrow	29.8 \uparrow	607.2 \uparrow

F-検定 (分散分析)、student-t 検定 $\uparrow\downarrow$: $p < 0.001$

表中の数値は3枚のプレートの平均値

SA : アジ化ナトリウム 9AA : 9-アミノアクリジン

2NF : 2-ニトロフロレン 2AA : 2-アミノアントラセン

③ 細菌を用いた宿主経路試験

(資料No. VII-1)

試験機関 : 残留農薬研究所

報告書作成年 : 1976 年

検体の純度 : %

供試動物 : ICR系マウス、7週齢、1群雄5匹、体重 : 34.7±1.4g

試験方法 : 検体を1% tween80に懸濁し、マウスに24時間間隔で5及び10mg/kgの用量を2回経口投与した。投与容量は20ml/kgとした。2回目の薬物投与直後、対数生育期にあるヒスチジン要求性のサルモネラ菌(*Salmonella typhimurium*) G46株 2mlを腹腔内に注入し、3時間後に頸椎脱臼で屠殺し、腹腔内の菌液を回収した。回収した菌株は37°Cで2日間培養後、復帰変異菌数及び生存菌数を計測した。また、G46株を用い、0、200、1000及び5000µg/プレートの用量で *in vitro*における復帰変異試験を行なった。

陽性対照としてジメチルニトロソアミン(DMN)50mg/kgを1回投与した。溶媒対照群には1% tween 80を投与した。

結果 : 結果を次表に示した。

G46株を用いた *in vitro*における復帰変異試験では、対照群と比較して検体処理群で復帰変異コロニー数の増加が認められなかった。一方、陽性対照であるβ-プロピオラクトン(BPL)を処理したプレートでは著明な復帰変異コロニー数の増加が認められたことから、検体の *in vitro*における復帰変異性は陰性と考えられる。宿主経路試験においても、対照群と比較して復帰変異菌数の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いたDMNでは対照群と比較して有意な復帰変異菌数の増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において検体は復帰変異誘発性を有し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日産化学工業株式会社にある。

<G46株を用いた *in vitro* における復帰変異試験>

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数/プレート
		G-46
検体	0	2.5
	200	7.0
	1000	4.5
	5000	7.0
陽性対照 (BPL)	1000	147

表中の数値は2枚のプレートの平均値

BPL: β - γ - ト ラクトン

<宿主経路試験>

群	総投与量 (mg/kg)	復帰変異 菌数/ ml	生存菌数 $\times 10^8/\text{ml}$	(復帰変異菌数/ 生存菌数) $\times 10^{-8}$	平均値 \pm S. D.
溶媒対照 (1% tween80)	(-)	14.17	24.1	0.59	0.55 \pm 0.12
		25.83	43.2	0.60	
		21.67	47.6	0.46	
		22.50	55.9	0.40	
		30.00	41.9	0.72	
検体	5 \times 2	14.17	70.0	0.20	0.32 \pm 0.12
		21.67	58.7	0.37	
		31.67	64.4	0.49	
		12.50	64.4	0.19	
		19.17	58.9	0.33	
	10 \times 2	25.00	58.4	0.43	0.60 \pm 0.17
		44.17	58.5	0.76	
		34.17	55.7	0.61	
		40.83	57.2	0.71	
		41.67	57.6	0.72	
陽性対照 (DMN)	50	4536.67	50.9	89.13	118.37 \pm 31.30 \uparrow
		3743.33	43.1	86.85	
		7330.00	49.9	146.89	
		5613.33	36.2	155.06	
		5360.00	39.1	137.08	
		4596.67	48.3	95.17	

student の t 検定 $\uparrow\downarrow$: $p < 0.001$

表中の数値は各個体別の値

DMN: ジメチルニトロアミン

④ マウスL5178Y細胞を用いた遺伝子突然変異試験

(資料No. VII-3)

試験機関 : Microtest Research Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1986 年

検体の純度 : %

試験方法 : マウスリンパ腫由来の L5178Y 細胞を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、6-チオグアニン(6TG)抵抗性細胞の出現頻度を調べ、検体の変異原性を検定した。検体はジメチルスルホオキシド(DMSO)を用いて溶解し S-9Mix の存在下及び非存在下で 0、7.9、15.7、31.3、62.5、125 及び 250 μ g/ml の濃度で細胞の培地中に処理し、処理後 6TG 抵抗性の細胞の出現頻度を調べた。独立した 2 回の試験を行った。

結果の判定は Furth らの方法を用い、検体処理群の突然変異率の 95%信頼限界を超えた場合、統計学的に有意とした。

陽性対照として 4-ニトロキノリン-N-オキサイド(NQO)及びベンツピレン(BP)を用いた。

結果 : 結果を次表に示した。

S-9Mix の非存在下では統計学的に有意な変異増加率が認められなかったが、S-9Mix の存在下では用量反応性に有意な増加が認められた。

一方、陽性対照群では統計学的に有意な変異率増加を示した。

以上の結果より、本試験条件下において検体は代謝活性化の存在下で、遺伝子突然変異性を有すると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

<観察結果>

薬物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S-9 Mix の有無	第1回目試験			第2回目試験		
			生存率 (%)	変異数/ 10^6 細胞	判定	生存率 (%)	変異数/ 10^6 細胞	判定
溶媒対照 (DMSO)	-	-	100	2.3		100	1.2	
検体	7.9*	-	87	3.2	-			
	15.7	-	82	3.1	-	84	3.9	-
	31.3	-	93	2.7	-	95	1.2	-
	62.5	-	81	5.4	-	89	3.3	-
	125	-	74	4.7	-	69	2.4	-
	250	-	33	<0.7	-	22	1.3	-
陽性対照 (NQO)	0.19	-	12	103.6	+	20	79.6	+
	0.38	-	1	93.4	+	2	202.1	+
溶媒対照 (DMSO)	-	+	100	2.7		100	0.7	
検体	7.9*	+	85	6.8	-			
	15.7	+	88	2.3	-	119	0.8	-
	31.3	+	82	1.2	-	123	0.4	-
	62.5	+	76	7.2	+	110	1.4	-
	125	+	70	9.3	+	96	5.8	+
	250	+	22	5.8	-	60	2.7	-
陽性対照 (BP)	2.0	+	66	77.0	+	75	87.9	+
	3.0	+	66	63.8	+	83	84.1	+

Furthらの検定法 * : 第1回目試験のみで実施

NQO : 4-ニトロキノリン-N-オキサイド BP : ベンツピレン

⑤ ハムスターの卵巣細胞(CHO)を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料No. VII-4)

試験機関 : Microtest Research Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1985 年

検体の純度 : %

試験方法 : チャイニーズ ハムスターの卵巣由来の CHO 細胞を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在及び非存在下で、染色体異常の誘発性を検定した。検体はジメチルスルホオキシド (DMSO) に溶解し、S-9Mix 存在下及び非存在下において 0、625、1250、2500 及び 5000 µg/ml の濃度で培地に処理した。処理 2 時間後に検体を除き、さらに 22 時間培養した後、染色体標本を作製し、観察が可能な上位 3 濃度について、各プレートあたり 100 個 (陽性対照は 25 個) の分裂中期の細胞を観察した。なお、各処理濃度あたり 2 枚のプレートを用いた。

陽性対照としてメチルメタンサルホネート (MMS) 及びシクロホスファミド (CPA) を用いた。

結果 : 結果を次表に示した。

検体処理群は代謝活性化の有無にかかわらず、溶媒対照群と同様の値を示した。

一方、陽性対照では染色体異常の有意な増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において検体は代謝活性化の有無にかかわらず、染色体異常誘発性を有しないものと判断される。

<観察結果>

薬物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S-9 Mixの有無	処理時間*		観察 細胞数	染色体異常を有する細胞数					染色体 異常頻度 (%)		染色体 異常細胞頻度 (%)		有糸 分裂率 (%)	
			検体 処理	標本 作製		ギャ ップ	染色体		染色分体		そ の 他	+g ¹⁾	-g ²⁾	+g ³⁾		-g ⁴⁾
							欠 失	交 換	欠 失	交 換						
溶媒対照 (DMSO)	(-)	-	2	24	200	18	2	0	4	0	1	12.5	3.5	9.5	3.5	0.4
検体	1250					18	0	2	5	1	5	15.5	6.5	11.5	6.0	1.6
	2500					14	2	1	6	0	2	12.5	5.5	10.0	5.5	1.2
5000	14				2	0	3	0	3	11.0	4.0	9.5	3.0	0.6		
陽性対照 (MMS)	50				50	7	2	1	14	8	0	64.0 \uparrow	50.0 \uparrow	44.0	38.0	-
溶媒対照 (DMSO)	(-)				+	2	24	200	2	1	0	5	1	2	5.5	4.5
検体	1250	15	1	2					2	0	2	11.0	3.5	9.5	2.5	0.8
	2500	9	2	0					4	0	3	9.0	4.5	9.0	4.5	1.0
5000	9	2	0	2				0	3	8.0	3.5	7.0	3.5	1.2		
陽性対照 (CPA)	25	50	52	12				2	62	39	8	350.0 \uparrow	246.0 \uparrow	94.0	80.0	-

χ^2 検定 $\uparrow\downarrow$: $p < 0.001$

*処理時間: 検体処理時間及び検体処理開始後標本作製までの時間

- 1): ギャップを含む染色体異常頻度
- 2): ギャップを含まない染色体異常頻度
- 3): ギャップを含む染色体異常細胞頻度
- 4): ギャップを含まない染色体異常細胞頻度

MMS: メチルメタンサルホネート

CPA: シクロホスファミド

⑥ ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料No. VII-5)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1987 年

検体の純度 : %

試験方法 : ヒト末梢血由来のリンパ細胞を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在及び非存在下で、染色体異常の誘発性を検定した。検体はジメチルスルホオキシド (DMSO) を用いて溶解し、S-9Mix 存在下及び非存在下において 0、3.125、6.25、12.5 及び 25 µg/ml の濃度で培地中に処理した。処理 3 時間後に検体を除き、さらに 25 時間培養した後 (試験開始後 72 時間)、細胞の染色体標本を作製した。各プレートあたり 100 個 (陽性対照は 25 個) の分裂中期の細胞を観察した。なお、各処理濃度あたり 2 枚のプレートを用いた。

陽性対照としてメチルメタンサルホネート (MMS) 及びシクロホスファミド (CPA) を用いた。

結果 : 結果を次表に示した。

全検体処理群で、代謝活性化の有無にかかわらず染色体異常を有する細胞が、明らかな用量相関性を示さないものの、統計学的に有意に増加した。

一方、陽性対照では染色体異常の有意な増加が認められたが、通常観察されるよりは低値であった。

以上の結果より、本試験条件下において検体は、代謝活性化の有無にかかわらず、染色体異常誘発性を有するものと判断される。

<観察結果>

薬物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S-9 Mixの 有無	処理時間*		観察 細胞数	染色体異常を有する細胞数						染色体 異常頻度 (%)		染色体 異常細胞頻度 (%)		有糸 分裂率 (%)				
			検体 処理	標本 作製		ギャ ップ	染色体		染色分体		同 位 座 欠 失	そ の 他	+g ¹⁾	-g ²⁾	+g ³⁾		-g ⁴⁾			
							欠 失	交 換	欠 失	交 換										
溶媒対照 (DMSO)	(-)	-	3	28	200	3	0	0	4	0	1	0	4.0	2.5	3.5	2.0	6.64			
検体	3.125					2	1	0	5	0	2	1	5.5	4.5	5.0	4.5	14.01			
	6.25					2	1	1	14	0	4	0	11.0	10.0 \uparrow	9.5	8.5 \uparrow	9.44			
	12.5					2	3	0	7	0	2	2	8.0	7.0	7.5	6.5	12.33			
	25.0					4	3	0	15	1	3	4	15.0	13.0 \uparrow	13.0	11.5 \uparrow	9.91			
陽性対照 (MMS)	50				50	4	4	4	28	4	12	0	28.0	26.0 \uparrow	22.0	20.0 \uparrow	-			
溶媒対照 (DMSO)	(-)				+	3	28	200	2	1	0	2	0	0	1	3.0	2.0	3.0	2.0	7.92
検体	3.125								5	0	1	9	0	1	3	9.5	7.0 \uparrow	8.0	5.5	10.45
	6.25								5	1	1	9	0	0	1	8.5	6.0	7.0	5.0	8.43
	12.5								4	5	0	11	1	2	0	11.5	9.5 \uparrow	7.5	6.5	12.11
	25.0	4	3	0					12	0	1	1	10.5	8.5 \uparrow	8.0	7.5 \uparrow	7.06			
陽性対照 (CPA)	25	50	16	16	0	48	8	28	0	58.0	50.0 \uparrow	42.0	36.0 \uparrow	-						

χ^2 検定 \uparrow : $p < 0.05$ \downarrow : $p < 0.01$ $\uparrow\downarrow$: $p < 0.001$

*処理時間：検体処理時間及び検体処理開始後標本作製までの時間

- 1) : ギャップを含む染色体異常頻度
- 2) : ギャップを含まない染色体異常頻度
- 3) : ギャップを含む染色体異常細胞頻度
- 4) : ギャップを含まない染色体異常細胞頻度

MMS : メチルメタンサルホネート

CPA : シクロホスファミド

⑦ マウス骨髄を用いた小核試験

(資料No. VII-6)

試験機関 : Microtest Research Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1985 年

検体の純度 : %

供試動物 : ICR (Cr1:CD-1) マウス、3-4 週齢、1 群雌雄各 5 匹、体重範囲: 雄 20-25g 雌 18-23g

試験期間 : 投与後 72 時間

試験方法 : 検体を 0.5%カルボキシメチルセルローズ (CMC) 溶液に溶解し、30mg/kg の濃度で単回強制経口投与した。同様に溶媒対照として 0.25%CMC を、陽性対照としてシクロホスファミド (CPA) 80mg/kg を投与した。投与容量は 25ml/kg とした。検体投与群は 24、48 及び 72 時間後に、陽性対照群は 48 時間後に屠殺し、大腿骨を摘出して牛胎仔血清を用いて骨髄を洗い出し、骨髄塗沫標本を作製した。1 動物当たり多染性赤血球 (PCE) 及び正染性赤血球 (NCE) の合計約 200 個を観察し、正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した後、引き続き多染性赤血球が 1000 個になるまで小核を有する多染性赤血球及び正染性赤血球の数を観察した。

結果 : 結果を次表に示した。

検体投与群において毒性徴候は認められず、小核を有する PCE 及び NCE の平均出現頻度は対照群と類似しており、正常範囲内であった。72 時間後に屠殺した群では、小核を有する NCE の平均出現頻度が統計学的に有意な低値を示したが、生物学的に意義があるとは考えられない。

一方、陽性対照として用いた CPA では、小核を有する PCE 及び NCE の平均出現頻度の有意な増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において検体は小核誘発性を有し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日産化学工業株式会社にある。

<骨髄標本観察結果>

薬物	投与量 (mg/kg)	性	PCE/NCE			MNPCE (%)			MNNCE (%)		
			24	48	72	24	48	72	24	48	72
溶媒対照 (CMC)	(-)	雄	1.02	1.16	1.08	2.4	0.6	2.0	0.2	1.86	1.73
		雌	0.98	1.56	1.18	1.4	2.4	2.0	1.77	4.69	3.31
検体	30	雄	1.07	1.44	1.71	1.6	3.0	2.2	1.71	2.58	1.37
		雌	0.79	2.04	1.46	1.4	1.4	1.6	0.48	0.82	0.29 ↓
陽性対照 (CPA)	80	雄		0.71			33.57 ↑			11.32 ↑	
		雌		0.68			29.09 ↑			16.40 ↑	

χ^2 検定 ↑ ↓ : p<0.05 ↑ ↓ : p<0.001

空欄 : 検査せず

PCE : 多染性赤血球数

NCE : 正染性赤血球数

MNPCE : 多染性赤血球 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

MNNCE : 正染性赤血球 1000 個のうち、小核を有する正染性赤血球数

CPA : シクロスポアミド*

⑧ 細菌を用いたDNA修復試験

(資料No. VII-1)

試験機関 : 残留農薬研究所
報告書作成年 : 1976年

検体の純度 : %

試験方法 : 枯草菌(*Bacillus subtilis*)のDNA組換修復機能保有株(H-17 Rec⁺)と欠損株(M-45 Rec⁻)の胞子を用いてDNA損傷の誘発性を検定した。検体はジメチルスルホオキシド(DMSO)を用いて溶解した。2000 μ g/diskを最高用量とし、以下1000、500、200、100、20 μ g/diskの計6用量を設定した。陰性対照としてカナマイシン、陽性対照としてマイトマイシンCを用いた。結果の判定は生育阻止帯の比が1.2以上かつ、生育阻止帯が4mm以上を陽性とした。

結果 :

薬物	濃度 (μ g/disk)	S-9 Mixの 有無	阻止帯の径 (mm)		差 (mm)	判定
			M-45	H-17		
溶媒対照 (DMSO)	(-)	-	0	0	0	-
検体	20		0	0	0	-
	100		0	0	0	-
	200		0	0	0	-
	500		0	0	0	-
	1000		0	0	0	-
	2000		0	0	0	-
陰性対照 (カナマイシン)	10	4	3	1	-	
陽性対照 (マイトマイシンC)	0.1	9	0.5	8.5	+	

検体には、両株に対する生育阻止が全く認められなかった。一方、陽性対照として用いたマイトマイシンCでは、両株の間に著明な生育阻止の差が生じ、陰性対照として用いたカナマイシンでは両株に同程度の生育阻止が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において検体はDNA損傷誘発性を有し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日産化学工業株式会社にある。

⑨ HeLa細胞を用いた不定期DNA合成試験

(資料No. VII-7)

試験機関 : Microtest Research Limited (GLP 対応)

報告書作成年 : 1985 年

検体の純度 : %

試験方法 : HeLa S3 細胞を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、不定期 DNA 合成の誘起性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、0、0.0064、0.032、0.16、0.8、4、20、100 及び 500 μ g/ml の濃度で [3 H]チミジンを添加した培地中に処理した。処理 2.5 時間後に検体を除き、液体シンチレーションカウンターを用いて細胞中の [3 H]チミジンの取り込み量を計測した。各処理濃度で 3 枚のプレートを用いた。

結果については、 [3 H]チミジンの取り込み量が統計学的に有意に増加し、かつ用量反応性に増加する場合を陽性とした。

陽性対照として 4-ニトロキノリン-N-オキサイド (NQO) 及びベンツピレン (BP) を用いた。

結果 : 結果を次表に示した。

S-9Mix 非存在下の 20 μ g/ml 以上、S-9Mix 存在下の 4 μ g/ml 以上の検体処理群で、溶媒対照群と比較して DNA 修復性に阻害が認められ、これは検体の毒性によるものと考えられ統計処理から除外した。その他の処理群で、DNA 修復性の統計的に有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた NQO 及び BP では、対照と比較して著明な [3 H]チミジン取り込みの増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において検体は、代謝活性化の有無にかかわらず不定期 DNA 合成誘起性を有し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日産化学工業株式会社にある。

薬 物	濃 度 (μ g/ml)	S-9 Mix の有無	平均 DNA (dpm/ μ g)
溶媒対照 (DMSO)	-	-	71.0
検 体	0.0064		68.5
	0.032		65.5
	0.16		68.6
	0.8		64.1
	4		63.4
	20		52.6 *
	100		42.8 *
	500		34.9 *
陽性対照 (NQO)	1.9		545.7 ↑
溶媒対照 (DMSO)	-	+	78.5
検 体	0.0064		73.8
	0.032		77.0
	0.16		78.4
	0.8		76.8
	4		64.3 *
	20		66.4 *
	100		39.6 *
	500	35.6 *	
陽性対照 (BP)	4.0 6.0	112.0 ↑ 94.6 ↑	

F 検定 (分散分析) ↓↑ : p<0.01 ↑↓ : p<0.001

* : 対照群と比べ DNA 修復性阻害が認められたので統計処理より除外

NQO : 4-ニトロキノリン-N-オキサイド BP : ベンツピレン

(14) 解毒及び生体の機能に及ぼす影響

① EPNの生体の機能に及ぼす影響に関する試験

(資料No. VIII-1)

試験機関 : 株式会社実医研
報告書作成年 : 1992年

検体の純度 : %

試験期間 : 1992年3月25日-8月7日 (試験計画書承認日-試験報告書提出日)

1 中枢神経系に対する影響

1) マウスの一般症状観察

供試動物 : ICR(Crj:CD-1)系マウス、5.5週-7週齢、1群雌雄各5匹

供試時体重範囲 : 雄 26.04-33.90g 雌 20.47-23.64g

投与方法 : 検体をオリーブ油に溶解し、0、3、5、8、12及び18mg/kgの用量で単回経口投与した。投与直後ならびに投与後15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、24時間、48時間、72時間及び96時間にIrwinの多元観察法に従い、認知力、気分、運動性、中枢興奮、姿勢、運動失調、筋緊張、反射、自律神経症状、死亡、及びその他の臨床症状を観察した。

結果 : 12mg/kg群では投与後24時間で雄1例及び48時間で雌2例が死亡した。また18mg/kg群では雌雄ともに全例が投与後24時間までに死亡した。一般症状で、3mg/kg群では変化は認められなかった。5-18mg/kg群では以下の症状が認められた。

①自律神経系におけるアセチルコリンのムスカリン様作用として、軽度の流涎が12mg/kg群では雌全例で4-48時間に、雄1例で6時間に、18mg/kg群では雄雌全例で投与後1-6時間に認められた。

②骨格筋の刺激(アセチルコリン様作用とこれに続く抑制作用)として、躯体の緊張が12mg/kg群及び18mg/kg群で、投与後1-4時間に全例で認められたが、投与後6-24時間には軽度または中等度の抑制に転じた。

③中枢神経系反応に類似した症状(ムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化とこれに続く抑制作用)として、自発運動の増加が8mg/kg群及び12mg/kg群では投与後2-6時間に雄雌全例で認められたが、投与後24-72時間には抑制に転じた。

18mg/kg群では投与後1-4時間に雄雌全例で自発運動の増加が認められたが、投与後6時間に生存例では抑制に転じた。

2) 脳波に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ、18週-25週齢、1群雄3匹

供試時体重範囲：3.08-3.50kg

投与方法：ペントバルビタールナトリウム麻酔下でウサギの気管にカニューレを装着し、人工呼吸下でガラミン6mg/kgの静脈内投与により非動化した後、脳定位置固定装置に固定した。皮質脳波を前頭部(運動領)、頭頂部(知覚領)及び後頭部(視覚領)に刺入した電極を介して誘導した。深部脳波は、同芯円電極を使用し、Sawyerらの脳地図に従って扁桃核、海馬及び中脳網様体に電極を刺入して誘導した。検体は1% Tween80溶液に懸濁し、2及び5mg/kgの用量を単回腹腔内投与した。記録は麻酔覚醒後に30分間の投与前記録を行い、検体投与後1時間まで行った。

結果：2及び5mg/kgの腹腔内投与はウサギの皮質脳波及び深部脳波に影響を及ぼさなかった。

3) 自発運動量に対する作用

供試動物：ICR(Crj:CD-1)系マウス、5.5週-7週齢、1群雄10匹、

供試時体重範囲：26.04-33.90g

投与方法：検体をオリーブ油に溶解し、0、3、5及び8mg/kgの用量で単回経口投与した。投与前に1回、投与後1時間から1時間毎に4時間まで各5分間の運動量の総和を自発運動量測定装置で測定した。

結果：8mg/kg群で投与後3及び4時間に有意に自発運動量が増加した。3及び5mg/kgの経口投与は自発運動量に影響を及ぼさなかった。

4) 最大電撃痙攣に対する作用

供試動物：ICR(Crj:CD-1)系マウス、5.5週-7週齢、1群雄10匹

供試時体重範囲：26.04-33.90g

投与方法：検体をオリーブ油に溶解し、0、3、5及び8mg/kgの用量で単回経口投与した。投与後3時間にマウスの両眼に生理食塩水を1滴点眼した後、角膜電極を介して電撃痙攣装置で電撃を加えて、強直性屈曲痙攣、強直性伸展痙攣及び間代性痙攣の発現、持続時間及び生死の観察を行った。

結果：3、5及び8mg/kgの経口投与はマウスの電撃により誘発される強直性屈曲痙攣、強直性伸展痙攣及び間代性痙攣に影響を及ぼさなかった。

5) Penterazol 痙攣に対する作用

供試動物：ICR(Crj:CD-1)系マウス、5.5週-7週齢、1群雄10匹

供試時体重範囲：26.04-33.90g

投与方法：検体をオリーブ油に溶解し、0、3、5及び8mg/kgの用量で単回経口投与した。投与後3時間にPenterazol 150mg/10ml/kgを皮下投与して、30分間における痙攣の発現及び死亡までの時間を測定した。

結果：3、5及び8mg/kgの経口投与はマウスのPenterazolの皮下投与により誘発される痙攣に影響を及ぼさなかった。

6) 協調運動に対する作用(回転棒法)

供試動物 : ICR(Crj:CD-1)系マウス、5.5週-7週齢、1群雄10匹

供試時体重範囲 : 26.04-33.90g

投与方法 : 検体をオリーブ油に溶解し、0、3、5及び8mg/kgの用量で単回経口投与した。投与後1時間から4時間まで1時間毎に、マウスを直径30mmで毎分10回転する回転棒に乗せて60秒以内での落下の有無を観察した。

結果 : 8mg/kg群で投与後2時間に10例中4例、3時間に10例中6例、4時間に10例中8例の落下動物が観察された。3及び5mg/kgの経口投与はマウスの協調運動に影響を及ぼさなかった。

7) 体温に対する作用

供試動物 : 日本白色種ウサギ、15週-25週齢、1群雄3匹

供試時体重範囲 : 2.76-3.70kg

投与方法 : 検体をオリーブ油に溶解し、0、12.5、25及び50mg/kgの用量で単回経口投与した。投与後1、2及び4時間に体温を測定し、あわせて耳介毛細管の収縮あるいは拡張についても観察した。

結果 : 25、50mg/kg群で投与後2時間または4時間に投与前と比較して有意な体温の低下が認められた。12.5mg/kgの経口投与はウサギの体温に影響を及ぼさなかった。なお、いずれの投与群においても耳介毛細血管の収縮は認められなかった。

8) 睡眠時間に対する作用

供試動物 : ICR(Crj:CD-1)系マウス、5.5週-7週齢、1群雄10匹

供試時体重範囲 : 26.04-33.90g

投与方法 : 検体をオリーブ油に溶解し、0、3、5及び8mg/kgの用量で単回経口投与した。投与後3時間にヘキソバルビタール100mg/3ml/kgを腹腔内投与して、正向反射が消失してから回復するまでの時間を測定した。

結果 : 3、5及び8mg/kgの経口投与はマウスのヘキソバルビタール睡眠に影響を及ぼさなかった。

9) 鎮痛作用

供試動物 : ICR(Crj:CD-1)系マウス、5.5週-7週齢、1群雄10匹

供試時体重範囲 : 26.04-33.90g

投与方法 : 検体をオリーブ油に溶解し、0、3、5及び8mg/kgの用量で単回経口投与した。投与後3時間に酢酸0.7%溶液を10ml/kgで腹腔内投与し、酢酸投与後5分から苦悶回数を5分間測定した。

結果 : 3、5及び8mg/kgの経口投与は酢酸投与によるマウスの苦悶回数に影響を及ぼさなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

10) 筋弛緩作用(傾斜板法)

供試動物 : ICR(Crj:CD-1)系マウス、5.5週-7週齢、1群雄10匹

供試時体重範囲 : 26.04-33.90g

投与方法 : 検体をオリーブ油に溶解し、0、3、5及び8mg/kgの用量で単回経口投与した。投与後0.5、1、2及び3時間にマウスを30°の傾斜板上に乗せ、動物が10秒以上傾斜板に留まることができるか否かを観察した。

結果 : 8mg/kg群で投与後2時間に10例中4例、3時間に10例中8例に筋弛緩作用が認められた。3及び5mg/kgの経口投与では筋弛緩作用は認められなかった。

11) 筋弛緩作用(懸垂法)

供試動物 : ICR(Crj:CD-1)系マウス、5.5週-7週齢、1群雄10匹

供試時体重範囲 : 26.04-33.90g

投与方法 : 検体をオリーブ油に溶解し、0、3、5及び8mg/kgの用量で単回経口投与した。投与後0.5、1、2及び3時間に水平に張った直径2mmの金属線にマウスの前肢をかけさせ、10秒以内に後肢をかけられるか否かを観察した。試行回数は3回連続とした。

結果 : 8mg/kg群で投与後2時間に10例中3例、3時間に10例中7例に筋弛緩作用が認められた。3及び5mg/kgの経口投与では筋弛緩作用は認められなかった。

2 呼吸・循環器系に対する試験

1) 呼吸及び循環器に対する作用

供試動物 : 日本白色種ウサギ、15週-25週齢、1群雄6匹

供試時体重範囲 : 2.76-3.70kg

投与方法 : ウサギをウレタンで麻酔した後、気管カニューレを装着すると共に総頸動脈に逆行性に血圧測定用カニューレを装着し、呼吸数は気管カニューレで、血流量及び血圧は血圧測定用カニューレを用いて測定を行った。検体を1% Tween80溶液に懸濁し、2及び5mg/kgの用量で単回腹腔内投与した。投与前、投与後10、30分及び1時間に呼吸数、血流量、血圧及び心拍数を測定し、心電図を記録した。

結果 : 5mg/kg群では投与直後に軽度の心拍数の減少が認められたが、投与後10分には正常に回復した。呼吸、血圧、血流量、心電図には変化は認められなかった。2mg/kgの腹腔内投与はウサギの呼吸、血圧、心拍数、血流量、心電図に影響を及ぼさなかった。

3 自律神経系に対する試験

1) 瞳孔に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ、15週-25週齢、1群雄3匹

供試時体重範囲：2.76-3.70kg

投与方法：検体をオリーブ油に溶解し、0、12.5、25及び50mg/kgの用量で単回経口投与した。照度150-300ルクスの室内で、40Wの光源から約1.5m離れた位置で光源の方向へウサギを首かせ固定器に固定し、左右の瞳孔径を万能測定器を用いて測定した。投与前に30分間隔でそれぞれ2回、投与後1、2及び4時間に各1回測定した。

結果：12.5、25及び50mg/kgの経口投与はウサギの瞳孔径に影響を及ぼさなかった。

2) 摘出回腸に対する作用

供試動物：Hartley系モルモット、8.5週齢、1群雄3匹

供試時体重範囲：440-470g

投与方法：モルモットを放血死させた後、回腸を摘出して標本を作製した。摘出標本は20mlのタイロード液(30-32°C、95%O₂+5%CO₂通気)を満たしたマグヌス管内に、1gの負荷をかけて懸垂した。検体、Agonistはジメチルスルホオキシド(DMSO)に溶解し、いずれもマグヌス管への添加量が0.2mlで所定の濃度となるように調製した。検体の単独作用として10⁻³g/mlの濃度で検討を行った。また検体10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴、及び10⁻³g/mlの適用1分後に、Agonistであるアセチルコリン(8×10⁻⁷g/ml)またはヒスタミン(2×10⁻⁷g/ml)による収縮反応に及ぼす作用を検討した。また、DMSOの0.2mlを適用して溶媒単独の作用も検討した。

結果：モルモット摘出回腸において、検体10⁻³g/ml及びDMSOの単独適用では変化は認められなかった。また、検体10⁻⁹-10⁻³g/mlの投与後のAgonistによる収縮に変化は認められなかった。

4 神経筋標本に対する試験

1) 横隔膜神経-筋標本に対する作用

供試動物：SD(Crj:CD)系ラット、9.5週-10.5週齢、1群雄3匹、

供試時体重範囲：420.4-540.7g

投与方法：ラットを放血致死させ、横隔膜神経を中枢端で切断し、横隔膜筋と共に摘出した。摘出標本は50mlのタイロード液(30-32°C、95%O₂+5%CO₂通気)を満たしたマグヌス管内に、5gの負荷をかけて懸垂し、矩形波電気刺激を与えながら検体、あるいはDMSOを適用し、投与後10分間の筋収縮に及ぼす影響を観察した。検体はジメチルスルホオキシド(DMSO)に溶解し、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³g/mlの濃度で、いずれもマグヌス管への投与量が0.5mlとなるようにした。またDMSOについてもマグヌス管内に0.5ml投与して単独の作用を観察した。

結果：10⁻⁷-10⁻³g/mlの濃度では、ラットの横隔膜神経-筋標本の刺激収縮反応に影響を及ぼさなかった。

5 骨格筋に対する試験

1) 前脛骨筋収縮に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ、15週-25週齢、1群雄6匹、

供試時体重範囲：2.76-3.70kg

投与方法：ウレタン麻酔下でウサギを背位に固定し、前脛骨筋上の皮膚を切開し、前脛骨筋を上部まで分離した。さらに大腿部外側後部の皮膚を切開し、腓骨神経を分離してその中枢端で切断した。前脛骨筋に10gの負荷を加えて矩形波刺激を与え、その収縮を記録した。検体は、1% Tween80 溶液に懸濁し、2及び5mg/kgの用量を単回腹腔内投与した。観察、記録は検体の投与前30分及び投与後1時間までとした。

結果：2及び5mg/kgのウサギ腹腔内投与は、腓骨神経または前脛骨筋の電気刺激による前脛骨筋収縮に対して影響を及ぼさなかった。

6 消化器に対する試験

1) 小腸輸送能に対する作用

供試動物：SD(Crj:CD)系ラット、5.5週-6.5週齢、1群雄6匹

供試時体重：122.2-132.1g

投与方法：オリーブ油に溶解した検体を0、6、12.5、25及び50mg/kgの用量で、ラットに単回経口投与し、30分後に10%アラビアゴムに懸濁した10%粉末活性炭を10ml/kgの割合で経口投与した。活性炭投与30分後にクロロホルムで麻酔死させ、開腹して幽門部から炭末先端までの長さを測定し、小腸全体の長さに対する比率を求めた。

結果：12.5、25及び50mg/kgにおいて有意な輸送能の低下が認められた。6mg/kgの経口投与はラットの小腸輸送能へ影響を及ぼさなかった。

7 血液に対する試験

1) 溶血性試験(Parpart法)

供試動物：日本白色種ウサギ、15週-25週齢、1群雄2匹

供試時体重範囲：2.76-3.70kg

投与方法：検体をオリーブ油に溶解し、0、12.5、25及び50mg/kgの用量で単回経口投与した。投与前及び投与後24時間に耳介動脈より採血し、血液9容に対し、抗凝固剤ヘパリンを1容の割合で加えた。濃度を0.85、0.75、0.70、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.2、0.1%に調製した緩衝液加食塩水を各5mlずつ試験管に分注し、ヘパリン加血液0.05mlを加えて混和した。室温で30分放置した後再度混和し、1000rpmで5分間遠心分離した。得られた上清について540nmで吸光度(A)を測定した。

溶血率は次式で算出した。

$$\text{溶血率} = \frac{\text{各液の A} - 0.85\% \text{液の (A)}}{0.1 \text{ 液の A} - 0.85\% \text{液の (A)}} \times 100$$

結果：12.5、25及び50mg/kgの経口投与は、ウサギ赤血球に対して溶血作用を有しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

2) 血液凝固に対する作用 (APTT 法)

供試動物 : 日本白色種ウサギ、15 週-25 週齢、1 群雄 3 匹

供試時体重範囲 : 2.76-3.70kg

投与方法 : 検体をオリーブ油に溶解し、0、12.5、25 及び 50mg/kg の用量で単回経口投与した。

投与前、投与後 1、2 及び 4 時間に耳動脈より採血し、血液 9 容に対し、抗凝固剤 3.13%クエン酸ナトリウムを 1 容の割合で加えた。1000rpm で 5 分間遠心分離処理した血漿を用いて、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を血液凝固測定装置で測定した。

結果 : 12.5、25 及び 50mg/kg の経口投与は、ウサギの血液凝固能に影響を及ぼさなかった。

[EPNの生体の機能に及ぼす影響に関する試験]の総括表

試験項目	試験動物 (麻醉の有無)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 (匹/群)	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要	
中枢神経系	一般症状観察 (Irwinの多元観察法)	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 3, 5, 8, 12, 18	雄雌5	5	3	① 自律神経系におけるアセチルコリンのムスカリン様作用：流涎 ② 骨格筋の刺激（アセチルコリン様作用とこれに続く抑制作用）：躯体の緊張 ③ 中枢神経系反応に類似した症状（ムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化とこれに続く抑制作用）：自発運動増加/減少 死亡例 12：雄1、雌2 18：雄5、雌5
	脳波	ウサギ (麻醉下)	腹腔内 (1% Tween80)	2, 5	雄3	-	5	影響なし
	自発運動量	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 3, 5, 8	雄10	8	5	増加
	最大電撃痙攣	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 3, 5, 8	雄10	-	8	影響なし
	Penterazol痙攣	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 3, 5, 8	雄10	-	8	影響なし
	協調運動 (回転棒法)	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 3, 5, 8	雄10	8	5	協調運動抑制
	体温	ウサギ	経口 (オリーブ油)	0, 12.5, 25, 50	雄3	25	12.5	体温低下
	睡眠時間	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 3, 5, 8	雄10	-	8	影響なし
	鎮痛作用	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 3, 5, 8	雄10	-	8	影響なし
	筋弛緩作用 (傾斜板法)	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 3, 5, 8	雄10	8	5	筋弛緩
	筋弛緩作用 (懸垂法)	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 3, 5, 8	雄10	8	5	筋弛緩
呼吸・循環器系	呼吸及び循環器	ウサギ (麻醉下)	腹腔内 (1% Tween80)	2, 5	雄6	5	2	心拍数の減少
自律神経系	瞳孔	ウサギ	経口 (オリーブ油)	0, 12.5, 25, 50	雄3	-	50	影響なし
	摘出回腸	モルモット	in vitro	$0, 1 \times 10^{-9}$ $\sim 1 \times 10^{-3}$ g/ml	雄3	-	1×10^{-3}	影響なし
神経筋	横隔膜神経-筋標本	ラット	in vitro	$0, 1 \times 10^{-7}$ $\sim 1 \times 10^{-3}$ g/ml	雄3	-	1×10^{-3}	影響なし
骨格筋	前脛骨筋収縮	ウサギ (麻醉下)	腹腔内 (1% Tween80)	2, 5	雄6	-	5	影響なし
消化器系	小腸輸送能	ラット	経口 (オリーブ油)	0, 6, 12.5, 25, 50	雄6	12.5	6	小腸輸送能低下
血液	溶血性試験 (Parpart法)	ウサギ	経口 (オリーブ油)	0, 12.5, 25, 50	雄2	-	50	影響なし
	血液凝固 (APTT法)	ウサギ	経口 (オリーブ油)	0, 12.5, 25, 50	雄3	-	50	影響なし

② マウスにおける解毒試験

(資料No. VIII-2)

試験機関 : 臨床医科学研究所

報告書作成年 : 1986年

検体の純度 : %

供試動物 : Slc:ICR系マウス、5週齢、1群雌雄各10匹

体重(平均) : 雄 23.0 ± 1.3 - 23.3 ± 0.8 g 雌 20.2 ± 1.2 - 20.5 ± 1.1 g

観察期間 : 11日間観察(1985年12月10日-12月28日)

投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、16時間の絶食後、単回強制経口投与した。検体単独投与群の投与量は、9.6(雌のみ)、11.6、13.9、16.7、20.0、24.0(雄のみ) mg/kgとし、解毒剤投与群の投与量は、11.6(雌のみ)、13.9(雌のみ)、16.7、20.0、24.0、28.8、34.6(雄のみ)、41.5(雄のみ) mg/kgとした。対照群にはコーン油のみを同様に投与した。投与容量は0.1ml/10gとした。解毒剤のアトロピンは、60mg/10ml/kgを検体投与30分後に日本薬局方生理食塩液に溶解して単回腹腔内投与した。

観察項目 : 一般状態及び死亡について投与当日は数回、翌日からは毎日1回観察した。体重は投与直前と投与3、7、11日後に測定した。死亡動物については死亡発見直後、生存動物については投与11日後に全生存例を剖検して肉眼的病理検査を行なった。

結果 : 結果を下表に示す。

性別	雄		雌	
	-	+	-	+
アトロピンの有無	-	+	-	+
投与量 (mg/kg)	0, 11.6, 13.9, 16.7, 20.0, 24.0	0, 16.7, 20.0, 24.0, 28.8, 34.6, 41.5	0, 9.6, 11.6, 13.9, 16.7, 20.0	0, 11.6, 13.9, 16.7, 20.0, 24.0, 28.8
LD ₅₀ 値 (mg/kg) ¹⁾ (95%信頼限界)	16.7 (15.1-18.4)	27.3 (24.6-30.3)	14.4 (13.2-15.7)	19.7 (17.8-21.9)
死亡開始及び 終了時間	1時間-2日	1時間-24時間	2時間-5日	1時間-3日
症状発現及び 消失時間	10分-4日	10分-4日	10分-5日	10分-4日

1) : Probit 法

一般症状としては、検体投与により自発運動の低下、鎮静、痙攣、呼吸困難、衰弱が認められた。アトロピン投与によりこれらの症状は改善し、自発運動の増加が認められた。

体重変化においては、検体単独投与群とアトロピン投与群の間に顕著な差はなかった。

死亡例の剖検では肺のうっ血が認められ、胃及び小腸粘膜の出血が散見されたが、雌のアトロピン投与群には小腸粘膜の出血は認められなかった。剖検所見においては、解毒剤投与により所見の軽減が認められた。

生存例の剖検では、投与群の胸腹腔内各臓器に異常はみられず、対照群に比し差異が認められなかった。

以上の結果から、検体投与による毒性が一般的に有機リンの解毒剤として用いられているアトロピン投与により軽減されることが示され、アトロピンが本剤の解毒剤として有効であることが認められた。

③ ラットにおける解毒試験

(資料No. VIII-3)

試験機関 : 動物繁殖研究所 (GLP 対応)

報告書作成年 : 1994 年

検体の純度 : %

供試動物 : SD(Crj:CD)系ラット、開始時 6 週齢、1 群雄 10 匹、体重範囲 : 167-201g

観察期間 : 7 日間観察 (1993 年 11 月 2 日-1994 年 1 月 24 日)

投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、非致死用量 20mg/kg 及び致死用量 50mg/kg の用量で単回強制経口投与し、その後 1、3、5、7 時間目及び 1 日目に、解毒剤としてアトロピン (0.1、1、10mg/kg) またはアトロピンと PAM の混合液 (0.1+2.5、1+25、10+250mg/kg) を 5 回腹腔内投与し、解毒剤無処置群と比較して解毒剤の効果を調べた。

観察項目 : 一般状態及び死亡は、投与当日は投与後 1、3、5、7、8 時間目に、投与翌日は解毒剤投与直前及び投与後 1 時間目に、それ以降は 1 日 1 回観察した。体重は投与当日、投与後 1、3、7 日目及び死亡時に測定した。

結果 :
死亡 ;

投与量 (mg/kg)			累積死亡数						
検体	アトロピン	PAM	0日	1日	2日	3日	4日	5-7日	合計
20	0	0	0	1	2	2	2	2	2/10
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	1	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	10	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	0.1	2.5	0	0	0	0	0	0	0/10
	1	25	0	0	0	0	0	0	0/10
	10	250	10↑	10↑	10↑	10↑	10↑	10↑	10/10↑
50	0	0	0	8	9	9	9	9	9/10
	0.1	0	0	4	7	7	7	7	7/10
	1	0	0	2↓	3↓	4↓	5	5	5/10
	10	0	0	0↓	3↓	5	5	5	5/10
	0.1	2.5	0	8	8	9	9	10	10/10
	1	25	0	1↓	1↓	2↓	2↓	2↑	2/10↓
	10	250	7	10	10	10	10	10	10/10

Fisherの直接確率検定 ↑↓: $p < 0.05$ ↑ ↓: $p < 0.01$

検体 20mg/kg 群では、EPN 単独投与群では2例の死亡が認められた。アトロピン 10mg/g + PAM250mg/g 併用処理群では、有意な死亡数の増加ならびに死亡時期の短縮が認められた。これはPAMの毒性によるものと思われた。これ以外の処理群では死亡が認められなかった。

検体 50mg/kg 群では、EPN 単独投与群では、9例の死亡が認められた。アトロピン 1mg/kg 単独処理群以上で投与後1-3日に、アトロピン 1mg/kg + PAM25mg/kg 併用処理群で試験期間を通じて有意に死亡率の減少が認められた。

一般状態 ; アトロピン単独もしくはPAMの併用処置により、腹臥、縮瞳、流涎、自発運動量の低下、振戦、軟便等の出現頻度が有意に減少した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

体重変化；

投与量 (mg/kg)			0 日	1 日		3 日		7 日	
検体	アトロピン	PAM	(g)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)
20	0	0	182	178	100	200	100	250	100
	0.1	0	181	192	108↑	210	105	256	102
	1	0	181	185	104	201	101	250	100
	10	0	182	183	103	194	97	239	96
	0.1	2.5	180	185	104	205	103	251	100
	1	25	180	191	107↑	213	107	256	102
	10	250	179	-	-	-	-	-	-
50 ^{注1)}	0	0	188	177		155		191	
	0.1	0	189	183		177		225	
	1	0	187	185		173		229	
	10	0	186	183		187		234	
	0.1	2.5	188	179		152		-	-
	1	25	190	183		195		241	
	10	250	187	179		-	-	-	-

Student t-test ↑ ↓ : P < 0.01

注 1) : 検体 50mg/kg 群は解毒剤無処理群が 1-2 匹であるため、統計処理を実施せず

検体 20mg/kg 群でアトロピンの 0.1mg/kg 単独投与群及びアトロピン 1mg/kg + PAM25mg/kg の併用処理群において、投与後 1 日の体重減少が有意に抑えられた。

以上の結果から、検体投与によるラットの毒性作用に対して、アトロピン 1mg/kg と PAM25mg/kg を併用した処方が有効な解毒作用を示した。

④ ラットにおける解毒試験

(資料No. VIII-4)

試験機関 : (株) 実医研

報告書作成年 : 2002 年

検体の純度 : %

供試動物 : SD(Crj:CD)系ラット、6 週齢、体重 : 雄 177-216g 雌 140-176g、
1 群 雌雄各 15 匹

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体はコーン油で調製後、単回強制経口投与した。投与前に 18-20 時間絶食した。検体投与用量は雄 46 mg/kg、雌 24 mg/kg とした。有機リン剤の解毒剤として広く認知されているアトロピン及び 2-PAM を選択した。検体投与後 1 時間からアトロピンを皮下投与、2-PAM を筋肉内投与した。アトロピンは検体投与後 1、7、13 及び 25 時間に投与した (合計 4 回)。2-PAM は 3 日間連日投与とし、1 日目は検体投与後 1 及び 7 時間 (1 日 2 回)、2 及び 3 日目は 1 日目の投与時間にあわせて投与した (合計 6 回)。

下表に検体の群構成、解毒剤の投与用量及び投与回数を示した。

群	検体 (mg/kg)		アトロピン mg/kg × (回数)	2-PAM mg/kg × (回数)
	雄	雌		
1	46	24	0	0
2			$30 \times (1) + 10 \times (3)$	0
3			$30 \times (4)$	0
4			0	$50 \times (2) \times 3$ 日間
5			$30 \times (1) + 10 \times (3)$	$50 \times (2) \times 3$ 日間
6			$30 \times (4)$	$50 \times (2) \times 3$ 日間

観察項目 : 症状及び生死の観察を検体投与前、投与当日 (投与 1 日) は投与後 1、2、4、6、8、24 時間に、投与 2-14 日は午前と午後の 1 日 2 回行った。

結果 : 死亡数は、雄で第2及び3群で共に5/15例、6群で3/15例であり、第1群の12/15例に比し有意な死亡率の抑制が認められた。雌では第2及び3群が共に10/15例、第5及び6群が共に5/15例であり、第1群の15/15例に比し有意な死亡率の抑制が認められた。また、アトロピン単独群（雌雄の第2及び3群）に比べアトロピンと2-PAM併用群（雄の第6群、雌の第5及び6群）のほうが総死亡数に抑制が見られた。結果を下表に示す。

性別	群	EPN mg/kg	アトロピン mg/kg× (回数)	2-PAM mg/kg× (回数)	動物 数	死亡数 (匹)							
						投与日 (日)							総死亡数 (%)
						1	2	3	4	5	6	7-14	
雄	1	46	0	0	15	9	1	2	0	0	0	0	12 (80)
	2		30×(1)+ 10×(3)	0		0	2	2	0	1	0	0	5 (33) ↓
	3		30×(4)	0		0	1	4	0	0	0	0	5 (33) ↓
	4		0	50×(2) ×3日間		11	1	1	0	0	0	0	13 (87)
	5		30×(1)+ 10×(3)	50×(2) ×3日間		3	2	1	0	0	0	0	6 (40)
	6		30×(4)	50×(2) ×3日間		0	2	0	1	0	0	0	3 (20) ↓
雌	1	24	0	0	15	15							15 (100)
	2		30×(1)+ 10×(3)	0		2	2	3	2	0	1	0	10 (67) ↓
	3		30×(4)	0		0	3	4	1	2	0	0	10 (67) ↓
	4		0	50×(2) ×3日間		12	0	2	0	0	0	0	14 (93)
	5		30×(1)+ 10×(3)	50×(2) ×3日間		0	3	1	1	0	0	0	5 (33) ↓
	6		30×(4)	50×(2) ×3日間		2	1	2	0	0	0	0	5 (33) ↓

Fisherの直接確率法：雌雄各第1群と解毒剤投与群（雌雄各第2-6群）の総死亡数間に有意差が認められた群を示した。↑↓：p<0.05 企↓：p<0.01 ↑↓：p<0.001

申請者注】雌雄各第2群と第5又は6群、雌雄各第3群と第5又は6群の総死亡数に有意差は認められなかった。

症状は、検体投与群（雌雄の第1群）で投与後2時間以内に自発運動低下、縮腫が認められ、投与後8時間までに筋線維性攣縮、腹臥位、異常歩行、流涎、眼球突出、流涙、体温低下、皮膚色低下、下痢などが認められた。

アトロピン投与群（雌雄の第2及び3群）では、アトロピン投与後に全例に散瞳が認められた。その他に自発運動低下、筋線維性攣縮、腹臥位、異常歩行が認められたが、投与2日以降から症状の回復が見られた。

2-PAM投与群（雌雄の第4群）では、第1群と同様の症状を認めた。症状観察中に瞳孔径が正常な個体も見られたが、全体的に第1群と同様の経過を示した。

アトロピンと2-PAMの併用群（雌雄第5及び6群）では、アトロピン投与群と同様の症状及び経過が見られたが、雄では症状の発現が少ない傾向があった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

以上の結果から、EPNのラットに対する毒性作用に対して、アトロピンは有効な解毒作用を示した。さらに2-PAMを併用することでより良好な治療効果が期待できるものと考えられた。

3. 製剤

3-1. 45%乳剤

(1) 急性毒性

① 45%乳剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. I-5)

試験機関 : 日本実験医学研究所

報告書作成年 : 1978年

検体の純度 : 45%乳剤

〔組成〕 原体 45.0%
乳化剤・有機溶媒等 55.0%

供試動物 : Wistar系ラット、1群雌雄各10匹、5週齢、体重:雄130-150g 雌120-150g

観察期間 : 7日間観察(投与日を0日として起算)

投与方法 : 検体を精製水に懸濁(4mg/ml)し、一晚絶食したラットに単回強制経口投与した。

観察・検査項目 : 一般症状及び死亡を7日間観察した。

死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	13.9、16.7、20.0、24.0、28.8、34.6
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 19.50(16.81-22.61) 雌 21.50(18.22-25.37)
死亡開始及び終了時間	投与後30分/投与後2日
症状発現及び消失時間	投与後5分/投与後2日
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌雄 13.9

死亡 ; 投与後30分、28.8mg/kg群以上で強度の間代性痙攣と眼球突出を伴った死亡が認められた。ほとんどの死亡は投与後1-3時間以内に認められた。

症状 ; 投与後5-10分に自発運動の低下と静居性、投与後15-20分間に間代性痙攣、流涙が認められた。生存動物は投与後3-5時間にほぼ回復した。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

② 45%乳剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料No. I-4)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP対応)

報告書作成年 : 1987年

検体の純度 : 45%乳剤

(組成) 原体 45.0%
 乳化剤・有機溶媒等 55.0%

供試動物 : ICR(Cr1:CD-1 BR)系マウス、1群雌雄各 10 匹、体重 : 雄 22-30g 雌 20-26g

観察期間 : 14 日間観察 (投与日を 1 日として起算)

投与方法 : 検体を蒸留水に懸濁し、一晩絶食したマウスに単回強制経口投与した。投与容量は 10ml/kg とした。

観察・検査項目 : 一般症状及び死亡について投与当日は投与後 30 分間、1、2 及び 4 時間に観察した。その後、一般症状については 1 日 1 回、死亡については 1 日 2 回観察した。体重は投与後 1、8 及び 15 日に測定し、死亡した動物は解剖時に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	2.5、10、40、80*、160、640
LD ₅₀ (mg/kg)	雄 152 雌 126
死亡開始及び終了時間	雄 投与後30分以内/投与後2時間 雌 投与後30分以内/投与後2日
症状発現及び消失時間	雄 投与後30分以内/投与後2日 雌 投与後30分以内/投与後4日
毒性徴候の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雌雄 10
死亡例の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雌雄 40

* : 雌のみ

死亡 ; 投与後 2 日の 2 匹を除き、全ての死亡は投与当日に認められた。

症状 ; 雌雄に関係なく、40mg/kg 群以上に立毛、嗜眠、円背位、振戦及び協調不能が認められた。他に、全般的な被毛の汚れ、痙攣、流涎及び呼吸数の減少も認められた。

体重 ; 生存している 160mg/kg 群雌 1 匹は投与後 8-15 日までの間、体重減少を示した。その他の全生存動物は体重増加を示した。

肉眼的病理検査 ; 死亡した 160mg/kg 群雌雄(計 5 匹)及び 640mg/kg 群雌(9 匹)で、肝臓の小葉像明瞭化が認められた。生存動物で異常は認められなかった。

③ 45%乳剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料No. I-6)

試験機関 : 日本実験医学研究所 (GLP対応)

報告書作成年 : 1985年

検体の純度 : 45%乳剤

〔組成〕 原体 45.0%
乳化剤・有機溶媒等 55.0%

供試動物 Wistar系ラット、1群雌雄各10匹、9週齢、体重:雄260-302g 雌160-202g

観察期間 : 14日間観察(投与日を0日として起算)

投与方法 : 原液を投与前日に剪毛した背部中央に塗布し、24時間後直ちに塗布部位を中性洗剤で洗浄した。

観察・検査項目: 一般症状及び死亡を投与当日は投与後30分間、1及び6時間に観察した。その後は1日2回(午前及び午後)観察した。体重は投与開始前、投与後1-7日までの毎日、投与後14日に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経皮
投与量(ml/kg)	0, 0.25, 0.50, 1.00
LD ₅₀ (ml/kg)	雌雄 >1.00
死亡開始及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	症状発現例なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量(ml/kg)	雌雄 1.00
死亡例の認められなかった最高投与量(ml/kg)	雌雄 1.00

死亡 ; 死亡は認められなかった。

症状 ; 特記すべき異常は認められなかった。

体重 ; 全群雄で投与後1日に体重増加抑制または体重減少が認められた。全群雌では投与後1日から2日目まで増加抑制または体重減少が認められ、このうち0.5及び1.0ml/kg群では有意に減少した。その後は雌雄ともに体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 0.25, 0.50及び1.00ml/kg群雌に子宮水腫がそれぞれ、1, 2及び2匹ずつ認められたが、その他は各投与群とも内部諸臓器ならびに皮膚塗布面及び皮下組織において異常は認められなかった。

④ 45%乳剤のラットにおける急性吸入毒性試験

(資料No. I-7)

試験機関 : Hazleton UK (GLP対応)

報告書作成年 : 1988年

検体の純度 : 45%乳剤

〔組成〕 原体 45.0%
 乳化剤・有機溶媒等 55.0%

供試動物 : SD(Cr1:CD BR)系ラット、1群雌雄各5匹、6-9週齢、体重:雄202-347g 雌147-277g

観察期間 : 14日間観察(投与日を1日として起算)

暴露方法 : 検体を改良型ガラス製 DeVilbiss 気体発生装置を用いて噴霧し、4時間頭部暴露させた。対照群は空気のみ暴露させた。暴露空気を吸引採取し、ガスクロマトグラフィーにより実際濃度を算出した。

暴露条件 :

名目濃度 (mg 製剤/l)	雄	0	0.700		2.833			4.511	6.887	21.200
	雌	0	0.700	1.860	2.833	2.100	3.633			
実際濃度 (μ g 有効成分/l)	雄	0	49.23		184.96			362.11	550.28	1392.82
	雌	0	49.23	130.84	184.96	198.61	303.55			
空気力学的質量中位径* (μ m)		-	1.15	1.23	0.99	1.21	1.27	1.33	1.52	1.55
チャンパー容量(l)	4									
チャンパー内通気量 (l/分)	5	13	12	13	13	13	13	12	12	13
暴露条件	エアロゾル、4時間、頭部暴露									

*: カスケードインパクターを用いて4回測定した平均値

観察・検査項目: 暴露中は1時間毎、さらに暴露後14日間は一般症状については1日1回、死亡については1日2回観察した。体重は暴露直前及び直後、投与後8及び15日、死亡時に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。また、肺、気管支及び気管の臓器重量を測定した。肉眼的病変部位は固定し、病理組織学的に検査した。

結果

投与方法	吸入
暴露濃度 (μg 有効成分/ ℓ)	雄 0、49.23、184.96、362.11、550.28、1392.82 雌 0、49.23、130.84、184.96、198.61、303.55
LC ₅₀ (μg 有効成分/ ℓ) [95%信頼限界]	雄 351 雌 121[16.3-158]
死亡開始及び終了時間	雄 暴露中/暴露後4日 雌 暴露中/暴露後5日
症状発現及び消失時間	雄 暴露中/暴露後7日 雌 暴露中/暴露後3日
毒性徴候の認められなかった 最高暴露濃度 (μg 有効成分/ ℓ)	雄 184.96 雌 49.23
死亡例の認められなかった 最高暴露濃度 (μg 有効成分/ ℓ)	雄 184.96 雌 49.23

- 死亡 ; 死亡は 362.11 $\mu\text{g}/\ell$ 群以上の雄、130.84 $\mu\text{g}/\ell$ 以上の雌で認められた。ほとんどの死亡は暴露当日に認められた。死亡率と暴露濃度には用量相関性が認められた。
- 症状 ; 362.11 $\mu\text{g}/\ell$ 群以上の雄及び 130.84 $\mu\text{g}/\ell$ 群以上 (暴露中に全動物が死亡した 303.55 $\mu\text{g}/\ell$ 群は除く) の雌で暴露当日、振戦、他に流涎、流涙、鼻汁、虚脱、運動失調、呼吸困難及び眼球突出が認められたが、翌日には多くが回復した。
- 体重 ; 対照群と比較して増加率は低かったが、130.84 $\mu\text{g}/\ell$ 群雌 1 匹を除き全動物で体重増加が認められた。
- 肉眼的病理検査 ; 肺重量に影響は認められなかった。死亡動物で局所反応を示唆する鼻汁、鼻甲介あるいは肺の発赤または変色が認められた。2 匹は消化管に退色巣が認められた。これら異常は組織学的に明らかにされなかった。生存動物で異常は認められなかった。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

① 45%乳剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料No. II-3)

試験機関 : 環境保健生物研究センター (GLP対応)
報告書作成年 : 1985年

検体の純度 : 45%乳剤

[組成] 原体 45.0%
乳化剤・有機溶媒等 55.0%

供試動物 : SPF ニュージーランド白色ウサギ、9週齢、雄6匹、体重 : 1.86-2.12kg

観察期間 : 7日間観察 (適用日を0日として起算)

投与方法 : 投与前日に背部被毛を電気バリカンで刈り、脱毛剤を用いて脱毛した。背部正中線の左右にそれぞれ2.5cm×2.5cmの擦過皮膚2部位と非擦過皮膚2部位計4部位を設けた。そのうち擦過皮膚、非擦過皮膚のそれぞれ1部位にリント布を用いて注射用蒸留水で正確に5倍希釈した検体0.5mlを適用した。残り2部位は無処理対照部位としてリント布のみを適用した。暴露時間は4時間とし、皮膚に残った検体は微温水を用いて拭き取った。

観察項目 : 暴露後4.5 (リント布除去後30分)、24、48、72時間及び7日に適用部位の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無を Draize 法に従って採点した。また、暴露後4.5、24、48時間の評点より皮膚一次刺激率を算出した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点を次頁の表に示す。

暴露後4.5時間より擦過部位、非擦過部位ともに軽度の紅斑及び非常に軽度の浮腫が認められ、暴露後24時間にはともにややその程度が増強した。

暴露後48時間には、浮腫は消失する傾向となり、紅斑はより明確となったが、暴露後7日には全匹が回復した。反応は擦過部位の方が非擦過部位よりもやや顕著であったが、いずれも血管及び皮下組織へおよぼす傷害性を示すものではなかった。一次刺激性率は2.0であり中等度に分類された。

以上の結果から、本剤はウサギの皮膚に対して中等度の刺激性があるものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

動物 番号	項目		最高 評点	暴露後時間					評点
				4.5h	24h	48h	72h	7日	
1	紅斑・痂皮	擦過	4	0	2	2	1	0	2.67
		非擦過		0	2	2	1	0	
	浮腫	擦過	4	1	2	1	0	0	
		非擦過		1	2	1	0	0	
2	紅斑・痂皮	擦過	4	0	1	1	1	0	1.17
		非擦過		0	1	0	0	0	
	浮腫	擦過	4	1	1	0	0	0	
		非擦過		1	1	0	0	0	
3	紅斑・痂皮	擦過	4	1	1	2	1	0	2.00
		非擦過		1	1	2	1	0	
	浮腫	擦過	4	1	1	0	0	0	
		非擦過		1	1	0	0	0	
4	紅斑・痂皮	擦過	4	1	1	2	1	0	2.33
		非擦過		1	1	2	1	0	
	浮腫	擦過	4	1	2	1	0	0	
		非擦過		1	1	0	0	0	
5	紅斑・痂皮	擦過	4	1	1	2	2	0	2.17
		非擦過		1	1	2	1	0	
	浮腫	擦過	4	1	1	1	0	0	
		非擦過		1	1	0	0	0	
6	紅斑・痂皮	擦過	4	1	1	1	1	0	1.50
		非擦過		0	1	1	0	0	
	浮腫	擦過	4	1	1	0	0	0	
		非擦過		1	1	0	0	0	
合計*	紅斑・痂皮	擦過	24	4	7	10	7	0	11.84
		非擦過		3	7	9	4	0	
	浮腫	擦過	24	6	8	3	0	0	
		非擦過		6	7	1	0	0	
平均*	紅斑・痂皮	擦過	4	0.67	1.17	1.67	1.17	0	2.0 ±0.6
		非擦過		0.5	1.17	1.5	0.67	0	
	浮腫	擦過	4	1	1.33	0.5	0	0	
		非擦過		1	1.17	0.17	0	0	

*：申請者が算出した

② 45%乳剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料No. II-3)

試験機関 : 環境保健生物研究センター (GLP対応)

報告書作成年 : 1985年

検体の純度 : 45%乳剤

[組成] 原 体 45.0%
乳化剤・有機溶媒等 55.0%

供試動物 : SPF ニュージーランド白色ウサギ、9 週齢、非洗眼群 : 雄 6 匹、洗眼群 : 雄 3 匹
体重 : 1.91-2.13kg

観察期間 : 14 日間観察 (適用日を 0 日として起算)

投与方法 : 検体を注射用蒸留水を用いて 5 倍に希釈したもの 0.1ml を右眼の下眼瞼結膜嚢内に適用し、1 秒間眼瞼を閉じあわせた。適用後 6 匹は洗眼せず、3 匹は適用後 3 分に微温水で 1 分間洗眼した。

観察項目 : 適用後 1、24、48、72 及び 7、14 日に角膜、虹彩、結膜の損傷ならびに刺激性変化を観察し、日本農林水産省ガイドラインに従って採点した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点を次頁の表に示す。

角膜の混濁及び虹彩の充血は適用後 1 時間から非洗眼群、洗眼群ともに認められ、24 時間から 48 時間にやや顕著となった。結膜及び瞬膜の血管拡張、出欠、浮腫も適用後 1 時間から認められたが、時間の経過とともに軽減した。これらの所見は適用後 7 日にはほぼ回復した。

以上の結果から、本剤はウサギの眼粘膜に対して刺激性を有するものと判断される。洗眼効果は特に認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

項目			最高 評点	適用後時間						
				1時間	24時間	48時間	72時間	7日	14日	
非洗眼群	動物 番号 1	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	-	
		虹 彩	2	0	1	0	0	0	-	
		結 膜	発 赤	3	1	1	1	0	0	-
			浮 腫	4	2	2	0	0	0	-
	動物 番号 2	角膜混濁	4	0	1	1	1	0	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	-	
		結 膜	発 赤	3	1	1	1	1	0	-
			浮 腫	4	2	2	1	0	0	-
	動物 番号 3	角膜混濁	4	0	1	1	1	0	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	-	
		結 膜	発 赤	3	1	1	1	1	0	-
			浮 腫	4	2	2	1	0	0	-
	動物 番号 4	角膜混濁	4	0	1	1	0	0	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	-	
		結 膜	発 赤	3	1	1	1	0	0	-
			浮 腫	4	2	2	1	0	0	-
	動物 番号 5	角膜混濁	4	0	1	1	1	0	0	
		虹 彩	2	0	1	1	0	0	0	
		結 膜	発 赤	3	1	1	1	1	1	0
			浮 腫	4	2	2	1	0	0	0
動物 番号 6	角膜混濁	4	0	1	1	1	0	-		
	虹 彩	2	1	1	0	0	0	-		
	結 膜	発 赤	3	1	1	1	1	0	-	
		浮 腫	4	2	1	0	0	0	-	
平均	角膜混濁		4	0	0.83	0.83	0.67	0	0	
	虹 彩		2	0.17	0.5	0.17	0	0	0	
	結 膜	発 赤	3	1	1	1	0.67	0.17	0	
		浮 腫	4	2	1.83	0.67	0	0	0	
	合計		13	3.2	4.2	2.7	1.3	0.2	0	
洗眼群* (3匹平均)	角膜混濁		4	0.33	1	0.67	0.67	0	-	
	虹 彩		2	0.33	0.67	0.33	0	0	-	
	結 膜	発 赤	3	1	1	1	0	0	-	
		浮 腫	4	2	1.33	0.67	0	0	-	
	合計		13	3.67	4	2.67	0.67	0	-	

*: 申請者が算出した

-: 観察せず

(3) 皮膚感作性

① 45%乳剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料No. II-7)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP対応)
報告書作成年 : 1987年

検体の純度 : 45%乳剤

[組成] 原体 45.0%
乳化剤・有機溶媒等 55.0%

供試動物 : Dunkin Hartley 系モルモット、1 群雌各 20 匹、体重 : 366-498g

観察期間 : 感作開始から惹起終了後 48 時間観察まで (24 日間)

試験操作 : [Maximization 法]

本試験の処理方法を下表に示す。

群	匹数	処理		
		感作		惹起
		皮内投与	経皮投与	経皮投与
検体 投与群	20	①FCA* ②5%検体流動パラフィン溶液 ③5%検体流動パラフィン溶液/FCA 等量混合液	100%検体流動 パラフィン溶液	(1) 100%検体流動 パラフィン溶液 (2) 50%検体流動 パラフィン溶液
陰性 対照群	20	①FCA* ②流動パラフィン液 ③流動パラフィン液/FCA 等量混合液	流動パラフィン液	(1) 100%検体流動 パラフィン溶液 (2) 50%検体流動 パラフィン溶液

* : FCA ; フロイント完全アジュバント

感作皮内投与 : 背部を剪毛し、左右各々の区画 (約 6×4cm) に感作皮内投与液①、②及び③を各々 0.1ml ずつ投与した。

感作経皮投与 : 感作皮内投与後 7 日に、同部位を剪毛し、感作経皮投与液をしみこませたパッチ (4×2cm) を 48 時間閉塞貼付した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

惹起経皮投与：感作経皮投与後 14 日（試験開始後 21 日）に、背部及び脇腹を剪毛し、左脇腹に惹起経皮投与液(1)、右脇腹に惹起経皮投与液(2)をしみこませたパッチ(2×2cm)を 24 時間閉塞貼付した。

観察項目：惹起経皮貼付除去後 24 及び 48 時間に適用部位の紅斑及び浮腫の有無を肉眼的に観察し、採点した。

採点及び評価方法；各観察時に下記に示した基準に従い採点した。

Magnusson & Kligman の基準

皮膚反応の程度

肉眼的に変化なし
散在性又は斑状の紅斑
中等度びまん性の紅斑
強い紅斑と浮腫

評価

0
1
2
3

結果：

群	処理			匹数	感作反応動物数								陽性動物数	感作率 (%)	
	感作		惹起		皮膚反応評点										
	皮内投与	経皮投与	経皮投与		24 時間後				48 時間後						
					0	1	2	3	0	1	2	3			
検体投与群	①FCA* ②5%検体流動ハラフィン溶液 ③5%検体流動ハラフィン溶液/FCA 等量混合液	100%検体	100%検体	20	10	2	4	0	10	2	4	0	6	9	56.3**
			50%検体		10	3	3	0	10	2	4	0			
陰性対照群	①FCA* ②流動ハラフィン液 ③流動ハラフィン液/FCA 等量混合液	流動ハラフィン液	100%検体	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			50%検体		0	0	0	0	0	0	0	0			

*：FCA；フロイント完全アジュバント

**：4 匹死亡のため匹数は 16 匹とした

検体投与群の 4 匹は惹起前に死亡した。

検体投与群では 50 及び 100%群ともに弱い感作性が認められ、感作率は 56.3%であった。陰性対照群では感作反応は認められなかった。

なお、陽性対照物質 DNCB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) を用いた感受性確認試験は 1986 年 11 月 11 日-1986 年 12 月 5 日に実施され、感作率は 90%であった。

以上の結果から、本剤は感作率 56%で、皮膚感作性は中等度であると判断される。

3-2. 1.5%粉剤

(1) 急性毒性

① 1.5%粉剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. I-9)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP対応)
報告書作成年 : 1987年

検体の純度 : 1.5%粉剤

[組成] 原体 1.5%
 鉱物質粉等 98.5%

供試動物 : SD(Cr1:CD BR)系ラット、1群雌雄各10匹、体重:雄75-93g 雌74-91g

観察期間 : 14日間観察(投与日を1日として起算)

投与方法 : 検体を蒸留水で懸濁し、一晚絶食したラットに単回強制経口投与した。投与容量は20ml/kgとした。

観察・検査項目 : 一般症状及び死亡について投与当日は投与後30分間、1、2及び4時間に観察した。その後、一般症状については1日1回、死亡については1日2回観察した。体重は投与後1、8及び15日に測定し、死亡した動物は解剖時に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	25、75、225、390*、675、2025
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 675 雌 403(317-512)
死亡開始及び終了時間	雄 投与後30分以内/投与後1時間 雌 投与後30分以内/投与後5日
症状発現及び消失時間	雄 投与後30分以内/投与後7日 雌 投与後30分以内/投与後5日
死亡例の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雄 225 雌 75

*: 雌のみ

死亡 ; 225mg/kg 群雌1匹を除き、全ての死亡は投与当日に認められた。

症状 ; 雌雄に関係なく、投与当日から円背位、立毛、嗜眠、協調不能、振戦、及び流涎が観察された。他に、虚脱、頬・眼・肛門・生殖器周囲の被毛の汚れ、痙攣、側臥位、呼吸緩徐、呼吸困難も認められた。

体重 ; 生存動物で体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

② 1.5%粉剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料No. I-8)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP対応)
報告書作成年 : 1987年

検体の純度 : 1.5%粉剤

〔組成〕 原体 1.5%
 鉱物質粉等 98.5%

供試動物 : ICR(Cr1:CD-1 BR)系マウス、1群雌雄各10匹、体重:雄20-28g 雌20-24g

観察期間 : 14日間観察(投与日を1日として起算)

投与方法 : 検体を蒸留水で懸濁し、一晚絶食したマウスに単回強制経口投与した。投与容量は20ml/kgとした。

観察・検査項目 : 一般症状及び死亡について投与当日は投与後30分間、1、2及び4時間に観察した。その後は毎日1回観察した。体重は投与後1、8及び15日に測定し、死亡した動物は解剖時に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	667、1000、1500、2250、3375
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 3001(2537-3822) 雌 2256(1874-2766)
死亡開始及び終了時間	雄 投与後30分以内/投与後2時間 雌 投与後30分以内/投与後1時間
症状発現及び消失時間	雄 投与後30分以内/投与後4日 雌 投与後30分以内/投与後3日
毒性徴候の認められなかった最高暴露濃度(mg/kg)	雄 — 雌 1000
死亡例の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雄 1500 雌 1000

死亡 ; 全ての死亡は投与当日に認められた。

症状 ; 雌雄に関係なく立毛、円背位、嗜眠が観察された。他に振戦、協調不能、紅涙、痙攣も認められた。立毛のみ投与翌日以降も認められた。雄は投与後4日から、雌は投与後3日から正常であった。

体重 ; 全生存動物で体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 検体投与に関連した異常として、死亡動物で角膜混濁及び肝臓の小葉像明瞭化が認められた。その他検体投与に関連した異常は認められなかった。

③ 1.5%粉剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料No. I-10)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP対応)
報告書作成年 : 1987年

検体の純度 : 1.5%粉剤

〔組成〕 原体 1.5%
 鉱物質粉等 98.5%

供試動物 : SD(Cr1:CD BR)系ラット、1群雌雄各10匹、体重:雄265-304g 雌209-252g

観察期間 : 14日間観察(投与日を1日として起算)

投与方法 : 蒸留水で湿らせた検体を、投与前日に刈毛した背部皮膚20cm²に塗布した。塗布部位はガーゼで被覆し、包帯で固定した。塗布24時間後、被覆物を取り除き、塗布部位を温水で洗浄した。

観察・検査項目 : 一般症状及び死亡を投与当日は投与後30分間、1、2及び4時間に観察した。その後は毎日1回観察した。体重は投与当日、投与後8及び15日に測定した。観察期間終了時に全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経皮
投与量(mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 >2000
死亡開始及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	症状発現例なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雌雄 2000
死亡例の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雌雄 2000

死亡 ; 死亡は認められなかった。

症状 ; 特記すべき異常は認められなかった。

体重 ; 全動物で体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

④ 1.5%粉剤のラットにおける急性吸入毒性試験

(資料No. I-11)

試験機関 : Inveresk Research International Limited (GLP対応)

報告書作成年 : 1992年

検体の純度 : 1.5%粉剤

[組成] 原体 1.5%
 鉍物質粉等 98.5%

供試動物 : SD(Cr1:CD)系ラット、1群雌雄各5匹、体重:雄223-276g 雌172-211g

観察期間 : 14日間観察(投与日を1日として起算)

暴露方法 : 微粉碎した検体を用いてコンプレッサー圧縮空気供給下 RBG装置*によりエアロゾルを発生させ、4時間鼻部暴露させた。対照群は空気のみを暴露させた。暴露空気をガラスフィルターを用いて捕集し、重量測定法により実際濃度を算出した。

* RBG=Rotating Brush Generator

暴露条件 ;

名目濃度 (mg/l)	26.5	
実際濃度 (mg/l)	5.56	
粒子径分布* (%)	>10	33.3
	6	32.5
	3.5	19.0
	2.0	12.05
	0.9	3.05
	0.5	0.15
	0.25	-
	<3.5	15.3
空気力学的質量中位径 (μm)	7.0 #	
呼吸可能な粒子 (<10μm) の割合 (%)	66.7% (質量比)	
チャンバー容積 (l)	45	
チャンバー内通気量 (l/分)	25	
暴露条件	エアロゾル、4時間、鼻部暴露	

* : カスケードインパクターを用いて2回測定した平均値

: 申請者が原報告書の表3より算出した平均値

観察・検査項目 : 一般症状及び死亡について暴露中は継続して30分毎に、暴露後は1-2時間に観察した。その後は少なくとも1日1回、通常は1日2回観察した。体重は暴露直前及び暴露後2、3、4、10及び14日に測定した。観察期間終了時、全動物について肉眼的病理検査を実施した。また、肺重量を測定し体重比を算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

結果

投与方法	吸入
暴露濃度 (mg/l)	0、5.56
LC ₅₀ (mg/l)	雌雄 >5.56
死亡開始及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	雄 暴露直後/暴露後1-2時間 雌 暴露直後/暴露後8日
毒性徴候の認められなかった 最高暴露濃度 (μg/l)	雌雄 5.56
死亡例の認められなかった 最高暴露濃度 (μg/l)	雌雄 5.56

死亡 ; 死亡は認められなかった。

症状 ; 全ての動物は暴露中、呼吸緩徐及び浅速呼吸が認められた。暴露直後は鎮静並びによろめきが認められ、暴露後 1-2 時間に雄は回復したが、雌 3 匹は依然鎮静を示した。このうち 2 匹は体温低下及び腹臥位も認められた。その他、雌のみに円背位、被毛粗剛及び呼吸困難が認められたが、ほとんどは暴露後 5 日までに回復した。

体重 ; 全動物で体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 肺重量に影響は認められず、肉眼的異常も認められなかった。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

① 1.5%粉剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料No. II-5)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP対応)
報告書作成年 : 1986年

検体の純度 : 1.5%粉剤

〔組成〕 原体 1.5%
 鉱物質粉等 98.5%

供試動物 : ニュージーランド白色ウサギ、雌6匹、体重 : 2.6-3.0kg

観察期間 : 7日間観察 (適用日を0日として起算)

投与方法 : 検体0.5gを蒸留水0.5mlでペースト状にした後2.5cm×2.5cmのリント布に塗り、投与前日に剪毛した背部皮膚に適用して包帯で閉塞した。暴露時間は4時間とし、皮膚に残った検体は37℃の水に浸した生綿を使って洗浄した。

観察項目 : 暴露終了後1、24、48、72及び168時間に適用部位の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)の有無をDraize法に従って採点した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

動物 番号	項目	最高 評点	暴露後時間				
			1h	24h	48h	72h	168h
154	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
155	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
156	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
158	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
159	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
160	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	24	0	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0

刺激性変化はいずれの動物でも認められなかった。

以上の結果から、本剤はウサギの皮膚に対して刺激性がないものと判断される。

② 1.5%粉剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料No. II-4)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP対応)
報告書作成年 : 1986年

検体の純度 : 1.5%粉剤

〔組成〕	原体	1.5%
	鉍物質粉等	98.5%

供試動物 : ニュージーランド白色ウサギ、非洗眼群 : 雌 6 匹、洗眼群 : 雌 3 匹、体重 : 2.3-2.5kg

観察期間 : 7 日間 (適用日を 0 日として起算)

投与方法 : 検体 0.1g を右眼の下眼瞼結膜嚢内に適用し、数秒間眼瞼を閉じあわせた。適用後 6 匹は洗眼せず、3 匹は適用後 2 分に 37 度の蒸留水約 40ml で 1 分以上洗眼した。

観察項目 : 適用後 1、24、48、72 及び 168 時間に角膜、虹彩、結膜の損傷ならびに刺激性変化を観察し、Draize 法に従って採点した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点を次頁の表に示す。

角膜及び虹彩の刺激性変化は非洗眼群、洗眼群ともに認められなかった。

結膜の刺激性変化は、非洗眼群 4 匹で適用後 1 時間に明らかな発赤、浮腫、分泌物が認められた。残りの 2 匹では軽度の結膜の浮腫、発赤が認められた。適用後 24 時間には軽度の発赤が 2 匹で残っていたが、適用後 48 時間には消失した。一方、洗眼群 1 匹で適用後 1 時間に軽度の発赤、浮腫が認められ、適用後 24 時間には軽度の発赤が残っていたが、適用後 48 時間には消失した。

以上の結果から、本剤はウサギの眼粘膜に対して、極く軽度の刺激性を有するものとの判断される。また、洗眼効果が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

《非洗眼群》

項目			最高評点	適用後時間					
				1時間	24時間	48時間	72時間	168時間	
非洗眼群	動物番号 329	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0
			面積*	4	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	0	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0	0
	動物番号 330	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0
			面積*	4	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0	0
	動物番号 332	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0
			面積*	4	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	2	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	1	0	0	0	0
	動物番号 333	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0
			面積*	4	0	0	0	0	0
虹彩		2	0	0	0	0	0		
結膜		発赤	3	2	0	0	0	0	
		浮腫	4	2	0	0	0	0	
		分泌物*	3	1	0	0	0	0	
動物番号 336	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	
		面積*	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	2	0	0	0	0	
		浮腫	4	2	0	0	0	0	
		分泌物*	3	1	0	0	0	0	
動物番号 337	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	
		面積*	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	1	0	0	0	
		浮腫	4	2	0	0	0	0	
		分泌物*	3	1	0	0	0	0	
合計**			660	40	4	0	0	0	
平均**1)			110	6.67	0.67	0	0	0	

*：農水省ガイドラインには記載なし

**：申請者が算出した

1) Draize 法による評価点 (最高 110 点)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

《洗眼群》

項 目			最高評点	適 用 後 時 間				
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	168 時間
洗眼群** (3 匹平均)	角 膜	混 濁	4	0	0	0	0	0
		面 積*	4	0	0	0	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0	0
	結 膜	発 赤	3	0.33	0.33	0	0	0
		浮 腫	4	0.33	0	0	0	0
		分泌物*	3	-	0	0	0	0
	合計 ¹⁾			110	1.33	0.67	0	0

*：農水省ガイドラインには記載なし

**：申請者が算出した

1) Draize 法による評価点 (最高 110 点)

-：洗眼のため評価不可能

(3) 皮膚感作性

① 1.5%粉剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料No. II-8)

試験機関 : Toxicol Laboratories Limited (GLP対応)
報告書作成年 : 1987年

検体の純度 : 1.5%粉剤

〔組成〕 原体 1.5%
 鉱物質粉等 98.5%

供試動物 : Dunkin Hartley 系モルモット、1群雌 20匹、体重 : 387-497g

観察期間 : 感作開始から惹起終了後 48 時間観察まで (24 日間)

試験操作 : [Maximization 法]

本試験の処理方法を下表に示す。

群	匹数	処理		
		感作		惹起
		皮内投与	経皮投与	経皮投与
検体投与群	20	①FCA* ②5%検体流動パラフィン溶液 ③5%検体流動パラフィン溶液/FCA 等量混合液	50%検体流動 パラフィン溶液	(1)50%検体流動 パラフィン溶液 (2)25%検体流動 パラフィン溶液
陰性 対照群	20	①FCA* ②流動パラフィン液 ③流動パラフィン液/FCA 等量混合液	流動パラフィン液	(1)50%検体流動 パラフィン溶液 (2)25%検体流動 パラフィン溶液

* : FCA ; フロイント完全アジュバント

感作皮内投与 : 背部を剪毛し、左右各々の区画 (約 6×4cm) に感作皮内投与液①、②及び③を各々0.1ml ずつ投与した。

感作経皮投与 : 感作皮内投与後 7 日に、同部位を剪毛し、感作経皮投与液をしみこませたパッチ (4×2cm) を 48 時間閉塞貼付した。

惹起経皮投与 : 感作経皮投与後 14 日 (試験開始後 21 日) に、背部及び脇腹を剪毛し、左脇腹に惹起経皮投与液 (1)、右脇腹に惹起経皮投与液 (2) をしみこませたパッチ (2×2cm) を 24 時間閉塞貼付した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

観察項目 : 惹起経皮貼付除去後 24 及び 48 時間に適用部位の紅斑及び浮腫の有無を肉眼的に観察し、採点した。

採点及び評価方法 ; 各観察時に下記に示した基準に従い採点した。

Magnusson & Kligman の基準

皮膚反応の程度

肉眼的に変化なし
 散在性又は斑状の紅斑
 中等度びまん性の紅斑
 強い紅斑と浮腫

評価

0
 1
 2
 3

結果 :

群	処理			匹数	感作反応動物数								陽性動物数	感作率 (%)
	感作		惹起		皮膚反応評点									
	皮内投与	経皮投与	経皮投与		24 時間後				48 時間後					
					0	1	2	3	0	1	2	3		
検体投与群	①FCA*	50%検体	50%検体	20	13	7	0	0	11	9	0	0	13	60**
	②5%検体流動ハラフィン溶液 ③5%検体流動ハラフィン溶液/FCA 等量混合液		25%検体		15	5	0	0	17	3	0	0		
陰性対照群	①FCA*	流動ハラフィン液	50%検体	20	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	②流動ハラフィン液 ③流動ハラフィン液/FCA 等量混合液		25%検体		0	0	0	0	0	0	0	0		

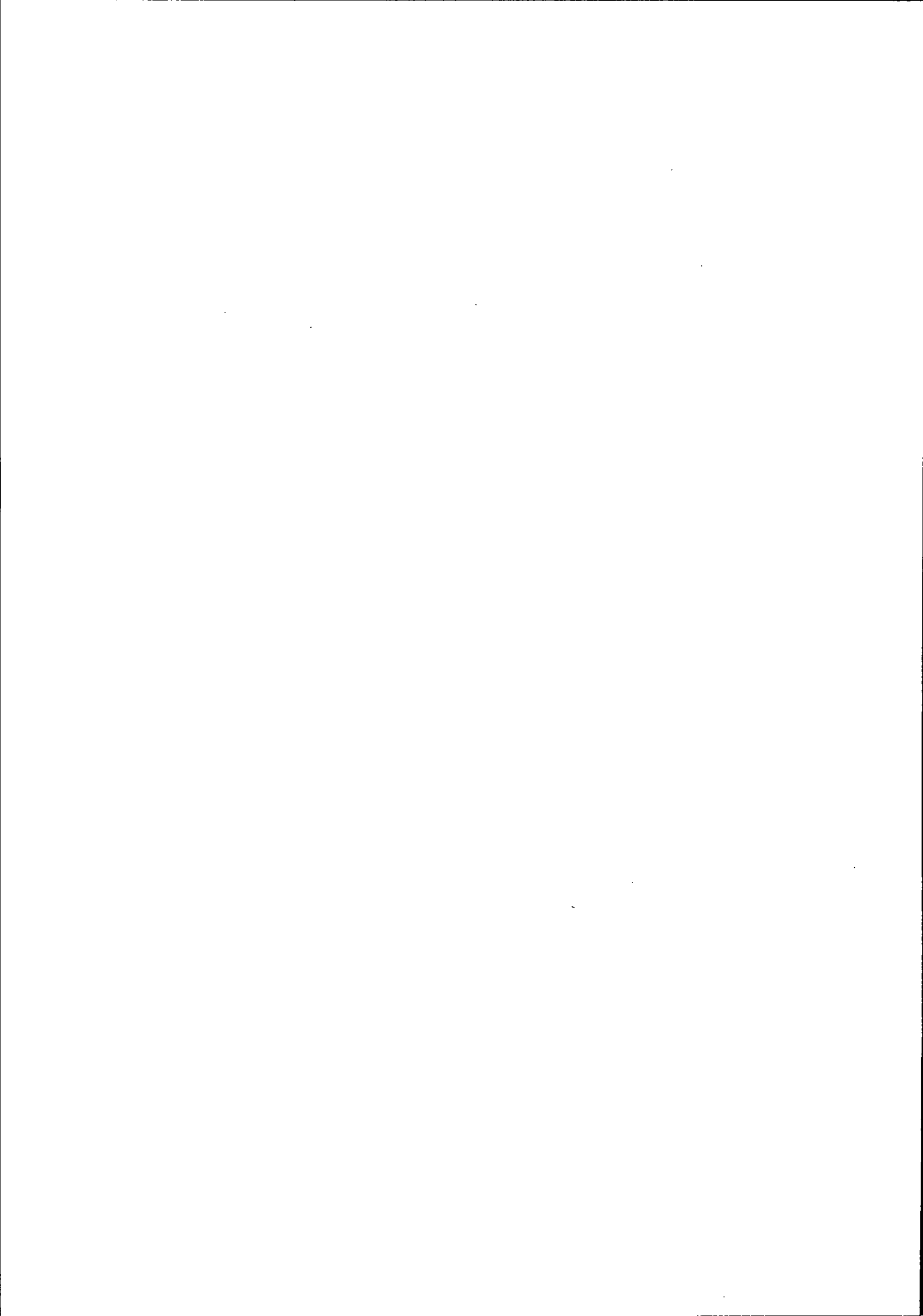
* : FCA ; フロイント完全アジュバント

** : [(検体投与群陽性動物数 - 陰性対照群陽性動物群) / 20] *100

検体投与群では 25 及び 50%群ともに感作性が認められ、感作率は 60%であった。陰性対照群では 1 匹に陽性反応が認められた。

なお、陽性対照物質 DNCB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) を用いた感受性確認試験は 1986 年 11 月 11 日-1986 年 12 月 5 日に実施され、感作率は 90%であった。

以上の結果から、本剤の皮膚感作性は中等度であると判断する。



IX. 動植物及び土壌における代謝分解

【代謝分解試験一覧表】

資料No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	頁
IX-1 GLP (M-1)	動物体内運命に関する試験 ラット体内における代謝試験(吸収、分布、代謝及び排泄)	Cri:CD (SD)BR系 ラット	標識 低用量経口1回 雄 0.8mg/kg 雌 0.3mg/kg	投与後5日間での排泄率(93~96%) 雄:尿 51%、糞 31% 雌:尿 42%、糞 37% 最高血中濃度到達時間 雌雄12時間 AUC 雄 8.53 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 、雌 3.51 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 組織残留は低濃度	Hazleton Laboratories Europe Ltd. (1986)	IX-6
			非標識 14日間 投与後標識1回 雄 0.8mg/kg 雌 0.3mg/kg	投与後4日間での排泄率(96~97%) 雄:尿 59%、糞 26% 雌:尿 68%、糞 17% 連続投与による動態への影響なし		
			高用量経口1回 雄 30mg/kg 雌 15mg/kg	投与後7日間での排泄率(約90%) 雄:尿 43%、糞 36% 雌:尿 32%、糞 46% 最高血中濃度到達時間 雌雄6時間 血中濃度の低下は緩慢 AUC 雄 157 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 、雌 110 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 組織残留の様相は低用量に類似 主要分布臓器:肝臓、肺、腎		
IX-2 GLP (M-2)	動物体内運命に関する試験 ラット体内における代謝試験(吸収、分布、排泄 ^(注) 及び胆汁排泄)	Cri:CD (SD)BR系 ラット	標識 低用量経口1回 雄 0.3mg/kg	投与後3日間で大部分が排泄 7日間での排泄率93% 尿 49%、糞 24% 組織残留は低濃度	Hazleton UK (1988)	IX-11
			非標識 14日間 投与後標識1回 雄 0.3mg/kg	投与後4日間での排泄率 97% 尿 62%、糞 21% 連続投与による組織残留への影響なし		
			高用量経口1回 雄 15mg/kg	投与後4日間での排泄率 95% 尿 47%、糞 34% 組織残留の様相は低用量に類似 主要分布臓器:肝臓、肺、腎臓、脂肪		
			胆汁排泄 経口 1回 雄 0.3mg/kg 雌 0.3mg/kg	投与後24時間の胆汁排泄率 雄 1.87%、雌 2.26% 胆汁排泄は主要経路ではない 吸収率(申請者が推定) 低用量:雄>69% 雌>58% 高用量:雄>61% 雌>44%		
IX-3 GLP (M-3)	動物体内運命に関する試験 ラット体内における代謝試験(代謝物定量及び構造解析)	Cri:CD (SD)BR系 ラット	標識 低用量経口1回 雄 0.3mg/kg 雌 0.3mg/kg	投与後3日間の代謝物 尿: 糞: 雌雄とも検出された代謝物は同様 投与後96~168時間の肝臓中代謝物: 雄ラット: 雌ラットはのみ検出	Hazleton UK (1989)	IX-16
			非標識 14日間 投与後標識1回 雄 0.3mg/kg 雌 0.3mg/kg			
			高用量経口1回 雄 15mg/kg 雌 15mg/kg			

(注) 本試験(IX-2)の吸収、分布及び排泄試験は、前試験(IX-1)での雌雄の用量を合わせるため、雄において0.3mg/kg及び15mg/kgの用量で追加実施された。

【代謝分解試験一覧表】(続き)

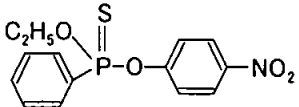
資料No	試験の種類	供試動物植物等	投与方法・処理量	結果	試験場所 (報告年)	頁
IX-4 (M-4)*	動物体内運命に関する試験 ラット体内における代謝試験(排泄、分布及び代謝)	SD系ラット	低用量経口1回 標識 雌 0.5, 1.0, 2.0, 3.0mg/kg 標識 雌 2.0mg/kg	投与後7日間での排泄率 標識 94~99% 尿65~77%、糞23~32% 投与3日間で大部分排泄 標識 88% 尿 72%、糞 16% 主要分布臓器(標識) 肝臓、肺、腎臓 主要代謝物	日産化学工業(株) 東京農業大学 (1980)	IX-19
IX-5 (M-5)*	植物体内運命に関する試験 大豆における代謝試験(吸収、移行、代謝)	大豆	標識 標識 50μg/葉	処理後1日目で処理葉に54%、他部位に0.01~0.06%検出、他部位への移行は少ない EPNの半減期は1日以内 主要代謝物は	日産化学工業(株) 東京農業大学 (1980)	IX-25
IX-6 (M-6)*	植物体内運命に関する試験 大豆における代謝試験	大豆	標識 標識 根部処理法 茎注入法 (約20μg相当量)	は主に処理部位で検出 標識の代謝物は主に葉に存在、 主要代謝物 標識の代謝物は主に処理部位に存在、主要代謝物	日産化学工業(株) 東京農業大学 (1980)	IX-29
IX-11 (M-7)*	植物体内運命に関する試験 水稻における代謝試験	水稻	標識 散布処理 67.5g a.i./10a	処理45日後の玄米及び稲わら中のEPN換算残留放射能濃度はそれぞれ2.5ppm及び36ppm	日産化学工業(株) (2001)	IX-32
			標識 葉面塗布 4.5μg/葉, 5葉/ポット	葉面塗布されたEPNは経時的に減少し、処理28日後で処理放射能の2.7%残存 主要分解物として		

【代謝分解試験一覧表】(続き)

資料No.	試験の種類	供試動植物等	投与方法・処理量	結果	試験場所 (報告年)	頁
IX-12 GLP (M-8)*	植物体内運命に関する試験 ネギにおける代謝試験	ネギ	標識 葉面塗布 67.5g a.i./10a	処理30日後のEPN換算残留放射能濃度は3.0ppm EPN換算比率及び濃度	日産化学工業(株) (2001)	IX-42
IX-7	土壤中運命に関する試験 好氣的湛水及び好氣的土壤中運命試験	火山灰土 洪積土 沖積土	1ppm 畑条件 湛水条件 滅菌湛水条件	半減期 畑条件 30~90日 湛水条件 3~15日 分解物:	日産化学工業(株) 東京農業大学 (1982)	IX-49
IX-14 GLP	水中運命に関する試験 加水分解運命試験	滅菌緩衝液 pH4 pH 7 pH 9	標識/ 標識 0.5ppm 25℃、暗所	半減期 pH4: 試験期間中安定 pH7: 38.7日 pH9: 3.6日 主要分解物	日産化学工業(株) (2003)	IX-57
IX-10 参考 資料	加水分解試験	滅菌緩衝液 pH4 pH 7 pH 9	0.5ppm 25℃、暗所	酸性下安定、アルカリ性下分解 半減期 pH7=22.1日 pH9=3.5日 pH4推定半減期=70.7日	日産化学工業(株) (1992)	IX-62
IX-13 GLP	水中運命に関する試験 水中光分解運命試験	滅菌蒸留水 滅菌河川水	標識/ 標識 0.5ppm、25℃ キノンランプ 700W/m ² (300-800nm)	半減期(太陽光換算値) 滅菌蒸留水: 1.1日(7.6日) 滅菌河川水: 1.0日(7.2日) 主要分解物	日産化学工業(株) (2003)	IX-64
IX-9 参考 資料	水中光分解試験	滅菌蒸留水 河川水	非標識体、0.5ppm 15-25℃ キノンランプ 48-51W/m ² (310-400nm) 0, 6, 12, 24時間	照射区半減期 滅菌蒸留水: 12.6時間 河川水: 11.2時間	日産化学工業(株) (1992)	IX-70
IX-8	土壌吸着性試験	軽埴土 シルト質埴土 砂質埴土 軽埴土	土壌吸着試験 4段階濃度 (0.3, 0.15, 0.1, 0.075 ppm)	K: 121-4698 Koc: 15954-460609 非移動性	(財)日本食品分析 センター (1990)	IX-72
IX-15	生物濃縮性試験	コイ	非標識体 試験水濃度: 10及び1.0 µg/L	取込期間: 週間、排泄期間: 7日間 濃縮係数: 10 µg/L 試験区; 659-1590 (平均 1232) 1.0 µg/L 試験区; 358-1520 (平均 975) 生物濃縮判断: 濃縮性あり (但し速やかな排泄により蓄積性なし)	(財)化学品検査協 会 (1983年)	IX-74

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

代謝分解物一覧表

記号	由来	略称	化学名 (IUPAC)	構造式
A	親化合物	EPN	<i>O</i> -ethyl <i>O</i> -4-nitrophenyl phenylphosphonothioate <i>O</i> -エチル= <i>O</i> -4-ニトロフェニル=フェニ ルホスホノチオアート	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

EPNの代謝・分解試験に使用した標識化合物について

1. 標識化合物

2. 標識位置設定理由

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

1. 動物体内運命に関する試験

(1)ラットにおける吸収、分布、代謝及び排泄試験

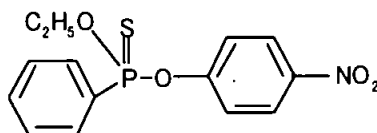
資料 No. IX - 1

試験機関 Hazleton Laboratories Europe Ltd.

[GLP対応]

報告書作成年 1986年

供試標識化合物 : 標識EPN



比放射能:

放射化学的純度:

化学名 ; *O*-ethyl *O*-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate

供試動物 : Crl:CD (SD) BR系雌雄ラット

6~9週齢、体重150~250g (入荷時)

方法 : 投与及び投与量

検体をコーン油に溶解し、下記の条件で強制経口投与した。

投与群	性別	動物数	投与量
低用量単回投与 (A群)	雄	5	0.8mg/kg
	雌	5	0.3mg/kg
低用量反復投与 ^{注)} (B群)	雄	5	0.8mg/kg
	雌	5	0.3mg/kg
高用量単回投与 (C群)	雄	5	30mg/kg
	雌	5	15mg/kg

注) 非標識EPNを雄0.8mg/kg又は雌0.3mg/kgの割合で14日間反復経口投与後、
15日目に 標識EPNを投与した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

試験項目：

1) 排泄試験

投与後、各動物の尿、糞及び呼気をそれぞれ採取し、放射能を測定した。糞中放射能はメタノール抽出液と残渣に分けてそれぞれ測定した。

2) 薬物動態学試験

投与後、尾静脈より経時的に血液を採取し血中放射能を測定した。

3) 組織内分布試験

投与した放射能の90%が排泄された時点、または168時間後に血液、骨髄、骨、脳、屍体、脂肪、性腺、心臓、腎臓、肺、肝臓、骨格筋、脾臓、子宮を採取し組織内放射能濃度を測定した。

4) 代謝試験

投与群、性毎に尿あるいは糞を合わせTLCによる代謝物分析を行った。放射能の検出にはラジオアナライザーを使用した。

結果：

1) 排泄試験

各投与群における尿、糞及びケージ洗浄液中放射能の投与量に対する比率を表1-1及び表1-2に示した。低用量単回投与群では投与後48時間までに投与放射能の大部分が、また144時間までには93%以上が尿及び糞中へ排泄された。低用量反復投与群の尿中排泄率は低用量単回投与群に比べ若干増加傾向が認められた。また、呼気への排泄は認められなかった。

表1-1 雄ラットにおける尿糞中排泄率 (投与量に対する%、5匹の平均値)

投与後の時間	低用量単回投与群				低用量反復投与群				高用量単回投与群			
	尿	糞	洗浄	合計	尿	糞	洗浄	合計	尿	糞	洗浄	合計
0-12	22.32	8.69	8.67	39.68	36.75	11.7	7.66	56.11	18.30	4.31	6.21	28.82
12-24	14.80	14.37	1.72	30.89	11.80	7.63	3.29	22.72	7.58	14.25	3.18	25.01
24-48	8.38	6.11	0.28	14.77	7.07	5.28	0.42	12.77	12.66	10.57	2.23	25.46
48-72	3.41	0.98	0.13	4.52	2.32	0.57	0.15	3.04	2.54	3.85	0.54	6.93
72-96	1.22	0.3	0.12	1.64	1.07	0.38	0.41	1.86	0.79	0.74	0.20	1.73
96-120	0.85	0.13	0.53	1.51	-	-	-	-	0.50	0.65	0.17	1.32
120-144	-	-	-	-	-	-	-	-	0.18	0.15	0.06	0.39
144-168	-	-	-	-	-	-	-	-	0.14	0.08	0.59	0.81
合計	50.98	30.58	11.45	93.01	59.01	25.56	11.93	96.50	42.69	34.60	13.18	90.47

- : 測定せず

表 1-2 雌ラットにおける尿糞中排泄率 (投与量に対する%、5匹の平均値)

投与後の 時間	低用量単回投与群				低用量反復投与群				高用量単回投与群			
	尿	糞	洗浄	合計	尿	糞	洗浄	合計	尿	糞	洗浄	合計
0-12	21.05	17.26	9.66	47.97	43.12	3.50	7.08	53.7	10.83	12.78	6.01	29.62
12-24	8.81	11.73	2.09	22.63	11.60	6.72	2.94	21.26	7.81	17.16	2.27	27.24
24-48	6.44	5.27	1.01	12.72	9.49	5.41	0.88	15.78	8.62	11.30	1.14	21.06
48-72	2.63	2.3	0.47	5.4	2.52	1.58	0.51	4.61	1.58	2.72	0.35	4.65
72-96	1.49	0.32	0.21	2.02	1.25	0.27	0.55	2.07	1.48	1.06	0.45	2.99
96-120	1.06	0.14	0.24	1.44	-	-	-	-	0.73	0.72	0.20	1.65
120-144	0.68	0.30	2.32	3.3	-	-	-	-	0.38	0.13	0.08	0.59
144-168	-	-	-	-	-	-	-	-	0.25	0.11	1.93	2.29
合計	42.16	37.32	16.00	94.48	67.98	17.48	11.96	97.42	31.48	45.98	12.43	89.89

- : 測定せず

2) 薬物動態学試験

各投与群における血中濃度の推移を表2に、薬物動態学的パラメータを表3に示した。
 低用量単回投与群では、投与後12時間に最高値(雄0.322 μ g/g、雌0.088 μ g/g)に達したのち減少し168時間後には雄0.003 μ g/g、雌0.001 μ g/gまで低下した。
 高用量単回投与群では、投与後6時間に最高値(雄1.939 μ g/g、雌1.278 μ g/g)に達したのち減少し168時間後には雄0.190 μ g/g、雌0.375 μ g/gに低下した。

表 2 血中濃度の推移 (μ g EPN 換算/g、5匹の平均値)

時間	雄		雌	
	低用量単回投与群	高用量単回投与群	低用量単回投与群	高用量単回投与群
投与前	ND	ND	0.001	ND
0.25	0.009	0.931	0.004	0.296
0.50	0.013	0.944	0.006	0.608
1.00	0.023	1.052	0.005	0.762
3.00	0.113	1.324	0.013	1.055
6.00	0.254	1.939	0.030	1.278
12.00	0.322	1.711	0.088	1.043
24.00	0.132	1.487	0.064	1.102
48.00	0.040	1.320	0.026	0.924
72.00	0.014	0.923	0.017	0.609
96.00	0.009	0.841	0.007	0.442
168.00	0.003	0.190	0.001	0.375

ND : 検出されず

表 4 組織内濃度

(μg EPN 換算/g、5 匹の平均値)

臓器	低用量単回投与群		低用量反復投与群		高用量単回投与群	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	120hr*	144hr*	96hr*	96hr*	168hr*	168hr*
全血	0.004 (-)	0.001 (-)	0.012 (-)	0.004 (-)	0.089 (-)	0.109 (-)
骨髓	ND (-)	ND (-)	ND (-)	ND (-)	ND (-)	ND (-)
骨	0.002 (-)	ND (-)	0.003 (-)	0.001 (-)	0.047 (-)	0.029 (-)
脳	0.001 (0.001)	ND (ND)	0.002 (0.002)	ND (ND)	0.110 (0.004)	0.070 (0.005)
屍体	0.002 (0.246)	0.001 (0.354)	0.006 (0.656)	0.002 (0.643)	0.234 (0.805)	0.147 (0.902)
脂肪	0.008 (-)	0.001 (-)	0.015 (-)	0.003 (-)	0.164 (-)	0.205 (-)
性腺	0.003 (0.004)	ND (ND)	0.005 (0.007)	0.001 (ND)	0.283 (0.014)	0.070 (0.001)
心臓	0.004 (0.002)	ND (0.001)	0.008 (0.004)	0.002 (0.002)	0.082 (0.001)	0.074 (0.002)
腎臓	0.024 (0.028)	0.006 (0.016)	0.059 (0.051)	0.013 (0.033)	0.407 (0.013)	0.339 (0.017)
肺	0.258 (0.180)	0.058 (0.105)	0.124 (0.077)	0.068 (0.116)	0.405 (0.009)	0.502 (0.019)
肝臓	0.460 (3.092)	0.164 (2.359)	0.555 (1.983)	0.341 (3.307)	1.418 (0.214)	1.504 (0.362)
骨格筋	0.001 (-)	ND (-)	0.002 (-)	0.001 (ND)	0.023 (-)	0.028 (-)
脾臓	0.002 (0.001)	ND (ND)	0.005 (0.001)	0.001 (0.001)	0.061 (ND)	0.046 (0.001)
子宮	/	0.001 (0.002)	/	0.003 (0.006)	/	0.088 (0.004)

* : 投与後経過時間

ND : 検出されず

() : 投与量に対する分布率%

申請者注) : 投与量に対する分布率は、申請者がラットの体重に占める各臓器の重量比(文献値)を調べて計算した。計算に用いたラットの体重は、各時間毎の屠殺時の平均体重を用いた。

- : ラットの体重に占める各臓器の重量比が不明のため計算せず。

(2)ラットにおける吸収、分布、排泄及び胆汁排泄試験

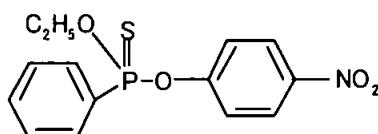
資料 No. IX - 2

試験機関 Hazleton UK

[GLP対応]

報告書作成年 1988年

供試標識化合物 : 標識EPN



比放射能 ;

放射化学的純度 ;

化学名 ; *O*-ethyl *O*-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate

供試動物 : Crl:CD (SD) BR系ラット

6~9週齢、体重135~225g (入荷時)

方法 : 投与及び投与量

検体をコーン油に溶解し、下記の条件で強制経口投与した。

	投与群	性別	動物数	投与量
排泄試験	低用量単回投与 (A群)	雄	5	0.3mg/kg
	低用量反復投与 ^{注)} (B群)	雄	5	0.3mg/kg
	高用量単回投与 (C群)	雄	5	15mg/kg
胆汁排泄試験	低用量単回投与	雌雄	7	0.3mg/kg

注) 非標識EPNを雄0.3mg/kgの割合で14日間反復経口投与後、15日目に標識EPNを投与した。

申請者注) 雄は雌に比べて毒性が弱く、予備試験の結果からは15mg/kgにおいても赤血球コリンエステラーゼ活性の低下は認められていない。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

試験項目：

1) 排泄試験

投与後、各動物の尿・糞・呼気をそれぞれ採取し、放射能を測定した。

2) 組織内分布試験

投与した放射能の90%以上排泄された時点又は168時間後に血液、骨髓、骨、脳、屍体、脂肪、性腺、心臓、腎臓、肺、肝臓、筋肉、脾臓を採取し組織内放射能濃度を測定した。

3) 胆汁排泄試験

ラットをペントバルビトンナトリウムで麻酔し、腹部を開腹した後、胆管カニュレーション術を施した。投与後、次の間隔で胆汁、尿及び糞を採取し、放射能を測定した。

胆汁： 0-1、1-2、2-4、4-8及び8-24時間

尿： 0-12及び12-24時間

糞： 0-24時間

結果： 1) 排泄試験

表1 尿糞中排泄率 (投与量に対する%)

処理後 時間	低用量単回投与群				低用量反復投与群				高用量単回投与群			
	尿	糞	洗浄	合計	尿	糞	洗浄	合計	尿	糞	洗浄	合計
0-12	19.49	6.54	13.09	39.12	35.62	7.13	9.58	52.33	30.21	8.98	7.52	46.71
12-24	14.95	6.01	2.65	23.61	13.31	3.05	1.49	17.85	12.85	16.22	4.41	33.48
24-48	9.56	7.66	1.37	18.59	9.12	8.04	1.33	18.49	2.90	8.24	0.60	11.74
48-72	1.98	1.82	0.61	4.41	2.80	2.49	0.40	5.69	0.85	0.56	0.10	1.51
72-96	1.30	0.32	0.25	1.87	1.19	0.46	0.48	2.13	0.40	0.24	1.35	1.99
96-120	0.96	0.11	0.29	1.36	-	-	-	-	-	-	-	-
120-144	0.70	0.12	0.14	0.96	-	-	-	-	-	-	-	-
144-168	0.49	1.22	1.15	2.86	-	-	-	-	-	-	-	-
合計	49.43	23.80	19.56	92.79	62.04	21.17	13.28	96.49	47.21	34.24	13.98	95.43

- : 測定せず

各投与群における尿、糞及びケージ洗浄液中放射能の投与量に対する比率を表1に示した。いずれの投与群においても48時間以内に投与放射能の大部分が排泄された。尿及び糞中への排泄比率は前試験（資料No.IX-1）の結果と類似していた。また、呼気中への排泄は認められなかった。

2) 組織内分布試験

表 2 組織内濃度 (µg EPN 換算/g、5 匹の平均値)

組織	低用量単回投与群	低用量反復投与群	高用量単回投与群
	168hr*	96hr*	96hr*
血液	<0.001 (-)	0.004 (-)	0.144 (-)
骨髄	0.060 (-)	0.142 (-)	ND (-)
骨	0.001 (-)	0.002 (-)	ND (-)
脳	0.001 (<0.01)	<0.001 (<0.01)	0.073 (<0.01)
屍体	ND (ND)	0.002 (0.61)	0.054 (0.30)
脂肪	0.008 (-)	0.004 (-)	0.409 (-)
生殖腺	0.001 (<0.01)	0.002 (0.01)	0.178 (0.01)
心臓	0.001 (<0.01)	0.002 (<0.01)	0.099 (<0.01)
腎臓	0.004 (0.01)	0.011 (0.02)	0.689 (0.03)
肺	0.040 (0.06)	0.095 (0.14)	0.942 (0.03)
肝臓	0.087 (0.96)	0.279 (2.31)	2.473 (0.46)
筋肉	0.001 (-)	0.001 (-)	0.022 (-)
脾臓	0.001 (<0.01)	0.001 (<0.01)	0.070 (<0.01)

* : 投与後経過時間

ND : 検出されず

- : データなし

() : 投与量に対する分布率%

各投与群における組織内濃度と投与量に対する比率を表2に示した。

低用量単回群及び低用量反復投与群における組織残留の傾向は類似していた。各組織濃度は低かったが、肝臓、肺及び骨髄に有意な濃度が認められた。高用量群では投与量に対する割合では低い傾向が認められたが、濃度としては低用量群に比べ高かった。

3) 胆汁排泄試験

表3 胆汁中排泄率及び速度 (5匹の平均値)

投与後時間	排泄率 (投与量に対する%)		排泄速度 (%投与量/時間)	
	雄	雌	雄	雌
0 - 1	0.02	0.02	0.02	0.02
1 - 2	0.02	0.03	0.02	0.03
2 - 4	0.07	0.10	0.04	0.05
4 - 8	0.36	0.34	0.09	0.09
8 - 24	1.40	1.77	0.09	0.11
合計	1.87	2.26		

①0.3mg/kg投与後の胆汁中排泄率及び速度を表3に示した。
胆汁中排泄量は極めて少なく、投与放射能の約2%程度に過ぎなかった。

表4 投与24時間後の排泄率 (投与量に対する%)

試料	雄	雌
胆汁	1.87	2.26
尿	13.90	6.67
糞 ^(注)	19.44	12.58
ケージ洗浄	2.55	2.72
合計	37.76	24.23

注) 申請者が糞のメタノール抽出、残渣及びケージ残渣中放射能を合計した。

②投与後24時間目の胆汁、尿、糞、ケージ洗浄液中の放射能の投与量に対する比率を表4に示した。

消化管及び屍体中の放射能を測定しなかったため、この胆汁排泄試験から吸収率の推定はできなかった。

申請者注) 胆汁中排泄率が非常に少ないため、吸収率は尿中排泄率とほぼ同様であると考えられた。そこで申請者は、資料No. IX - 1及び資料No. IX-2の排泄試験の尿中排泄率とケージ洗浄液中比率(尿中放射能に由来と推定)を合計して吸収率を推定した。表5に推定吸収率を示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

表5 吸収率の推定 (投与量に対する%, 5匹の平均値)

投与群			尿	ケージ洗浄	合計	推定吸収率
雄	低用量単回	0.8mg/kg	50.97	11.45	62.42	>62
	低用量反復	0.8mg/kg	59.01	11.76	70.77	>71
	高用量単回	30mg/kg	42.69	13.19	55.88	>56
	低用量単回	0.3mg/kg	49.43	19.56	68.99	>69
	低用量反復	0.3mg/kg	62.04	13.28	75.32	>75
	高用量単回	15mg/kg	47.21	13.98	61.19	>61
雌	低用量単回	0.3mg/kg	42.17	15.99	58.16	>58
	低用量反復	0.3mg/kg	67.98	11.96	79.94	>80
	高用量単回	15mg/kg	31.66	12.43	44.09	>44

吸収率は、低用量単回投与群で約60～70%、低用量反復投与群で約70～80%、高用量単回投与群で約45～60%であると推定された。