

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

2) マウスを用いた飼料混入投与による2年間反復経口投与毒性/発癌性併合試験

(資料 No. 15)

検体の純度： アシユラム-Na

供試動物：Charles River CD-1 マウス、投与開始時 約6週齢、投与開始時の体重範囲 雄；
21～26 g、雌；16～22 g、1群雌雄各75匹、12カ月間投与後に各群雌雄各10
匹を中間屠殺

投与期間：2年間（1989年1月から1991年1月）

投与方法：飼料中における検体の有効成分濃度が0(対照)、500、5000及び50000 ppmと
なるように検体を飼料に混入し、2年間の投与期間を通して自由に摂取させた。
検体混入飼料の調製を毎週行った。

観察・検査項目及び結果：

死亡率；供試動物の生死及び瀕死状態について平日には1日3回、また、週末及び休
日にあつては1日2回観察した。

投与期間における死亡率を次表に示す。

投与期間における死亡率 (%)

性	雄				雌			
	0	500	5000	50000	0	500	5000	50000
投与量(ppm)								
第6週まで								
第53週まで								
第105週まで ¹⁾								

¹⁾：第53週に中間屠殺した各群雌雄各10匹を死亡動物として計算した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

雌雄ともに最初の第 53 週時までの死亡率が 50000 ppm 投与群でわずかに上昇した。その主原因は 50000 ppm 投与群の飼料が給餌器中で凝縮して摂取困難になっていたため、特に投与開始 3～5 週の雄において顕著であった。この事実気付いた 5 週以降からはからは摂餌可能かどうかを常にチェックした。第 53 週以降における各投与群の死亡率は、雌雄ともに対照群と、また、本系統の加齢マウスで認められる死亡率と概ね同等であった。

一般状態；供試動物の中毒症状等を毎日、即ち、生死及び瀕死状態の確認時に観察し、触診等を含む詳細な一般状態の観察を少なくとも 1 週間に 1 回実施した。

雌雄ともに 5000 ppm 及び 50000 ppm 投与群で、第 53～65 週及び第 66～78 週に「皮膚の変色」の発生頻度が高かったが、この期間だけの高値であることから検体投与とは関連しないと考えられた。その他には特記すべき一般状態の変化は認められなかった。

体重；全生存動物を対象として、群分け時及び投与開始前にそれぞれ 1 回、投与開始後の最初の 16 週間には 1 週間に 1 回、その後の投与期間には 4 週間に 1 回体重を測定した。

代表的な投与時期における体重を次表に示す。50000 ppm 投与群の雌雄ともに概ね全測定時期を通して統計学的に有意に低い体重が認められ、検体投与による影響と考えられた。但し、雌においては雄の場合より統計学的に有意に低い体重が認められた頻度が幾分少なかった。500 ppm 投与群では第 60 週に、5000 ppm 投与群では投与開始 1 週間前に統計学的に有意な変動 ($p \leq 0.05$ 又は 0.01) が認められたが、この 2 群の有意差は投与用量との関連性の無い変化で、検体投与による影響とは考えられなかった。

体重 (対照群を 100 とした場合の値)

週	雄			雌		
	500 ppm	5000	50000	500 ppm	5000	50000
第 4 週						
第 8 週						
第 12 週						
第 24 週						
第 52 週						
第 76 週						
第 104 週						

注) * : $p < 0.05$ (Student t 検定法)
空欄 : 統計学的有意差なし。

** : $p < 0.01$ (Student t 検定法)
() : 参考データ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

摂餌量;全生存動物を対象として、投与期間の最初の16週間には1週間に1回、また、その後の投与期間には4週間に1回摂餌量を測定し、1日1匹当たりの摂取量 (g/animal/day) 及び1日体重1kg当たりの摂取量 (g/kg/day) を算出して検討した。

代表的な投与時期における摂餌量を次表に示す。50000 ppm 投与群の雌雄で概ね全測定時期を通して摂餌量の増加が認められ、検体投与による影響と考えられた。この変化は「1匹当たりの摂餌量 (g/animal/day)」ではあまり顕著ではなかったが、「体重1kg当たりの摂取量 (g/kg/day)」の場合には顕著となった。<申請者注: 飼料が給餌器中で凝縮して摂取困難になっていたことを考えると多量のこぼし等が考えられ、検体投与によるとすべきではないと考えられる。>また、その他の投与群でも統計学的に有意な変化が認められたが、用量相関性がないため、検体投与とは関連性のない変化と考えられた。

1日1匹当たりの摂餌量 (g/animal/day) (対照群を100とした場合の値)

週	雄			雌		
	500 ppm	5000	50000	500 ppm	5000	50000
第4週						
第8週						
第12週						
第24週						
第52週						
第76週						
第104週						

注) *: p < 0.05 (Student t 検定法) **: p < 0.01 (Student t 検定法)
空欄: 統計学的有意差なし。 (): 参考データ

1日体重1kg当たりの摂取量 (g/kg/day) (対照群を100とした場合の値)

週	雄			雌		
	500 ppm	5000	50000	500 ppm	5000	50000
第4週						
第8週						
第12週						
第24週						
第52週						
第76週						
第104週						

注) *: p < 0.05 (Student t 検定法) **: p < 0.01 (Student t 検定法)
空欄: 統計学的有意差なし。 (): 参考データ

食餌効率;全生存動物を対象として、投与期間の最初の14週間における各週の食餌効率を次式に従って算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

$$\text{食餌効率} = \frac{\text{体重増加量 (g)}}{\text{摂餌量 (g)}} \times 100$$

いずれの投与群の雌雄においても測定時期による変動が著しく、検体投与によると考えられる明らかな変化は認められなかった。

検体摂取量；測定した摂餌量、体重及び飼料中の検体濃度（設定濃度）から検体摂取量（mg/kg/day）を算出した。

投与期間における平均検体摂取量は次表のとおりである。

投与用量 (ppm)		500	5000	50000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	74	730	8040
	雌	95	938	10353

血液学的検査；血液学的検査のための対象動物の振り分けを次表に示す。なお、採血前に飼料及び飲水の摂取を制限することはなかった。

血液学的検査のための対象動物の振り分け（検査用、予備）

検査時期 (カ月)	対象動物	雄			雌		
		500 ppm	5000 ppm	50000 ppm	500 ppm	5000 ppm	50000 ppm
6	検査用動物	10	10	10	10	10	10
	予備動物	5	5	5	5	5	5
12	検査用動物	10	10	10	10	10	10
	予備動物	5	5	5	5	5	5
(12)	中間屠殺	10	10	10	10	10	10
18	検査用動物	10	10	10	10	10	10
	予備動物	5	5	5	5	5	5
24	検査用動物	10	10	10	10	10	10
	予備動物*	5	5	5	5	5	5

*検査対象数が不足したため、24カ月の検査対象動物数が10匹になるように予備動物から追加。

血液学的検査項目は次のとおりである。

白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (HGB)、ヘマトクリット (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数 (PLT)、及び白血球分画

統計学的有意差が認められた血液学的検査結果を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

血液学的検査結果

(対照群を 100 とした場合の値)

検査項目	検査時期	雄			雌		
		500 ppm	5000	50000	500 ppm	5000	50000
WBC	6 カ月						
	12						
	(12)						
	18						
RBC	6 カ月						
	12						
	(12)						
	18						
HGB	6 カ月	統計学的有意差なし					
	12	統計学的有意差なし					
	(12)	統計学的有意差なし					
	18	統計学的有意差なし					
HCT	6 カ月	統計学的有意差なし					
	12	統計学的有意差なし					
	(12)	統計学的有意差なし					
	18	統計学的有意差なし					
MCV	6 カ月	統計学的有意差なし					
	12	統計学的有意差なし					
	(12)	統計学的有意差なし					
	18	統計学的有意差なし					
MCH	6 カ月	統計学的有意差なし					
	12	統計学的有意差なし					
	(12)	統計学的有意差なし					
	18	統計学的有意差なし					
MCHC	6 カ月	統計学的有意差なし					
	12	統計学的有意差なし					
	(12)	統計学的有意差なし					
	18	統計学的有意差なし					
PLT	6 カ月	統計学的有意差なし					
	12	統計学的有意差なし					
	(12)	統計学的有意差なし					
	18	統計学的有意差なし					
分葉好中球	6 カ月	統計学的有意差なし					
	12	統計学的有意差なし					
	(12)	統計学的有意差なし					
	18	統計学的有意差なし					
リンパ球	6 カ月			189*			
	12						
	18						
	24						

注) *: p < 0.05 (Student t 検定法) **: p < 0.01 (Student t 検定法)
 (): 12 カ月時の中間屠殺動物のデータ 空欄: 統計学的有意差なし。

50000 ppm 投与群の雌雄で赤血球数 (RBC) 及びヘマトクリット (HCT) の減少が認められ、その結果、平均赤血球血色素量 (MCH) 及び平均赤血球血色素濃度 (MCHC) が上昇し、検体投与の影響と考えられた。また、5000 ppm 投与群の雄で MCHC が上昇し、検体投与による影響が示唆されたが、わずかな変動であり、他の血液学的検査項目との連動もみられず、検体投与とは関係しないと考えた (申請者の判断)。その他にも統計学的に有意な変動が認められたが、いずれも一時的に認められた変化であることから、検体投与とは関連しないと考えられた。

肉眼的病理検査 ; 第 12 カ月及び投与期間終了後の計画屠殺動物、並びに投与期間における切迫屠殺動物及び途中死亡動物の全てを対象として剖検を行い、肉眼的に認めた異常を記録した。なお、計画屠殺及び切迫屠殺には二酸化炭素により安楽

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

死した。

第 12 カ月時まで死亡した動物及び第 12 カ月時の中間屠殺動物には検体投与との関連性を示す病変は全く認められなかった。

第 12 カ月時以降に死亡した動物及び最終屠殺動物では腎臓の嚢胞の発生頻度が雄で上昇し、0, 500, 5000, 50000ppm 投与群で、それぞれ 6/63, 7/63, 10/59, 15/58 であった。しかしながら、本病変の発生頻度の上昇は雌では認められなかった (0, 500, 5000, 50000ppm 投与群で 3/62, 3/60, 2/62, 2/59)。また、腎嚢胞は加齢マウスにおいては一般的に認められる病変であることから、本試験で認められた雄の腎嚢胞の発生頻度の上昇は、供試された雄の偶発的な変動に由来したものと考えられる。

その他には検体投与との関連性を示す病変は全く認められなかった。

腎嚢胞の発生頻度を次表に示す。

肉眼的に認められた腎嚢胞の発生頻度

性	所見	0 ppm (対照)			500 ppm			5000 ppm			50000 ppm		
		死亡	屠殺	合計	死亡	屠殺	合計	死亡	屠殺	合計	死亡	屠殺	合計
12 カ月時までの死亡動物及び 12 カ月時の中間屠殺動物 (雌雄ともに腎嚢胞の発生例なし)													
12 カ月時～最終屠殺の死亡動物及び最終屠殺動物													
雄	検査数												
	腎嚢胞												
雌	検査数												
	腎嚢胞												

注) 統計学的有意差検定は申請者による。

*: $p < 0.05$ (χ^2 検定法)

臓器重量 ; 第 12 カ月時及び投与期間終了時の全計画屠殺動物を対象として、剖検時に次の臓器を摘出して重量を測定し、最終体重及び脳重量を用いて臓器重量対体重比及び臓器重量対脳重量比を算出した。

脳、腎臓、肝臓 (胆嚢を含む)、脾臓及び精巣

統計学的有意差が認められた臓器重量検査項目の概要を次表に示す。第 12 カ月時の中間屠殺動物では、50000 ppm 投与群の雄で脾臓重量の全ての指標に、また、雌では対体重比に高値が認められ、脾臓の重量増加が示された。第 24 カ月時の最終屠殺動物では、脾臓重量の検査項目に雌雄ともに統計学的に有意な変動は認められなかった。なお、第 24 カ月時の最終屠殺動物の雌で脳重量の指標に統計学的に有意な変動が認められたが、用量相関性がなく、検体投与とは関連しないと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

臓器重量検査結果

(対照群を 100 とした場合の値)

検査項目		雄			雌		
		500 ppm	5000	50000	500 ppm	5000	50000
第 12 カ月時中間屠殺動物							
脾臓	絶対重量						
	対体重比						
	対脳重量比						
第 24 カ月時最終屠殺動物							
脳	絶対重量						
	対体重比						
脾臓	絶対重量						
	対体重比						
	対脳重量比						

注) * : p < 0.05 (Student t 検定法)

** : p < 0.01 (Student t 検定法)

空欄 : 統計学的有意差なし。

() : 参考データ

病理組織学的検査；全動物を対象として剖検時に種々の臓器及び組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて固定した。但し、眼球／視神経の場合はグルタルアルデヒド固定液で固定し、10%中性緩衝ホルマリン液中で保存した。また、肺及び膀胱の場合には固定液を注入して拡張状態で固定した。常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、顕微鏡検査に供した。なお、アミロイド症の確認のために、第 53 週の屠殺動物の切片の一部をコンゴレッド染色し、アミロイドを確認した。病理組織学的検査を行った臓器及び組織の種類は次のとおりである。

副腎、大動脈、骨及び骨髄（大腿骨）、脳（前脳、中脳、後脳）、眼球及び視神経、胆嚢、食道、前胃、腺胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、卵巣、精巣（精巣上体を含む）、心臓、腎臓、肝臓、肺（主要気管支を含む）、リンパ節（縦隔膜、腸間膜、腫瘍の周辺）、乳腺領域（雌のみ）、膵臓、下垂体、前立腺、精嚢、唾液腺（顎下腺、下顎リンパ節を含む）、坐骨神経、骨格筋（大腿部）、皮膚、脊髄（頸部、胸部、腰部）、脾臓、胸腺（又は胸腺領域）、舌、気管、膀胱、子宮、腫瘍及び肉眼的病変部位

なお、病理組織学的検査の対象とした動物を雌雄別に、また、群別に次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

病理組織学的検査対象試験群

臓器名／組織名	中間屠殺動物		最終屠殺動物		死亡／切迫屠殺動物	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
肺、肝臓、腎臓、肉眼的病変部位	全群	全群	全群	全群	全群	全群
脾臓	500 ppm 投与群を除く全群	全群	全群	全群	全群	全群
膵臓、胃	対照群と 50000 ppm 投与群	全群	対照群と 50000 ppm 投与群	全群	全群	全群
その他の臓器及び組織	対照群と 50000 ppm 投与群		対照群と 50000 ppm 投与群		全群	全群

病理組織学的所見の発生率に関する統計学的有意差検定；申請者は χ^2 検定法により改めて統計学的有意差検定を行った。但し、用量の増加に伴って低下する発生率および肉眼的異常所見が見られた動物の臓器／組織については検定を行わなかった。

非腫瘍性病変；主要な非腫瘍性病変の発生頻度を次表に示す。全群を検査対象とした肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃及び膵臓において認められた病変のうち、取りまとめた標本群（死亡／切迫屠殺、中間屠殺及び最終屠殺）ごとに統計学的有意差（注：申請者実施）の認められた病変を記載した。

「中間屠殺動物」においては、50000 ppm 投与群の雌雄で褐色色素沈着が肝臓、脾臓、腎臓等で認められ、検体投与による影響と考えられた。胃底腺の拡張、胃の粘液腺上皮細胞過形成、気管支周囲のリンパ球性亜急性炎症等が認められたが、用量相関性のない変化であった。

「死亡／切迫屠殺動物」においては、脾臓の褐色色素沈着が 50000 ppm 投与群の雌で有意に増加した。甲状腺ろ胞の肥大／過形成及び肝細胞空胞変性がいずれも 50000 ppm 投与群の雌で、また、肺の血管周囲の浮腫が同群の雄で有意に増加したが、「最終屠殺動物」ではこのような増加が認められないので偶発的な変化と考えられた。その他にも統計学的に有意な変動が認められたが、明らかな用量相関性の認められない変化であった。

「最終屠殺動物」においては、腺胃粘膜上皮過形成が 50000 ppm 投与群の雄で有意に増加したが、その発生率は低く、偶発的な変化と考えられた。その他にも統計学的に有意な変動が認められたが、明らかな用量相関性がみられないか

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

又は片側性の変化で、検体投与によるものとは考えられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

主な非腫瘍性病変の発生頻度
(中間屠殺動物)

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
胃	(検査動物数)	(10)	(0)	(0)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
肝臓	(検査動物数)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
膵臓	(検査動物数)	(10)	(0)	(0)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
脾臓	(検査動物数)	(10)	(0)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
肺	(検査動物数)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
腎臓・左	(検査動物数)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)

注) *: $p < 0.05$ (χ^2 検定) **: $p < 0.01$ (χ^2 検定) ***: $p < 0.001$ (χ^2 検定)

(続<)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

主な非腫瘍性病変の発生頻度 (続き)

(死亡/切迫屠殺動物)

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
肝臓	(検査動物数)	(33)	(30)	(34)	(30)	(31)	(21)	(33)	(36)
脾臓	(検査動物数)	(33)	(30)	(33)	(30)	(31)	(21)	(33)	(36)
肺	(検査動物数)	(34)	(30)	(34)	(30)	(30)	(22)	(33)	(36)
子宮体	(検査動物数)	—	—	—	—	(31)	(22)	(33)	(36)
腎臓・右	(検査動物数)	(34)	(30)	(34)	(30)	(31)	(22)	(33)	(36)
腎臓・左	(検査動物数)	(34)	(30)	(34)	(30)	(31)	(22)	(33)	(36)
甲状腺	(検査動物数)	(34)	(30)	(32)	(29)	(30)	(22)	(32)	(35)
上皮小体	(検査動物数)	(28)	(28)	(27)	(23)	(28)	(19)	(29)	(28)

注) *: p<0.05 (χ^2 検定) **: p<0.01 (χ^2 検定) ***: p<0.001 (χ^2 検定) (続く)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

主な非腫瘍性病変の発生頻度（続き）

（最終屠殺動物）

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
胃	(検査動物数)	(28)	(6)	(4)	(28)	(30)	(38)	(29)	(21)
肝臓	(検査動物数)	(28)	(33)	(25)	(28)	(30)	(38)	(29)	(21)
肺	(検査動物数)	(28)	(33)	(25)	(28)	(30)	(38)	(29)	(21)
腎臓・右	(検査動物数)	(28)	(33)	(25)	(28)	(30)	(38)	(29)	(21)
腎臓・左	(検査動物数)	(28)	(33)	(25)	(28)	(30)	(38)	(29)	(21)

注) *: $p < 0.05$ (χ^2 検定) **: $p < 0.01$ (χ^2 検定) ***: $p < 0.001$ (χ^2 検定) (続く)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

主な非腫瘍性病変の発生頻度 (続き)

(全動物)

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
胃	(検査動物数)	(61)	(36)	(35)	(54)	(59)	(58)	(62)	(57)
肝臓	(検査動物数)	(61)	(63)	(59)	(58)	(61)	(59)	(62)	(57)
脾臓	(検査動物数)	(61)	(63)	(58)	(58)	(61)	(59)	(62)	(57)
肺	(検査動物数)	(62)	(63)	(59)	(58)	(60)	(60)	(62)	(57)
子宮体	(検査動物数)								

注) *: $p < 0.05$ (χ^2 検定) **: $p < 0.01$ (χ^2 検定) ***: $p < 0.001$ (χ^2 検定) (続く)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

主な非腫瘍性病変の発生頻度 (続き)
(全動物)

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
腎臓・右	(検査動物数)	(62)	(63)	(59)	(58)	(61)	(60)	(62)	(57)
腎臓・左	(検査動物数)	(62)	(63)	(59)	(58)	(61)	(60)	(62)	(57)
甲状腺	(検査動物数)	(62)	(30)	(32)	(57)	(60)	(22)	(32)	(56)
上皮小体	(検査動物数)	(53)	(28)	(27)	(51)	(58)	(19)	(29)	(48)

注) *: $p < 0.05$ (χ^2 検定) **: $p < 0.01$ (χ^2 検定) ***: $p < 0.001$ (χ^2 検定) (続く)
*左右独立して評価

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

腫瘍性病変：認められた腫瘍性病変を次表に示す。

50000 ppm 群では、雄の全動物において精巢の

発生頻度が統計学的に有意に増加した。さらに同群雌の全動物において子宮角部の平滑筋腫の発生頻度が統計学的に有意に増加した。なお、その他にも統計学的に有意な変動を示す腫瘍性病変が散見されたが、いずれも用量相関性がないか又は片側性の発生で、検体投与による影響とは考えられなかった。また、原発腫瘍数、担腫瘍動物数、良性腫瘍数及び悪性腫瘍数のいずれにも検体投与に関連した変化は認められなかった。したがって、検体投与により腫瘍性病変が増加することはないと考えられた。

腫瘍性病変の発生頻度

(中間屠殺動物)

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
	(検査動物数)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
	(検査動物数)	(10)	(0)	(0)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
	(検査動物数)	(10)	(0)	(0)	(10)	(10)	(0)	(0)	(10)

注) 良性腫瘍 (B) と悪性腫瘍 (M) への分類は、申請者の判断による。

(続く)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

腫瘍性病変の発生頻度 (続き)

(全動物)

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
胃	(検査動物数)								
空腸	(検査動物数)								
結腸	(検査動物数)								
腸間膜リンパ節	(検査動物数)								

注) 良性腫瘍 (B) と悪性腫瘍 (M) への分類は、申請者の判断による。

(続く)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

腫瘍性病変の発生頻度（続き）

（全動物）

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
肝臓	(検査動物数)								
膵臓	(検査動物数)								
顎下腺	(検査動物数)								
脾臓	(検査動物数)								
胸腺	(検査動物数)								
肺	(検査動物数)								
精巣 1*2	(検査動物数)								
精巣 2*2	(検査動物数)								

注) 良性腫瘍 (B) と悪性腫瘍 (M) への分類は、申請者の判断による。

報告書では統計学的に有意な値が必ずしも明らかでない。したがって、申請者が検定した。

*2: 左右どちらかを意味する。

*: $p < 0.05$ (χ^2 検定)

(続く)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

腫瘍性病変の発生頻度 (続き)

(全動物)

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
精巣 上体	(検査動物数)								
前立腺	(検査動物数)								
卵巣 1*2	(検査動物数)								
卵巣 2*2	(検査動物数)								
子宮 頸部	(検査動物数)								
子宮 体部	(検査動物数)								
子宮 角部 1*2	(検査動物数)								

注) 良性腫瘍 (B) と悪性腫瘍 (M) への分類は、申請者の判断による。
 報告書では統計学的に有意な値が必ずしも明らかでない。したがって、申請者が検定した。
 *2: 左右どちらかを意味する。

*: $p < 0.05$ (χ^2 検定)

(続く)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

腫瘍性病変の発生頻度（続き）

（全動物）

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
子宮角部 2*2	(検査動物数)								
膀胱	(検査動物数)								
前脳	(検査動物数)								
中脳	(検査動物数)								
後脳	(検査動物数)								
下垂体	(検査動物数)								
腎臓	(検査動物数)								
副腎 1*2	(検査動物数)								
副腎 2*2	(検査動物数)								
甲状腺	(検査動物数)								
皮膚	(検査動物数)	(61)	(30)	(34)	(58)	(61)	(21)	(34)	(56)

注) 良性腫瘍 (B) と悪性腫瘍 (M) への分類は、申請者の判断による。

報告書では統計学的に有意な値が必ずしも明らかでない。したがって、申請者が検定した。

*2: 左右どちらかを意味する。

*: $p < 0.05$ (χ^2 検定)

(続く)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

腫瘍性病変の発生頻度（続き）

（全動物）

臓器	所見	雄				雌			
		0 ppm	500	5000	50000	0 ppm	500	5000	50000
乳腺	(検査動物数)								
大腿骨	(検査動物数)								
全身	(検査動物数)								
皮膚その他	(検査動物数)								
検査動物数									
腫瘍数	良性								
	悪性								
腫瘍総数									
担腫瘍動物数									
担複数腫瘍動物数									

注) 良性腫瘍 (B) と悪性腫瘍 (M) への分類は、申請者の判断による。

<N> 悪性腫瘍の内、転移性悪性腫瘍数

以上のように本検体をマウスに2年間にわたって飼料混入投与した場合、50000 ppm 投与群の雌雄で軽度の体重減少、MCH と MCHC の増加を伴う赤血球数及びヘマトクリットの低下、脾臓重量の増加、肝臓、腎臓及び脾臓における褐色色素沈着が認められた。5000 ppm 以下の投与量では投与による影響は認められなかった。したがって、本試験における無毒性量は雌雄ともに 5000 ppm (雄: 730 mg/kg/day; 雌: 938 mg/kg/day) であると判断される。また、催腫瘍性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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

3) マウスを用いた飼料混入投与による18カ月間発がん性試験 (資料No. 16)

検体の純度： アシュラム (酸としてのアシュラムを指す)

供試動物： Carworth CF-1 非近交系マウス、
投与開始時の体重範囲 雄；18～28 g、雌；14～20 g、1群雌雄各60匹

投与期間： 79週間 (1975年4月～1976年11月)

なお、各群の雄15匹を第46日以降の2週間、優性致死試験 (資料No. 29) に供した。この2週間には検体を投与しなかったが、2週間経過後にそれぞれが該当する投与量の検体投与を継続した。

申請者注： 優性致死試験に用いた後、当該試験に戻した各群の雄15匹については、その後の個体別体重 (付表1) 及びケージごとの摂餌量 (付表2) を確認したところ、当該試験における残りの各群45匹と明らかな差は認められなかった。したがって、これらの雄を優性致死試験に2週間使用したことが当該試験に与える影響は無視できるものと考えられた。また、優性致死試験に用いた各群の雄15匹については、当該試験の体重及び摂餌量の評価からそれぞれ2週間及び3週間除外したが、この期間についても各群の残りの動物で十分評価が可能であったことから、当該試験の体重及び摂餌量の評価には問題はなかったと考えられた。

投与方法： 検体を0 (対照群)、1500及び5000 ppmとなるように飼料に混入し、所定の投与期間を通して自由に摂取させた (上記の投与期間の項を参照)。なお、飼料調製を毎週1回行った。

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率； 供試動物の一般状態、中毒症状、生死等については1日2回、また、変化が認められる動物についてはそれ以上の頻度で観察した。更に、1週間に1回、触診を行って結節あるいは腫瘤の有無等について調べた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

投与期間における死亡動物数 (%) 及び死亡動物の平均生存週数を次表に示す。

投与用量 (ppm)		0 (対照)	1500	5000
死亡動物数 (%)	雄			
	雌			
死亡動物の平均生存週数 (週)	雄			
	雌			

雌雄ともに検体投与による死亡率の上昇及び死亡動物の平均生存週数の減少は全く認められなかった。

投与期間に認められた主要な一般状態の所見及び触診により認められた腫瘍の発現頻度を次表に示す。

一般状態の主要所見の発生例数

性	雄			雌		
	投与量 (ppm)	0 (対照)	1500	5000	0 (対照)	1500
(検査動物数)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
膿瘍						
角膜混濁						
腹部膨満						
脱毛						
結節						
外傷						
痂皮						
腹部湿潤						
触診腫瘍						

[申請者注]統計検定実施せず

検体投与によると考えられる一般状態の変化は、いずれの投与群の雌雄にも認められなかった。なお、結節とした病変は一時的なもので、次の観察時には「ただれ (sore)」として認められた。本病変は皮下の膿瘍であった。また、触診により検出した腫瘍を有する動物数の発現頻度及びその平均発生時期にも検体投与との関連性は認められなかった。

体 重; 全生存動物 (但し、第 6~8 週時においては、優性致死試験に使用した各群の雄 15 匹を除く) を対象として、投与開始時、投与開始後 12 週間においては 1 週間間隔で、また、その後の期間においては 1 カ月間隔で測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

雄においては投与開始後の最初の 12 週間に統計学的に有意な変動が時に認められたが、用量相関性がない、あるいは対照群と比べて僅かな変動で、検体投与とは関連しないと考えられた。また、雌においては第 56 週時以降に統計学的に有意な変動が時に認められたが、用量相関性がない変動で検体投与とは関連しないと考えられた。(Dunnett 両側検定 ; $p \leq 0.05$)

摂餌量 ; 全生存動物 (但し、第 6~8 週時においては、優性致死試験に使用した各群の雄 15 匹を除く) を対象として、投与期間を通して毎週、ケージ単位 (投与開始時:5 匹/ケージ) で摂餌量を測定し、1 日 1 匹当たりの摂取量 (g/mouse/day) を算出した。

投与期間に時に投与群の雄または雌で摂餌量に変動が認められたが、全体としては雌雄ともに対照群と投与群の間に差は認められず、摂餌量に対する検体投与の影響はないと考えられた。

検体摂取量 ; 各週における摂餌量、体重及び飼料中の検体濃度 (設定濃度) から検体摂取量 (mg/kg/day) を算出した。但し、第 13 週時以降においては、4 週間単位の平均値として検体摂取量を算出した。また、投与期間を通じた平均検体摂取量を算出する際には、最初の 12 週間における各週の値を 4 週間単位の平均値とし、残りの期間の 4 週間単位の平均値と合わせて平均値を算出した。

投与期間における平均検体摂取量は次表のとおりである。

投与用量 (ppm)		1500	5000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	191.6	648.5
	雌	183.2	630.0

食餌効率 ; 第 13 週時までは各週における摂餌量及び体重増加量を、また、それ以降においては摂餌量及び体重増加量のそれぞれ 4 週間単位の平均値を用いて食餌効率を算出した。

対照群を含めいずれの投与群の雌雄においても測定時期により変動が認められたが、全体としては雌雄ともに対照群と各投与群との間に差はないと考えられた (報告書には記載がないので申請者の判断)。

眼科学的検査 ; 全供試動物を対象として、投与開始前、第 12 カ月及び第 18 カ月時に検査を行った。

いずれの眼科学的検査時期においても、認められた所見の発生頻度に雌雄ともに対照群と各投与群との間に差は認められなかった。また、肉眼的病変及び病理組織学的病変の発生頻度にも、雌雄ともに対照群と各投与群との間に差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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

肉眼的病理検査；投与期間における途中死亡動物及び切迫屠殺動物、並びに投与期間終了時における全生存動物を対象として剖検を行い、肉眼的病理所見を記録した。

第12カ月時以前の死亡／切迫屠殺動物、並びに第13カ月時以降の死亡／切迫屠殺動物及び最終屠殺動物において、統計学的有意差が認められた所見及び発生頻度を次表に示す。

統計学的有意差が認められた肉眼的病理所見

性	雄			雌		
	0 (対照)	1500	5000	0 (対照)	1500	5000
12 カ月時以前の死亡／切迫屠殺動物						
(検査動物数)						
13 カ月時以降の死亡／切迫屠殺動物及び最終屠殺動物						
(検査動物数)						

注) * : $p \leq 0.05$ (χ^2 検定法)

第12カ月時以前の死亡／切迫屠殺動物の雌で1500 ppm及び5000 ppm投与群で脾臓の腫大の発生頻度が統計学的に有意に上昇した。これらの脾臓の腫大は、病理組織学的にはいずれもリンパ肉腫であった。しかしながら、脾臓の腫大を伴わなかったリンパ肉腫も考慮して検討すると、第12カ月時以前の死亡／切迫屠殺動物の雌で検体投与に関連したリンパ肉腫の発生頻度の上昇は認められなかった。

第13カ月時以降の死亡／切迫屠殺動物及び最終屠殺動物の雄においては、5000 ppm投与群で皮下の腫瘤の発生頻度に統計学的に有意な上昇が認められた。これらの皮下の腫瘤は病理組織学的にはいずれも皮膚／皮下織の未分化肉腫であった。皮膚／皮下織の未分化肉腫は5000 ppm投与群の雄にのみ認められた。

臓器重量；投与期間終了時における全生存動物を対象として、剖検時に次の臓器を摘出して重量を測定した。また、剖検時の体重を用いて臓器重量対体重比を算出した。

肝臓、腎臓、脾臓、心臓、性腺（精巣／卵巣）、副腎、甲状腺、下垂体、及び脳

統計学的有意差が認められた臓器重量検査項目の概要を次表に示す。腎臓、心臓、脳、甲状腺及び下垂体に統計学的に有意な増減が認められた。しかしながら、これらの増減には明らかな用量相関性がなく、また、対応する病理組織学的変化も認められなかった。したがって、検体投与による臓器重量への影響はないと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

臓器重量検査結果

(対照群値=100)

検査項目	絶対重量				対体重比			
	雄		雌		雄		雌	
投与量 (ppm)	1500	5000	1500	5000	1500	5000	1500	5000
最終体重								
腎臓								
心臓								
脳								
甲状腺								
下垂体								

注) $\Delta\Delta$: $p \leq 0.05$ (ANOVA + Dunnett の検定法)

空欄 : 統計学的有意差なし。

病理組織学的検査 ; 全動物を対象として剖検時に次の臓器及び組織を採取した。

副腎、大動脈、脳、骨髄、盲腸、結腸、眼球、食道、大腿骨、胆嚢、心臓、腎臓、肝臓、肺、乳腺、リンパ節 (腸間膜)、卵巣、膵臓、下垂体、前立腺、唾液腺、精嚢、骨格筋、皮膚、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、脊髄、脾臓、胃、精巣 (精巣上部を含む)、胸腺、甲状腺 (上皮小体を含む)、気管、膀胱、子宮 (子宮頸部を含む) 及び肉眼的病変部位

上記の組織の固定液として 10%緩衝ホルマリン液を用いた。なお、当試験実施機関にて病理組織標本の作製を行ったが、病理組織学的検査を
に委託した。

[非腫瘍性病変] ; 非腫瘍病変の発生分布の概要を次表に示す。

主要な非腫瘍性病変

臓器	雄			雌		
	0 ppm	1500	5000	0 ppm	1500	5000
(検査動物数)	60	60	60	60	60	60
肺						
腎臓						
肝臓						
脾臓						
胃						
結腸						
小腸						
膵臓						
リンパ節						
唾液腺						
精巣						
精嚢						
前立腺						
膀胱						
皮膚/皮下織						
卵巣						
子宮						
眼球						

注) * : p ≤ 0.05 (χ²検定法)

小腸石灰沈着の発生頻度が 1500 及び 5000 ppm 投与群で雌雄ともに統計学的に有意に高く、特に、雌においては用量相関性が認められた。更に、雌においては胃の石灰沈着の発生頻度が有意に高かった。しかしながら、申請者は、石灰沈着は上記表に示す臓器以外にも種々の臓器で 4 例未満の発生頻度で、雌雄各群で認められたことから、雌雄の小腸及び雌の胃で認められた高率の石灰沈着は検体投与とは関連しないと考えた。

次に、皮膚/皮下織の過角化症（軽度）の発生頻度が 5000 ppm 投与群の雄で統計学的に有意に上昇したが、本病変の重症度が上昇することはなかった。また、本病変は雌には全く認められなかった。したがって、申請者は 5000 ppm 投与群の雄で認められた本病変の発生頻度の上昇は検体投与とは関連しないと判断する。

更に、皮膚/皮下織の寄生虫の発生頻度が 5000 ppm 投与群の雄で統計学的に有意

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

に上昇したが、この変化は検体投与とは関連しないと判断する（申請者の判断）。
上記以外の発生頻度にも統計学的に有意な変動が認められたが、用量相関性のない
変化で検体投与による影響ではないと考えられた。

〔腫瘍性病変〕；腫瘍性病変の発生分布を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

腫瘍性病変の発生分布（転移した腫瘍を除く）

臓器	所見	雄			雌		
		0 ppm	1500	5000	0 ppm	1500	5000
(検査動物数)		(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
肺							
下垂体							
骨格筋							
肝臓							
精巣							
骨							
甲状腺							
副腎							
卵巣							
子宮							
造血器							
皮膚／皮下織							
膀胱							
小腸							
検査動物数		60	60	60	60	60	60
腫瘍数	良性						
	悪性						
総腫瘍数							
担腫瘍動物数	良性						
	悪性						
担腫瘍動物総数							
担複数腫瘍動物数							

注) △: $p \leq 0.05$ (χ^2 検定法)

皮膚／皮下織の未分化肉腫の発生頻度が 5000 ppm 投与群の雄で統計学的に有意に増加した。しかし、申請者は 5000 ppm 投与群の雄における本腫瘍の発生例数

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

は4例と僅かであること、また、その他、良性腫瘍数にも悪性腫瘍数にも検体投与によると考えられる影響が認められないことから、この腫瘍が検体投与により発生したものではないと考えた。したがって本検体には催腫瘍性はないと考えられた。

以上のように、本検体をマウスに18カ月間にわたって飼料混入投与したが、最高投与量である5000 ppmでも一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査結果、臓器重量、並びに肉眼的及び病理組織学的検査結果に投与によると考えられる影響は認められなかった。したがって、本試験における無毒性量は雌雄ともに5000 ppm（雄 648.5 mg/kg/day；雌 630.0 mg/kg/day）であると判断される。

なお、最高投与量である5000 ppmでも催腫瘍性はないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

4) イヌを用いた1年間反復経口投与毒性試験

(資料 No. 39)

検体の純度： アシュラム [申請者注]酸としてのアシュラムを指す

供試動物：ビーグル犬、投与開始時約8カ月齢、投与開始時体重;雄8.5～10.1 kg(平均9.4 kg)、
雌7.0～9.0 kg(平均7.9 kg)、1群雌雄各5匹
[但し、600 mg/kg/dayの雌1例が試験47日に事故死したため、試験71日より他の雌と置き換えた。]

投与期間：52週間(2001年5月17日～2002年5月26日、置き換えた雌は2001年7月26日～
2002年7月26日)

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁させ、一日一回52週間毎日、0(対
照群)、100、300および600 mg/kg/dayの用量で強制経口投与した。投与容量は
2 mL/kg/dayの一定とした。投与液は、純度換算(補正係数1.217)の上、既知
の安定性結果から遮光下で調製を行い、9日以内に使用した。

試験(実施年)	28日間(2000年)			6カ月間(1980年)(資料No.12)		
投与量 (mg/kg/day)						
死亡率						
臨床症状						
血液学的検査						
血液生化学的 検査						
尿検査						
臓器重量						
病理組織学的 検査						

-: 発生なしまたは毒性影響なし

以上より、本試験にはNOEL(無影響量)と予想される100 mg/kg/dayを低用量に、軽度の毒性が予想される300 mg/kg/dayを中用量にし、1000 mg/kg/dayで死亡例や嘔吐が予想されるため、1年間の投与を考慮して高用量を600 mg/kg/day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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；動物の生死及び瀕死状態について毎日2回観察し、嘔吐・下痢・出血・粘膜の状態に特に注意した臨床症状観察を含む一般状態観察を毎日実施した。

投与期間中の死亡はなかった。

検体投与に関連すると思われる症状は、過度の流涎、投与液逆流、嘔吐であった。これらをまとめると以下ようになる。

投与量 (mg/kg/day)	観察された臨床症状								
	流涎			投与液逆流			嘔吐		
	頻度	程度の 最高	時間の 最高	頻度	程度の 最高	時間の 最高	頻度	程度の 最高	時間の 最高
雄									
0									
100									
300									
600									
雌									
0									
100									
300									
600									

(n) : 合計頻度数、 h : 時間、 dt : 投与期間中、 - : 適用外

流涎が代表的な症状であり、この症状を示す動物数、頻度、程度及び持続時間ともに用量との関連が認められた。100 mg/kg/day 群の雌ではこの症状がみられず、雄でも2例のみに合計6回認められただけであった。300及び600 mg/kg/day 群ではほとんど全ての日に流涎が認められた。投与液逆流は投与後すぐにみられ、600 mg/kg/day 群の雄では1例のみに認められたが、300及び600 mg/kg/day 群の雌ではそれぞれ1および2例に認められ、頻度・程度ともに用量との関連性が認められた。嘔吐は300及び600 mg/kg/day 群で投与数分後にみられ、600 mg/kg/day 群でより明瞭であった。これらすべての症状（流涎、投与液逆流、嘔吐）は投与に関連しているものの、いずれも概ね数時間以内に症状が消失しており持続性がなかった。さらに、投与期間に関連した症状の程度の増強もみられなかったうえ、動物の体重増加量にも変化がなかったこと考慮すると、これらの症状は被験物質の明らかな毒性を示すものとは考えられなかった。その他に散発的な臨床症状が認められたが、他の検査結果との関連性がない偶発的なもので、検体投与との関連性はなかった。

機能検査；詳細な身体検査（機能検査）を、投与開始前に一回及び投与期間中は毎週一回実施した。

具体的には、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌の発現及び排泄並びに自動的な働き（例：流涎、流涙、立毛、瞳孔の大きさ、異常な呼吸パターン）、歩行、姿勢

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

及び手で触れた際の反応における変化並びに間代性または強直性の動きの存在、常同症（例：過剰な毛繕い、反復性の旋回）または奇異な行動（例：自己損傷、後方歩行）を観察し記録した。

対照群及び検体投与群のいずれにも異常は認められなかった。

摂餌量；各動物への給餌量及び翌朝の残量から摂餌量を算出した。動物ごとの一日当たりの摂餌量は投与開始前から投与期間中を含めて週ごとに計算した。

対照群及び検体投与群の試験期間中の摂餌量には差は認められなかった。

体重；各動物の体重を群分け前に一回、投与開始日及び投与期間中一週間に一回測定した。

各測定時の比較で、雌雄とも統計学的有意差は全く認められなかった。群平均体重及び群平均体重増加量をまとめると以下のようになる。

性	投与量(mg/kg/day)	0	100	300	1000
雄	体重(kg)				
	・試験1週(試験1日)				
	・試験52週				
	体重増加量(kg)				
	・試験1-52週				
雌(1)	体重(kg)				
	・試験1週(試験1日)				
	・試験52週				
	体重増加量(kg)				
	・試験1-52週				

(1)：試験開始時から他の動物に比し低体重で、10週までは増加し、その後減少を示した300 mg/kg/day 群の雌1例(Y51161)を除いている。

統計方法：Dunnnett test

異常な体重を示した雌の一例は試験期間を通じて体重が少なく、初期では群平均値の90%程度であったが、最終的には70%近くになった。体重増加量への検体投与による影響はみられなかった。

眼科学的検査；投与開始前にすべての動物について、投与期間中は投与12、25及び52週時に全供試動物について、散瞳剤を用いた眼底検査を含む眼科学的検査を実施した。

投与開始前に認められた眼所見は、この系統のイヌで自然発生的に認められる軽微なものばかりであり、毒性学的意義のあるものではなかった。試験期間中及び投与期間終了時の検査では、検体投与に起因する異常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ユービーエルジャパン株式会社にある。

血液学的検査；投与開始前及び投与 12 または 13、25 及び 51 週時に、一晚（14 時間以上）絶食させた検体投与前の全動物から無麻酔下で採血を行った。抗凝固剤にはクエン酸ナトリウム（血液凝固能検査項目）または EDTA（その他の検査項目）を用いた。さらに試験期間終了後の計画殺時に胸骨骨髓を用いて骨髓塗抹標本作製したが、血液検査で何ら異常がみられなかったため、骨髓細胞のディファレンシャルカウントは実施しなかった。測定項目は以下の通りである。

白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、血色素量（HB）、ヘマトクリット値（PCV）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）、血小板数（PLAT）、白血球百分比〔好中球（N）、好酸球（E）、好塩基球（B）、リンパ球（L）、単球（M）〕、網赤血球数（RETIC）、プロトロンビン時間（PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、フィブリノーゲン（FIB）

対照群との間に統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目	検査時期	投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		100	300	600	100	300	600
WBC	投与前						
	13 週						
	25 週						
RBC	投与前						
	13 週						
HB	投与前						
PCV	投与前						
MCHC	投与前						
	51 週						
N	13 週						
	51 週						
L	投与前						
	13 週						
	25 週						
APTT	投与前						
	51 週						
FIB	投与前						
	51 週						

Dunnett 検定 ↑↓ : p<0.05 ; ↑↑ : p<0.01

表中の数値は対照群を 100 とした場合の割合 (%)

() 付きの数値は有意差のみられない参考値

種々の血液学的検査項目に有意差がみられたが、投与開始前にみられたものあるいは投与前と同じ傾向（APTT）を示すもの、変動が小さいものないし検体

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

投与用量との関連性が認められないもの (RBC、MCHC、N、FIB)、変化に一貫性がないもの (WBC、L、RBC) であった。検体投与により引き起こされた毒性であるとは考えられなかった。

血液生化学的検査；血液学的検査と同時に (投与開始前及び投与 12 または 13、25 及び 51 週時)、ヘパリンを抗凝固剤として採取した血液から得られた血漿を用い、全動物について以下の項目の測定を行った。

ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)、カルシウム (Ca)、無機リン (I.PHOS)、グルコース (GLUC)、尿素 (UREA)、クレアチニン (CREAT)、総ビリルビン (TOT.BIL)、総蛋白 (PROT)、アルブミン (ALB)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、コレステロール (CHOL)、トリグリセライド (TRIG)、アルカリホスファターゼ (ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、クレアチンキナーゼ (CK)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)

対照群との間に統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目	検査時期	投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		100	300	600	100	300	600
Na	投与前						
	13 週						
	51 週						
Cl	投与前						
	25 週						
UREA	投与前						
	51 週						
PROT	投与前						
	25 週						
	51 週						
TRIG	投与前						
	13 週						
ASAT	投与前						
	13 週						
	51 週						
CK	投与前						
	25 週						

Dunnett 検定(Clを除く)または Dunn 検定(Clのみ) ↑↓ : p<0.05 ; ↑↓ : p<0.01

表中の数値は対照群を 100 とした場合の割合 (%)

() 付きの数値は有意差のみられない参考値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

対照群の値及び投与開始前の検査値と比較すると、血液生化学的検査項目には検体投与の影響はみられなかった。600 mg/kg/day 群のいくつかの検査項目に有意差がみられたが、変動が小さく、検体投与により引き起こされた毒性であるとは考えられなかった。

尿 検 査；投与開始前及び投与 12 または 13、25 及び 51 週時に全動物より採尿し、以下の項目を検査した。

尿量、pH、比重、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、亜硝酸塩、潜血、ウロビリノーゲン、尿沈査 [白血球、赤血球、円柱、リン酸マグネシウムアンモニウム結晶、リン酸カリシウム結晶、シュウ酸カリシウム結晶、上皮細胞]、外観、色

対照群との間に統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目	検査時期	投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		100	300	600	100	300	600
pH	25 週						

Dunnett 検定 ↑↓ : p<0.05 ; ↑↓↓ : p<0.01

表中の数値は対照群を 100 とした場合の割合 (%)

尿量及び尿比重に検体投与の影響はみられなかった。25 週の検査時のみで、600 mg/kg/day 群の雄の pH 上昇がみられたが、これは本群の各個体が pH7.0~8.0 のやや高い値を示したことによるものであった。尿の定性検査においてもいずれの群においても検体投与の影響はみられなかった。

肉眼的病理検査；投与期間終了後、14 時間以上絶食させた全動物についてチオペンタールナトリウムで麻酔して放血殺を行い、詳細な剖検による肉眼的異常を記録した。臓器・組織は 10%緩衝ホルマリンで固定したが、視神経を含む眼球は Davidson 液で、精巣と精巣上体は Bouin 液で固定した。

600-mg/kg/day 群の雄 2/5 例及び雌 1/5 例に甲状腺肥大が観察された。これは後述する病理組織学的変化との関連から、検体投与による変化と考えられた。その他の剖検所見は投与用量との関連性がなく、実験動物としてのイヌで自然発生することが知られている所見であった。

臓器重量；試験終了時の全生存動物について以下の臓器重量（絶対重量）を採材後すぐに無固定で測定し、相対重量（対体重比）も算出した。

副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、前立腺、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）、子宮

対照群との間に統計学的有意差の認められた臓器を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

臓器	検査項目	投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		100	300	600	100	300	600
副腎	絶対重量						
胸腺	絶対重量						
甲状腺	絶対重量						
	相対重量						

Dunnett 検定^aまたは Dunn 検定^b ↑↓: p<0.05; ↑↓↓: p<0.01

表中の数値は対照群を 100 とした場合の割合 (%)

() 付きの数値は有意差のみられない参考値

600 mg/kg/day 群の雌雄及び 300 mg/kg/day 群の雄において、甲状腺の絶対重量及び相対重量増加が認められた。この増加は後述する病理組織学的変化との関連から、検体投与による変化と考えられた。その他の臓器重量の変化は、投与用量との関連性がないもの、ごくわずかな差であるものないしは雌雄で異なる傾向を示すもの等であり、毒性学的意義はないと考えられた。

病理組織学的検査；全動物を対象として、以下の組織についてパラフィン包埋、4μ厚の薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した病理標本を作製し、鏡検した。

副腎、大動脈、脳（延髄/橋、小脳、大脳皮質を含む）、盲腸、結腸、十二指腸、精巣上体、食道、眼球、大腿骨（関節含む）、胆のう、心臓、回腸、空腸、腎臓、喉頭、肝臓、肺（気管支含む）、リンパ節（顎下及び腸間膜）、乳腺部、鼻腔、視神経、卵巣、膵臓、咽頭、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺（耳下腺及び顎下腺）、坐骨神経、骨格筋、皮膚、脊髄（頸部、胸部、腰部）、脾臓、胸骨（骨髄含む）、胃、精巣、胸腺、甲状腺（上皮小体含む）、舌、気管、膀胱、子宮（体部及び頸部）、膣、肉眼的異常部位

検体投与に関連すると考えられる病理組織学的変化は 600 及び 300 mg/kg/day 群において観察された甲状腺のろ胞上皮細胞肥大であった。グレード及び発生頻度をまとめると以下の通りである。

性	雄			雌		
	0	300	600	0	300	600
投与量(mg/kg/day)						
グレード 1(軽微)						
グレード 2(軽度)						
発生頻度						
平均グレード						

[申請者注]統計検定せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

対照群に比べて投与区で発生数が多いか、同等の所見が見られた結果について以下にまとめた。

表中の病理組織学的変化の鏡検に基づくグレード分けは本試験では以下の標記による。

- グレード1 (G1) (軽微)
- グレード2 (G2) (軽度)
- グレード3 (G3) (標準的)
- グレード4 (G4) (多数)
- グレード5 (G5) (広範囲)

また、次表は対照群の所見をベースにして以下のように整理した。

(1)各投与区において対照群で該当する症例数以上の発生数が認められた場合は、表に該当する動物数を示した。

(2)各投与区において対照群で該当する症例数以上の発生が認められなかった場合は、表を空欄とした。

性			雄				雌			
投与量(mg/kg/day)			対照群	投与区			対照群	投与区		
			0	100	300	600	0	100	300	600
副腎腺		G1					0			
		*								
大動脈		G1	0							
		G2	0							
脳		*				0				
盲腸		G2	0				0			
		G2	0				0			
十二指腸		G1	0				0			
		G1	0							
		G2					0			
食道		G1	0							
眼瞼		G3	0				0			

(次頁につづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

性			雄				雌			
投与量(mg/kg/day)			対 照 群	投与区			対 照 群	投与区		
			0	100	300	600	0	100	300	600
眼		G2	0				0			
大腿		G3	1				1			
		G4	2							
胆嚢		G3	3							
		G1	2							
胆嚢		G2	0				0			
		G3	0							
心臓		G1	0							
回腸		G2	0							
腎臓		G1	2							
		G2					0			
		G1	0							
		G1	0							
		G2					0			
		G2	0							
		G2	0							
		G1	0							
		G2	0							
		*								
		G1	0							
		*					0			
		G1					0			

(次頁につづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

性			雄				雌			
投与量(mg/kg/day)			対照群	投与区			対照群	投与区		
			0	100	300	600	0	100	300	600
肝臓		G1	3				4			
		G2	0							
		G1					1			
		G2	0							
肺		G1	0							
		G2	1				1			
		G3					4			
		G4	0							
		G1	1				1			
		G2	0				1			
		G3					0			
		G1					2			
		G2	1							
		G1	2				3			
		G3	0							
		G1					0			
		G2	0				0			
		*					0			
	乳腺域		*				0			
			*				0			
		*								
		*				1				
		*				0				

(次頁につづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

性			雄				雌			
投与量(mg/kg/day)			対 照 群	投与区			対 照 群	投与区		
				0	100	300		600	0	100
下顎リンパ節		G1					3			
		G2	0							
		G1	3				1			
		G2	1				0			
		G1	2				2			
		G2					1			
		G3	0							
		G1	0				2			
		G2	0							
		G1	0				0			
G2		0								
下顎腺		G1	1							
		G2	0							
腸管膜リンパ節		G1					4			
		G2	0				0			
		G3	0							
		G1	3				1			
		G2					0			
		G3	0							
鼻腔		G1	1				0			
		G2	0				0			

(次頁につづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

性			雄				雌			
投与量(mg/kg/day)			対照群	投与区			対照群	投与区		
			0	100	300	600	0	100	300	600
卵巢		*					0			
		*					0			
		*					1			
		*					1			
		*					0			
		*					0			
脾臓		G3					0			
		G1	1				0			
上皮小体		G2	0							
		*	0							
耳下腺		G2					0			
		G2					0			
前立腺		G1	0							
下垂体		*					2			
骨格筋		G1	0							
		G1					0			
脾臓		G1	0							
		G1					1			
		G2	2							
		G3	1				2			
		G4					0			

(次頁につづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

性			雄				雌			
投与量(mg/kg/day)			対 照 群	投与区			対 照 群	投与区		
			0	100	300	600	0	100	300	600
脾臓		G2					0			
		G3	3							
		G1	0							
		G2	0				0			
		G3	0							
		G2	0							
胸骨		G1	3				4			
		G2	2				1			
		G3	0							
胃		G3	0							
		G2					0			
		G2					0			
胸腺		G1	0				1			
		G2	0				2			
		G3					0			
		G4	0							
		*					1			
		G1					0			
甲状腺		*	1							
		G1	1							
		G2	0							
		G1	0				0			
		G2	0				0			

(次頁につづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

性			雄				雌			
投与量(mg/kg/day)			対 照 群	投与区			対 照 群	投与区		
			0	100	300	600	0	100	300	600
舌		G1	0							
		G2					0			
気管		G1	1				0			
膀胱		G2	0							
		*	0				0			
子宮		*				0				
膣		*				0				
		*				1				
		*				1				
		*				0				
		*				0				
		*				0				
		*				1				
		*				1				
		*				3				
		*				0				
		G2					0			
	G3					0				

統計は実施検定していない（申請者注）

*：症例が少ない等の理由によりグレード分け実施せず

その他甲状腺のろ胞上皮細胞肥大以外に観察された病理組織学的所見は、発生頻度が低いもの、投与用量との関連性がないものないし実験動物としてのイヌで自然発生することが知られている所見であった。従って は 毒性学的意義がない変化と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

以上の結果から、本検体のイヌに対する強制経口投与による1年間反復経口投与毒性試験における影響として600及び300 mg/kg/day 群の雌雄で

。従って、本試験における無毒性量は雌雄とも100 mg/kg/day 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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

(8) 繁殖毒性及び催奇形性

1) ラットを用いた繁殖毒性試験

(資料 No. 17)

検体の純度： アシュラム [申請者注]酸としてのアシュラムを指す

供試動物：CD系ラット、投与開始時35日齢、投与開始時の体重 雄124～158 g、雌82～137 g、1群雄12匹及び雌24匹
なお、群分け前の30日齢時に雌雄各20匹を屠殺し、病理組織学的に検査した結果、主たる病変は雄15匹、雌17匹に認められた軽度ないし中程度の間質性肺炎であった。

投与期間：F0世代；35日齢（1978年9月4日）～F1児動物の離乳（30日齢）時
F1世代；F2児動物の離乳（30日齢）時まで
F2世代；離乳（30日齢）時まで
（なお、F2離乳児を検体無添加飼料で30日間飼育した後に飼育期間を終了した。）

投与方法：検体濃度が0、1000、5000及び25000 ppmとなるように検体を飼料に混入し、所定の投与期間を通して自由に摂取させた。なお、飼料調製を約2週間間隔で実施した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

交配・選抜・方法及び観察・検査項目；概要を次表に示す。

世代	期 間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
F0	生育 (100日)		・ 一般状態 (毎日2回以上)、体重 (週1回)、摂餌量 (週2回)
	第1次交配 (10日)	・ 雄：雌=1：2で交配。 ・ 膣スメア中の精子の存在により交尾を確認 (妊娠1日) ・ 妊娠雌の分離飼育	・ 膣スメア中精子の確認、発情周期の観察 ・ 妊娠雌の体重測定
	第2次交配 (10日)	・ 第1回交配で交尾が確認されなかった雌を対象 ・ 膣スメア検査を交配期間の終了後20日間継続 (その他は、第1回交配に準じる。)	・ 交尾が確認されなかった雌、及び交尾が確認されたが分娩予定日の7日後でも分娩しなかった雌の子宮について着床痕の検査 (その他は第1回交配に準じる。)
	妊娠		・ 母動物の体重測定 (妊娠1, 8, 15, 22日) ・ 母動物の摂餌量 (5日間隔)
	分娩	・ 自然分娩とし、分娩確認日を哺育0日	・ 母動物の体重測定 ・ 新生児数、死産児数、新生児体重、新生児の性別、娩出児の奇形の有無、死産児の肉眼的病理検査
	哺育 (30日)		・ 母動物の哺育状況 (毎日1回以上) ・ 母動物の体重測定 (哺育8, 15, 22, 30日) ・ 母動物の授乳状況 (哺育1, 4日) ・ 児動物の生死の確認 (毎日2回以上) ・ 同腹児数の計数及び児動物の体重測定 (哺育4, 11, 18, 25, 30日)
	離乳	・ 哺育30日に離乳 ・ F1親動物として適性検査用動物の選抜 (1群5同腹子より雌雄各1匹) ・ F1親動物の選抜 (1群雄16匹、雌32匹)	・ F1親動物として適性検査用動物の肉眼的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査 ・ 適性検査用動物/F1親動物としなかった動物の肉眼的病理検査 (31~38日齢時)
	参考事項	雄親動物： ・ F1児動物の離乳後に肉眼的病理検査、精巣重量測定、精巣の病理組織学的検査 雌親動物： ・ F1児動物の離乳後に肉眼的病理検査	
F1	生育 (120日)	F0世代に準ずる。	F0世代に準ずる。
	第1次交配 (10日)		
	第2次交配 (10日)		
	妊娠		
	分娩		
	哺育 (30日)		
	離乳		
	参考事項		

(続く)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

(続き)

世代	期 間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
F2	F2 児動物の離乳後の飼育 (30 日)	<ul style="list-style-type: none"> ・ いずれの群の児動物も検体無混入飼料で飼育 ・ 各 F2 離乳児群より雌雄各 5 匹を選択。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 飼育期間に 1 週間間隔で体重測定 ・ 選択した F1 親世代及び 30 日間飼育した F2 離乳児の肉眼的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査
		<ul style="list-style-type: none"> ・ その他の動物 	<ul style="list-style-type: none"> ・ F1 親動物 (各群雄 10 匹、雌 25 匹) : 肉眼的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査 ・ F1 親世代の雌及び F2 世代の動物 : 肉眼的病理検査、精巣重量測定、精巣の病理組織学的検査
	参考事項	但し、F2 児動物の離乳時をもって投与期間を終了。	

1) F0 及び F1 親動物

一般状態及び死亡率；試験期間を通して全動物の一般状態及び生死を毎日 2 回以上（週末及び休日を除く）ケージサイドより、また、親動物の取り扱い時の状態（哺育期間を除く）を毎日 1 回以上観察した。

体 重；雄の親動物の場合には投与期間を通して 1 週間間隔で体重を測定した。雌の親動物の場合には生育期間においては 1 週間間隔で、妊娠期間においては妊娠 1、8、15、22 日に、また、哺育期間においては哺育 0、8、15、22、30 日に測定した。

摂餌量；いずれの親動物の場合も生育期間においては、雌雄ともに毎週 3 回測定した。また、妊娠期間の雌の親動物については 5 日間隔で測定した。

交配及び妊娠の確認；F0 親動物の場合には投与開始後 100 日間経過時より、また、F1 親動物の場合には離乳後 120 日間経過時より交配を開始した。親動物を雄：雌＝1：2 で同居させた。毎日、膣スメア検査を行って性周期を調べると同時に、膣スメア中の精子の有無を検査した。精子を認めた日を妊娠 1 日とした。交尾を確認した雌を体重測定し、繁殖用ケージで個体別に飼育した。第 1 次交配期間を 10 日間とし、この間に交尾しなかった雌を同一群の別の雄と更に 10 日間同居させた（第 2 次交配期間）。両交配期間に交尾の確認が得られなかった雌を雄とは別に約 20 日間飼育し、屠殺して肉眼的病理検査を行い、子宮を摘出して着床痕を調べた。

繁殖性検査；分娩確認日を哺育 0 日とし、妊娠日数を算出した。授乳状況を哺育 1 及び 4 日に観察した。また、次の指標（%）を算出して検討した。

$$\text{交尾率} = (\text{交尾した動物数} \div \text{交配に用いた動物数}) \times 100$$

$$\text{受胎率(妊娠率)} = (\text{妊娠動物数} \div \text{交尾した雌動物数}) \times 100$$

$$\text{授精率} = (\text{授精雄動物数} \div \text{交配に使用した雄動物数}) \times 100$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

新生児出産率 = (新生児出産雌動物数 ÷ 妊娠雌動物数) × 100

新生児生存率 = (哺育 X 日の生存児数 ÷ 新生児数) × 100

哺育率 = (哺育 X 日の生存児数 ÷ 哺育 4 日の生存児数) × 100

[申請者注]

授精率の計算式の定義は報告書に明記されていなかったが、結果から判断した。また、本試験成績では交尾率について言及していないが定義として加えた。

分娩状況調査：

分娩後直ちに親の体重、生存仔および死産仔の数、個々の生存仔の性別と体重、肉眼的に変形している仔の奇形の特徴を記録した。死産仔は切開し、その死因を調査した。

病理学的検査；F0 親動物の場合は F1 児動物の離乳後に、F1 親動物の場合は F2 離乳動物を離乳後 30 日間検体無添加飼料で飼育した後に病理学的検査を実施した。また、F2 離乳動物も 30 日間の飼育後に病理学的検査に供した。検査対象動物、匹数、及び検査内容は次表のとおりである。

世代	肉眼的病理検査	臓器重量 ⁴⁾	病理組織学的検査 ⁵⁾
F0 親 ¹⁾	雌雄ともに全動物	精巢 (雄の全動物)	精巢 (雄の全動物)
F1 親	雌雄ともに全動物	全対象臓器 (雄 10 匹、雌 25 匹) 精巢 (残りの雄)	全対象臓器 (雄の全動物、雌 25 匹)
F1 児 ²⁾	各群の 5 同腹児 の雌雄各 1 匹	全対象臓器 (各群の 5 同腹児の 雌雄各 1 匹)	全対象臓器 (各群の 5 同腹児の 雌雄各 1 匹)
F2 児 ³⁾	雌雄ともに全動物	全対象臓器 (各群の雌雄各 5 匹)	全対象臓器 (各群の雌雄各 5 匹)

註 1)： 群分け前の 30 日齢時に供試の適切性確認のため一部動物を剖検・組織検査。その後群分け

2)： 離乳の翌日 (31 日齢時) に検査

3)： 離乳 (30 日齢時) 後 30 日間、検体無添加飼料で飼育後に検査

4)： 対象臓器は、下記を参照

5)： 対象臓器は、下記を参照

重量測定対象臓器：副腎、脳、性腺、心臓、腎臓、肝臓、肺、下垂体、前立腺、脾臓

病理組織学的検査：F0 世代及び F1 世代の雄から、それぞれ F1 及び F2 児動物の離乳後に精巢を採取してヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、病理組織学的検査を行った。検査対象臓器・組織は次のとおりであった。

心臓、大動脈、脾臓、胸腺、骨髄、リンパ節 (頸部、腸間膜)、脳、脊

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

髄、坐骨神経、舌、唾液腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、脾臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮、眼球、骨、骨格筋、皮膚、腎臓、膀胱、肺、気管、下垂体、副腎、甲状腺

2) F1 及び F2 児動物 (哺育児)

児動物の離乳、選抜等；いずれの世代においても哺育 30 日に児動物を離乳させた。離乳時に各群の F1 児動物の雌雄各 5 匹について肉眼的に病理検査を行い更に病理組織学的検査を行った。また、各群の F1 離乳児動物の雄 16 匹、雌 32 匹を無作為に選抜し、F1 親動物として、所定の飼料を投与した。非選抜動物を肉眼的病理検査に供した。

児動物の観察；分娩終了後に新生児数、死産児数、新生児の性別、並びに奇形の有無を調べた。また、毎日死亡児動物の有無を調べた。更に、死産児の剖検を行い、死因を検討した。

児動物の体重；生存同腹児数及び体重を哺育 0、4、11、18、25、及び 30 日に測定した。

3) F2 離乳児

雌雄各 46～83 匹の F2 離乳児を各投与群より選出し、離乳後 30 日間検体無添加飼料で飼育した。毎週 1 回体重を測定し、飼育期間の終了後にこれらの動物を肉眼的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査に供した。

結 果：

1) F0 及び F1 親動物；F0 及び F1 親動物における結果の概要を次頁の表に示す。

死亡率及び一般状態／授乳状況；F0 親動物に死亡は全く認められず、検体投与に起因する一般状態／授乳状況の変化は認められなかった。

F1 親動物においては 25000 ppm 投与群を除く投与群の雌で 1～2 例の死亡／切迫屠殺動物が認められたが、検体投与に起因するとは考えられなかった。F1 親動物の雄には死亡は認められなかった。また、F1 親動物の一般状態／授乳状況に用量相関性のある変化は認められなかった。

体 重；F0 世代においては、統計学的には有意ではなかったが、25000 ppm 投与群の雄で生育期間の後半の体重が低かった。また、同投与群の雌では生育期間の初期に統計学的に有意に低い体重が認められた。妊娠期間及び哺育期間の雌の体重に統計学的に有意な変動は認められなかった。

F1 世代においては、25000 ppm 投与群の雌で生育期間の後半の体重が統計学的に有意に低かった。また、25000 ppm 投与群の雌では妊娠期間及び哺育期間においても低体重を示す時期が認められたが、認められた回数は少なく、検体投与による明らかな影響とは考えられなかった。なお、F1 世代の雄の体重には有意な変動は認められなかった。

[申請者注] このように体重に関しては F0 世代では雌の生育初期に、また F1 世代でも同じく雌の生育期間の後半に有意に低いことが確かめられた。こ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

の体重の減少は検体投与の影響と考えられた。一方、雄は F0, F1 世代とも有意な変動は認められなかった。

摂餌量；F0 及び F1 親世代の母動物の場合には、生育期間及び妊娠期間を通して、また、雄動物の場合には生育期間を通して検体投与に関連した摂餌量の変動は認められなかった。

(繁殖試験相：親動物)

世 代		対照群	親：F0		児：(F1)		対照群	親：F1		児：(F2)
投与量(ppm)		0	1000	5000	25000	0	1000	5000	25000	
供試動物数	雄	(12 匹)	(12 匹)	(12 匹)	(12 匹)	(16 匹)	(16 匹)	(16 匹)	(16 匹)	
	雌	(24 匹)	(24 匹)	(24 匹)	(24 匹)	(32 匹)	(31 匹)	(31 匹)	(32 匹)	
交配動物数	雄	(12 匹)	(12 匹)	(11 匹)	(12 匹)	(15 匹)	(14 匹)	(15 匹)	(15 匹)	
	雌	(23 匹)	(23 匹)	(21 匹)	(23 匹)	(24 匹)	(24 匹)	(29 匹)	(27 匹)	
一般状態/授乳状況										
死亡例数										
体 重	雄	測定日								
		親：F0 70 日								
	親：F1 42 日									
	親：F0 119 日									
雌	親：F1 252 日									
	親：F0 30 日									
雄	親：F1 42 日									
	親：F0 98 日									
雌	親：F1 91 日									
	親：F0 98 日									
摂餌量	生育期間	雄								
		雌								
	妊娠期間	雄	—	—	—	—	—	—	—	
		雌								
繁殖性検査	雌の交尾率 (全交配期)****									
	雌の交尾率 (交配 1~5 日)									
	受精率(雄)									
	妊娠率(雌)									
	妊娠日数									
新生児出産率										
肉眼的病理検査	雄									
	雌									

空欄：著変なし

()：参考データ

↑：増加

↓：減少

表中の数値[]は変動の目安として対照群を 100 とした場合の数を示す。

*：p ≤ 0.05 (t 検定法)

**：p ≤ 0.01 (t 検定法)

***：切迫屠殺

がみられた。

****：全交配期は 20 日間

(次頁へつづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

(繁殖試験相：親動物 つづき)

世 代			親：F0 児：(F1)			親：F1 児：(F2)		
投与量 (ppm)			1000	5000	25000	1000	5000	25000
臓器 重量	絶対重量	雄						
		雌	—	—	—			
	対体重比	雄						
		雌	—	—	—			

空欄：著変なし

↑：増加

↓：減少

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の数を示す。

*：p ≤ 0.05 (t 検定法)

**：p ≤ 0.01 (t 検定法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

検体摂取量；次表のとおりである。

検体摂取量 (mg/kg/day)

世 代		F0 親			F1 親		
投与量 (ppm)		1000	5000	25000	1000	5000	25000
生育期 の初期	雄						
	雌						
生育期 の末期	雄						
	雌						
平 均	雄	85	396	2116	90	452	2205
	雌	89	445	2470	94	474	2407
F0 と F1 の平均	ppm	1000		5000	25000		
	雄	87.5		424	2186		
	雌	91.5		460	2439		

繁殖性検査；F0 親世代においては、繁殖性検査の指標（雌の交尾率、雌雄の妊娠率、妊娠日数、新生児出産率、分娩状況）に対する検体投与の影響は全く認められなかった。また、非妊娠雌の生殖器官は肉眼的に正常であった。

F1 親世代においては、雌の妊娠率が 5000 ppm 及び 25000 ppm 投与群でわずかに低かったが明確な用量関連性も統計学的有意差もなかった。また、生存児出産率はすべての群で同等であった。

[申請者注]分娩状況の調査内容については「繁殖性検査」で言及している。

肉眼的病理検査；F0 親世代の雄においては腎臓の病変が認められたが、対照群で 1 例、投与量 1000ppm で 2 例、5000ppm で 2 例、25000ppm で 1 例と投与量との相関性は見られなかった。F0 親世代の雌には肉眼的病変は全く認められなかった。

臓器重量；F0 親世代については雄の精巣重量のみを検討対象としたが、いずれの投与群の精巣にも統計学的に有意な変動は認められなかった。

F1 世代動物においては、25000 ppm 投与群の雄で甲状腺の絶対重量及び対体重比に統計学的に有意な高値が、また、同群の雌で肝臓の絶対重量及び対体重比に統計学的に有意な低値が認められ、検体投与による影響と考えられた。その他の臓器にも統計学的に有意な変動が認められたが、絶対重量或いは対体重比のいずれかの変化、又は用量相関性のない変化であることから、検体投与による影響とは考えられなかった。

病理組織学的検査；F0 及び F1 親動物の精巣に検体投与に関連した変化は認められなかった。また、F1 親世代の雌雄においては、軽度～中程度のウイルス性肺炎と考えられる肉眼的変化が概ね全例の動物に認められたが、検体投与に起因すると考えられる病変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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

2) F1 及び F2 児動物 (次表を参照)

新生児数、死産児数、異常新生児数；F1 及び F2 児動物における新生児数が、統計学的には有意ではなかったが、5000 ppm 及び 25000 ppm 投与群で少なく、検体投与による影響が示唆された。死産児数及び異常新生児数はいずれの投与群でも散発的な発生で検体投与との関連性はなかった。なお、F1 児動物の投与群で認められた異常児動物はいずれも小眼球症又は無眼球症であり、F2 児動物の投与群では小～無眼球症 (1 例) 及び横隔膜ヘルニア (1 例) が認められた。

児動物の性比；哺育 0 及び 30 日に調べた F1 及び F2 新生児の性比に検体投与と関連する変化は認められなかった。

1 腹当たりの新生児数；哺育 0～30 日における 1 腹当たりの新生児数は、F1 新生児においては 5000 ppm 及び 25000 ppm 投与群で統計学的に有意に低下した。しかしながら、F2 新生児の場合にはこのような低下は認められなかったことから、F1 新生児で認められた変動は検体投与による明らかな影響とは考えられなかった (申請者の判断)。

新生児生存率及び哺育率；哺育期間における F1 及び F2 新生児生存率及び哺育 4～25 日の F1 及び F2 新生児生存率 (=哺育率) に統計学的に有意な変動は認められなかった。

新生児体重；哺育期間における F1 及び F2 新生児ともに、統計学的に有意に高い体重が 5000 ppm 投与群にのみ認められた。しかしながら、用量相関性のない変動であるため、検体投与による変動とは考えられなかった。

肉眼的病理検査；離乳時に剖検した F1 児動物の雌雄 [各群 5 頭, 全 8 群で 40 頭] では、過半数の動物に肺の変色病変が認められた。病理組織学的検査の結果、18 頭がウイルス性と考えられる肺炎と判明した。本報告ではこれらの病変はラットでは通常のものとしている。その他にも肉眼的病変が認められたが、いずれも検体投与に起因する病変とは考えられなかった。

臓器重量；離乳時に剖検した F1 児動物の雌雄における臓器重量では、肝臓の絶対重量及び対体重比が 25000 ppm 投与群の雌で減少し、検体投与による影響と考えられた (申請者の判断)。その他の臓器にも統計学的に有意な変動が認められたが、絶対重量或いは対体重比のいずれかの変化、又は用量相関性のない変化であるため、検体投与による影響とは考えられなかった。

病理組織学的検査；離乳時に剖検した F1 児動物の雌雄に、軽度～中程度のウイルス性肺炎と考えられる病変がいずれの群の動物にも認められた。その他の病変は主として肝臓及び腎臓に認められたが、発生頻度が低く、検体投与とは関連しないと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

(繁殖試験相：児動物)

世 代		親：(F0)		児：F1		親：(F1)		児：F2	
投与量(ppm)		1000	5000	25000	1000	5000	25000		
性 比	哺育0日								
	哺育30日								
妊娠母動物数									
生存児保有腹数									
生存児数									
死産児数									
異常 新生児数	無眼球症								
	小眼球症								
	横隔膜ヘルニア								
1腹当 たり生 存 新生児数	哺育0日								
	哺育4日								
	哺育11日								
	哺育18日								
	哺育25日								
	哺育30日								
新生児 生存率	哺育4日								
	哺育11日								
	哺育18日								
	哺育25日								
	哺育30日								
哺育率(哺育4~25日の新生児生存率)									
体 重	哺育0日								
	哺育4日								
	哺育11日								
	哺育18日								
	哺育25日								
	哺育30日								
肉眼的病理検査									
F1児動物 の離乳時 臓器重量	絶対 重量	雄							
		雌							
	対体 重比	雄							
		雌							
離乳時における 病理組織学的検査									

空欄：著変なし

()：参考データ

↑：増加

↓：減少

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の数を示す

*：p ≤ 0.05 (t検定法)

**：p ≤ 0.01 (t検定法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

3) F2 離乳児 (離乳後 30 日間検体無添加飼料で飼育)

F2 離乳児で認められた結果の概要を次表に示す。

死亡率及び一般状態 ; F2 離乳動物の離乳後の 30 日間、検体無添加飼料で飼育した。
5000ppm 投与群の雌で死亡例が見られた。報告によればこの雌は同じケージの仲間により損傷を受け、死因は特定できなかつたとしている。

体 重 ; F2 離乳動物の離乳後の 30 日間に、検体投与に起因すると考えられる変動は認められなかつた。

(F2 離乳動物)

世 代		F2 離乳動物 (31~61 日齢)		
投与量 (ppm)		1000	5000	25000
供試動物数	雄	74	48	62
	雌	82	46	72
一 般 状 態				
体 重	雄			
	雌			
肉眼的病理検査	雄			
	雌			
臓器重量	絶対重量	雄		
		雌		
	対体重比	雄		
		雌		
病理組織学的検査	雄			
	雌			

空欄 : 著変なし

↑ : 増加

↓ : 減少

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の数を示す

* : $p \leq 0.05$ (t 検定法)

** : $p \leq 0.01$ (t 検定法)

肉眼的病理検査 ; 検体投与に起因すると考えられる病変は認められなかつた。

臓器重量 ; F2 離乳児を 30 日間検体無添加飼料で飼育した後には、25000 ppm 投与群の雄で腎臓の絶対重量及び対体重比に統計学的に有意な高値が、また、雌で甲状腺及び下垂体の絶対重量及び対体重比に統計学的に有意な高値が認められ、検体投与による影響と考えられた (申請者の判断)。その他の臓器にも統計学的に有意な変動が認められたが、絶対重量或いは対体重比のいずれかの変化、又は用量相関性のない変化であることから、検体投与による影響とは考えられなかつた。

病理組織学的検査 ; F2 離乳児を離乳後 30 日間飼育してから剖検した結果、対照群を含む各投与群の雄では 3~5 例ずつに、また、雌の概ね全例に軽度~中程度のウイ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

ルス性肺炎と考えられる肉眼的変化が認められた。検体投与に起因すると考えられる病変は認められなかった。

以上の結果より、本検体をラットに2世代にわたって飼料混入投与した場合、親動物に対する影響として25000 ppmでは生育期間の体重の低下（雌）、F1親世代の雄で甲状腺重量の増加、雌で肝臓重量の低下並びに5000 ppm及び25000 ppmで妊娠率の軽度の低下が認められた。また、児動物に対する影響として5000 ppm及び25000 ppmで新生児数の低下並びに25000 ppmで肝臓重量の低下が認められ、離乳後30日間飼育したF2離乳児の雄で腎臓重量増加、雌で甲状腺重量及び下垂体重量の増加が認められた。

従って、無毒性量は親動物及び児動物に対して1000 ppm (F0:雄 85 mg/kg/day、雌 89 mg/kg/day、F1:雄 90 mg/kg/day、雌 94 mg/kg/day) であると判断された。

また繁殖性への影響として、5000ppmで妊娠率の軽度の低下、児動物に対する影響として同じく5000ppmで新生児数の低下が認められたところから、親動物、児動物への繁殖性に関する無毒性量も1000ppm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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

2) ラットにおける催奇形性試験

(資料 No. 18)

検体の純度： アシュラム [申請者注]酸としてのアシュラムを指す

供試動物：妊娠 1～4 日（交尾確認日＝妊娠 1 日）の CD 系雌ラット、1 群 28 匹、導入時の体重 約 200 g（この体重から供試動物は導入時に 65～70 日齢と推定される）。

投与期間：妊娠 5～17 日の 13 日間（試験実施上の投与期間：1980 年 2 月 2～23 日）。

投与方法：検体を 0.25%w/v トラガカントゴム水溶液に懸濁し、妊娠動物に妊娠 5～17 日（計 13 日間）の投与期間に投与量 500、1000 及び 1500 mg/kg/day（純度 100% として）で 1 日 1 回、強制経口投与した。投与容量を 5 mL/kg/day とした。なお、対照群の動物にはトラガカントゴム水溶液のみを同様に投与した。

観察・検査項目：親動物の一般状態及び生死を毎日観察した。切迫屠殺動物あるいは死亡動物については、可能な限り肉眼的病理検査を実施した。体重を供試動物の受領日、並びに妊娠 5、8、11、14、18 及び 22 日に測定した。摂餌量を毎週 3 回測定した。妊娠 22 日に供試動物を二酸化炭素により安楽死させて帝王切開し、黄体数、生存胎児数、早期死亡胚（胎児）数及び後期死亡胚（胎児）数を検査した。生存胎児を摘出してペントバルビタールナトリウムの胸腔内注射により致死させ、体重測定及び性別の判定を行い、外表、腹腔内、及び胸腔内の臓器及び組織を肉眼的に検査した。胎盤又は羊水の異常の有無についても観察した。外見上非妊娠の雌動物の子宮及び肉眼的に着床部位が認められない子宮角については、Salewski (1964) の方法により着床部位を確認した。いずれの生存胎児についてもブアン液で固定した脳を粗大切片法により、また、アリザリンレッド S 染色した骨格標本を解剖顕微鏡下で検査した。なお、比率の計算には次の式を用いた。

$$\text{着床前胚損失率 (\%)} = \frac{\text{黄体数} - \text{着床数}}{\text{黄体数}} \times 100$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

$$\text{着床後胚損失率 (\%)} = \frac{\text{着床数} - \text{生存胎児数}}{\text{着床数}} \times 100$$

なお、黄体数より着床数が多い場合には着床前胚損失率を0%とした。

結果：結果の概要を次頁以降の表に示す。

親動物の一般状態、体重及び摂餌量；1000 mg/kg/day 投与群の1例が誤挿管により死亡した。本例は非妊娠動物であったため群平均の検討から除外した。1500 mg/kg/day 投与群の3例が死亡した（2例は誤挿管、1例は死因不明）。これらの動物はいずれも妊娠していたため妊娠率の計算には含めたが、胎児の検討からは除外した。500 mg/kg/day 投与群の2例が早産したため、これらの動物を胎児の検討から除外した。生存胎児が認められた妊娠動物の体重が、統計学的には有意ではなかったが、1500 mg/kg/day 投与群で投与期間においてのみ軽度低下した。摂餌量に検体投与による影響は認められなかった。

親動物の妊娠率、黄体数、着床数、着床前及び着床後胚損失率、早期及び後期吸収胚（胎児）数、並びに肉眼的病理検査；1500 mg/kg/day 投与群の着床数が軽度に少なかった。500、1000及び1500 mg/kg/day 投与群で着床前胚損失率が統計学的には有意ではなかったが、対照群より高かった。しかしながら、申請者は500 mg/kg/day 投与群の着床前胚損失率は対照群と比べて変動の程度が大きくないことから、検体投与による影響ではないと考える。早期吸収胚（胎児）数が1000及び1500 mg/kg/day 投与群で多く、検体投与による影響が示唆された（申請者の判断）。1500 mg/kg/day 投与群で着床後胚損失率が統計学的には有意ではなかったが、僅かに上昇した。しかしながら、申請者はこの変動の程度は対照群と比べて僅かであり、投与用量との関連性が認められないので検体投与による影響ではないと考える。後期吸収胚（胎児）数及び帝王切開した動物の肉眼的病理検査結果には検体投与によると考えられる変動は認められなかった。親動物の各所見について、統計学的な有意差は認められなかった。

胎児数、性比、胎児体重、大奇形及び小奇形；1500 mg/kg/day 投与群の総生存胎児数及び平均1腹生存胎児数が、統計学的には有意ではなかったが、対照群より少なく、検体投与による影響と考えられた（Fisher 正確検定を実施）。性比及び生存胎児の平均体重に群間差は認められなかった。大奇形は1500 mg/kg/day 投与群の1例（小眼球）に認められたに過ぎなかった。小奇形に関しては、対照群の発生数がいずれの検体投与群より多かった。したがって、検体投与による奇形の誘発は認められなかった。

以上の結果より、本検体を妊娠ラットに投与すると、親動物に対しては1500 mg/kg/day で体重増加量の減少が認められた。胎児に対しては1000及び1500 mg/kg/day で着床前胚損失率の上昇及び早期吸収胚（胎児）数の増加が認められ、更に、1500 mg/kg/day で生存胎児数の減少が認められた。したがって、検体の無毒性量は親動物に対しては1000 mg/kg/day、胎児に対しては500 mg/kg/day であると判断される。また、最高投与量である1500 mg/kg/day でも胎児に対して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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

投与量 (mg/kg/day)		0	500	1000	1500	
親 動 物	供試動物数 (交尾確認動物数)	28	28	28	28	
	一般状態					
	死亡動物数					
	死因					
	体重増加量 (g) (妊娠 5~18 日)					
	摂餌量 ³⁾ (妊娠 5~18 日)					
	検査動物数 (妊娠動物数)					
	統計学的検討 に用いた腹数					
	着床 所見	黄体数 ⁵⁾				
		着床数 ⁵⁾				
		着床前胚損失率 ⁵⁾				
		着床後胚損失率 ⁵⁾				
		早期吸収胚 (胎児)数				
		後期吸収胚 (胎児)数				
	肉眼的病理所見 (妊娠 22 日)					

- 1) 妊娠 7 日に妊娠の確証のない 1 例が死亡。本例を群平均の計算から除外した。
- 2) 妊娠動物 3 例が死亡。妊娠動物としてカウントしたが、腹平均の計算から除外した。
- 3) g/rat/day
- 4) 早産した 2 例を群平均の計算から除外した。
- 5) 腹当たりで計算した値を示した。

空欄：著変なし

t 検定法または多重 t 検定法、Mann-Whitney の U 検定法、
 χ^2 検定、Fisher の直接確率法または Mann-Whitney の U 検定法

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

投与量 (mg/kg/day)		0	500	1000	1500	
児 動 物	総生存胎児数					
	平均1腹生存胎児数					
	性比 (♂/♀)					
	平均体重 (g)					
	外表					
	内臓					
	骨					
格						
発生数	総胎児数					
	腹数					

空欄： 著変なし []：所見が認められた胎児を有する腹数

Fisher 正確検定 ↑/↓ : 0.01 < p ≤ 0.05 ↑↑/↓↓ : p ≤ 0.01 ↑↑↑/↓↓↓ : p ≤ 0.001

6) 発生率 (%) の計算には次式を用いた；

$$\text{発生率 (\%)} = \frac{\text{群内の各腹における奇形の発生率 (\%) の合計}}{\text{群内の腹数}}$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

3) ラットにおける催奇形性試験

(資料 No. 19)

検体の純度： アシュラム [申請者注]酸としてのアシュラムを指す

供試動物：CD系雌ラット、1群20匹、試験開始時体重：196～241 g

投与期間：妊娠6～15日の10日間（試験期間：1981年12月8日～1982年1月29日）

投与方法：検体を0.25%w/vトラガカントゴム水溶液に懸濁し、妊娠動物に妊娠6～15日（計10日間）の投与期間に投与量500、1000及び2000 mg/kg/dayで1日1回、強制経口投与した。投与容量を10 mL/kg/dayとした。なお、投与容量はその日の体重に基づいて決定した。対照群の動物にはトラガカントゴム水溶液のみを同様に投与した。臏垢塗抹標本中に精子が認められた日、または臏栓が認められた日を妊娠第1日とした。

観察・検査項目：親動物の一般状態及び生死を、試験期間中毎日観察した。投与に対する反応徴候が認められた場合、その種類、程度、発症の時期及び持続期間を記録した。体重を妊娠1日、3日、6～15日、18日及び21日に測定した。摂餌量を妊娠1～2日、3～5日、6～8日、9～11日、12～15日、16～17日及び18～20日に測定した。妊娠21日に動物を二酸化炭素により安楽死させて帝王切開し、黄体数、各子宮角内着床部位数、着床吸収部位数（前期、後期）、生存胎児数及び死亡胎児数を検査した。

各胎児について性を判別して体重を測定し、外形異常を記録した。各胎盤重量を測定し、肉眼的異常を記録した。各同腹児の2/3について、頭腔、胸腔、腹腔を切開して検査した。必要な場合には低倍率で拡大して調べた。異常は全て記録した。これらの胎児についてはドーソンの染色法の改良法により染色し、骨格検査に供した。各同腹児の残りの1/3の胎児はブアン固定し、ウィルソンのフリーハンド連続切片作成法で検査した。

なお、比率の計算には次の式を用いた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

$$\text{着床前胚損失率 (\%)} = \frac{\text{黄体数} - \text{着床数}}{\text{黄体数}} \times 100$$

$$\text{着床後胚損失率 (\%)} = \frac{\text{着床数} - \text{生存胎児数}}{\text{着床数}} \times 100$$

結 果：結果の概要を次頁以降の表に示す。

親動物の一般状態、体重及び摂餌量；試験期間中死亡はみられず、一般症状、体重及び摂餌量は全投与群において対照群と同等であった。

親動物の妊娠率、黄体数、着床数、着床前及び着床後胚損失率並びに肉眼的病理検査；いずれの投与群の妊娠率、黄体数、着床数及び着床後胚損失率も対照群と比較して有意な差はなかった。

胎児数、性比、胎児体重及び胎盤重量；いずれの投与群の胎児数、性比、胎児体重及び胎盤重量も対照群と比較して有意な差はなかった。

胎児の外形、内臓、骨格異常；500 mg/kg/day 投与群の 1 胎児において鎖肛が認められた。これを含め、認められた異常は当試験施設においてこの系統のラットに通常観察されるものであり、投与に関連した外形、内臓、骨格異常はみられなかった。

以上の結果より、妊娠ラットに本検体の 500、1000 及び 2000 mg/kg/day を投与した場合、親動物の体重増加、摂餌量及び胚と胎児の生存率及び発育に影響のないことが判明した。したがって、検体の無毒性量は親動物及び胎児ともに 2000 mg/kg/day であると判断される。また、最高投与量である 2000 mg/kg/day でも胎児に対して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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

投与量 (mg/kg/day)		0	500	1000	2000
親	供試動物数	20	20	20	20
	一般状態				
	死亡動物数				
	体重増加量 (g) (妊娠 6~15 日)				
	摂餌量				
	検査動物数				
動物	着床所見 (腹当たり)	黄体数			
		着床数			
		着床前胚損失率			
		着床後胚損失率			
		早期吸収胚 (胎児) 数			
		後期吸収胚 (胎児) 数			
	肉眼的病理所見 (妊娠 21 日)				

空欄：異常なし

t 検定法または多重 t 検定法、Mann-Whitney の U 検定法、

χ^2 検定、Fisher の直接確率法または Mann-Whitney の U 検定法

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

投与量 (mg/kg/day)		0	500	1000	2000	
胎 児	平均 1 腹生存胎児数					
	性比 (♂/♀)					
	平均体重 (g)					
	平均胎盤重量 (g)					
	外形異常	検査胎児数				
		腹数				
		小胎児 (3.0g 未満) (%)				
		大胎児 (4.5g 以上) (%)				
		鎖肛 (%)				
	内臓異常	検査胎児数				
		腹数				

— : 該当なし。 {} : 所見が認められた胎児を有する腹数。 () : 検査胎児を母数とした奇形の発生率。

Fisher 正確検定 ↑/↓ : $0.01 < p \leq 0.05$ ↑↑/↓↓ : $p \leq 0.01$ ↑↑↑/↓↓↓ : $p \leq 0.001$

(次頁へつづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

投与量 (mg/kg/day)		0	500	1000	2000	
胎 児	骨 格 異 常	検査胎児数				
		腹数				

— : 該当なし。 [] : 所見が認められた胎児を有する腹数。 () : 検査胎児を母数とした奇形の発生率。

Fisher 正確検定 ↑/↓ : $0.01 < p \leq 0.05$ ↑↑/↓↓ : $p \leq 0.01$ ↑↑↑/↓↓↓ : $p \leq 0.001$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

胎児異常の背景データ

投与量 (mg/kg/day)		0	500	1000	2000	背景データ*
外形等異常						
内臓異常						
内臓異常 (連続切片法)						
骨格異常						

* : 上段出現頻度の平均値、下段出現頻度の範囲

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

4) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 No. 20)

検体の純度： アシュラム [申請者注]酸としてのアシュラムを指す

供試動物：ニュージーランドホワイト種の妊娠 0 日の雌ウサギ（体重約 3 kg）、1 群 15 匹以上（但し、陽性対照群の場合は 11 匹）。

性成熟した処女雌ウサギを同系の授精能を有する雄動物と 1:1 で交配し、交尾が確認された雌動物を各群に配分した。特定の雄動物による妊娠雌動物が群間で偏らないようにした。なお、交尾確認日を妊娠 0 日とした。

投与期間：妊娠 5～20 日の 16 日間（実施の投与期間：1980 年 4 月 26 日～同年 8 月 3 日）

投与方法：検体を 0.25%w/v トラガカントゴム水溶液に懸濁し、妊娠雌動物に妊娠 5～20 日（計 16 日間）の投与期間に投与量 150、300、750 及び 1500 mg/kg/day（純度 100%として）で 1 日 1 回、強制経口投与した。投与容量を 5 mL/kg/day とした。溶媒対照群の動物には懸濁液のみを同様に投与した。妊娠 5、9、13 及び 17 日の体重に基づき投与量を調整した。

なお、1500 mg/kg/day では投与開始直後より体重増加量の減少、摂餌量の低下、一般状態の悪化、妊娠 10 日以降に死亡、瀕死状態等が認められたため、最高投与量を 750 mg/kg/day とした。

更に、本試験においては陽性対照群（妊娠雌動物 11 匹）を設け、サリドマイド 150 mg/kg/day をゼラチンカプセルに封入して上記の投与期間に経口投与した。

観察・検査項目：親動物の一般状態及び生死を毎日観察した。切迫屠殺動物あるいは死亡動物については、可能な限り肉眼的病理検査に供した。体重及び摂餌量を妊娠 0、5、9、13、17、21、25 及び 29 日に測定した。妊娠 29 日に供試動物をペントバルビタールナトリウムの静脈内投与により致死させ、肉眼的病理検査に供し、子宮及び卵巣を摘出して黄体数、生存胎児数、早期死亡胚（胎児）数及び後期死亡胚（胎児）数を検査した。生存胎児を摘出してペントバルビタール注射により致死させ、体重測定及び性別の判定を行った。更に、外表、腹腔内及び胸

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

腔内の臓器及び組織を肉眼的に検査し、胎盤又は羊水の異常の有無についても観察した。いずれの生存胎児についても脳をブアン液で固定後に、また、心臓をホルマリン生食水で固定後に粗大切片を作製して検査した。更に、アリザリンレッドS染色した骨格標本を検査した。
なお、比率の計算には次の式を用いた。

$$\text{着床前胚損失率 (\%)} = \frac{\text{黄体数} - \text{着床数}}{\text{黄体数}} \times 100$$

$$\text{着床後胚損失率 (\%)} = \frac{\text{着床数} - \text{生存胎児数}}{\text{着床数}} \times 100$$

$$\text{1 腹平均胎児体重} = \frac{\text{1 腹の総生存胎児体重}}{\text{1 腹の総生存胎児数}}$$

$$\text{群平均胎児体重} = \frac{\text{当該群の 1 腹平均胎児体重の合計}}{\text{当該群の総腹数}}$$

$$\begin{aligned} & \text{当該群の平均大奇形 (又は小奇形) 発生率 (\%)} \\ & = \frac{\text{当該群の各腹の大奇形 (又は小奇形) 発生率 (\%) の合計}}{\text{当該群の総検査腹数}} \end{aligned}$$

結 果：結果の概要を次頁以降の表に示す。

親動物の一般状態、体重及び摂餌量；溶媒対照群、検体 150、300、750 mg/kg/day 投与群及び陽性対照（サリドマイド）群でそれぞれ 10、9、5、5 及び 1 例の死亡又は切迫屠殺動物が認められた。但し、これらのうちそれぞれ 6 (1)、7 (1)、4 (1)、4 (1)、及び 0 (0) 例が誤挿管（又は投与時に生じた骨折）に起因するもので、検体の毒性に起因するものではなかった。

体重増加量に関しては統計学的には有意ではなかったが、検体 750 mg/kg/day 投与群で投与期間である妊娠 5～21 日の体重増加量が著しく低かった。この低い体重増加量には検体投与期間の終了後に著しい改善が認められた。その他の検体投与群の体重増加量は溶媒対照群と同等であった。一方、陽性対照（サリドマイド）群の体重増加量は投与開始後より試験終了時まで著しく低かった。

摂餌量に関しても統計学的には有意ではなかったが、検体 750 mg/kg/day 投与群で妊娠 5～17 日に低い値が認められた。その他の検体投与群の摂餌量は溶媒対照群と同等であった。一方、陽性対照（サリドマイド）群においては妊娠 5～13 日に著しく低かった。

親動物の黄体数、着床数、着床前及び着床後胚損失率、早期及び後期吸収胚（胎児）数、並びに肉眼的病理検査；親動物の黄体数および着床数を、溶媒対象群、検体投与群および陽性対照（サリドマイド）群のそれぞれと比較すると、溶媒対象群では

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

10.4 および 9.3, 検体投与群では 10.3~10.9 および 8.7~9.1, 陽性対照 (サリドマイド) 群では 10.8 および 8.7 とほとんど変わらなかった。

着床前胚損失率が統計学的に有意な差は認められなかったが、検体の 150 及び 750 mg/kg/day 投与群で溶媒対照群より僅かに高かった。しかしながら、申請者は 150 mg/kg/day 投与群における着床前胚損失率の高値は用量相関性を伴わないので、検体投与による変化ではないと考える。早期吸収胚 (胎児) 数が検体 300 mg/kg/day 投与群で多かった。しかしながら、申請者はこの高値には用量相関性が認められないため、検体投与による影響ではないと考える。陽性対照 (サリドマイド) 群では着床前胚損失率の明らかな上昇及び早期吸収胚 (胎児) 数の増加が認められた。

着床後胚損失率及び後期吸収胚 (胎児) 数が統計学的には有意ではなかったが、検体 300 及び 750 mg/kg/day 投与群で幾分高く、検体投与による影響が示唆された (申請者の判断)。一方、陽性対照 (サリドマイド) 群においては着床後胚損失率が統計学的に有意に上昇し、後期吸収胚 (胎児) 数の増加との関連性が示された。

帝王切開した動物の肉眼的病理検査結果には検体又はサリドマイドの毒性によると考えられる変化は認められなかった。

胎児数、性比、胎児体重、大奇形及び小奇形; 検体投与群の平均 1 腹生存胎児数、性比及び群平均胎児体重は本質的に溶媒対照群と同等であった。一方、陽性対照 (サリドマイド) 群では平均 1 腹生存胎児数が少なかった。

大奇形としては、検体投与群では 300 mg/kg/day 投与群に 2 例 (片側性腎臓と尿管の無発生 1 例、及び水頭症 1 例) 及び 750 mg/kg/day 投与群に 2 例 (臍帯附着部の前方移動・肺中間葉無発生等の複合奇形 1 例及び単眼・長鼻・小口・小顎等の複合奇形 1 例) のみに過ぎず、検体投与による影響は認められなかった。陽性対照 (サリドマイド) 群の大奇形としては、主として種々の複合奇形が 19 例の胎児に認められた。認められた小奇形の殆どが未骨化、骨化遅延、癒合等であったが、検体投与群及び陽性対照 (サリドマイド) 群の小奇形発生率は溶媒対照群と同等であった。

以上の結果より、本検体を妊娠ウサギに投与すると、親動物に対しては 750 mg/kg/day で体重増加量及び摂餌量の減少が認められた。児動物に対しては 300 及び 750 mg/kg/day で着床後胚損失率の上昇及び後期吸収胚 (胎児) 数の増加が示唆され、また、750 mg/kg/day で着床前胚損失率の上昇が認められた。したがって、本検体の無毒性量は親動物に対しては 300 mg/kg/day であると判断されるが、胎児に対しては 150 mg/kg/day であることが示唆された。また、最高投与量である 750 mg/kg/day でも胎児に対して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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

投与量 (mg/kg/day)		溶媒対照	検体			陽性対照 ¹⁾
		0	150	300	750	150
母動物						
交尾確認雌動物数						
妊娠雌動物数						
腹数						
一般状態						
死亡動物数						
体重 増加量 (kg)	妊娠 5~21 日					
	妊娠 5~29 日					
摂餌量 (g/動物 /日)	妊娠 5~9 日					
	妊娠 9~13 日					
	妊娠 13~17 日					
	妊娠 17~21 日					
着床所見	黄体数 ³⁾					
	着床数 ³⁾					
	着床前 胚損失率 ³⁾					
	着床後 胚損失率 ³⁾					
	早期吸収胚 (胎児)数					
	後期吸収胚 (胎児)数					
肉眼的病理所見 (妊娠 29 日)						

△△ : p ≤ 0.05 (t 検定法)

1) 陽性対照物質 : サリドマイド

2) 吸収胚のみの雌 1 例のデータを含む

3) 腹当たりで計算した値を示す

空欄 : 著変なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

投 与 量 (mg/kg/day)	溶媒対照	検 体			陽性対照 ¹⁾
	0	150	300	750	150
生 存 胎 児					
総 生 存 胎 児 数					
平均 1 腹 生 存 胎 児 数					
性 比 (♂/♀)					
群 平 均 体 重 (g)					
検 査 胎 児 数					
腹 数					
骨 格					
内 臓					
外 表					

Fisher 正確検定 ↑/↓ : $0.01 < p \leq 0.05$, ↑↑/↓↓ : $p \leq 0.01$, ↑↑↑/↓↓↓ : $p \leq 0.001$

[] : 所見が認められた胎児を有する腹数

1) 陽性対照物質 : サリドマイド

空欄 : 著変なし

* : 骨格を検査する際に損傷した胎児は検査胎児数に含めていない

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

(9) 変異原性

1) 細菌を用いた突然変異誘起性試験

(資料No. 21)

検体の純度： アシユラム-Na

1. Rec-assay

試験方法：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、-80°Cに保存した両株を融解後、小型ピペットを用いて B-2 寒天培地上に出発点が接触しないようにストリークした。検体は滅菌蒸留水に溶解した。直径 10 mm の濾紙に検体を 0.02 mL 染ませ、ストリークの開始点をおおうように置き、37°C で一夜培養後、阻止帯の長さを測定した。陰性対照として Kanamycin、陽性対照として Mitomycin C を用いた。

試験結果：結果を次の表 1 に示す。

表 1 Rec-assay 結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	阻止域(mm)		差(mm)
		M-45	H-17	
対照(H ₂ O)		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
Kanamycin	10	8	8	0
Mitomycin C	0.1	10.5	1.5	9

検体は M-45 及び H-17 株にすべての濃度で全く阻止帯を誘起しなかった。一方、陽性対照として用いた Mitomycin C では両株の間に著明な生育阻止の差を生じ、陰性対照として用いた Kanamycin では両株に同じ長さの生育阻止帯を認めた。

本検体の Rec-assay における変異原性は陰性であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

2. 復帰突然変異試験

試験方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* の5株 (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *hcr* の1株を用い、PCBで酵素誘導したSD系雄ラットの肝臓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らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は滅菌蒸留水に溶解し、S-9 Mixの非存在下で10~3000 µg/プレートの6濃度で、S-9 Mixの存在下で10~1000 µg/プレートの5濃度で試験を実施した。試験は2連制とした。

試験結果: 結果を次ページの表2に示す。

検体はS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの濃度においても対照に比べ復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いたAF-2 (フリルフラマイド)、 β -propiolactone、9-aminoacridine、2-nitrofluoreneではS-9 Mixの非存在下で著明な増加を認めた。また、2-aminoanthraceneではS-9 Mixを加えることにより活性化され、TA1535、TA100、TA1537、TA1538、TA98株に著明な復帰変異を誘起した。

本検体の復帰突然変異試験における変異原性は陰性であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

表 2 復帰突然変異試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix	復帰変異 colony 数/plate					
			Base-change 型			Frame-shift 型		
			WP2 <i>hcr</i>	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
溶媒対照 (H ₂ O)		-						
検体	10	-						
	50	-						
	100	-						
	500	-						
	1000	-						
	3000	-						
溶媒対照 (H ₂ O)		+						
検体	10	+						
	50	+						
	100	+						
	500	+						
	1000	+						
2-amino- anthracene	10	-						
	10	+						
陽性対照		-						

- a) 0.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ furyl furamide b) 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ β -propiolactone
c) 0.05 $\mu\text{g}/\text{plate}$ furyl furamide d) 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 9-aminoacridine
e) 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 2-nitrofluorene f) 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ furyl furamide

[申請者注] 菌の生育阻害について報告書に記載なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

3. 宿主経路試験

投与量設定根拠：LD₅₀ 値を基準として、数段階の量をマウスに経口投与して臨床症状を観察した。その結果に基づき本試験の1回投与量を2000及び4000 mg/kgとした。

試験方法：検体は滅菌蒸留水に溶解させた。試験には日本クレアより購入したICR系雄マウス（7週齢、体重30.8±0.8 g）を使用し、以下の4群（雄6匹/群）に分けた。

群	薬物	1回投与量 mg/kg	総投与量 mg/kg	匹数
対照群	H ₂ O			6
処置群	検体	2000	4000	6
処置群	検体	5000	10000	6
陽性対照群	DMN	50	50	6

DMN : dimethylnitrosamine

マウス用胃ゾンデを用い、20 mL/kgの容量で検体を24時間間隔で2回強制経口投与した。2回目の投与直後に、対数期の *Salmonella typhimurium* ヒスチジン要求性株 G46 (3.3×10⁸/mL) 2 mL をマウスの腹腔内に注入した。処置3時間後に頸椎脱臼でマウスを屠殺し、1/15M リン酸緩衝液 (pH7.0) 2 mL を腹腔内に注入し、滅菌注射筒を用いて腹腔内菌液を回収した。生存菌数測定には1/3×10⁻⁶希釈液を0.1 mL、復帰変異菌数測定には回収液0.4 mL を軟寒天液（ビオチンは含まない）に加え、各3枚ずつ最少寒天培地に拡げた。37°Cで2日間培養後、復帰変異コロニー数及び生存菌数を計数した。また、G46株を用いて *in vitro* 復帰変異試験を行った。

試験結果：結果を次ページの表3及び4に示す。

G46株を用いた *in vitro* 復帰変異試験の結果は陰性であった。

宿主経路試験では、対照群と比較して検体による復帰変異菌数の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照のDMN投与群では対照群と比較して著明な復帰変異菌数の増加が認められた。

本検体の宿主経路試験における変異原性は陰性であった。

以上3試験の結果、本検体の突然変異誘起性は陰性であると結論される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

表 3 *Salmonella typhimurium* G46 の復帰突然変異試験結果

検体 μg/plate	0	10	50	100	500	1000	3000	β-propiolactone 1000 μg/plate
復帰変異コ ニ-数/plate								

表 4 宿主経由試験結果

薬物	総投与量 mg/kg	復帰変異菌数 /mL	生存菌数 ×10 ⁻⁸ /mL	復帰変異菌数 /生存菌数	平均値±SD
溶媒対照 H ₂ O	0				
	0				
	0				
	0				
	0				
	0				
検体	2000×2				
	2000×2				
	2000×2				
	2000×2				
	2000×2				
	2000×2				
検体	5000×2				
	5000×2				
	5000×2				
	5000×2				
	5000×2				
	5000×2				
陽性対照 DMN	50				
	50				
	50				
	50				
	50				
	50				

*** : p<0.001 (t 検定法)

DMN : dimethylnitrosamine

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

2) 復帰変異試験

(資料 No. 22)

検体の純度： アシュラム
[申請者注]酸としてのアシュラムを指す

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株) を供試菌株として、代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いてプレインキュベーション法で変異原性を検定した。試験用量は TA100 株を用いた予備試験の結果から、S-9 mix の存否にかかわらず、検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、すべての菌株に対して 0.9、8.7、50.0、87.0、500、1000、及び 2000 µg/プレート の 7 用量で、各 3 枚のプレートをを用いて試験した。軟寒天液 2 mL を小試験管に小分けし、S-9 Mix 0.5 mL または 0.2M リン酸緩衝液を添加した。続いて菌液 0.1-0.2 mL、薬液 0.05-0.15 mL (添加濃度による) を加えてよく混合して、37°C、20 分のプレインキュベーション後、最少寒天培地上に拡げた。37°C で 2 日間培養後、復帰変異コロニー数をコロニーカウンターで計数した。

評価基準は、対照群のコロニー数が各菌株で設定された正常範囲内に入っていて、しかも検体のコロニー数が対照群の値の 2 倍以上 (TA98 及び TA100) ないし 3 倍以上 (TA1535、TA1537 及び TA1538) で用量相関性が認められたときに陽性と判断する。

試験結果：結果を次ページの表に示す。

検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、いずれの濃度においても溶媒対照 (DMSO) に比べ復帰変異コロニー数の 2 倍ないし 3 倍以上の増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いた化合物では顕著な増加が認められた。

結 論：以上の結果より、本検体は代謝活性化系の存在下または非存在下のいずれの条件においても復帰突然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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

表 復帰変異試験結果—各3枚の平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基置換型		フレームシフト型		
			TA1535	TA100	TA1538	TA98	TA1537
溶媒対照(DMSO)	(50 μL)	—					
検体	0.9	—					
	8.7	—					
	50.0	—					
	87.0	—					
	500	—					
	1000	—					
	2000	—					
溶媒対照(DMSO)	(50 μL)	+					
検体	0.9	+					
	8.7	+					
	50.0	+					
	87.0	+					
	500	+					
	1000	+					
	2000	+					
陽性対照	2-nitrofluorene	10	—				
	9-aminoacridine	75	—				
	sodium azide	10	—				
	2-aminoanthracene	2.5	+				

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

3) 復帰変異試験

(資料 No. 23)

検体の純度： アシュラム [申請者注]酸としてのアシュラムを指す

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株) を供試菌株として、代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いてプレート法で、各 3 枚のプレートを用いて試験した。検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、すべての菌株に対して 10、33、100、333 及び 1000 µg/プレートの 5 用量で試験を実施した。軟寒天液 2 mL を小試験管に小分けし、S-9 Mix 0.5 mL または 0.05M リン酸緩衝液を添加した。続いて菌液 0.1 mL、薬液 0.2 mL を加えてよく混合し、最少寒天培地上に拡げた。37°C で 2 日間培養後 (一部はそれ以上の時間培養した)、復帰変異コロニー数をコロニーカウンターで計数した。プレートは沈殿物についても検査し、微小コロニー増殖は顕微鏡によって確認した。

試験結果：結果を次ページの表に示す。

復帰変異コロニー数が溶媒対照群の平均値の 2 倍以上で、用量相関性が認められた場合に陽性と判断する。48 時間培養後の成績では検体の変異原性を示す結果は得られなかった。1000 µg/plate ではコロニー数が少なかったが、微小コロニー増殖が認められたので検体による殺菌作用ではないと考えられた。このプレートをさらに 36 時間培養 (84 時間培養) して再検査をしたところ、大きいコロニー増殖も認められたが、比較対照プレートの培養はしなかったので再度試験を行った。48 時間培養後の検査に続いてさらに 24 時間培養を行った (72 時間培養)。1000 µg/plate での 48 時間後は前回と同様微小コロニー増殖が認められ、72 時間培養後では大きいコロニーが出現したが、同時培養の対照群と比較しても変異原性は陰性であった。一方、代謝活性化が必要である陽性対照の 2-aminoanthracene では 2 回目の試験 (72 時間培養) の TA-100 を除いて著明なコロニー数増加を示した。

結論：以上の結果より、本検体は代謝活性化系の存在下または非存在下のいずれの条件においても復帰突然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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

表 復帰変異試験結果—表中の数値は3反復の平均値

薬物	添加量 (μg /plate)	塩基置換型				フレームシフト型					
		TA 1535		TA 100		TA 1537		TA 1538		TA 98	
		S-9 +	S-9 -	S-9 +	S-9 -	S-9 +	S-9 -	S-9 +	S-9 -	S-9 +	S-9 -
(a) 48 時間培養		復帰変異コロニー数									
溶媒対照 (DMSO)	(0.2 mL /plate)										
2-amino- anthracene	0.5										
検体	10										
	33										
	100										
	333										
	1000										
(b) 84 時間培養		復帰変異コロニー数									
検体	1000										
(c) 72 時間培養		復帰変異コロニー数									
溶媒対照 (DMSO)	(0.2 mL /plate)										
2-amino- anthracene	0.5										
検体	100										
	333										
	1000										

* : 菌の生育阻害が認められた

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

4) 復帰突然変異試験

(資料 No. 24)

検体純度： アシユラムナトリウム
[申請者注]酸としてのアシユラムを指す

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。
検体はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解し、62~5000 µg/プレートの範囲の 5 濃度で実施した。試験は 3 連制とし、プレート法で 1 回行った。
検体のプレートにおいて平均復帰変異コロニー数が濃度依存的に増加した場合、あるいは溶媒対照プレートでみられる平均復帰変異コロニー数の 2 倍以上の再現性のある増加が認められた場合に陽性反応と判定した。

試験結果：結果を次表に示した。

TA 1535 株の S9-mix 非存在下、TA 1537 株および WP2 *uvrA* 株の S9 mix 存在下および非存在下では 1667 µg/プレート以上、TA 1535 株の S9 mix 存在下、TA 98 株および TA 100 株の S9 mix 存在下および非存在下では 5000 µg/プレートで毒性 (復帰変異コロニー数の平均値が溶媒対照と比較して 50%以上低下) が認められた。

検体は、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても、毒性が認められた用量を含む最高用量 5000 µg/プレートまで、濃度依存的に、あるいは溶媒対照と比較して平均復帰変異コロニー数の増加を誘発しなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム (NaN₃)、9-アミノアクリジン (9-AA)、2-ニトロフルオレン (2-NF)、N-エチル-N-ニトロソウレア (ENU) では S9 mix 非存在下において、また、2-アミノアントラセン (2-AA)、ベンゾ(a)ピレン (BP) では S9 mix 存在下において、S9 mix 非存在下の TA1537 株を除いた各試験菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した (試験 1)。TA1537 株については再試験を行い、陽性対照における明らかな復帰変異コロニー数の増加を認めた (試験 2)。

以上の結果より、検体は代謝活性化の有無にかかわらず本試験条件下で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ユーピーエルジャパン株式会社にある。

試験1の結果

(表中の数値は3反復の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 <i>uvrA</i>	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (PBS)		—					
検体	62	—					
	185	—					
	556	—					
	1667	—					
	5000	—					
対照 (PBS)		+					
検体	62	+					
	185	+					
	556	+					
	1667	+					
	5000	+					
陽性 対照	NaN ₃	1.0	—				
	9-AA	80.0	—				
	2-NF	2.0	—				
	ENU	100	—				
	2-AA	2.0	+				
	2-AA	80.0	+				
	BP	4.0	+				

統計解析は実施していない。

* : 菌の生育阻害が認められた

陽性対照物質

NaN₃ : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-NF : 2-ニトロフルオレン

ENU : N-エチル-N-ニトロソウレア

2-AA : 2-アミノアントラセン

BP : ベンゾ(a)ピレン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はユーピーエルジャパン株式会社にある。

試験 2 の結果

(表中の数値は 3 反復の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の 有無	復帰変異コロニー数/ プレート
			フレームシフト型
			TA1537
対照 (PBS)		—	
検体	62	—	
	185	—	
	556	—	
	1667	—	
	5000	—	
陽性 対照	9-AA	80.0	—

統計解析は実施していない。

陽性対照物質

9-AA : 9-アミノアクリジン