

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

2) イヌを用いた強制経口投与による慢性毒性試験

(資料 25)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1985年

検体の純度 :

試験動物 : ビーグル犬, 1群雌雄各6匹, 開始時4~6ヶ月齢

試験期間 : 12ヶ月 (1983年7月26日~1984年7月27日)

投与方法 : 検体をゼラチンカプセルに封入し, 0, 1, 8及び64mg/kg/dayを, 1年間投与した。

検体の充填量は個体別体重変化に相応させ毎週調整した。

投与量設定のため, 予備投与試験を実施し, その結果を参考とした。

試験項目及び結果 :

一般状態及び死亡率 ; 一般状態及び生死を毎日観察した。

頭部のかしぎ, 回転の抑制失調および斜視が64mg/kg/day投与群雄1例に認められたが, 他の動物に同様な変化はなく検体投与との関連は認められなかった。

64mg/kg/day投与群雄の1例が48日目に死亡したが, 多発性気管支肺炎と急性胸膜炎と判断され, 検体投与に起因するものとは考えられなかったため, 交替動物を64日目から供試した。死亡は認められなかった。

体重変化 ; 体重を毎週測定した。

統計学的有意差を示す投与群はいずれの期間でも認められなかったが, 64mg/kg/day投与群の雄および, 8mg/kg/day以上の投与群の雌で対照群に比し有意差はないものの軽度の増加抑制が投与期間中認められ, 検体投与に伴う変化と考えられた。

摂餌量 ; 毎週測定した。

64mg/kg/day投与群の雄に最初の6週間, 摂餌量の減少が認められたが, それ以降は差は認めなかった。

血液学的検査 ; 投与開始1週間前, 投与後4, 8, 13, 25, 38および51週に全ての動物を対象として, 頸静脈より採血し, 白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 血小板数, 白血球百分率, 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), プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。

網赤血球数は貧血症状が認められない4, 8および25週にも全動物について測定した。

8mg/kg/day投与群の雌において, 8, 13, 25週検査時に血小板数がわずかに上昇したが, この変化の生物学的有意性は明らかでなかった。

64mg/kg/day投与群において, さまざまな検査時期に多くの変動が雌雄ともに認められた。分葉核好中球および白血球数が13週検査時の雌で上昇し, 赤血球数, ヘモグロビン量およびヘマトクリット値が, 8, 13, 25又は38週検査時に雌雄とも低下し, 血小板数が雌雄ともに, さまざまな検査時期に上昇した。しかしながらこれらの変化は51週検査時には, 対照群と統計的有意差はなく, 生物学的意義は明らかでなかった。

血液生化学検査 ; 上記の血液学的検査における同一の検査時期に全ての動物を対象として, その血清を用いて, ナトリウム, カリウム, 塩素, カルシウム, 無機リン, ALP, 総ビリルビン, GG T, AST (GOT), ALT (GPT), LDH, クレアチンホスフォキナーゼ, 尿素窒素,

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。
 クレアチニン、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アルブミン/グロブリン比、コレステロール、血糖および尿酸を測定した。
 下表に対照群と比べ、統計学的有意差の認められた項目を示す。

項目	投与群, 性別 検査時間 (週)		8 mg/kg/day												64mg/kg/day											
			雄						雌						雄						雌					
			4	8	13	25	38	51	4	8	13	25	38	51	4	8	13	25	38	51	4	8	13	25	38	51
カルシウム		↓												↓	↓	↓										
無機リン																									↑	
ALP																	↑	↑	↑							
ALT					↓									↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓					
LDH	↑								↓																	
尿素窒素																								↓		
クレアチニン														↓		↓										
総蛋白			↓	↓		↓							↓	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
アルブミン	↓				↓	↓							↓			↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓		
グロブリン				↓																						
コレステロール																	↑	↑	↑		↑				↑	
GGT				↓								↑				↓								↓	↓	

統計学的有意差：↓↑ P < 0.05, ↑↓ P < 0.01 (Student's t test)

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), 総蛋白およびアルブミンの低下は、検体投与に関連していると考えられた。その他の変化は投与期間あるいは投与量に相関せず、投与の影響とは判断しなかった。

コリンエステラーゼ活性検査；上記の血液学的検査における同一の検査時期に全ての動物を対象として、血漿コリンエステラーゼ活性及び赤血球コリンエステラーゼ活性を測定し、投与終了時に脳コリンエステラーゼ活性を測定した。なお、測定にはアセチル及びブチリルチオコリンの両基質を用いた。

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

8mg/kg/day以上の投与群で雌雄とも血漿コリンエステラーゼ活性に有意な低下が試験期間を通じ認められ、検体投与に関連するものと考えられた。

赤血球及び脳コリンエステラーゼ活性には検体投与の影響は認めなかった。

尿検査 ; 上記の血液学的検査における同一の検査時期に全ての動物を対象として、外観、沈査の顕微鏡的検査、比重、尿量、pH、蛋白、糖、潜血、亜硝酸塩、ビリルビン、ケトン体およびウロビリノーゲンを検査した。

各検査時期とも各投与群で対照群と統計学的有意差はなく、投与の影響は認められなかった。

眼検査 ; 投与開始前、投与後26週及び53週時に全ての動物を対象として検査した。各検査時期また各投与群とも検体投与による影響と考えられる異常は認められなかった。

臓器重量 ; 試験終了時の全生存動物を対象として、解剖ののち、副腎、脳および脳幹、心、腎、肝、肺および気管支、卵巣、脳下垂体、脾、精巣、甲状腺および副甲状腺の重量を測定した。

また対体重比も算出した。

64mg/kg/day投与群雌雄で腎の対体重比の統計学的に有意な増加が認められたが、病理組織学的検査に投与に関連した腎病変は認めらず毒性学的意義は明らかでなかった。

また、64mg/kg/day投与群雌に肝の対体重比の統計学的に有意な増加が認められたが、病理組織学的観察との相関はなく毒性学的有意性は明らかでなかった。

それ以外には統計学的あるいは毒性学的に有意な変化は認められなかった。

肉眼的病理検査 ; 試験終了時の全生存動物及び途中死亡動物を対象として、検査を行った。

死亡動物（1例）で気管支肺炎が認められたが、検体投与に起因するものとは考えられなかった。

肉眼的に認められた病変は偶発的なものか、非特異的な変化であり、検体投与によるものではなかった。

病理組織学的検査 ; 上記の肉眼的病理検査を実施した動物を対象として重量測定臓器を含む大動脈、骨および骨髄、盲腸、結腸、十二指腸、精巣、精巣上体、食道、眼、胆嚢、回腸、空腸、前立腺、直腸、唾液腺、坐骨神経、骨格筋、皮膚、脊髄（頸部、胸部、腰部）、胃、胸腺、気管、膀胱、子宮、及び肉眼的病変部について、病理標本を作成し、鏡検した。

脳に機能障害が発現した動物（64mg/kg/day投与群雄1例）に脳の慢性血管周囲炎及び頸部脊髄の慢性髄膜炎が認められたが、検体投与に関連するとは考えられなかった。

その他の観察された病変はいずれも自然発生病変であり、検体投与に関連した組織的变化は認められなかった。

以上の結果から、本剤の12ヶ月強制経口投与による慢性毒性試験における影響として、8mg/kg/day投与群以上に体重の増加抑制、血漿コリンエステラーゼ活性の低下及び生化学検査におけるALTの低下、アルブミン、総蛋白の減少が認められたので、最大無作用量は、雌雄とも1mg/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クミアイ化学工業株式会社にある。

3) マウスを用いた飼料混入投与による発がん性試験

(資料 26)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1982年

検体の純度 :

試験動物 : B6C3F₁系 (C57BL/6雄×C3H/He系雌) マウス, 1群雌雄各72匹
開始時6週齢

投与後52週に各群雌雄各12匹を中間屠殺した。

試験期間 : 雄105週, 雌121週 (1979年1月30日~1981年6月11日)

投与方法 : 検体を0, 25, 100, 400及び1600ppmの濃度で飼料に混入し, 最高121週にわたって随時摂食させた。

検体を混入した飼料は毎週1回調製した。

投与量設定には, 予備投与試験を実施し, その結果を参考とした。

試験項目及び結果 :

一般状態及び死亡率 ; 一般状態及び生死を毎日観察し, 週1回すべての動物を手にとって触診した。

眼排泄物, 立毛, 眼混濁等の症状が対照群を含め認められたがいずれも検体投与によるものとは考えられなかった。

触診によって認められた腫張の出現と発生時期は検体投与に関係があるとは考えられなかった。

試験終了時の死亡率は対照群, 25, 100, 400及び1600ppm投与群の雄で各々45, 60, 33, 52, 38%, また雌で50, 53, 43, 50, 42%であった。

いずれの群においても死亡は少く, また投与による影響はなかった。

体重変化 ; 投与開始から14週間は週1回, 以後は2週間に1回すべての生存動物の体重を測定した。

1600ppm投与群で雄は最初の24週, 雌は52週の期間に体重増加抑制が認められ, 雄はその後回復したが雌は回復しなく検体投与の影響と考えられた。

摂餌量及び食餌効率 ; 各ケージ毎の摂餌量を週1回測定し, 食餌効率は最初の14週間, 週1回算出した。

1600ppm投与群雄は8~67週に, 雌は0~56週に対照群に比べ摂餌量が減少した。食餌効率は1600ppm投与群雌雄で対照群に比較してわずかに減少した。

飲水量 ; 毎日給水ビンを見て評価した。

投与に関連した飲水量の変化はなかった。

検体摂取量 ; 摂餌量及び投与濃度から算出した1日当りの平均検体摂取量は下表のとおりである。

投与濃度 (ppm)		0	25	100	400	1600
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	0	2	10	40	166
	雌	0	3	11	42	191

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

血液学検査；投与後51週及び投与終了時（雄104週，雌120週）に各群雌雄各12匹ずつを対象として眼窩後方血脈洞から採血し，ヘマトクリット値，ヘモグロビン濃度，赤血球数，白血球数，白血球百分比，血小板数，網赤血球数を測定した。

さらに，投与期間中の屠殺動物，中間屠殺動物および投与終了時の屠殺動物について血液および骨髄の塗抹標本検査を行った。

51週検査時に400及び1600ppm投与群雄でヘマトクリット値のわずかな低下，25，400及び1600ppm投与群雌で白血球数の低下等統計的有意差の認められた項目があったが，いずれも120週の検査では対照群と差はなく，検体投与の影響とは考えなかった。また骨髄塗抹標本検査及び血液塗抹標本検査では対照群と投与群で差はなかった。

臓器重量；投与後52週の屠殺動物及び試験終了時の全生存動物を対象として脳，心，腎，肝，卵巢，精巣の重量を測定した。又，対体重比も算出した。

以下に対照群と比して統計学的有意差を認めた項目を示す。

性別	雄								雌							
	52週				105週				52週				121週			
検査時期	25	100	400	1600	25	100	400	1600	25	100	400	1600	25	100	400	1600
投与群 (ppm)	25	100	400	1600	25	100	400	1600	25	100	400	1600	25	100	400	1600
体重				↓								↓				↓
脳重量 対体重比				↑				↓				↑			↓	↓
心重量 対体重比		↑				↓		↓				↑			↓	↓
肝重量 対体重比	↑	↑						↑				↑				
腎重量 対体重比				↓	↓	↓	↓	↓				↑	↑			↑
精巣重量 対体重比				↑												
卵巢重量 対体重比										↓		↓				

統計学的有意差：↓↑ P<0.05, ↑↓ P<0.01, ↑↓ P<0.001 (Student's t test)

1600ppm投与群雄では，腎重量の低下が各検査時期でみられ，対体重比も同様に低下した。又，同群で肝重量及び対体重比の増加が105週検査時にみられ，いずれも検体投与の影響と考えられた。

それ以外の変化は用量相関性が認められず，投与による影響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クミアイ化学工業株式会社にある。

肉眼的病理検査；投与後52週の間屠殺動物，試験終了時の全生存動物及び途中死亡動物を対象として検査をおこなった。

試験終了時の屠殺動物で，1600ppm投与群の雄では，肝蒼白化，雌では蒼白肺病巣の増加が認められ検体投与に関連する変化と考えられた。

他の所見はいずれも自然発生的な変化であり，検体投与によるものではなかった。

病理組織学的検査；上記の肉眼的病理検査を実施した動物を対象として，副腎，骨，脳，気管支，結腸，十二指腸，胆のう，ハーダー腺，心，回腸，空腸，腎，肝，肺，リンパ節，乳腺，中耳，食道，鼻腔および副鼻腔，卵巣，膵，下垂体，前立腺，唾液腺，坐骨神経，骨格筋，皮膚，脊髄，脾，胃，精巣，胸腺，甲状腺，気管，膀胱，子宮頸，子宮及び肉眼的病変部について，病理標本を作成し，鏡検した。さらに試験終了時の屠殺動物から各群雌雄各10匹について頭頂部切片を作成し鏡検した。

52週後に中間屠殺した動物で広範囲にありふれた変性及び炎症性の変化があったが，いずれの変化もこの系統のマウスに一般的に認められるものであり，薬物投与によるものとは考えられなかった。試験終了時の検査動物の，100ppm以上の投与群雌で，肝の全小葉性肝細胞蒼白化の増加，小葉中間体大脂肪空胞形成の増加が認められ，1600ppm投与群雌でも同様な病変が認められた。また肺の肺胞大食細胞をともなった肺胞壁細胞扁平上皮化生域または巣（area or foci of alveolar wall epithelialisation with associated alveolar macrophages）が1600ppm投与群雌雄で増加した。これら肝及び肺に認められた病変の増加は検体投与に影響するものと考えられたが，これらは毒性反応ではなく軽度の反応性変化と考えられた。

その他の変化はいずれもこの系統に一般的な病変であった。

投与1年目以降の死亡動物では1600ppm投与群雌雄で肺の肺胞大食細胞の出現および肺胞壁細胞扁平上皮化生域または巣の出現増加が認められた。

腫瘍性病変としては，乳腺癌，肝のType AおよびType B結節，肺腺腫と肺癌，ハーダー腺腫，下垂体腺腫と悪性リンパ腫などが散見されたが，この系統に一般的にみられる型および出現率であり，検体投与に関連する病変および発生率の上昇は認めなかった。

各群における腫瘍動物数，腫瘍総数，悪性及び良性腫瘍数は下表のとおりであり，腫瘍の発生頻度に関して検体投与による影響はなかった。

性別	雄					雌					
	投与群 (ppm)	対照	25	100	400	1600	対照	25	100	400	1600
検査動物数		72	72	72	72	72	70	71	72	72	71
腫瘍数	良性	26	34	33	27	27	11	26	29	23	26
	悪性	36	35	21	36	32	44	46	47	41	43
腫瘍総数		62	69	54	63	59	55	72	76	69	69
腫瘍動物数		45	39	37	42	43	42	48	49	41	51

投与期間中における腫瘍性病変の発生頻度を本項末に表示した。

以上の結果から，本剤の生涯飼料混入投与による発がん性試験において催腫瘍性はないものと考えられる。また1600ppm投与群で体重増加抑制が認められたことにより，最大無作用量は，400ppm（雄40mg/kg/day，雌42mg/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クミアイ化学工業株式会社にある。

腫瘍性病変、発がん性区分

検査時期	臓器	性別	雄					雌				
		投与量 (ppm)	0	25	100	400	1600	0	25	100	400	1600
全動物	所見/検査動物数		72	72	72	72	72	70	71	72	72	71
	皮膚・皮下	乳頭腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		扁平上皮癌 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		血管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		線維腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
		線維肉腫 (M)	0	0	0	0	2	2	1	3	1	3
		肉腫 (M)	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
	乳腺	腺棘細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
		腺癌 (M)	0	0	0	0	0	3	4	3	2	6
	基底細胞腫 (B)		1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	脾臓	島細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		外分泌腺癌 (M)	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0
		脂肪腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	肝臓	Type A結節 ^a	15	17	17	14	13	4	7	11	10	3
		Type B結節 ^b	14	18	8	15	7	3	2	2	1	1
		胆管細胞腺腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		胆管細胞癌 (M)	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
		血管腫 (B)	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0
		肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	肺	肺腺腫 (B)	5	7	4	3	2	1	3	3	3	3
		肺癌 (M)	4	1	4	4	5	1	3	2	5	1
	腎臓	腎腺腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	卵巢	腺腫 (B)	-	-	-	-	-	1	0	1	0	0
		顆粒膜細胞腫 (B)	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
		奇形種 (M)	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
	子宮	腺腫 (B)	-	-	-	-	-	0	0	1	1	0
		肉腫 (M)	-	-	-	-	-	0	0	0	1	0
膣	血管腫 (B)	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0	
前立腺	癌 (M)	0	1	0	0	0	-	-	-	-	-	

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

[申請者注^a: Foci及び肝細胞腺腫^b: 肝細胞癌 Walker AIT et al.: The toxicology of Dieldrin (HEOD).

I. Long-term oral toxicity studies in mice. Fd Cosmet Toxicol, 11(3); 415-432, 1973]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。
腫瘍性病変、発がん性区分

検査時期	臓器	性別	雄					雌				
		投与量 (ppm)	0	25	100	400	1600	0	25	100	400	1600
全動物	所見/検査動物数		72	72	72	72	72	70	71	72	72	71
	ハーダー腺	腺腫 (B)	3	7	10	6	7	1	1	6	5	6
		癌 (M)	3	4	2	0	1	0	1	0	0	1
	下垂体	腺腫 (B)	0	0	0	0	0	2	6	2	2	5
	上皮小体	癌 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	甲状腺	濾胞腺腫 (B)	0	1	0	0	0	0	2	2	0	4
	副腎	皮質癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		褐色細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	胸腺	胸腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	精巣	間細胞腫 (B)	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-
	脊髄	血管腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	脾臓	血管腫 (B)	2	0	2	0	1	1	3	0	0	0
	胃	血管腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	子宮脂肪	血管腫 (B)	-	-	-	-	-	0	0	1	0	0
	分類不能	癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	原発不詳	線維肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	分類不能	肉腫 (M)	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
		平滑筋肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		横紋筋腫 (M)	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1
		血管肉腫 (M)	1	3	1	1	2	2	2	2	0	2
骨原性肉腫 (M)		0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	
骨膜肉腫 (M)		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
組織球種 (M)		1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	
悪性リンパ腫 (M)		6	5	6	14	10	32	29	31	27	25	
	肥満細胞腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

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

[申請者注：マウス2年間発がん性試験（資料26）で100 ppm以上投与群に見られた肝および肺の病理所見と最大無作用量を400 ppmとしたことに関する補足

本試験における非腫瘍性病変の発生頻度を下表に示す。

病理組織学的検査において、2年目の死亡／切迫屠殺動物の肺、及び105週（雄）及び121週（雌）の計画解剖動物の肺及び肝臓に変化が認められた。試験終了時の計画解剖動物では、肺に肺泡マクロファージ及びコレステロール性裂（cholesterol clefts）を伴った細胞壁細胞扁平上皮化生域または巣が100 ppm以上の投与群の雌及び1600 ppm投与群の雄において増加した。肝臓の汎小葉性肝細胞（グリコーゲン）蒼白化の発生頻度が100 ppm以上の投与群の雌で増加した。1600 ppm投与群の雄では細胞内赤血球を伴うOccasionalな腫大肝細胞の発生頻度が増加し、これは脂肪肝によくみられる安楽死に関連した変化であると考えられた。また、小葉中心性微細脂肪空胞化が100及び1600 ppm群の雄で発生頻度が増加した。これらの肺および肝臓に見られた所見について試験責任者は毒性反応ではなく、軽度の反応性変化と判断している。したがって、これらの病変に毒性学的意義はないものと考えた。以下に報告書考察部分を参考として記載する。

報告書、p30

3) the microscopic changes in the lungs of animals killed or dying during the second year of treatment and in the lungs and liver of animals sacrificed after completion of 105 or 121 weeks of treatment, i. e. the focal epithelialisation of alveolar walls associated with alveolar macrophages with/without cholesterol clefts in the lung and the panacinar hepatocytic (glycogen) pallor, occasional enlarged hepatocytes containing intracellular erythrocytes, fatty vacuolation, mid-zonar large fatty vacuolation and panacinar fine fatty vacuolation of the liver. None of these changes are considered to be toxic responses, but are considered to be evidence of mild reactive changes.

試験の第2年目における死亡あるいは屠殺動物の肺、並びに105週間及び121週間後の最終屠殺動物の肺及び肝にみられた組織病変、例えば肺における限局性肺泡マクロファージ及びコレステロール性裂を伴った細胞壁細胞扁平上皮化生域または巣、肝の汎小葉性肝細胞（グリコーゲン）蒼白化、細胞内赤血球を伴うOccasionalな腫大肝細胞、脂肪空胞化、小葉中間性大脂肪空胞化、小葉中心性微細脂肪空胞化である。これらの変化は毒性反応ではなく軽度の反応性変化と考えられる。]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。
非腫瘍性病変の発生頻度

所見	投与量 (ppm)									
	雄					雌				
	0	25	100	400	1600	0	25	100	400	1600
検査動物数										
-1年目の死亡/切迫屠殺動物	6	9	3	7	5	1	2	1	0	0
-52週 of 計画解剖動物	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
-2年目の死亡/切迫屠殺動物	24	28	17	24	18	27	31	28	30	28
-105週 (M) 及び 121週 (F) の計画解剖動物	30	23	40	29	37	30	26	31	30	31
肺										
<u>肺泡マクロファージ及びコレステロール性裂を伴った細胞壁細胞扁平上皮化生域または巣</u>										
-1年目の死亡/切迫屠殺動物*	0	0	0	2	1	0	0	1	-	-
-52週 of 計画解剖動物**	3	1	0	1	3	0	1	2	0	5
-2年目の死亡/切迫屠殺動物*	1	5	1	2	5	3	0	3	5	12
-105週 (M) 及び 121週 (F) の計画解剖動物*	2	1	7	1	11*	6	2	5	4	17*
肝臓										
<u>汎小葉性肝細胞 (グリコーゲン) 蒼白化</u>										
-1年目の死亡/切迫屠殺動物*	0	0	0	0	2	0	1	1	-	-
-52週 of 計画解剖動物**	6	10	8*	11	4	11	2***	10	10	11
-2年目の死亡/切迫屠殺動物*	0	4	3	2	4	6	10	6	10	15*
-105週 (M) 及び 121週 (F) の計画解剖動物*	18	14	35*	13	21	21	22	27*	25*	30*
<u>小葉中間性大脂肪空胞化</u>										
-1年目の死亡/切迫屠殺動物**	0	0	0	1	0	0	0	0	-	-
-52週 of 計画解剖動物**	4	10	8	9	6	0	0	0	2	1
-2年目の死亡/切迫屠殺動物**	0	1	0	1	2	3	1	5	4	8
-105週 (M) 及び 121週 (F) の計画解剖動物**	2	0	6	8	27***	9	10	19*	18*	23**
<u>小葉中心性微細脂肪空胞化*</u>										
-1年目の死亡/切迫屠殺動物*	1	0	1	1	0	0	0	0	-	-
-52週 of 計画解剖動物**	5	10	9	9	7	0	0	0	0	0
-2年目の死亡/切迫屠殺動物*	3	5	1	2	5	2	1	0	2	0
-105週 (M) 及び 121週 (F) の計画解剖動物**	11	5	17*	13	27***	0	0	0	0	0
<u>細胞内赤血球を伴うOccasional な腫大肝細胞</u>										
- 105週 (M) 及び 121週 (F) の計画解剖動物	0	1	1	2	13***	6	3	4	5	9

+ 軽度および中程度の変化の発生頻度の合計

++ 軽度、中程度および著明な変化の発生頻度の合計

Fisherの正確検定 : * p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.00

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

(12) 繁殖毒性及び催奇形性

1) ラットを用いた繁殖性試験-1

(資料 27)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1984年

検体の純度 :

試験動物 : S. D系ラット, 1群雌雄各30匹, 投与開始時43日齢

投与期間 : F₀世代雄-133日 (投与開始から交配後の屠殺まで)

F₀世代雌-159日 (投与開始からF₁児離乳時まで)

F₁世代雄-282日 (離乳時から特別交配試験完了まで)

F₁世代雌-270日 (離乳時からF₂児離乳時まで)

F_{2a}世代雌雄-91日 (離乳後から成長期中)

(1982年6月29日~1983年9月26日)

投与方法 : 検体を1.0%Tween80添加0.7%CMC水溶液に懸濁し, 0, 2, 10及び40mg/kg/dayのレベルで胃挿管法により経口投与した。投与量設定のため, 予備投与試験を実施し, その結果を参考とした。

方法及び試験項目: 概要は下記の表にまとめた。

一般状態及び死亡率: 全動物の全検査期間に一般状態及び生死を毎日観察した。

交配及び妊娠の確認: 交配は雌雄1対1で同居させ, 翌日膈栓及び精子により交配を確認した。

なお, 特別交配試験では雄1匹に対し雌2匹を同居させた。妊娠の確認は出産をもって行った。

繁殖性に関する指標: 交配, 妊娠, 出産及び離乳時までの観察に基づき次の指標を算出した。

$$\text{雌交配率} = \frac{\text{交配した雌の数}}{\text{交配に用いた雌の数}}$$

$$\text{雄交配率} = \frac{\text{交配した雄の数}}{\text{交配に用いた雄の数}}$$

$$\text{妊娠率} = \frac{\text{妊娠した雌の数}}{\text{交配の証拠があった雌の数}}$$

$$\text{雄授精率} = \frac{\text{雌を妊娠させた雄の数}}{\text{交配した雄の数}}$$

$$\text{出産時生存率} = \frac{\text{出産時の生存児数}}{\text{出産時の生存及び死亡児数}}$$

$$\text{4日後の生存率} = \frac{\text{生存4日目の生存児数}}{\text{出産時の生存児数}}$$

$$\text{4~21日の生存率} = \frac{\text{生後21日目の生存児数}}{\text{生後4日目の生存児数}}$$

$$\text{21日後(離乳時)の生存率} = \frac{\text{生後21日目の生存児数}}{\text{出産時の生存児数}}$$

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

$$\text{同腹の生存率} = \frac{\text{離乳時生存児の腹数}}{\text{出産時生存児の腹数}}$$

臓器重量検査：F₁雄の総ての動物についてのみ精巣重量を測定した。

病理組織学的検査：

F₀成熟動物—雄から精巣，精巣上体，前立腺，精嚢，雌から子宮体，子宮頸及び全動物からの肉眼病巣について鏡検した。

F₁成熟動物—副腎，心，腎，肝，肺，卵巣，下垂体，前立腺／精嚢，脾，精巣（含精巣上体），甲状腺，子宮（子宮体，子宮頸）及び肉眼病巣について，全動物を対象に鏡検した。

F₂a 成熟動物—1群雌雄各5匹の動物を対象にして，F₁成熟動物と同一の臓器について鏡検した。

F₁，F₂a，F₂b 新生児—無作為に選択した各群雌雄各5匹の動物を対象にして，F₁成熟動物と同一の臓器について鏡検した。

特別交配試験：第二次交配期間後，雄の生殖活動不活発を検査する目的で第一次交配及び第二次交配時に交配行動をとらなかった雄，第一次交配で雌を妊娠させず，第二次交配時に交配行動をしなかった雄を用い，非投与の雌と交配させた。交配した雌は妊娠16日に屠殺し子宮着床部位の有無を記録した。交配しなかった雌は交配期間終了後10日目に屠殺した。交配率，妊娠率，授精率を検査した。なお，供試した動物数は対照群雄3匹，2mg/kg/day投与群雄9匹，10mg/kg/day投与群雄6匹，40mg/kg/day投与群雄3匹であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。
方法及び試験項目の概要

世代	期間 (週間)	作業手順	試験項目
P (F ₀)	生育 (15週)		体重, 摂餌量を週1回測定
	交配 (2週)	雌雄1対1で交配, 交尾は膣栓及び精子で確認 (妊娠0日)	交配状況の観察。 交配終了後, 雄を屠殺し, 全動物について病理検査を行った。
	妊娠 (3週)		妊娠0, 7, 14, 17, 20日目に体重を測定。
	出産		出産状況の観察
	哺育 (3週)		新生児数, 死産児数, 性別, 外表異常及び生存児体重を測定。 母動物の体重を哺育0, 7, 14, 21日に測定。0, 4, 7, 14, 21日目に生存児数, 児体重を測定。尚途中死亡新生児は肉眼的病理検査を行った。
F ₁	離乳	継代用の各群雌雄各30匹ずつを1腹につき雌雄各2匹以下として無作為に選抜。	母動物を全例屠殺し, 病理組織学的検査を行った。また継代用以外の児動物は屠殺し, 各群雌雄各5匹ずつ病理組織学的検査を行った。
	生育 (17週)	— (P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	一次交配 (3週)		
	妊娠 (3週)		
	出産		(P世代に準ずる)
	哺育 (3週)		(P世代に準ずる)
	離乳	各群雌雄各29~30匹ずつを無作為に選抜した。	離乳時にF ₂ a出生児の各群雌雄各5匹を屠殺し病理組織学的検査を行った。
F ₂	生育 (1週)	— (P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	二次交配* (3週)		
	妊娠 (3週)		
	出産		(P世代に準ずる)
	哺育 (3週)		(P世代に準ずる)
	離乳		母動物は全例屠殺し, 病理組織学的検査を行った。F ₂ b出生児の各群雌雄各5匹を屠殺し病理組織学的検査を行った。 F ₁ 親の雄は特別交配試験後屠殺し, 病理組織学的検査を行った。
	→ 生育 (F ₂ a)		

*最高濃度群の新生児に死亡が多く認められたところから二次交配を行った。

試験結果：

世代	親：P		児：F ₁		親：F ₁		児：F _{2a} , F _{2b}		F _{2a}		
	対照群	2	10	40	対照群	2	10	40	対照群	2	
投与量 (mg/kg/day)											
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
一般状態											
死亡率 (%)		3.3	0.0	10.0	3.3	0.0	10.0	10.0	0.0	0.0	0.0
体重変化		0.0	6.7	3.3	0.0	0.0	6.7	10.0	0.0	0.0	0.0
飼育期	雄			やや増加抑制				やや増加抑制			増加抑制
妊娠期	雌			やや増加抑制				やや増加抑制			やや増加抑制
哺乳期											
摂餌量	雄										
雌											
肉眼的病理検査											
臓器重量	精巢	-	-	-	-	-	-	わずかに増加	-	-	-
病理組織学的検査 (発生物数)	雄						肝：小葉中心部細胞の腫脹 (8/30)	左 (1/30)	同 (22/30)	肝：小葉中心部細胞の腫脹 (1/5)	左 (5/5)
雌							副腎：皮質腺腫 (1/30)	左 (1/30)	同 (1/30)		
交配率 (%)	a < 雄	93.1	96.4	90.0	88.9	80.0	85.7	85.7	85.7	66.7	85.7
雌		93.3	96.4	90.0	86.7	80.0	85.7	85.7	85.7	66.7	82.8
b < 雄		-	-	-	-	86.2	71.4	70.4	70.4	66.7	70.4
雌		-	-	-	-	86.7	71.4	70.4	70.4	66.7	70.4
妊娠率 (%)	a	96.4	88.9	92.6	88.5	80.8	87.5	88.0	78.6	68.2	68.0
b		-	-	-	-	53.6	59.1	36.4	59.1	43.5	36.4
授精率 (%)	a	96.3	88.9	92.6	87.5	83.3	87.5	70.8	87.5	65.0	70.8
b		-	-	-	-	60.0	60.0	42.1	60.0	50.0	42.1
妊娠期間 (日)	a	21.9	22.1	22.2	22.2	22.2	22.2	22.1	22.2	22.0	22.1
b		-	-	-	-	22.4	22.2	22.1	22.2	22.1	22.1

註) - : 検査せず, 空欄: 異常なし

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

(続き)

世 代		親 : P 児 : F ₁				親 : F ₁ 児 : F _{2a} , F _{2b}			
投与量 (mg/kg/day)		対照群	2	10	40	対照群	2	10	40
新生児生存数	a	12.7	11.5	10.7(↓)	11.6	11.0	11.2	11.3	9.8
	b	—	—	—	—	11.9	13.1	10.2	11.8
死産児数	a	0.3	0.5	0.7	0.5	0.2	0.6	0.7(↑)	0.3
	b	—	—	—	—	0.2	0.6	0.4	0.4
外表異常	a		頭蓋脊柱裂奇形 (1例)	口蓋破裂症 耳介突起の欠如, 左小眼後肢の短肢 (1例)				浮腫 (1例)	
	b	—	—	—	—			尾の切断 (1例)	
性 比 (出産時生存児 : 雄/雌)	a	1.0	1.1	1.0	1.2	1.0	0.9	1.2	0.9
	b	—	—	—	—	1.0	1.2	1.0	1.3
出生時生存率(%)	a	97.4	96.2	94.0	96.0	98.2	94.9	94.3	97.1
	b	—	—	—	—	98.3	95.6	96.4	96.9
4日目生存率(%)	a	97.4	97.1	98.9	92.1(↓)	95.5	86.3(↓)	87.5(↓)	68.3(↓)
	b	—	—	—	—	97.8	98.5	97.7	92.6
4~21日の生存率(%)	a	96.1	95.1	98.4	93.5	93.8	94.5	94.9	66.7(↓)
	b	—	—	—	—	98.9	99.2	100.0	98.9
離乳時生存率(%)	a	93.6	92.4	97.3	86.1(↓)	89.6	81.5	83.1	45.5(↓)
	b	—	—	—	—	96.6	97.7	97.7	91.5
同腹生存率(%)	a	100.0	95.8	100.0	95.7	100.0	86.7	95.5	70.6(↓)
	b	—	—	—	—	100.0	100.0	92.3	87.5
出産時体重(g)	a	5.8	6.1	6.1	5.8	6.0	5.7	6.2	6.0
	b	—	—	—	—	6.2	6.0	6.3	5.8
4日目体重(g)	a	8.1	8.6	9.0	8.1	8.7	8.0	8.6	7.5
	b	—	—	—	—	10.3	9.1	10.2	8.9
離乳時体重(g)	a	37.2	39.1	39.8	37.2	35.6	35.0	36.0	37.7
	b	—	—	—	—	41.0	37.0	42.1	35.1
肉眼的病理検査	a	—	—	—	—				
	b	—	—	—	—				
病理組織学的検査	a	—	—	—	—				
	b	—	—	—	—				

註) — : 検査せず, 空欄 : 異常なし, 統計学的有意差 : ↓ P < 0.05, ↓↓ P < 0.01 (Dunnett's test)

[申請者注] : 40 mg/kg体重/日における新生児生存率の低下について

対照群と40 mg/kg/day投与群の同腹児生存率について、F1世代では有意差がなかったことから被験物質投与による影響とはしていない。F2a世代では、”The litter survival index for the control group was 100% and was only slightly lower in the low- and mid-dose groups; these latter differences from control were not statistically significant and no treatment-related effect

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

was evident from these data. Two low-dose females and one mid-dose female failed to wean litters. At the high-dose level, the litter survival index was significantly lower than control: “との記述があり、2および10 mg/kg/day投与群では被験物質投与による影響とせず、40 mg/kg/day投与群のみを被験物質投与による影響としている。

特別交配試験結果：

投与量 (mg/kg/day)	対照群	2	10	40
雄 交 配 率	0.0 (0/3)	33.3 (3/9)	66.7 (4/6)	33.3 (1/3)
雌 交 配 率	0.0 (0/6)	22.2 (4/18)	58.3 (7/12)	33.3 (2/6)
妊 娠 率	—	75.0 (3/4)	85.7 (6/7)	100 (2/2)
授 精 率	—	100 (3/3)	100 (4/4)	100 (1/1)

註) () 内は例数

F₁世代の繁殖指数が対照群・投与群共に背景値に比し低値であった。これらの動物は良好な健康状態を示し、交配および交配後において繁殖能力に影響する環境要因も認められず、その原因は不明である。この、繁殖指数の低値は特に2 mg/kg/day投与群の雄における授精率に低下で顕著であった（対照群の-16.6%）。このため、特別交配試験を実施したところ前記の結果表からも明らかなごとく、繁殖指数について対照群の受精率が0であったため対照群との比較は出来ないが、投与群間に用量相関性は認められなかった。したがって、F₁世代の繁殖指数低値は検体投与の影響とは考えられない。以下に試験施設における交配率、妊娠率および雄受精率の背景値を示す。

Bio/dynamic Inc. の交配率、妊娠率および雄受精率の背景値 (12試験)

交配率： 雄 92.1% (66.7-100.0%)

雌 87.1% (70.0-100.0%)

妊娠率： 86.8% (67.9-100.0%)

雄受精率：93.2% (67.9-100.0%)

[申請者注]：本繁殖試験成績の確認のため、日本実験動物中央研究所にてJcl:SDラットを用いて0, 2, 20, 100mg/kg/dayの投与量で繁殖試験を実施したところ、100mg/kg/day群においても繁殖指数に投与の影響は観察されなかった（ラットを用いた繁殖性試験-2に記載;資料 80）。したがって、本繁殖試験で観察された繁殖指数の低値は偶発的変化と考える。

10mg/kg/day投与群では、F₂a 成熟世代の成長期におけるわずかな体重増加抑制と病理組織学的にF₁および、F₂成熟雄で小葉中心部肝細胞腫張が認められ検体投与による影響と考えられた。しかし、10mg/kg/day投与群では、繁殖能への悪影響は認められず、新生児への影響も認められなかった。40mg/kg/day投与群では、親動物の体重増加抑制、F₂b 繁殖期間の妊娠及び授精率の低下、病理組織学的に認められたF₁及びF₂成熟雄で小葉中心部肝細胞腫張、新生児生存率の低下及びF₂b 新生児体重のわずかな低下が認められ検体投与による影響と考えられた。

F₁雌成熟世代において副腎皮質腺腫が対照群1/30例 (3.3%)、40mg/kg/day群5/30例 (16.7%)に観

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

察されたが、試験施設における本ラット系統の同年齢における副腎皮質腺腫の背景的発生頻度以内であった。以下に試験施設における副腎皮質腺腫発生頻度の背景値を示す。

Bio/dynamic Inc. の副腎皮質腺腫発生頻度の背景値

雄 - 23% 0% [0/30例(0%) - 4/11例(36.4%)]

雌 - 6.1% 0% [0/27例(0%) - 5/11例(45.5%)]

[申請者注]:本繁殖試験成績の確認のため実施した前記の日本実験動物中央研究所における繁殖試験では、F1雌成熟世代の病理組織学的検査で100mg/kg/day群においても副腎に腫瘍性病変を含め増殖性変化を認めなかった。したがって、本試験の40mg/kg/day群における副腎皮質腺腫の高値は偶発的変化と考える。

以上の結果より、3世代にわたって本剤を経口投与した場合、10mg/kg/day投与群の親動物に体重増加抑制、肝の小葉中心部細胞腫張がみられたが繁殖能には何ら影響はみられなかった。ゆえに、一般毒性の最大無作用量は2mg/kg/day、繁殖毒性の最大無作用量は10mg/kg/day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クマイ化学工業株式会社にある。

2) ラットを用いた繁殖毒性試験-2

(資料 80)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1987年

検体純度 :

供試動物 : Jel:SDラット、1群雌雄各25匹、開始時5~6週齢

投与期間 : F0世代 : 交配前に11週間、交配期間、妊娠期、及び哺育期

F1世代 : 交配前に13週間、交配期間、妊娠期、及び哺育期

投与方法 : 検体を0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) に懸濁して2、20、及び100 mg/kgの投与レベルで毎日1回強制経口投与した。検体の調製液は1週間に1回作製した。なお、対照群には0.5% CMCを同様に投与した。

用量設定根拠 : ラットを用い5、25、50、及び100 mg/kgの投与量で実施した予備試験の結果、100 mg/kg群で体重、肝臓重量、及びF1児の発育に軽微な影響が生じたことから、本試験の高投与量を100 mg/kgとし、低投与量を2 mg/kg、中投与量を20 mg/kgに設定した。

交配・調整・選抜及び観察・検査項目 : 概要を表1にまとめた。

一般状態及び死亡率 : 試験期間を通じて全動物の一般状態及び生死を毎日観察した。

交配及び妊娠の確認 : 雌雄を1対1で同居させ、膣栓または膣スメア中の精子により交尾を確認した。

妊娠の確認は分娩の有無または子宮内の着床痕の有無によって行った。

同じ試験群内の最初の交配において2週間以内に交尾しない場合、雄は無処置雌と再交配させ、雌は交尾可能であることを確認した同じ試験群の別の雄と最長1週間再交配させた。交尾したもののペア雌を妊娠させられなかった雄、あるいは妊娠しなかった雌は無処置動物と最長2週間再交配させた。これらの結果から、最終的に繁殖不能の動物を判定した。

交尾が確認された日を妊娠0日とし、分娩が認められた日を分娩後0日または生後0日とした。

繁殖性に関する指標 : 交配前、交配、妊娠、分娩、哺育、及び離乳時期の観察に基づき、同じ試験群内の交配について次の指標を算出した。

交尾率 = (交尾動物数 / 交配動物数) × 100

受胎率 = (妊娠動物数 / 交尾動物数) × 100

妊娠期間

出産率 = (生存児を分娩した雌数 / 妊娠動物数) × 100

出生率 = (生存新生児数 / 着床数) × 100

4日生存率 = (生後4日の生存児数 / 生存新生児数) × 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クミアイ化学工業株式会社にある。

離乳時の生存率（離乳時の生存児数／生後4日の哺育児数）×100

交配後の雄の観察・検査項目：同じ試験群内の最初の交配においてペア雌と交尾して妊娠させた場合はペア雌の妊娠確認後まで、ペア雌と交尾しなかった場合は無処置雌との再交配後25日まで、ペア雌と交尾したものの妊娠させられなかった場合は再交配期間の交尾日または終了時まで投与を継続し、屠殺して肉眼的病理検査、臓器重量の測定、及び病理組織学的検査を行った。

臓器重量：すべてのF0及びF1親を対象として、屠殺時に下記の臓器重量を測定し、体重比重量も算出した。
下垂体、肝臓、腎臓、副腎、精巣、前立腺、卵巣、及び子宮

病理組織学的検査：すべてのF0及びF1親を対象として、下記の組織について病理標本を作製し、鏡検した。
下垂体、肝臓、腎臓、副腎、精巣、前立腺、卵巣、子宮、精巣上体、精嚢、膈、肉眼的異常部位

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

表1、交配・調整・選抜及び観察・検査項目

世代	期間（週間）	交配・調整・選抜	観察・検査項目
F0	生育（11週）		雌雄の体重を週1回、摂餌量を毎週測定。 10週時から性周期を検査。
	交配 （2週以内）	雌雄1対1で交配。膣栓 または精子で交尾を 確認。	交配状況の観察。
	妊娠		母動物の体重を妊娠0、6、14、及び21日に測定、 摂餌量を毎週測定。
	出産		出産状況の観察。 リターサイズ、出生児数、死産児数、外表異常、 及び性別を観察、体重を測定。
	哺育（21日）	生後4日に各同腹児数 を8匹に調整（原則と して雌雄各4匹）。	母動物の体重を分娩後0、7、14、及び21日に測 定、摂餌量を毎週測定。 児動物の体重を生後4、7、14、及び21日に測定、 発達指標（耳介展開、背部毛成長、歯萌出、外 耳道開口、及び開眼）をそれぞれ生後4、11、 12、14、及び15日に観察。 途中死亡及び生後4日屠殺のF1児について肉眼 的病理検査。
F1	離乳	継代用に各群雌雄各 25匹を無作為に選抜。	すべてのF0母動物を屠殺し、肉眼的病理検査、 臓器重量の測定、及び病理組織学的検査。 残りのF1児を屠殺し、肉眼的病理検査。
	生育（13週）		雌雄の体重を週1回、摂餌量を毎週測定。 12週時から性周期を検査。
	交配 （2週以内）	（F0世代に準ずる）	（F0世代に準ずる）
	妊娠		（F0世代に準ずる）
	出産		（F0世代に準ずる）
	哺育（21日）	（F0世代に準ずる）	（F0世代に準ずる）
F2	離乳		すべてのF1母動物を屠殺し、肉眼的病理検査、 臓器重量の測定、及び病理組織学的検査。 すべてのF2児を屠殺し、肉眼的病理検査。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。
結果：概要を表2に示した。

i、F0及びF1親動物の一般毒性

体重変化を図1-1～1-6に示している（検定方法：Studentのt検定またはCochran-Coxのt検定）。100 mg/kg群のF0雄で生育期間の5週目以後に、100 mg/kg群のF1雄で生育期間を通じて有意な低体重が認められた。さらに、100 mg/kg群のF1雌で生育期間の9週目以後から哺育期終了時まで有意な低体重が認められた。

摂餌量を表3に示している。すべての投与群のF0及びF1雌雄で対照群との有意差が散見されたが、軽微であり、また、用量反応関係がないことから、生物学的意義はないと判断した。

肝臓の絶対重量及び/または体重比重量が100 mg/kg群のF0及びF1雌雄と20 mg/kg群のF0雌雄及びF1雄で増加した。100及び20 mg/kg群のF0及びF1雌雄で肝臓腫大などの肉眼的変化が認められた。肝臓の病理組織学的検査において、100及び20 mg/kg群のF0及びF1雌雄と2 mg/kg群のF0雌雄で小葉中心性肝細胞肥大の発生頻度が増加した。このような変化は薬物代謝酵素を誘導するフェノバルビタール、ベンゾジアゼピン、及びその他の多くの薬剤により生じることが報告されている^{1, 2, 3}。検体により生じた肝細胞肥大はこれらの論文に記載された変化と非常に類似している。従って、本変化は検体の代謝に関連した適応変化であり、毒性変化ではないと考えられる。100 mg/kg群のF0雄及びF1雌雄と20 mg/kg群のF1雌雄で単細胞性肝細胞壊死の発生頻度が増加した。しかし、ほとんどの動物で本変化の重症度は軽度であり、本所見の自然発生頻度は比較的変動することから、毒性変化ではないと判断した。

腎臓の絶対重量及び/または体重比重量が100 mg/kg群のF0及びF1雄で増加し、これらの動物で腎臓腫大などの肉眼的変化が認められた。腎臓の病理組織学的検査において、対照群を含むすべての投与群のF0及びF1雄で近位尿細管上皮硝子滴及び好酸性小体沈着が認められた。これらの変化は蛋白様物質の再吸収像と考えられるため⁴、毒性変化ではないと判断した。しかし、100 mg/kg群のF0及びF1雄で尿細管上皮壊死及び尿細管腔内細胞片の発生頻度が増加し、100 mg/kg群の雄で腎臓傷害が生じたことが示唆された。

その他の臓器の絶対重量及び体重比重量について対照群との差が散見されたが、用量依存性がないこと、F0及びF1世代のいずれかのみ認められること、低体重に起因するものであること、及び/または関連する病理組織学的変化がないことから、検体投与との関連はないと判断した。

[申請者註]：雄の全投与群で観察された腎臓尿細管上皮硝子滴及び好酸性小体沈着は、雌ラットに観察されないところから α -2 μ globulin腎症の所見と考えて妥当である。本症は一部の薬物により雄ラットにのみ発生する腎症であり、硝子滴・好酸性小体の沈着が過剰になると上皮細胞壊死を伴うことが知られている。しかし、雌ラットには見られず、また、ヒトを含め他の動物での発生報告はない。したがって、雄ラットにおける本症のヒトへのリスクは極めて少ないと考えられる。

参考文献

Lehman-McKeeman LD, et al. (1990): Lysosomal degradation of alpha 2u-globulin and alpha 2u-globulin-xenobiotic conjugates. Toxicol Appl Pharmacol, 103(3):539-548.

ii、F0及びF1親動物の繁殖能力

2 mg/kg群のF0雌で繁殖不能動物数が増加し、2 mg/kg群のF0雌雄で受胎率が減少したが、これらの検査項目に用量反応関係がないことから、検体投与による影響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クミアイ化学工業株式会社にある。

従って、いずれの投与群にも繁殖能力について検体投与による影響はなかった。

iii、F1及びF2児動物への影響

体重変化を図2-1～2-4に示している（検定方法：Studentのt検定またはCochran-Coxのt検定）。100 mg/kg群のF1児で低体重傾向を示し、雄で生後7日に、雌で生後4日に有意差が認められた。本変化はリターによる影響が大きく、F2児で同様の変化が認められないことから、生物学的意義はないと判断した。

100 mg/kg群のF1児の4日生存率が有意に減少した。本変化はリターのみが低値（55.6%）を示したことに起因し、F2児で同様の変化が認められないことから、生物学的意義はないと判断した。

100 mg/kg群のF2児で開眼率が有意に減少した。しかし、発達指標の陽性率の減少は本項目のみで認められ、その他の項目から発育遅延が示唆されないことから、本変化は偶発的であると判断した。従って、F1及びF2児の生存及び発育について検体投与による影響はなかった。

以上の結果から、2世代にわたって本剤を反復経口投与した場合、親動物への毒性影響として100 mg/kg群の雌雄で低体重が認められ、100 mg/kg群の雄で腎臓毒性を示唆する病理組織学的変化が認められたが、児動物への影響は認められなかった。繁殖能力に対しては何ら影響が認められなかった。

従って、無毒性量は親動物に対して20 mg/kgと判断される。繁殖については最高投与量の100 mg/kgでも影響がなかった。

参考文献

- ¹ Staubli, W., Hess, R., and Weibel, E.R.: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes. *J. Cell Biol.*, 42, 92-112, 1969
- ² Barka, T. and Popper, H.: Liver enlargement and drug toxicity. *Medicine*, 46, 103-177, 1967
- ³ Tanaka, H. and Watanabe, M.: The morphological changes observed commonly in animals treated repeatedly with benzodiazepine derivatives. *Jap. J. Clin. Pharmacol.*, 3, 297-299, 1972
- ⁴ Gray, J. E.: Chronic progressive nephrosis, Rat. In *Monographs on pathology of laboratory animals, urinary systems*. Jones, T.C., Hunt, R.D. (ed), Springer-Verlag, pp. 174-179, 1986

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

表2、結果の概要

世代		親：F0 児：F1				親：F1 児：F2				検 定 方 法
投与量 (mg/kg)		0	2	20	100	0	2	20	100	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	
親動物	一般状態	投与に関連する異常はなかった				投与に関連する異常はなかった				
	死亡率 (%)	雄	0	0	0	0	0	0	0	0
		雌	0	0	4	0	4	0	4	4
臓器重量 [数値は対照に対する相対値 (%)]										①
肝臓	(絶対)	雄			↑ 108	↑* 135				↑* 115
		雌			↑ 112	↑* 115				
	(体重比)	雄			↑* 108	↑* 141			↑ 106	↑* 138
		雌			↑* 110	↑* 119				↑* 109
腎臓	(絶対)	雄				↑* 120				
	(体重比)	雄				↑* 124				↑* 120
下垂体	(絶対)	雄							↓ 90	↓* 80
	(体重比)	雌				↓ 85				
		雌				↓ 87		↑ 113	↑ 116	↑ 113
副腎	(絶対)	雄								↓ 88
	(体重比)	雌							↓ 87	↓* 81
		雌							↓ 91	↓ 89

検定方法：①Studentのt検定またはCochran-Coxのt検定

↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

②Wilcoxonの順位和検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

③カイ2乗検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

④Fisherの正確確率検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01 (申請者実施)

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

表2、結果の概要（続き）

世代		親：F0 児：F1				親：F1 児：F2				検 定 方 法
投与量 (mg/kg)		0	2	20	100	0	2	20	100	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	
親 動 物	臓器重量 [数値は対照に対する相対値 (%)]									①
	精巣 (体重比)	雄						↑ 106	↑* 117	
	卵巣 (体重比)	雌							↑ 110	
肉眼的病理検査									④	
所見/検査動物数		雄	25	25	25	25	25	25		25
		雌	25	25	24	25	25	25		25
肝臓腫大		雄	0	0	2	↑20	5	1		1
		雌	0	0	↑7	↑7	4	0		0
肝臓黄色化		雄	1	0	1	1	2	1		0
		雌	0	0	0	1	2	1		1
肝臓黄白色巣		雄	0	0	0	0	0	0		1
		雌	0	0	0	0	0	1		2
腎臓緑褐色化		雄	0	0	0	↑11	0	0		0
		雌	0	0	0	0	0	0		0
腎臓腫大		雄	0	0	0	3	0	0		0
		雌	0	0	1	0	0	0		1
水腎症		雄	0	0	0	0	0	0		2
		雌	0	0	0	0	0	0	0	
腎臓表面細顆粒状		雄	0	0	0	3	0	0	0	
		雌	0	1	0	0	0	0	0	

検定方法：①Studentのt検定またはCochran-Coxのt検定

↑↓： $p \leq 0.05$ 、↑↓： $p \leq 0.01$ 、↑↓*： $p \leq 0.001$

②Wilcoxonの順位和検定 ↑↓： $p \leq 0.05$ 、↑↓： $p \leq 0.01$ 、↑↓*： $p \leq 0.001$

③カイ2乗検定 ↑↓： $p \leq 0.05$ 、↑↓： $p \leq 0.01$ 、↑↓*： $p \leq 0.001$

④Fisherの正確確率検定 ↑↓： $p \leq 0.05$ 、↑↓： $p \leq 0.01$ （申請者実施）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。
表2、結果の概要（続き）

世代		親：F0 児：F1				親：F1 児：F2				検 定 方 法		
投与量 (mg/kg)		0	2	20	100	0	2	20	100			
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25			
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25			
親 動 物	病理組織学的検査									④		
	臓 器	／検査動物数	雄	25	25	25	25	25	25		25	
		所見	雌	25	25	24	25	25	25		25	
	肝 臓	小葉中心性肝 細胞肥大	雄									
			軽度	0	9	25	1	0	0		22	1
			中等度	0	0	0	13	0	0		0	12
			重度	0	0	0	11	0	0		0	12
			合計	0	↑9	↑25	↑25	0	0		↑22	↑25
	小葉中心性肝 細胞肥大	雌										
			軽度	0	5	6	17	0	0		6	14
			中等度	0	0	0	7	0	0		0	8
			合計	0	↑5	↑6	↑24	0	0		↑6	↑22
	単細胞性肝細 胞壊死	雄										
			軽度	0	1	1	5	1	3		6	16
			中等度	0	0	0	2	0	0		1	1
			合計	0	1	1	↑7	1	3		↑7	↑17
単細胞性肝細 胞壊死	雌											
		軽度	7	5	8	7	0	1	5	3		
		中等度	0	0	0	2	0	0	0	2		
		合計	7	5	8	9	0	1	↑5	↑5		

検定方法：①Studentのt検定またはCochran-Coxのt検定

↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

②Wilcoxonの順位和検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

③カイ2乗検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

④Fisherの正確確率検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01（申請者実施）

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

表2、結果の概要（続き）

世代		親：F0 児：F1				親：F1 児：F2				検 定 方 法			
投与量 (mg/kg)		0	2	20	100	0	2	20	100				
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25				
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25				
親 動 物	病理組織学的検査									④			
	臓 器	／検査動物数	雄	25	25	25	25	25	25		25		
		所見	雌	25	25	24	25	25	25		25		
	腎 臓	近位尿細管上 皮硝子滴沈着	雄	軽度	18	4	0	0	21		20	3	0
				中等度	5	21	22	6	0		5	22	3
				重度	0	0	3	19	0		0	0	22
				合計	23	25	25	25	21		25	25	25
				近位尿細管上 皮好酸性小体	雄	軽度	6	9	7		1	10	13
	中等度	3	7	10		13	1	5	14		10		
	重度	0	0	6		10	0	0	11		15		
	合計	9	↑16	↑23		↑24	11	↑18	↑25		↑25		
	尿細管硝子円 柱	雄	軽度	0		1	0	14	2		3	1	9
	中等度		0	1	0	4	0	1	0		0		
	合計		0	2	0	↑18	2	4	1		↑9		
	再生上皮から 成る萎縮尿細 管	雄	軽度	0	3	2	10	3	7		11	7	
			中等度	0	0	0	12	0	0		3	13	
			重度	0	0	0	2	0	0		0	4	
			合計	0	3	2	↑24	3	7		↑14	↑24	

検定方法：①Studentのt検定またはCochran-Coxのt検定

↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

②Wilcoxonの順位和検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

③カイ2乗検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

④Fisherの正確確率検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01（申請者実施）

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

表2、結果の概要（続き）

世代		親：F0 児：F1				親：F1 児：F2				検 定 方 法		
投与量 (mg/kg)		0	2	20	100	0	2	20	100			
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	④		
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25			
親 動 物	病理組織学的検査									④		
	臓 器	／検査動物数	雄	25	25	25	25	25	25		25	
		所見	雌	25	25	24	25	25	25		25	
	腎 臓	尿細管上皮壊 死及び尿細管 腔内細胞片	雄									
			軽度	0	0	0	8	0	0		0	6
			中等度	0	0	0	9	0	0		0	8
			重度	0	0	0	5	0	0		0	4
			合計	0	0	0	↑22	0	0		0	↑18
	繁殖能力											
	性周期 (日)		4~5	4~5	4~5	4~5	4~5	4~5	4~5		4~5	
交尾率 (%)	雄	100	92.0	91.7	100	84.0	80.0	100	100	③		
	雌	100	100	100	100	96.0	88.0	100	100			
受胎率 (%)	雄	96.0	↓ 69.6	90.9	80.0	61.9	80.0	84.0	80.0	③		
	雌	96.0	↓ 68.0	87.5	80.0	66.7	81.8	84.0	80.0			
繁殖不能動物数	雄	0	0	1	1	0	2	0	2	④		
	雌	1	↑6	0	2	3	3	2	1			
妊娠期間 (日)		22.5	22.3	22.3	22.4	22.3	22.1	22.4	22.4	②		
出産率 (%)		100	100	100	95.0	93.8	100	100	100	③		
着床数		13.3	14.9	13.1	14.4	15.1	14.4	13.6	13.0	①		

検定方法：①Studentのt検定またはCochran-Coxのt検定

↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

②Wilcoxonの順位和検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

③カイ2乗検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01、↑↓*：0.001

④Fisherの正確確率検定 ↑↓：p≤0.05、↑↓：p≤0.01（申請者実施）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。
表2、結果の概要（続き）

世代		親：F0 児：F1				親：F1 児：F2				検 定 方 法
投与量 (mg/kg)		0	2	20	100	0	2	20	100	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	①
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	
児 動 物	リターサイズ	11.5	13.0	11.7	11.5	12.3	13.1	12.2	11.4	
	合計出生児数	275	221	245	230	197	236	243	217	①
	合計死産児数	12	8	4	9	26	4	4	10	①
	出生時の性比 (雄/雌)	144/ 131	111/ 110	124/ 121	117/ 113	91/ 106	105/ 131	114/ 129	116/ 101	
	出生率	83.8	87.7	86.5	79.4	79.0	90.9	90.3	90.8	②
	外表異常	投与に関連する異常はなかつた				投与に関連する異常はなかつた				
	4日生存率	97.9	98.8	94.0	↓ 93.3	92.4	92.9	96.9	95.7	②
	離乳時の生存率	98.6	100	99.4	97.4	99.1	99.3	100	98.0	②
	発達指標の陽性率									②
	耳介展開 (生後4日)	98.5	99.2	100	94.9	96.0	98.7	97.6	98.2	
	毛成長 (生後11日)	100	100	100	100	100	100	100	100	
	歯萌出 (生後12日)	100	100	100	100	100	100	100	100	
	外耳道開口 (生後14日)	100	100	99.4	100	99.2	100	100	100	
	開眼 (生後15日)	100	100	100	100	100	100	98.0	↓ 95.2	
肉眼的病理検査 (出生時及び哺育期の死亡児)	投与に関連する異常はなかつた				投与に関連する異常はなかつた					
肉眼的病理検査 (生後4日)	投与に関連する異常はなかつた				投与に関連する異常はなかつた					
肉眼的病理検査 (生後21日)	投与に関連する異常はなかつた				投与に関連する異常はなかつた					

検定方法：①Studentのt検定またはCochran-Coxのt検定

↑↓： $p \leq 0.05$ 、↑↓： $p \leq 0.01$ 、↑↓*： $p \leq 0.001$

②Wilcoxonの順位和検定 ↑↓： $p \leq 0.05$ 、↑↓： $p \leq 0.01$ 、↑↓*： $p \leq 0.001$

③カイ2乗検定 ↑↓： $p \leq 0.05$ 、↑↓： $p \leq 0.01$ 、↑↓*： $p \leq 0.001$

④Fisherの正確確率検定 ↑↓： $p \leq 0.05$ 、↑↓： $p \leq 0.01$ (申請者実施)

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

表3、摂餌量 [g/kg/日]

世代	検査 時期	投与量 (mg/kg)					
		雄			雌		
		2	20	100	2	20	100
F0	生育1週	↓96	↓*94	↓*92			
	生育2週		↓96	↓96			↑104
	生育3週		↓96	↓97			
	生育4週	↓95	↓95				↑104
	生育5週	↓95	↓93				↑108
	生育6週					↑104	↑*112
	生育7週						↑112
	生育8週			↑106			↑*115
	生育9週	↓94	↓93				↑107
	生育10週			↑104			↑109
	生育11週			↑*108		↑105	↑*116
	妊娠0～7日	—	—	—	↓93		
	妊娠7～14日	—	—	—	↓95		
	F1	生育2週		↓95		↓95	↓94
生育3週					↓95	↓96	
生育4週				↑104	↓96		
生育5週			↓96				
生育6週			↓97		↓94		
生育7週				↑104	↓96		↑108
生育8週				↑104	↓94		↑105
生育9週				↑*106	↓95		
生育10週		↓97		↑*108	↓95		
生育11週				↑*110			
生育12週				↑*108			↑104
生育13週				↑*109	↓94		
妊娠0～7日		—	—	—		↓92	
妊娠7～14日		—	—	—	↓94	↓94	↓95
妊娠14～21日	—	—	—	↓93			

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓*：0.001

(Studentのt検定またはCochran-Coxのt検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの。

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

図1-1、F0親の体重、生育期間

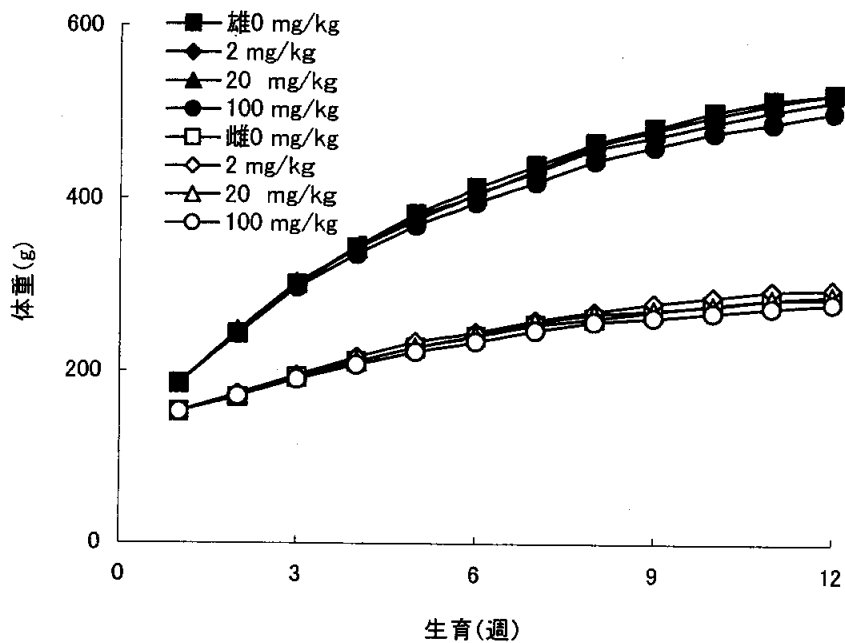


図1-2、F0母動物の体重、妊娠期

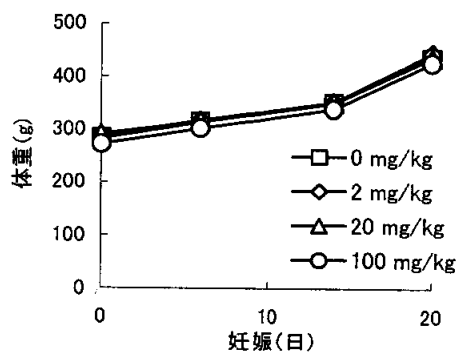
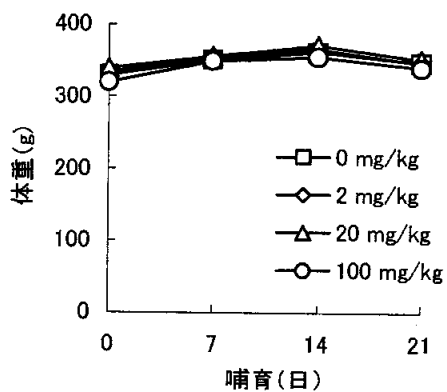


図1-3、F0母動物の体重、哺育期



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

図1-4、F1親の体重、生育期間

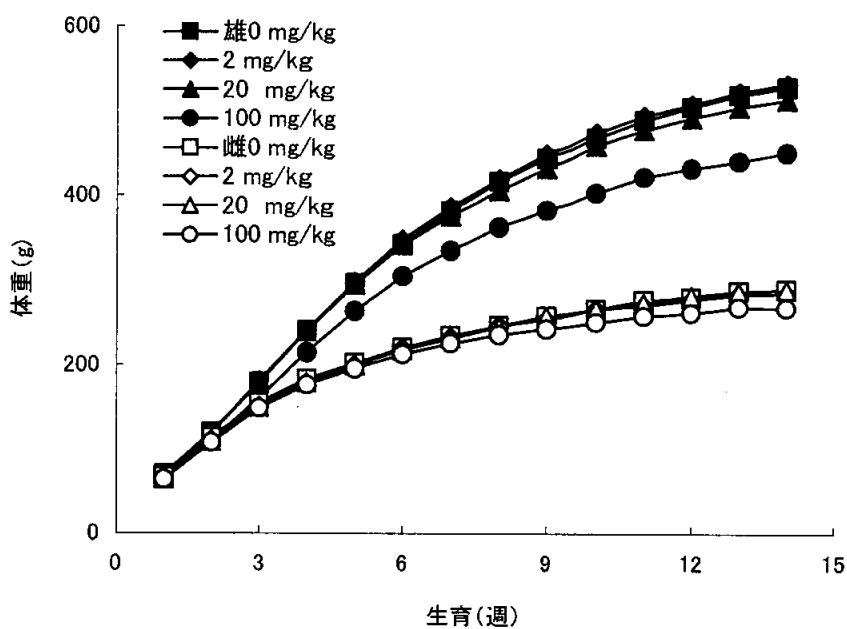


図1-5、F1母動物の体重、妊娠期

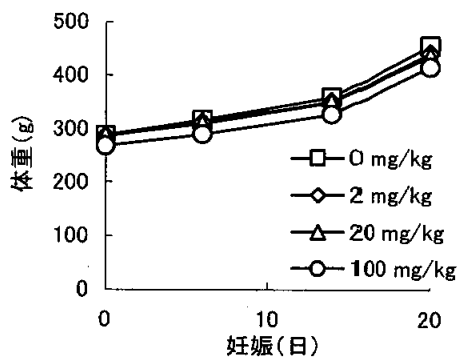
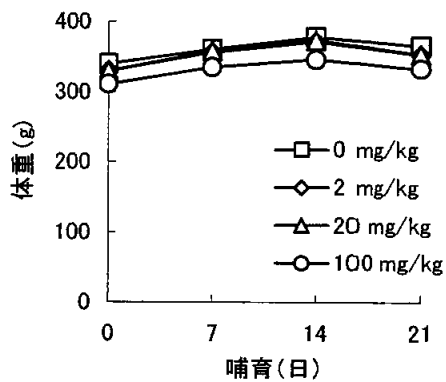


図1-6、F1母動物の体重、哺育期



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

図2-1、F1児の体重 (雄)

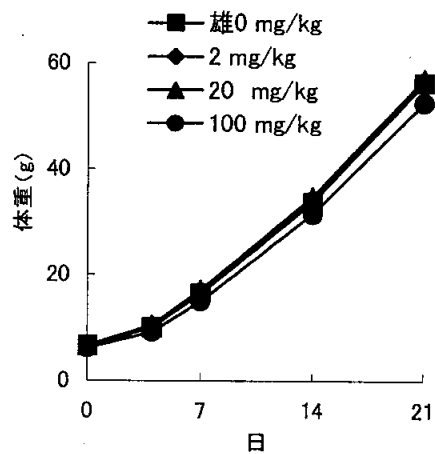
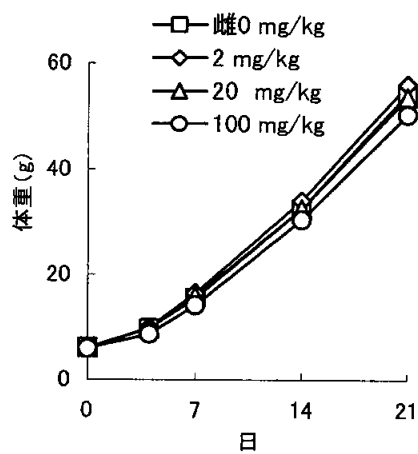


図2-2、F1児の体重 (雌)



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

図2-3、F2児の体重 (雄)

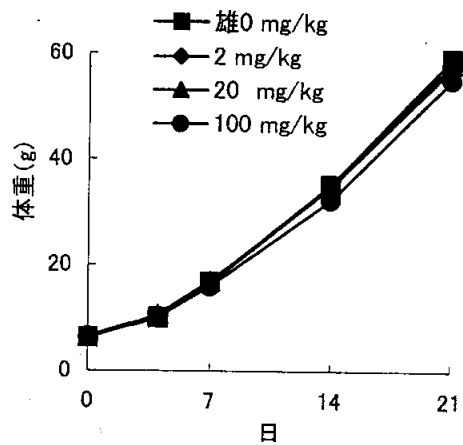
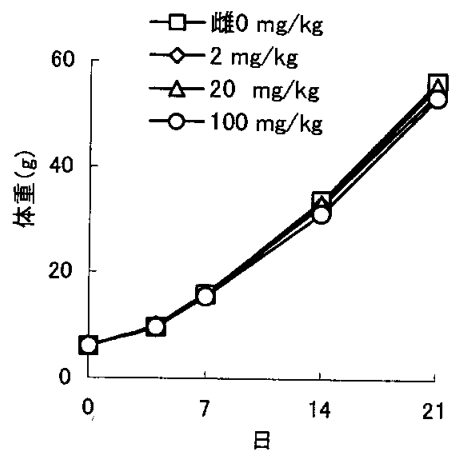


図2-4、F2児の体重 (雌)



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

3) ラットを用いた繁殖毒性試験における全身影響及び繁殖影響のNOELの再検討

(資料 80 補足)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1988年

背景：

でJc1:SDラットを用い、0、2、20、及び100 mg/kgの投与量で実施した繁殖毒性試験（資料ML-289A2）の結果、当該試験の試験責任者は毒性影響として100 mg/kg群の雌雄で低体重が認められ、100 mg/kg群の雄で腎臓毒性を示唆する病理組織学的変化が認められたが、いずれの用量群でも繁殖能力への影響はないと判断し、全身影響の無毒性量を20 mg/kg、繁殖影響の無毒性量を100 mg/kgとした。

これに対して、EPA担当官は肝臓及び腎臓で認められた組織学的変化に基づき、全身影響のNOELは2 mg/kg未満と結論した。また、100 mg/kg群のF2児で認められた開眼の遅延に基づき、繁殖影響のNOELを暫定的に20 mg/kgとし、成熟指標の評価方法に関してさらなる情報を提出するように指示した。

本試験の目的は、肝臓及び腎臓のスライドを再検査して全身影響のNOELを判断すること、及び100 mg/kg群のF2児で認められた開眼の遅延の意義を明確にして繁殖影響のNOELを判断することであった。

[申請者注]：繁殖影響のNOELの再検討の「ii. 繁殖影響」の実施機関について

本報告書ではi. 全身影響については病理スライドのピアレビューを、およびii. 繁殖影響については別の統計処理による解析を実施しており、動物を用いた実験は行っていない。実施は本報告書を作成した

のDr.

が、試験を実施した

を訪問し、

当該試験の試験責任者であるMr.

および試験担当病理学専門家

とともに試験所見及び成熟指標の評価方法を検討した。本抄録における「試験責任者」は、本抄録中の繁殖毒性試験-2を実施した試験責任者である を指す。

試験方法：

i、全身影響

肝臓及び腎臓について下記の切片を検査した。

肝臓：すべての用量群のF0及びF1雌雄のヘマトキシリン・エオジン染色切片。一部の標本のマッソントリクローム染色切片

腎臓：すべての用量群のF0及びF1雄と100 mg/kg群のF0及びF1雌のヘマトキシリン・エオジン染色切片及びマッソントリクローム染色切片

病理検査担当者により検体に関連した影響と考えられた下記の病変を評価した。

肝臓：小葉中心性肥大、単細胞性壊死

腎臓：再生/変性、硝子滴、球状円柱

ii、繁殖影響

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

試験責任者とともに成熟指標の評価方法を検討した。

結果：

i、全身影響

肝臓及び腎臓の病理組織学的所見を表1に示している。

肝臓では100 mg/kg群のF0及びF1雌雄と20 mg/kg群のF0及びF1雄で小葉中心性肥大が認められ、雄で重症度が用量依存性に増加した。100 mg/kg群のF0雄で単細胞壊死の発生頻度が増加傾向を示したが、本変化は小葉中心性肥大で生じる類洞圧迫の間接的影響と考えられた。20 mg/kg群のF0及びF1雌と2 mg/kg群のF0及びF1雌雄ではいずれの変化も認められなかった。

腎臓では100及び20 mg/kg群のF0及びF1雄でのみ再生/変性、硝子滴、及び/または球状円柱の発生頻度が増加し、硝子滴腎症の組織像が示された。100 mg/kg群のF0及びF1雌と2 mg/kg群のF0及びF1雄ではいずれの変化も認められなかった。

[申請者註]：雄の100及び20 mg/kg群で観察された硝子滴腎症は、雌ラットに観察されないところから α -2 μ globulin腎症の所見と考えて妥当である。本症は一部の薬物により雄ラットにのみ発生する腎症であり、硝子滴/好酸性小体の沈着が過多になると上皮細胞壊死を伴うことが知られている。しかし、雌ラットには見られず、また、ヒトを含め他の動物での発生報告はない。したがって、雄ラットにおける本症のヒトへのリスクは極めて少ないと考えられる。

参考文献

Lehman-McKeeman LD, et al. (1990): Lysosomal degradation of alpha 2u-globulin and alpha 2u-globulin-xenobiotic conjugates. Toxicol Appl Pharmacol, 103(3):539-548.

ii、繁殖影響

100 mg/kg群のF2児で統計学的に有意な開眼の遅延が認められた ($p < 0.05$, Wilcoxonの順位和検定) が、F1児では認められなかった。哺育15日に眼が開いている児動物は当該投与群で95.2%であったのに対し、対照群では100%であった。本開眼遅延は3リターのみを観察された。これらのうち2リターは低体重を呈し、開眼の遅延は低体重に関連する二次的影響と考えられるため、試験責任者は正常変動の範囲内と判断した。一方、体重に関し低体重のリターを含めて計算しても、平均リター体重は統計学的に有意に減少しなかった (Studentのt検定またはCochran-Coxのt検定)。従って、低体重は検体投与の影響ではなく正常のリター間の変動範囲と考える。また、これらの2リターを除いて統計解析を行うと、100 mg/kg群の開眼日齢に対照群との差は認められなかった (Wilcoxonの順位和検定)。

以上の結果から、100及び20 mg/kg群で腎臓及び肝臓に検体投与に関連した組織学的変化が認められたが、2 mg/kg群では変化が認められなかったことから、全身影響のNOELは2 mg/kgと判断する。

また、100 mg/kg群のF2児で認められた開眼の遅延は、2リターの平均リター体重が正常範囲内にあるものの低体重を呈したことによる二次的影響と考えられる。従って、繁殖影響のNOELは100 mg/kgと判断する。

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

表1、病理組織学的検査

	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg)	0	2	20	100	0	2	20	100
F0 親 動物	腎	所見/検査動物数	25	25	25	25	0	0	0	25
		球状円柱								
		軽微	0	0	0	5	—	—	—	0
		軽度	0	0	0	8	—	—	—	0
		中等度	0	0	0	8	—	—	—	0
		重度	0	0	0	1	—	—	—	0
		合計	0	0	0	↑22	—	—	—	0
		硝子滴								
		軽微	0	0	11	0	—	—	—	0
		軽度	0	0	0	1	—	—	—	0
		中等度	0	0	0	16	—	—	—	0
		重度	0	0	0	8	—	—	—	0
		合計	0	0	↑11	↑25	—	—	—	0
		再生/変性								
		軽微	1	0	3	0	—	—	—	0
		軽度	1	0	0	15	—	—	—	0
	中等度	0	0	0	7	—	—	—	0	
	重度	0	0	0	3	—	—	—	0	
	合計	2	0	3	↑25	—	—	—	0	
	肝	所見/検査動物数	25	25	25	25	25	25	25	25
		小葉中心性肥大								
		軽微	0	0	11	0	0	0	0	17
		軽度	0	0	8	4	0	0	0	7
		中等度	0	0	2	15	0	0	0	0
		重度	0	0	0	6	0	0	0	0
		合計	0	0	↑21	↑25	0	0	0	↑24
		単細胞性壊死								
		軽微	0	0	1	4	0	0	0	0
		合計	0	0	1	4	0	0	0	0

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↑↓：p<0.01 (Fisherの正確確率検定、申請者実施)

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

表1、病理組織学的検査（続き）

	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg)	0	2	20	100	0	2	20	100
F1 親 動物	腎 臓	所見/検査動物数	25	25	25	25	0	0	0	25
		球状円柱								
		軽微	0	0	1	6	—	—	—	0
		軽度	0	0	0	5	—	—	—	0
		中等度	0	0	0	6	—	—	—	0
	合計	0	0	1	↑17	—	—	—	0	
	硝子滴									
	軽微	0	0	13	6	—	—	—	0	
	軽度	0	0	2	12	—	—	—	0	
	中等度	0	0	0	5	—	—	—	0	
	重度	0	0	0	1	—	—	—	0	
	合計	0	0	↑15	↑24	—	—	—	0	
	再生/変性									
	軽微	3	0	9	4	—	—	—	0	
	軽度	0	0	0	15	—	—	—	0	
中等度	0	0	0	5	—	—	—	0		
重度	0	0	0	1	—	—	—	0		
合計	3	0	↑9	↑25	—	—	—	0		
肝 臓	所見/検査動物数	25	25	25	25	25	25	25	25	
	小葉中心性肥大									
	軽微	0	0	11	0	0	0	0	5	
	軽度	0	0	5	5	0	0	0	0	
	中等度	0	0	0	16	0	0	0	0	
	重度	0	0	0	4	0	0	0	0	
	合計	0	0	↑16	↑25	0	0	0	↑5	
	壊死									
	中等度	0	0	0	0	1	0	0	0	
	合計	0	0	0	0	1	0	0	0	
単細胞性壊死										
軽微	0	0	0	1	0	0	0	1		
軽度	0	0	0	0	1	0	0	0		
合計	0	0	0	1	1	0	0	1		

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01 (Fisherの正確確率検定、申請者実施)

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

4) ラットにおける催奇形性試験

(資料 28)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1982年

検体純度 :

試験動物 : SD系妊娠ラット (63~77日齢) 1群17~23匹

試験期間 : 交配から屠殺まで36日間 (1981年10月12日~1981年11月16日)

投与は妊娠6日~19日の14日間

方法 : 検体をTween80 (0.5% w/w) 及びCMC (0.7% w/w) と混合し, 5, 25および150mg/kgの投与レベルで妊娠後6日目から19日目までの14日間, 毎日1回経口投与した。

なお対照群には, CMC, Tween80を同様に投与した。

試験項目 :

母体 : 一般状態及び生死を毎日観察し, 妊娠0日, 妊娠6~19日, および妊娠20日目に体重を測定した。

妊娠20日目に帝王切開し, 黄体数, 着床数, 生存及び死亡・吸収胎児数を検査した。

生存胎児 : 性別, 体重及び外表異常の観察を行った。

全胎児について内臓検査および骨格異常を検査した。

また胎児の各群約半数を選んで頭部内の検査を行った。

結果 :

投与群 (mg/kg/day)		対照	5	25	150	
1群当り動物数		27	29	30	29	
親	一般状態	-	-	-	-	
	死亡率 (%)	0	0	0	0	
	体重変化 (g) (妊娠6日目と20日目の差)	98.1±14.73	95.5±14.25	92.0±17.92	78.5±22.97	
	妊娠動物数	17	23	23	21	
動物	解剖時の観察	水腎症 3例	水腎症 2例	水腎症 1例	水腎症 2例	
	着床所見	黄体数	11.6±2.15	11.7±1.66	12.1±1.70	11.0±2.80
		着床数	11.8±1.92	11.7±2.08	12.1±2.04	11.2±2.75
		生存胎仔数	11.2±2.04	11.3±2.29	11.7±1.91	10.6±2.91
		吸収胎仔数	10	7	8	12

註) 空欄は異常なし

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

投 与 群 (mg/kg/day)		対 照	5	25	150
妊 娠 動 物 数		17	23	23	21
胎	体 重 (g) ♂	3.9±0.34	3.9±0.24	3.9±0.28	3.4±0.32
	♀	3.7±0.32	3.7±0.24	3.6±0.28	3.2±0.26
性 別 (雄/雌)		1.2	1.1	0.9	1.1
仔	外 表 異 常	矮小仔 1例	矮小仔 1例	矮小仔 3例	矮小仔 10例
	頭 部 異 常			水頭症 1例	
動	骨 格 異 常				
	変 異 (%)	12.1	4.5	8.3	32.1
	奇 形 (%)	0	0	0	0
物	内 臓 異 常				
	変 異 (%)	0.5	0.7	1.0	2.1
	奇 形 (%)	0	0	0	0

註) 空欄は異常なし

親動物の150mg/kg投与群において体重増加抑制が認められた。

150mg/kg投与群において胎児動物の体重減少および骨格検査における胸骨変異の増加が認められたが、これらの変化は母体の体重増加抑制に関連すると考えられた。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに投与したときの母体における最大無作用量は25mg/kg/dayであった。また最高投与量の150mg/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。

[申請者注]：骨格異常と内臓異常の発生率の内訳について

対照群と有意差が認められている胸骨分節の変異についての次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。
 表. ラット催奇形性試験の胎児における胸骨分節の変異の発生頻度

Parameter	Dose level (mg/kg/day)			
	0	5	25	150
Foetal sternebral variations				
Number of litters examined	17	23	23	20
Number of foetuses examined	190	261	270	223
Incomplete ossification:				
Sternebra 1	0	0	1 (1)	1 (1)
Sternebra 2	6 (8)	1 (1)	1 (1)	9 (24)
Sternebra 3	1 (1)	0	2 (2)	8 (13)
Sternebra 4	2 (2)	0	0	10 (27)
Sternebra 5	0	0	0	0
Sternebra 6	6 (8)	4 (7)	6 (10)	9 (18)
Absent (unossified):				
Sternebra 1	0	0	0	0
Sternebra 2	1 (2)	0	1 (3)	2 (3)
Sternebra 3	0	0	0	0
Sternebra 4	0	0	0	0
Sternebra 5	6 (8)	0	2 (2)	13 (57)
Sternebra 6	2 (2)	0	1 (1)	2 (3)
Bipartite:				
Sternebra 1	0	0	0	1 (1)
Sternebra 2	0	0	0	3 (3)
Sternebra 3	0	0	0	2 (2)
Sternebra 4	0	0	1 (1)	3 (3)
Sternebra 5	0	0	0	0
Sternebra 6	0	0	0	1 (1)
Lack of apposition:				
Sternebra 1	0	0	0	1 (1)
Sternebra 2	0	0	0	2 (2)
Sternebra 3	0	0	0	3 (4)
Sternebra 4	0	0	2 (2)	2 (3)
Sternebra 5	0	0	0	0
Sternebra 6	0	0	0	0

Foetal incidence in parenthesis

Combined incidence of sternebral variations statistically significant higher than in controls ($p < 0.001$)

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

5) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 29)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1985年

検体の純度 :

試験動物 : New Zealand White系妊娠ウサギ (6ヶ月齢) 1群16匹

試験機関 : 動物入手から骨格観察まで85日間 (1985年6月11日~8月24日)
投与は妊娠6日から18日までの13日間

方 法 : 検体を0.5%CMC水溶液に懸濁し, 0, 20, 100及び200mg/kgの投与レベルで妊娠6日から18日までの13日間, 毎日1回経口投与した。

試験項目 :

母 体 : 一般状態及び生死を毎日観察し, 妊娠0, 6, 9, 12, 15, 18, 23, 28日目に体重を測定した。

摂餌量は毎日測定した。

妊娠28日目に帝王切開し, 黄体数, 着床数, 生存胎児数, 死亡胚数, 死亡胎児数を検査した。

また, 試験に用いたすべての動物について, 体表, 体孔および胸腔, 腹腔骨盤腔内の臓器を肉眼的に検査し, 計画屠殺動物については, 肝, 腎, 心, 副腎の重量を測定し対体重比も算出した。

生存胎児 : 性別, 体重及び外表異常の観察を行った。

全例の生存胎児について内臓検査を行った後, 骨格標本作製し, 骨格異常の有無を検査した。

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

結 果：

投与群 (mg/kg/day)	対 照	20	100	200		
1 群当り動物数	16	16	16	16		
親動物	一般状態	妊娠23日より皮温低下, 妊娠24日に流産 (1例)	妊娠16日~19日に妊娠22日に流産 (1例) 一過性の下痢 (2例)	一過性の下痢 (3例)	一過性の下痢 (3例)	
	死亡率 (%)	0	0	0	0	
	切迫屠殺動物数	1	1	0	0	
	体重変化					
	摂餌量		妊娠27~28日に低下		妊娠19~21日, 22~25日に増加	
	妊娠動物数	14	14	14	13	
	剖検所見	肝の黄白色斑, 白色斑, 小結節, 乳頭突起の黄色, 嚢胞, 胆嚢の萎縮, 小結節, 腎の小嚢胞, 肺の局所的気腫 (各1例)		肝の淡緑色小腫瘍 (1例)	腎の小嚢胞, 肺の局所的色調変化 (各1例)	
	臓器重量		心: 重量減少	腎: 対体重比増加	肝: 重量及び対体重比増加, 心: 重量増加	
	着床所見	黄体数	9.3±2.4	8.0±2.0	9.0±2.1	8.8±2.4
		着床数	8.6±2.5	7.4±2.3	8.1±1.9	7.8±2.5
生存胎仔数		8.1±2.4	7.1±2.3	7.9±1.8	7.5±2.6	
死亡胚数		7	4	3	3	
胎仔死亡率 (%)		5.8	3.8	2.6	3.0	
胎仔動物	体重 (g)	雌 37.7±4.2 雄 40.5±6.6	雌 39.2±4.2 雄 40.8±3.3	雌 38.0±4.7 雄 39.2±5.8	雌 41.1±6.0 雄 41.2±5.0	
	性比 (雄/雌)	0.84	1.13	0.66	1.18	
	外表異常	腹壁裂 (1例)				
	骨格異常		胸骨癒合 (1例) 肋骨数の増加 (1例)	胸骨癒合 (2例) 胸骨数の増加 (1例)	胸骨癒合 (2例)	
	内臓異常					

注) 空欄は異常なし

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

親動物の一般状態、体重及び摂餌量において、多少の変動を示す個体が散見されたが、用量相関性が認められないことから検体投与と関連のない偶発的変化と考えられた。

200mg/kg投与群で肝の重量及び対体重比で有意な増加が認められ、検体投与に起因するものと考えられた。

胎児動物については、胎児死亡率、外表、骨格及び内臓異常の発現率にいずれの投与群も対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

以上の結果により、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母体における最大無作用量は100mg/kg/dayであった。また最高投与量の200mg/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クマイ化学工業株式会社にある。

(13) 変異原性

1) 細菌を用いたDNA修復及び復帰突然変異試験

(資料 30)

試験機関

[非GLP]

報告書作成年 1974年

検体の純度 : 精製品 ;

原 体 ;

方 法 : 1) DNA修復試験

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、DNAの損傷の誘発性を検定した。検定原液と5%検体DMSO溶液を各々直径10 mmの濾紙に0.02 mLしみこませ実施した。

2) 復帰突然変異試験

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌*Salmonella typhimurium* TA1535, TA1536, TA1537, TA1538およびトリプトファン要求性大腸菌*E. coli* WP2 hcr^+ 株とWP2 hcr^- 株を用いて、変異原性を検定した。5%検体DMSO溶液0.02 mLを濾紙にしみこませた場合 (定性的) と原体の0.1%DMSO溶液、精製品の1%DMSO溶液をの0.1 mLを寒天培地に溶かした場合 (定量的) の両方行った。

結 果 :

1) DNA修復試験

薬 剤	濃 度 (処理量、 $\mu\text{g}/\text{disk}$)	阻 止 域 (mm)		差 (差mm)
		M-45	H-17	
対照 (DMSO)	—	0	0	0
原 体	100% (22290 μg)	0	0	0
	5% (1115 μg)	0	0	0
精製品	100% (23220 μg)	0	0	0
	5% (1161 μg)	0	0	0
Mitomycin C	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	17	7	10

注 : 処理量は%をv/vと解釈し、各被験物質の純度および比重 (1.167 g/cm^3) から申請者が算出した。

検体投与群では、両株に生育阻止を認めなかった。一方陽性対照のMitomycin Cでは両株の間に明らかな生育阻止の差が生じた。

以上の結果より本検体はDNA損傷の誘発性が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クマイ化学工業株式会社にある。

2) 復帰突然変異試験

i) 定性的試験

薬物	濃度 (処理量、 µg/disk)	S-9 Mixの 有無	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2 hcr^+	WP2 hcr^-	TA1535	TA1536	TA1537	TA1538
対照 (DMSO)		—	0	0	0	0	0	0
原体	5%溶液	—	0	0	0	0	0	0
	(1115 µg)	—	0	0	0	0	0	0
精製品	5%溶液	—	0	0	0	0	0	0
	(1160 µg)	—	0	0	0	0	0	0

注：処理量は%をv/vと解釈し、各被験物質の純度および比重（1.167 g/cm³）から申請者が算出した。

ii) 定量的試験

薬物	濃度 (処理量 µg/plate)	S-9 Mixの 有無	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2 hcr^+	WP2 hcr^-	TA1535	TA1536	TA1537	TA1538
対照 (DMSO)		—	10	19	6	0	9	54
		—	12	20	7	0	9	57
原体	0.1%溶液	—	7	17	9	0	12	23
	(111 µg)	—	—	24	15	0	18	47
精製品	1%溶液	—	12	11	5	0	3	25
	(1160 µg)	—	20	12	9	0	—	37

注：処理量は%をv/vと解釈し、各被験物質の純度および比重（1.167 g/cm³）から申請者が算出した。

検体投与群で、定性的には、復帰変異を起こした特異的なコロニーは認められず、定量的にも復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、検体は本試験条件下で復帰変異誘発性は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クマイ化学工業株式会社にある。

2) チャイニーズ・ハムスターの肺線維芽細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 3 1)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1985年

検体の純度：

方 法：チャイニーズ・ハムスターの継代培養した肺線維芽細胞を用いた。試験前に濃度設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果から、本試験の濃度は50%細胞増殖抑制の2倍量、すなわち直接法で80 μ g/mL、代謝活性化法で36 μ g/mLまでとした。各濃度でシャーレ当たり100個、2枚のシャーレ、計200個の分裂中期像を観察した。染色体の数的異常は倍数性細胞の出現数を計測し、構造異常をギャップ、切断、交換、環状形成、細片化及びその他（多動原体など）に分類し計測した。異常を有する細胞の出現頻度は5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結 果：

代謝活性化の有無	薬 物	濃 度 (μ g/mL)	培 養 時間 (時間)	観 察 細胞数	構造異常を有する細胞数						構造異 常細胞 出現率 (%)	倍数性 細胞出 現率 (%)	評 価
					ギャップ	切断	交換	環状 形成	細片化	その他			
直接法	溶媒対照 (DMSO)	—	24	200	2	1	0	0	0	0	1.5	0.5	—
	検 体	10	24	200	1	3	1	0	0	0	2.5	2.0	—
		20	24	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	—
		40	24	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.0	—
		80	24	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.0	—
	溶媒対照 (DMSO)	—	48	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—
	検 体	10	48	200	0	2	0	0	0	0	1.0	0.0	—
		20	48	200	1	1	0	0	0	0	1.0	1.0	—
		40	48	200	0	0	1	0	0	0	0.5	0.0	—
		80	48	200	0	0	0	0	0	0	0.0	5.0	±
	陽性対照 (MNNG)	3	48	200	15	90	109	12	3	9	69.5	8.5	+

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

代謝活性化の有無	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	培養時間 (時間)	観察細胞数	構造異常を有する細胞数						構造異常細胞出現率 (%)	倍数性細胞出現率 (%)	評価	
					ギャップ	切断	交換	環状形成	細片化	その他				
代謝活性化法	溶媒対照 (DMSO)	—	6	200	1	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—
	検体	4.5	6	200	3	0	0	0	0	0	0	1.5	0.5	—
		9.0	6	200	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—
		18.0	6	200	1	1	0	0	0	0	1	1.5	0.5	—
		36.0	6	200	4	20	34	0	3	4	24.5	3.0	+	
	陽性対照 (B(a)P)	30	6	200	5	33	62	5	0	2	43.5	1.0	+	

直接法の検体 $80\mu\text{g/mL}$ 投与群で倍数性細胞の増加及び代謝活性化法の検体 $36\mu\text{g/mL}$ 投与群で染色体異常の増加が認められた。また陽性対照として用いたN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) 及び1, 2-benzopyrene (B(a)P) では、顕著な染色体異常の増加がみられた。

以上の結果から本検体におけるチャイニーズ・ハムスターの肺線維芽細胞を用いた*in vitro*染色体異常試験での変異原性は陽性であると判断される。

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

3) ヒトのリンパ球細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験

(資料 32)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1985年

検体の純度 :

方 法 : ヒトのリンパ球細胞を用いた。

試験前に濃度設定のために実施した細胞毒性の試験から本試験の濃度は、非活性化法で20 μ g/mL, 活性化法で40 μ g/mLまでとした。

各濃度で100個の分裂中期像を3枚のシャーレについて観察した。

染色体の異常をギャップ (Gap), 切断 (Break), 交換 (Exchange), 細片 (Fragment) に分類し計測した。評価は異常細胞数が統計学的に有意に増加および異常細胞の出現頻度が、陰性対照の通常頻度より高い場合を陽性とした。

結 果 :

代謝活性化の有無	薬 物	濃 度 (μ g/mL)	観 察 細胞数	異常を有する細胞数				異常細胞 出現率 (%)	評価
				ギャップ	切断	交換	細片		
非活性化	溶媒対照 (DMSO)	—	300	6	2	0	0	2.3	—
	無 処 理	—	300	1	1	2	3	2.3	—
	検 体	5	300	3	1	2	0	1.7	—
		10	300	0	1	3	1	1.7	—
		20	300	5	2	0	4	3.0	—
	陽性対照 (Cyclophosphamide)	6	300	2	1	2	0	1.7	—
陽性対照 (EMS)	300	293	16	20	16	8	18.3	+	
活 性 化	溶媒対照 (DMSO)	—	282	1	0	2	0	1.1	—
	無 処 理	—	300	2	1	1	0	1.3	—
	検 体	10	300	3	0	0	1	1.3	—
		20	300	2	1	0	2	1.3	—
		40	300	5	2	0	0	2.3	—
	陽性対照 (Cyclophosphamide)	6	300	10	33	14	7	17.7	+

検体投与群は、染色体異常の発現頻度において、濃度と相関した異常細胞の増加及び対照と比して有意な異常細胞の増加は認められなかった。

一方陽性対照として用いたCyclophosphamide及びEthyl methanesulphonate (EMS) では顕著な染色体異常の増加がみられた。

以上の結果から、本検体におけるヒトのリンパ球細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験での変異原性は陰性であると判断される。

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

4) マウスリンホーマ細胞を用いた突然変異試験

(資料 76)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 2003年

検体純度 :

試験方法 : マウスリンホーマ細胞 (L5178Y 3.7.2c) を用い、アロクロール1254で誘導した雄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チミジンキナーゼ遺伝子座のTK+/-からTK-/-の変異を指標とした前進性突然変異を検索した。検体に最も適した溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を選択した。処理容量は1% v/vとした。

S9 mixの非存在下では検体を0.02-0.4 mMの8用量で3時間処理し、S9 mix存在下で検体を0.0025-0.1 mMの8用量で3時間処理した。検体処理後新しい培地に交換し、48時間の発現時間培養後、96wellマイクロプレートに播種した。10-14日後にコロニーを計数した。検体処理後 (Day0) の相対生存率ならびに検体処理48時間後 (Day2) のコロニー形成率を測定し、突然変異誘発頻度の算出に用いた。突然変異コロニーについては、その大きさについても解析した。

何れの場合も溶媒対照ならびに陽性対照を同時に試験し、検体処理群および陽性対照群については1濃度あたり2枚のプレートを用い、溶媒対照については4枚のプレートを用いた。

用量設定根拠 :

検体が培地中で析出する濃度である5 mMを最高濃度として予備毒性試験を実施した。S9 mixの存在下および非存在下で3時間、S9 mix非存在下で24時間、検体を処理した。その結果、3時間処理では、S9 mix非存在下における相対生存率は、0.313 mMで4%、0.156 mMで23%であった。S9 mix存在下における相対生存率は、0.039 mMで6%であった。24時間処理では0.156 mMで2%、0.078 mMで34%であった。以上の結果から、本試験における最高濃度をS9 mix非存在下と存在下で0.4 mMおよび0.04 mMとした。

結果 : 結果を次頁の表に示した。

S9 mixの非存在下では、0.2, 0.3, 0.4 mM処理において突然変異頻度が有意に増加した。Day0の相対生存率はそれぞれ14%, 7%, 3%であった。0.02-0.1 mM処理においては、突然変異頻度の有意な増加は認められなかった。なお、高濃度の処理により大コロニーの変異体の割合が増加した。

S9 mix存在下では、0.02, 0.03, 0.04 mM処理において突然変異頻度が有意に増加し、溶媒対照のそれぞれ約1.7, 2.2, 2.8倍に増加した。Day0の相対生存率はそれぞれ43, 20, 17%であった。0.0025-0.01 mM処理においては変異頻度の有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では、明らかな突然変異頻度の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において遺伝子突然変異誘発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クマイ化学工業株式会社にある。

表

薬物	濃度 (mM)	処理時間 (h)	S9 mixの有無	Day0の相対生存率 (%)	Day2のコロニー形成率 ^a	Day2の平均相対コロニー形成率 (%)	コロニー形成率 ^b ($\times 10^{-6}$)	突然変異頻度 ^c ($\times 10^{-6}$)	平均突然変異頻度 ($\times 10^{-6}$)	小コロニーの割合 (%)				
陰性対照 (DMSO)	0	3	-	100	1.05 0.84 0.92 0.92	100	147 169 172 176	141 201 187 191	180	66				
検体	0.02	3	-	94	0.98 0.84	98	144 147	147 175	161	75				
	0.04				96		0.84 0.95	96			147 144	175 151	163	74
	0.06				70		1.16 0.92	112			169 137	145 149	147	66
	0.08				89		0.95 1.01	105			191 200	201 198	199	67
	0.1				55		1.05 1.16	118			191 199	183 171	177	70
	0.2				14		0.98 0.95	104			373 362	381 382	381**	59
	0.3				7		0.89 1.16	110			463 407	519 351	435	45
	0.4				3		0.61 0.65	68			432 384	704 593	648	45
陽性対照 (MMS)	10	3	-	93	0.63 0.71	72	928 1019	1472 1443	1457**	76				

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

表 (続き)

陰性対照 (DMSO)	0	3	+	100	0.89	100	302	338	272	71					
					1.05		269	258							
					0.91		243	266							
					0.87		195	225							
検体	0.0025	3	+	89	0.98	117	269	275	242	76					
					1.20		252	209							
					0.005		79	1.08			118	292	270	281	70
								1.12				326	291		
					0.01		80	0.79			110	311	393	359	73
								1.25				407	326		
					0.02		43	0.79			92	402	507	474**	69
								0.92				407	442		
0.03	20	0.77	94	599	777	588**	71								
		0.98		390	398										
0.04	17	1.01	94	673	664	750**	70								
		0.73		607	835										
0.08	5	-	-	-	-	-	-								
		-		-	-										
0.1	2	-	-	-	-	-	-								
		-		-	-										
陽性対照 (3-MC)	2.5	3	+	68	0.89	108	1061	1188	1122**	67					
					1.12		1184	1057							

a: 非選択培地中のコロニー形成率, b: 選択培地中のコロニー形成率

c: 突然変異頻度 = b/a (選択培地中のコロニー形成率/非選択培地中のコロニー形成率)

MMS: メチルメタンスルホネート, 3-MC: メチルコラントレン

** p<0.01 (Robinsonらの検定法)

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

5) マウスを用いた小核試験

(資料 33)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1985年

検体の純度 :

試験方法 :

試験動物 ; BDF₁マウス, 8週齢, 体重—雄25.0~28.1g, 雌20.0~24.1g

動物数 ; 単回投与試験—1群雌雄各5匹

4回連続投与試験—1群雌雄各5匹

投与濃度 ; 投与量設定予備試験結果より, 下記の通り設定した。

単回投与試験—雄 : 0, 270, 540, 1080mg/kg

雌 : 0, 405, 810, 1620mg/kg

(陽性対照Mitomycin C : 2mg/kg)

4回連続投与試験—雌雄とも0, 540mg/kg

方法 : 検体を0.25%CMC水溶液に懸濁し, マウス体重10g当り0.1mLを胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

陽性対照Mitomycin Cは生理食塩水に溶解し腹腔内投与した。4回連続投与試験では1回投与後24時間おきに1日1回4日間連続投与した。

予備試験結果より単回投与試験では投与48時間後に, 4回連続投与試験では, 最終投与24時間後に, また陽性対照群では投与24時間後に動物を屠殺し, 直ちに大腿骨を摘出した。常法により骨髓細胞を取り出し塗抹標本を作成した。

各染色塗抹標本につき多染性赤血球(PCE)1000個を鏡検し, 小核を有する多染性赤血球数を測定した。また赤血球1000個中の多染性赤血球数を測定した。

$$\text{多染性赤血球の割合 (\%)} = \frac{\text{多染性赤血球数}}{\text{観察赤血球数}} \times 100$$

$$\text{小核赤血球出現頻度 (\%)} = \frac{\text{小核を有する多染性赤血球数}}{\text{観察多染性赤血球数}} \times 100$$

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

結果：

単回投与試験

性	薬物	薬量 (mg/kg)	観察赤血球数	多染性赤血球 数の割合(%) ^a	小核赤血球の 出現頻度(%) ^b	小核赤血球の 出現範囲 (最低-最高)
雄	検体	0	5000	49.5±5.4	0.26±0.15	1-5
		270	5000	55.4±6.8	0.36±0.25	0-7
		540	5000	52.2±12.5	0.48±0.25	3-9
		1080	5000	42.4±7.7	1.80±1.34(↑)	8-40
		陽性対照	2	5000	35.4±8.2(↓)	6.60±1.15(↑)
雌	検体	0	5000	61.4±8.8	0.34±0.18	1-5
		405	5000	64.3±9.2	0.48±0.29	1-9
		810	5000	57.0±19.7	0.78±0.16(↑)	5-9
		1620	5000	46.4±16.0	0.88±0.37(↑)	4-13
		陽性対照	2	5000	43.3±6.2	6.68±1.11(↑)

統計学的有意差：↓ P<0.05, ↑ : P<0.01

(^a Kastenbaum and Dowman推計学的方法、^b Dunnett's test)

4回連続投与試験

性	薬物	薬量 (mg/kg)	観察赤血球数	多染性赤血球 数の割合(%) ^a	小核赤血球の 出現頻度(%) ^b	小核赤血球の 出現範囲 (最低-最高)
雄	検体	0	5000	58.3±15.8	0.44±0.11	3-6
		2160	5000	63.3±13.8	0.88±0.23(↑)	6-12
雌	検体	0	5000	71.3±11.4	0.40±0.12	2-5
		2160	5000	69.3±7.6	0.86±0.33(↑)	5-13

統計学的有意差：↓ P<0.05, ↑ : P<0.01

(^a Kastenbaum and Dowman推計学的方法、^b Dunnett's test)

単回投与試験において、雄では検体1080mg/kg投与、雌では検体810mg/kg以上の投与群で小核赤血球の出現頻度が統計学的に有意な増加を示した。

一方陽性対照として用いたMitomycin C投与群では小核赤血球の出現頻度が明らかな増加を示した。

また4回連続投与試験において、雌雄とも小核赤血球の出現頻度が統計的に有意な増加を示した。

以上の結果より本検体はマウス骨髄細胞に対し、染色体異常ないし紡錘体阻害を誘発するものと判断された。

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

6) マウスを用いた急性及び亜急性優性致死試験

(資料 34)

試験機関

[非GLP]

報告書作成年 1978年

検体の純度 :

試験動物 : CD-1系マウス, 1群雄15匹 (最終投与後, 無作為に1群10匹を抽出し交配に用いた。)
1群雌160匹 (非投与)

方 法 :

投 与 : 急性及び亜急性試験における検体の投与量及び投与回数は下表のとおりとし, 胃ゾンデを用い, 強制経口投与した。陽性対照としてEthyl methanesulphonate (EMS) を用いた。

	薬 物	投 与 量 (mg/kg/day)	投与回数	動 物 数
急性 試験	対 照	—	—	10
	溶 媒 対 照 (0.5%トラガカント・ゴム)	—	単 回	10
	検 体	600	単 回	10
亜 急性 試験	陽 性 対 照 (EMS)	200	3 日間毎日	10
	溶 媒 対 照 (0.5%トラガカント・ゴム)	—	5 日間毎日	10
	検 体	33	5 日間毎日	10
		100	5 日間毎日	10
	300	5 日間毎日	10	

交 配 : 最終投与の24時間後に1群10匹の雄を無作為に抽出し, 雄1匹に対し, 未経産雌2匹を同居させ, 7日後雌を分離し, 新たに別の雌2匹を同居させ交配させた。この操作を8週にわたり, 計8回の交配を繰り返した。

雌は交配期間中毎朝, 膣栓の有無を検査した。

交配後処置 : 交配させた雌は雄との同居日より17日目にと殺し, 総着床数, 初期死胚数, 後期死胚数を観察した。

判 定 : 妊娠率, 平均着床数, 着床胚死亡率を用いて判定した。

なお, 妊娠率および着床胚死亡率は下記の如く算出した。

$$\text{妊娠率 (\%)} = \frac{\text{妊娠動物数}}{\text{交配動物数}} \times 100$$

$$\text{着床胚死亡率 (\%)} = \frac{\text{死胚数}}{\text{総着床数}} \times 100$$

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

結果：統計的有意差の認められた項目は下表のとおりである。

	項目	薬剤	投与量 (mg/kg)	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週	
急性試験	妊娠率 ^a	検体	600	↑								
		陽性対照(EMS)	200									
	平均着床数 ^b	検体	600	↑								
		陽性対照(EMS)	200		↓							
	着床胚死亡率 ^c	検体	600							↓		
		陽性対照(EMS)	200	↑	↑					↓		
亜急性試験	妊娠率 ^a	検体	33	↑							↑	
			100					↓				
			300									↑
		陽性対照(EMS)	200		↓						↑	
	平均着床数 ^b	検体	33									
			100									↓
			300									
		陽性対照(EMS)	200	↓	↓						↑	
	着床胚死亡率 ^c	検体	33									
			100									
			300									
		陽性対照(EMS)	200	↑	↑							

統計学的有意差：↓ ↑ P < 0.05, ⇕ : P < 0.01, ↑ : P < 0.001

(^a Chi-squared test, ^b Mann-Whitney U test, ^c Student's t test)

急性試験の検体投与群では、妊娠率の低下、平均着床数の低下および着床胚死亡率の増加は認められなかった。

亜急性試験の検体投与群100mg/kgで妊娠率の低下（5週のみ）、平均着床数の低下（8週のみ）が認められたが、薬量相関性はなく影響とは考えなかった。

一方、陽性対照として用いたEthyl methanesulphonateでは急性及び亜急性試験のいずれにおいても、平均着床数の低下及び着床胚死亡率の増加が認められた。

以上の結果から、本検体におけるマウスを用いた優性致死試験での変異原性は陰性であると判断される。

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

7) ラット肝細胞を用いた *in vivo* DNA修復試験-1

(資料 77)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 2004年

検体純度 :

供試動物 : Sprague-Dawleyラット雄、6~7週齢、体重177~241 g、1群5匹 (陽性対照群は1群3匹)

試験方法 : 検体をコーン油に溶解し、150及び500 mg/kgの投与レベルで1回強制経口投与した。陰性対照群にはコーン油を同様に投与した。

投与後2及び14時間にそれぞれ各群5匹を屠殺し、酵素分離により肝細胞を単離した。単離肝細胞をガラス製カバーガラスに付着させ、10 $\mu\text{Ci/mL}$ の(メチル- ^3H)チミジンとともに *in vitro*で4時間培養し、修復合成されるDNAを放射性標識した。次に、肝細胞を非標識チミジンとともに20時間追加培養した後、固定してオートラジオグラフィの処理をした。取り込まれた放射性チミジンにより、被覆したオートラジオグラフィ用乳剤中の銀粒子が沈殿する。DNA修復を評価するため、肝細胞の総核内粒子数及び細胞質内(核に隣接し最も銀粒子分布が密な部分)粒子数を計数し、これらの数値から正味の核内粒子数(総核内粒子数-細胞質内粒子数)を算出した。

陽性対照群にはdimethylnitrosamine (DMN) (4 mg/kg)及び2-acetylaminofluorene (2AAF) (50 mg/kg)を投与し、それぞれ投与後2及び14時間に屠殺して同様の処理・評価を行った。

単離肝細胞の生存細胞率及び生存細胞収量から陰性対照群及び検体投与群では検査時期ごとにそれぞれ4匹の細胞を、陽性対照群ではそれぞれ2匹の細胞を選択して培養した。

用量設定根拠 ; Sprague-Dawleyラット雄を用い、500、750、及び1000 mg/kgの投与量で実施した予備試験の結果、死亡・切迫屠殺動物数はそれぞれ0/4、1/4、及び4/4であり、すべての投与群で毒性症状が認められたことから、500 mg/kgを最大耐量と判断した。これを本試験の最高用量とし、投与量を150及び500 mg/kg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クミアイ化学工業株式会社にある。

結果：

屠殺時間 (投与後)	薬物	投与量 (mg/kg)	検査 動物数	総核内 粒子数 (平均値)	細胞質内粒 子数 (平均値)	正味の核内 粒子数 (平均値)
2時間	陰性対照 (コーン油)		4	8.9	12.3	-3.4
	検体	150	4	10.2	13.9	-3.7
	検体	500	4	9.8	13.3	-3.5
	陽性対照 (DMN)	4	2	↑30.7	12.2	↑18.5
14時間	陰性対象 (コーン油)		4	8.1	10.9	-2.8
	検体	150	4	12.4	14.1	-1.7
	検体	500	4	↑14.4	13.5	0.9
	陽性対照 (2AAF)	50	2	↑30.7	15.5	↑15.2

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓↓：p<0.001 (Studentのt検定)

500 mg/kg群の14時間後の評価でのみ、総核内粒子数が統計学的に有意に増加した。本検査時期における当該投与群の個別成績は下記のとおりである。

	総核内粒子数	細胞質内 粒子数	正味の 核内粒子数	S期細胞率 (%) *
動物1	8.5	11.7	-3.2	3.8
動物2	8.9	11.2	-2.2	1.3
動物3	17.8	16.8	1.0	4.2
動物4	22.3	14.5	7.8	1.1

*対照群：1.3~2.0%

500 mg/kg群の4例中2例で変化は認められなかったが、残りの2例で総核内粒子数及び正味の核内粒子数が増加した。これらの動物のうち1例はS期細胞数が非常に多いために銀粒子の背景頻度が高く、核内及び細胞質内粒子数の増加はアーティファクトであると考えられる。残りの1例では総核内粒子数及び正味の核内粒子数が大幅に増加したが、単発的であり、偶発的なものと考えられた。

以上の結果から、本試験条件下において検体はDNAを損傷しないと判断される。

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

8) ラット肝細胞を用いた *in vivo* DNA修復試験-2

(資料 78)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 2004年

検体純度 :

供試動物 : Sprague-Dawleyラット雄、8週齢、体重242~280 g、1群7匹 (陽性対照群は1群3匹)

試験方法 : 検体をコーン油に溶解し、50、100、及び500 mg/kgの投与レベルで1回強制経口投与した。陰性対照群にはコーン油を同様に投与した。

投与後14時間に動物を屠殺し、酵素分離により肝細胞を単離した。単離肝細胞をガラス製カバーガラスに付着させ、10 $\mu\text{Ci/mL}$ の(メチル- ^3H)チミジンとともに *in vitro*で4時間培養し、修復合成されるDNAを放射性標識した。次に、肝細胞を非標識チミジンとともに20時間追加培養した後、固定してオートラジオグラフィーの処理をした。取り込まれた放射性チミジンにより、被覆したオートラジオグラフィー用乳剤中の銀粒子が沈殿する。DNA修復を評価するため、肝細胞の総核内粒子数及び細胞質内(核に隣接し最も銀粒子分布が密な部分)粒子数を計数し、これらの数値から正味の核内粒子数(総核内粒子数-細胞質内粒子数)を算出した。

陽性対照群には2-acetylaminofluorene (2AAF) (50 mg/kg)を投与して同様の処理・評価を行った。陽性対照群では単離肝細胞の生存細胞率及び生存細胞収量から2匹の細胞を選択して培養した。

用量設定根拠 ; 同研究所でSprague-Dawleyラット雄を用い、150及び500 mg/kgの投与量で実施した前回のラット肝細胞を用いた *in vivo* DNA修復 (UDS) 試験 (資料 77) の結果、14時間後の評価において500 mg/kg群で総核内粒子数が有意に増加した。この結果に再現性があるか否かを確認するために本試験を計画し、本試験の投与量を50、100、及び500 mg/kgとした。50 mg/kgは無影響量を示すために用い、100 mg/kgは50 mg/kgで生じる身体負荷量の2倍に相当する投与量として選択した。

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

結果：

屠殺時間 (投与後)	薬物	投与量 (mg/kg)	検査 動物数	総核内 粒子数 (平均値)	細胞質内粒 子数 (平均値)	正味の核内 粒子数 (平均値)
14時間	陰性対象 (コーン油)		7	3.3	4.1	-0.8
	検体	50	7	4.0	↑5.0	-1.1
	検体	100	7	4.1	↑5.2	-1.1
	検体	500	7	↑6.4	↑6.4	↑0.0
	陽性対照 (2AAF)	50	2	↑7.1	3.7	↑3.4

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↑↓：p<0.001 (Studentのt検定)

500 mg/kg群で総核内粒子数が有意に増加し、100及び50 mg/kg群でも総核内粒子数の増加傾向が認められた。しかし、これらの変化とともにすべての検体投与群で細胞質内粒子数も有意に増加した。これらの所見は細胞全体にわたってトリチウム化チミジンが取り込まれたことを示唆し、不定期DNA合成を特異的に示すものではない。

以上の結果から、本試験条件下において検体により不定期DNA合成は生じなかったと判断される。

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

(14) 生体の機能に及ぼす影響

チオベンカルブにおける薬理試験

(資料 42)

試験機関

[非GLP]

報告書作成年 1985年

検体の純度 :

統計学的有意差 : 対照群と投与群間の比較はStudent's testで行った。

(1) マウスの中樞神経系に対する作用

1) 自発行動への影響

供試動物 : ddY系マウス, 体重24~30 g, 1群雄10匹

方 法 : 検体は0.5% CMC生理食塩水溶液に懸濁して, 600, 300及び150 mg/kgを経口投与し, 24時間後までIrwinの多元観察法に準じ一般症状を観察した。さらに検体を経口投与し7日後のLD₅₀値を求めるとともに, 検体投与後10分および1時間の計2回, PAM20 mg/kg又はグルタチオン500 mg/kgをそれぞれ腹腔内投与し拮抗薬の影響を検討した。

結 果 :

i) 一般症状 ; 300 mg/kg以上の投与群で投与15分後に自発運動および懸垂力の低下, 30分後に体温下降, 粗呼吸が観察され, 1時間後には受動性を示したが, 3時間後から回復に向かい, 6時間後には正常に復した。300mg/kg投与群は600 mg/kg投与群に比べ, 症状発症例数は少く, 軽度かつ回復も早かった。

ii) PAMおよびグルタチオンの防御効果 ; 検体のLD₅₀値1250 mg/kgに対し, PAM及びグルタチオン処理によりそれぞれ1400 mg/kgおよび1435 mg/kgとわずかな高値を示した。

2) 自発運動量への影響

供試動物 : ddY系マウス, 体重24~29 g, 1群雄10匹

方 法 : 検体は0.5% CMC生理食塩水溶液に懸濁して, 600, 300及び150 mg/kgを経口投与し, Irwinの回転カゴ法で, 投与直後から10分間隔で200分後まで回転数を測定した。

結 果 : 600 mg/kg投与群では, 投与後10分から50分で対照群に比べ有意な低値を示したが130分以降では高値を示し150~160分後で有意差が認められた。300 mg/kg投与群でも600 mg/kg投与群と同様な傾向を示し, 投与後10, 30および50分に有意な低値を示し, 投与後150~160分および190分で有意な高値を示した。150 mg/kg投与群では, 対照群と比べて有意差は認められなかった。

(2) ウサギの呼吸, 循環器系に対する影響

供試動物 : 日本白色種ウサギ, 体重2.7~3.2 kg, 1群雄4~5匹

方 法 : 検体は0.5% CMC生理食塩水溶液に懸濁して50, 5及び0.5 mg/kgをウサギの静脈内に投与し呼吸, 血圧, 心拍数を測定し, 心電図を記録した。さらにacetylcholine chloride (Ach) およびadrenaline chloride (Adr) の反応に対する影響を単独作用のみられない0.5 mg/kg投与群で検討した。

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

結 果 :

- i) 呼吸数; 50 mg/kg投与群では, 投与後4~5分持続する呼吸数の増加(増加率: 58.1 ± 19.8%) が認められた。その後徐々に減少し, 10分以降では投与前より低値を示した。呼吸数の増加および減少ともに対照群と比べて有意差が認められた。
5 mg/kg投与群では投与直後から持続的に増加(増加率: 38.0 ± 6.8%) し, 対照群と比べて有意差が認められたが, 10分後には回復した。0.5 mg/kg投与群では変化は認められなかった。
- ii) 呼吸振幅; 50 mg/kg投与群では, 投与後一過性の呼吸振幅減少(減少率: 58.8 ± 11.8%) を示し, 4~5分頃から振幅の増大(最高時投与後10分の18.8 ± 6.6%増) がみられ, いずれも対照群と比べて有意差が認められたが, 60分後には回復した。5 mg/kg投与群では, 一過性の呼吸振幅の減少(減少率: 27.9 ± 13.0%) を示したが, 対照群と比べて有意差はみられなかった。0.5 mg/kg投与群では変化は認められなかった。
- iii) 血 圧; 50 mg/kg投与群では, 投与後一過性の下降を示し, 1~2分で回復したが4~5分後再び下降し5分後の22.1 ± 4.4%減が60分まで持続した。投与直後および10分以降の減少率は対照群と比べて有意差が認められた。5 mg/kg投与群では, 投与後一過性の下降(下降率: 7.2 ± 1.6%) を示し, 対照群と比べて有意差が認められた。
0.5 mg/kg投与群では変化は認められなかった。
- iv) 心 拍 数; 50 mg/kg投与群では, 投与直後6.9 ± 2.8%減少したが, 60分後には回復した。5 mg/kg及び0.5 mg/kg投与群では変化は認められなかった。
- v) 心 電 図; 全投与群とも変化は認められなかった。
- vi) AchおよびAdrの反応への影響; 実施した0.5 mg/kg投与群ではAchおよびAdrの呼吸数, 呼吸振幅, 血圧, 心拍数および心電図の反応に対する影響は認められなかった。

(3) モルモット及びラットの平滑筋に対する影響

1) 摘出回腸への影響

供試動物 : Hartley系モルモット, 体重270~320 g, 1群雄5匹

方 法 : モルモットを18時間絶食し, 常法に基づいて回腸を摘出し, 栄養液(32°C)を満したMagnus装置に懸垂し, 収縮反応を記録した。検体 10^{-7} ~ 3×10^{-4} g/mLの単独作用と投与2分後にAchおよびhistamine dihydrochloride (Hist) を累積投与し, 相互作用を検討した。

結 果 :

- i) 単独作用; 検体 3×10^{-7} ~ 3×10^{-4} g/mL投与で6例中2例に用量相関的な収縮が認められた。
- ii) AchおよびHistの用量反応曲線への影響; 検体 10^{-4} および 10^{-5} g/mL投与でAchおよびHistによる収縮に対し, 抑制的に作用した。

2) 摘出子宮への影響

供試動物 : Wistar系ラット, 体重150~160 g, 1群雌5匹

方 法 : 処女ラットの卵巣を摘出し, Vaginal smear testで発情期間を確認後子宮を摘出し, 栄養液の温度を25°Cとした他は摘出回腸と同様に行った。検体 10^{-7} ~ 3×10^{-4} g/mLの単独作用と投与2分後にAchおよびoxytocinの累積投与による相互作用を検討した。

結 果 :

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

- i) 単独作用；検体 10^{-5} ～ 3×10^{-5} g/mLで6例中3例に収縮が認められた。
- ii) Achおよびoxytocinの用量反応曲線への影響；検体 10^{-5} および 10^{-6} g/mL投与でAchおよびoxytocinによる収縮に対し抑制的に作用した。

(4) ラットの肝機能に対する作用

供試動物：Wistar系ラット，体重140～160 g，1群雄10匹

方 法：検体は0.5% CMC生理食塩水溶液に懸濁して，600，300および150 mg/kgを経口投与した。投与30分後Bromsulphalein (B S P) 75 mg/kgを尾静脈より投与し，30分後にエーテル麻酔下で頸動脈より採血し，血清B S P濃度を比色定量してB S P排泄能への影響を検討した。

結 果：検体600 mg/kg投与群で対照群と比べて有意なB S P排泄抑制が認められた。

以上の試験結果より，本剤は，比較的高用量で中枢神経系，循環器系，平滑筋，肝機能に非特異的な作用を示すものと思われる。

また，本剤の中毒に対し，PAMおよびグルタチオンの防御効果は明らかでなかった。

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

「生体の機能に及ぼす影響、チオペンカルブにおける薬理試験」の総括表

試験対象 (試験動物)	検査項目	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 (マウス)	一般症状を Irwin法に準 じ、観察	経口 (0.5%CMC 生理食塩液)	150, 300, 600	雄10	300	150	自発運動、懸垂力の低下、体温下降、粗呼吸、受動性6時間後に正常化
	自発運動量を Irwinの回転 カゴ法で測定		150, 300, 600	雄10	300	150	投与後10~50分では有意な低値、投与後150分以降では有意な高値を示した。
循環器系 (ウサギ)	麻醉動物の呼吸、 血圧、心拍数、心電図 測定	静脈注射 (0.5%CMC 生理食塩液)	0.5, 5, 50	雄 4~5	5	0.5	呼吸数、振幅の一過性増加、血圧の一過性低下、心拍数の一過性減少。心電図の変化はなかった。
	アセチルコリンおよびアドレナリン反応への影響		0.5		—	0.5	呼吸、血圧、心拍心電図の変化はなかった。
自律神経系 (モルモット)	摘出回腸に及ぼす影響	浸漬 (Loche-Ringer液)	10^{-7} ~ 3×10^{-4} g/mL	雄5	3×10^{-7} g/mL	1×10^{-7} g/mL	収縮反応が認められた。
	アセチルコリンおよびヒスタミン反応への影響		10^{-4} , 10^{-5} g/mL		1×10^{-5} g/mL	—	アセチルコリンおよびヒスタミンによる収縮反応に対し抑制的に作用した。
自律神経系 (ラット)	摘出子宮に及ぼす影響	浸漬 (Loche-Ringer液)	10^{-7} ~ 3×10^{-4} g/mL	雌5	1×10^{-5} g/mL	1×10^{-6} g/mL	収縮反応が認められた。
	アセチルコリンおよびオキシトシン反応への影響		10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} g/mL		1×10^{-6} g/mL	1×10^{-7} g/mL	アセチルコリンおよびオキシトシンによる収縮反応に対し抑制的に作用した。
肝機能 (ラット)	BSP排泄能 測定	経口 (0.5%CMC 生理食塩液)	150, 300, 600	雄10	600	300	有意なBSP排泄抑制がみられた。

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

(参考-1)

急性毒性試験、刺激性試験及び数種酵素に及ぼす影響

試験機関

[非GLP]

報告書作成年 1972年

検体の純度：

(1) マウスにおける急性経口、皮下、経皮毒性試験

試験動物：ddy-S系マウス（5週齢）1群雌雄10～15匹

試験期間：10日間観察

方法：経口、皮下投与では検体を0.25%CMC溶液（Tween80添加）に懸濁して投与した。
経皮投与は原液を塗布した。

試験項目：中毒症状及び生死を10日間観察した。

試験終了時に剖検を行った。

結果：

投与方法	経口	皮下	経皮
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1,860 (1,524～2,269) 雌 2,400 (1,983～2,904)	雄 >7,425 雌 >9,653	雌雄共に >10,000

中毒症状としては、経口投与で、自発動物の減少、腹臥、閉眼、立毛が認められ、高薬量群では、水、餌を摂取せず、体温が下降し、呼吸、脈拍が弱くなり死に至った。

皮下及び経皮投与では中毒症状は認められなかった。

経口投与での解剖所見で脳硬膜下に少量の出血が認められたが、検体の影響とは思われなかった。

(2) ラットにおける急性経口、経皮毒性試験

試験動物：Wistar系ラット（5週齢）1群雌雄10～15匹

試験期間：10日間観察

方法：経口投与は検体を0.25%CMC溶液（Tween80添加）に懸濁して投与した。経皮投与は原液を塗布した。

試験項目：中毒症状及び生死を10日間観察した。

結果：

投与方法	経口	経皮
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 920 (697～1,214) 雌 960 (821～1,123)	雌雄共に >10,000

中毒症状としては、経口投与で、伏臥、流涙、流涎が認められた。

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

(3) ニワトリにおける急性経口毒性試験

試験動物：白色レグホン種ニワトリ雄

試験期間：10日間観察

方法：検体を0.25% CMC溶液 (Tween80添加) に懸濁して投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を10日間観察した。

結果：

投与方法	経口
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 673 (616~726)

(4) ウサギを用いた眼粘膜一次刺激性試験

試験動物：日本在来種ウサギ (体重2.2~2.6 kg) 1群雌6匹

試験期間：14日間観察

方法：検体をCMC溶液に懸濁し、検体10及び1 mg/眼の薬量を左眼に投与し、3匹は30秒以内に洗眼した。3匹については洗眼しなかった。

観察項目：投与後1, 2, 3, 4, 7および14日に角膜, 虹彩, 結膜の刺激性変化をDraize法に従い観察した。

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。

薬量 (mg/眼)	項目	投与後時間				
		1日	2日	3日	14日	
検体：10	洗眼群 (3匹平均)	角膜・虹彩	0	0	0	0
		結膜	2	1.3	1.3	0
	非洗眼群 (3匹平均)	角膜・虹彩	0	0	0	0
		結膜	0	2.6	2	0
検体：1	洗眼群 (3匹平均)	角膜・虹彩	0	0	0	0
		結膜	0	0.6	0.6	0
	非洗眼群 (3匹平均)	角膜・虹彩	0	0	0	0
		結膜	0	1.3	0.6	0
2% HgCl ₂ : 2	洗眼群 (3匹平均)	角膜・虹彩	1.6	3.3	10	0
		結膜	12	10.6	10.6	1.3
	非洗眼群 (3匹平均)	角膜・虹彩	6.6	5	6.6	0
		結膜	10	12.6	9	2

角膜及び虹彩の刺激性変化は洗眼群, 非洗眼群ともに認められなかった。結膜の刺激性変化は洗眼群, 非洗眼群では軽度の発赤が投与後1日に認められたが, この変化は4日目頃には消失した。一方, 陽性対照として用いたHgCl₂投与群では, 角膜, 虹彩, 結膜に強い障害が認められた。

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

以上の結果から、本剤はウサギの眼粘膜に対してほとんど刺激性がないものと思われる。

(5) ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

試験動物：日本在来種ウサギ雌（体重2.2～2.6kg）

試験期間：72時間観察

方法：検体を10, 100及び1000 mg/9cm²の薬量で刈毛した動物の背中の皮膚に塗布した。塗布時間は24時間とした。

また、陽性対照として5%NaOH水溶液0.5 mLを同様に塗布した。

観察項目：投与後24, 48及び72時間に塗布部位の刺激性変化（紅斑、痂皮、浮腫）をDraize法に従い観察した。

結果：検体のいずれかの投与群でも炎症性変化はまったく認められなかった。一方、陽性対照として用いたNaOH投与群では、明らかな変化を認めた。

以上の結果から本剤はウサギの皮膚に対して刺激性はないものと思われる。

(6) *in vitro*におけるコリンエステラーゼおよび炭酸脱水素酵素阻害試験

方法：コリンエステラーゼ活性の測定は牛赤血球コリンエステラーゼを使用しHestrin法を用いた。炭酸脱水素酵素活性は牛赤血球炭酸脱水素酵素を使用しWarburg検圧法によって測定した。検体は燐酸緩衝液で懸濁して使用した。

結果：検体の牛赤血球コリンエステラーゼに対する I_{50} は 1×10^{-3} M以上、炭酸脱水素酵素に対する I_{50} は 5×10^{-3} M濃度以上であった。

(7) *in vivo*におけるラット血清乳酸脱水素酵素（LDH）アイソザイムに及ぼす影響

供試動物：Wistar系ラット 1群雄3匹

方法：検体を0.25%CMC溶液で懸濁し、3,000及び5,000 mg/kgを皮下注射し、投与24時間後に大腿静脈から採血して、血清を得た。

LDHアイソザイムは寒天ゲル電気泳動法に準じて測定した。

結果：検体の5,000 mg/kg投与においても、血清LDHアイソザイム像に器官障害を示す異常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クミアイ化学工業株式会社にある。

(参考-2)

ラットを用いた対合摂食による嗜好性試験

試験機関

[非GLP]

報告書作成年 1980年

検体の純度 :

試験動物 : Fischer344系ラット, 1群雌雄各10匹, 開始時5~6週齢

試験期間 : 6週間

方法 : 検体を60及び300ppmの濃度で含有した粉末飼料を6週間連続的に投与した。

同様に構成した2群にそれらと対となった投与群が摂取したと同量の検体無添加の飼料を摂取させた。さらに他の1群には、飼料を自由に摂取させた。

群の構成は下記のとおりである。

群	投与	飼料中の検体濃度 (ppm)
1	自由摂食対照群	0
2	対合摂食対照群 (4群と対)	0
3	対合摂食対照群 (5群と対)	0
4	検体投与群	60
5	検体投与群	300

試験項目及び結果 :

一般状態及び死亡率 : 一般状態及び生死を毎日観察した。

検体投与に関連した症状は認められなく、死亡例もなかった。

飼料摂取量及び飼料効率 : 全動物の摂取量を毎日測定し、飼料効率は週毎に算出した。

検体投与群での摂取量は自由摂食対照群に比べ低く、影響の程度においても薬量相関が認められた。飼料効率では、自由摂食対照群に比べ、検体投与群および対合摂食対照群のいずれも低かったが検体投与群と対合摂食対照群の間には本質的な差はなかった。

体重変化 : 投与開始時とそれ以降は週2回体重を測定した。

検体投与群及び対合摂食対照群の体重増加量は、自由摂食対照群に比べ減少が認められた。

雌においては、検体投与群と対合摂食対照群の成長状態は本質的には一致していた。

しかし雄においては、検体投与群より対合摂食対照群の成長状態が劣っており、飼料摂取量の減少の程度を反映していた。

検体摂取量 : 飼料摂取量及び投与濃度から算出した1日当りの検体摂取量は下記の如くであった。

投与濃度 (ppm)		60	300
mg/kg/day	雄	4.3~7.1	22~33
	雌	4.9~6.8	24~34

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

臓器重量 : 投与6週後に屠殺し、全動物を対象として、副腎、脳、心、腎、肝、脾、甲状腺の重量を測定した。また対体重比も算出した。

自由摂食対照群と比較した場合、投与群及び対合摂食対照群で脳、心、肝、脾、腎に絶対重量及び対体重比の変動を認めたが、これらの変化は体重の不一致によるものと考えられた。

肉眼的病理検査 : 投与6週後、全動物を屠殺し、検査を行った。観察された病変はいずれも自然発生的な変化であり、検体投与によるものではなかった。

以上の結果より、飼料中濃度が300ppmまでの検体投与に関連した体重増加量の減少は飼料摂取量の減少にのみ関連し、検体投与ラットでの飼料摂取量の減少の最も可能性のある原因は、検体混合飼料の非嗜好性であり、検体の毒性学的影響を示唆するもので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クマイ化学工業株式会社にある。

2. 原体混在物及び代謝分解物

1) 原体混在物のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 11)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1985年

検体及び純度：

試験動物 : CD系ラット (7週齢), 1群雌雄各10匹

試験期間 : 14日間観察

方法 : 検体をオリーブ油に溶解し, 0.5%メチルセルロース液に懸濁した後, 約16時間絶食した動物に金属製胃ゾンデを用いて経口投与した。又, 対照群には, 溶媒のみを同様に投与した。

試験項目 : 一般状態および生死を14日間観察した。

死亡動物は発見時に, また生存動物は投与後14日に肉眼的病理検査を行った。

体重は投与直前, 1, 2, 3, 7, 10および14日に測定した。

結果 :

検 体			
投与量 (mg/kg)	0, 191 (♀のみ), 249, 323, 420, 546, 710, 923, 1200 (♂のみ)	0, 2500, 5000	0, 2500, 5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 547 (465~634) ♀ 531 (469~602)	♂, ♀共に >5000	♂, ♀共に >5000
死亡開始時間及び 終了時間	30分~1日	死亡例なし	死亡例なし
症状発現及び 消失時期	30分~1日	中毒症状なし	中毒症状なし
最大無作用量 (mg/kg)	♂ 323 ♀ 249	♂, ♀共に5000	♂, ♀共に5000

一般状態の変化としては, 雌雄420 mg/kg以上, 雌323mg/kg群において間代性痙攣, 振戦, 静穏, 流涎, 強直性痙攣, 皮膚の蒼白化, 腹臥が観察された。

体重は高用量群で投与翌日に減少あるいは増加抑制が認められたが, 以降は対照群とほぼ同様な増加を示した。

肉眼的病理検査では, 死亡例のほぼ全例に肺および肝の暗赤色化と脾の退色が認められたが, 生存例では特記すべき変化は認めなかった。

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

：
一般状態の変化は認められなかった。

体重は、投与後2～3日に増加抑制が認められたが、以降は対照群とほぼ同様な増加を示した。
肉眼的病理検査では特記すべき変化は認めなかった。

：
一般状態の変化は認められなかった。

体重は5000mg/kg（雄）で投与後2日に軽度な減少がみられたのみで、以降は、対照群とほぼ同様な増加がみられた。

肉眼的病理検査でも特記すべき変化は認めなかった。

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

2) 原体混在物のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 12)

試験機関

[非GLP]

報告書作成 1981年

検体及び純度 :

試験動物 : Fischer 344系ラット (8週齢), 1群雌雄各10匹

試験期間 : 14日間観察

方法 : 検体を0.25%CMC水溶液で懸濁し, 18時間絶食した動物に金属製胃ゾンデを用いて投与した。

試験項目 : 一般状態および生死を14日間観察した。

体重は投与直前, 投与後7日および14日に測定した。

死亡動物は発見時に, 生存動物は投与後14日に肉眼的病理検査を行った。

結果 :

投与量 (mg/kg)	572(♂のみ), 658, 756, 870, 1000, 1150, 1323(♀のみ)
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 800 (708~905) ♀ 820 (747~900)
死亡開始時間及び 終了時間	2日~4日
症状発現及び 消失時期	5分~4日
最大無作用量 (mg/kg)	(死亡例の認められなかった最高投与量: ♂ 572, ♀ 658)

一般状態の変化としては, 雌雄の全投与群において自発運動の増加及び減少, 失調性歩行, 歩行困難, 脱力, 腹臥, 体温下降, 流涎, 流涙, 立毛が観察された。

生存動物の体重は, 投与後1週では減少を認めたが, 2週目では増加していた。

肉眼的抄理研だでは, 死亡動物では, 肝および腎の退色, 脾の萎縮, 胃の幽門部, 十二指腸, 空腸, 肺, 膀胱および甲状腺における出血が認められた。生存動物では高用量群で, 脾の萎縮が認められたのみであった。

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

3) 代謝分解物のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 13)

試験機関

[非GLP]

報告書作成年

1972年

検体及び純度 :

* [] 内の数字は、本抄録中で代謝分解物に付した化合物番号

試験動物 : Wistar系ラット (体重100~125 g), 1群雌雄各10匹

試験期間 : 7日間観察

方法 : 検体を0.25% CMC水溶液で懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて経口投与した。

試験項目 : 一般状態および生死を7日間観察した。

結果 :

投与量 (mg/kg)	♂♀共に667, 1000, 1500, 2250, 3375, 5063, 6667
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 2440 (1807~3294) ♀ 2250 (1667~3038)
死亡開始時間及び 終了時間	4時間以内
症状発現及び 消失時期	不詳
最大無作用量 (mg/kg)	(死亡例の認められなかった最高投与量 : ♂ 1000, ♀ 667)

一般状態の変化としてけいれんが認められたが、性差はなかった。

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

4) 代謝分解物のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 14)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1985年

検体及び純度：

試験動物 : CD系ラット (7週齢), 1群雌雄各10匹

試験期間 : 14日間観察

方 法 : 検体をオリーブ油に溶解もしくは、0.5%メチルセルロース液に懸濁し、約16時間絶食した動物に金属製胃ゾンデを用いて経口投与した。

なお、対照群には、各々の溶媒を同様に投与した。

試験項目 : 一般状態および生死を14日間観察した。

体重は、投与直前、投与後1, 2, 3, 7, 10および14日に測定した。

死亡動物は発見時に、生存動物は投与後14日に肉眼的病理検査を行った。

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

結 果 :

検 体			
投与量 (mg/kg)	♂♀共に, 0, 1036, 1347, 1751, 2276, 2959, 3846, 5000	♂♀共に, 0, 462, 600, 780, 1014, 1318, 1714, 2228	0, 262, 328, 410, 512, 640, 800, 1000, 1250 (♀のみ)
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 2301 (1804~2942) ♀ 2312 (1795~3004)	♂ 763 (679~854) ♀ 837 (736~952)	♂ 746 (666~852) ♀ 836 (756~923)
死亡開始時間及び 終了時間	2時間~6日	2時間~5日	2時間~2日
症状発現及び 消失時期	5分~13日	5分~4日	5分~5日 (♀1000mg/kgの1例のみ) (角膜の白濁が回復せず)
最大無作用量 (mg/kg)	(死亡例の認められなかった) 最高投与量: ♂♀共に1036	(死亡例の認められなかった) 最高投与量: ♂♀共に462	(死亡例の認められなかった) 最高投与量: ♂410 ♀512

検 体		
投与量 (mg/kg)	♂♀共に, 0, 700, 910, 1183, 1538, 2000, 2600, 3380	♂♀共に, 0, 714, 1000, 1400, 1960, 2744, 3842
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 2109 (1804~2525) ♀ 2167 (1855~2573)	♂ 1502 (1241~1806) ♀ 1420 (1189~1686)
死亡開始時間及び 終了時間	4時間~5日	1日~3日
症状発現及び 消失時期	5分~6日	5分~8日
最大無作用量 (mg/kg)	(死亡例の認められなかった) 最高投与量: ♂910 ♀1183	(死亡例の認められなかった) 最高投与量: ♂♀共に714

一般状態の変化としては、静穏、異常歩行、呼吸粗大、腹臥、筋緊張の低下、流涙、一過性のチアノーゼ、角膜反射の抑制、眼瞼下垂、粗毛、体温低下、血尿および眼球白濁が観察された。体重は、投与後増加抑制あるいは減少を示したが、7日以降対照群とほぼ同様な増加を示した。肉眼的病理検査では、死亡動物においては、肺、肝および腎の暗赤色化、胸腺の暗赤色斑、肝、脾、腎の退色、脾の萎縮、腺胃部の暗赤色斑、小腸の暗赤色化、膀胱の暗赤色斑あるいは暗赤色化が認められたが生存動物では特記すべき変化は認められなかった。

一般状態の変化としては、静穏、呼吸粗大、腹臥、流涙、粗毛、異常歩行、間代性痙攣、体温低下、皮膚の蒼白化、眼瞼皮膚に血様物の付着が観察された。体重は、投与後増加抑制あるいは減少が認められたが、3日以降、対照群と同様な増加を示した。肉眼的病理検査では、死亡動物においては、肺、肝の暗赤色化、胸腺の暗赤色斑、肝、脾、腎の退色、胃に内容物の貯留、前胃に暗赤色斑、膀胱内に白色硬化物の残留および暗赤色尿の貯留が認められたが、生存動物では腹腔内諸臓器の癒着が2例認められたのみであった。

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

一般状態の変化としては、静穏、異常歩行、呼吸粗大、腹臥、流涙、筋緊張の低下、角膜反射の抑制、体温低下、眼瞼下垂、粗毛、角膜の白濁が観察された。

体重は投与後増加抑制あるいは減少が認められたが、2日以降対照群とほぼ同様な増加を示した。肉眼的病理検査では、死亡動物において肺、肝の暗赤色化、胸腺の暗赤色斑、脾の退色および萎縮、小腸の暗赤色化、膀胱の暗赤色斑あるいは暗赤色化また暗赤色尿の貯留、腺胃部の暗赤色斑あるいは暗赤色化が認められたが、生存動物では特記すべき変化は認められなかった。

一般状態の変化としては、静穏、異常歩行、呼吸粗大、腹臥、筋緊張の低下、流涙、角膜反射の抑制、体温低下、眼瞼下垂、粗毛が観察された。

体重は投与後増加抑制あるいは減少が認められたが、2日以降は対照群とほぼ同様な増加が認められた。

肉眼的病理検査では、死亡動物において肺、肝の暗赤色化、脾の退色および萎縮、胸腺の暗赤色斑、腎の退色、肝の退色、腎の暗赤色化、小腸の暗赤色化、膀胱の暗赤色斑あるいは暗赤色化また暗赤色尿の貯留、胃腺部の暗赤色斑が認められたが、生存動物では特記すべき変化は認められなかった。

一般状態の変化としては、静穏、呼吸粗大、異常歩行、粗毛、腹臥、流涎、眼瞼下垂、皮膚の蒼白化、血尿が観察された。

体重は、投与後2～3日に増加抑制あるいは減少が認められたが、以降は対照群とほぼ同様な増加が認められた。

肉眼的病理検査では、死亡動物において、肺の暗赤色化、胸腺の暗赤色化ならびに暗赤色斑、肝の暗赤色化、胃腺部の暗赤色斑あるいは暗赤色化、小腸の暗赤色化あるいは暗赤色斑、小腸内の暗赤色液貯留、膀胱内の暗赤色尿の貯留が認められたが、生存動物では、特記すべき変化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クマイ化学工業株式会社にある。

5) 原体及び原体混在物の細菌を用いたDNA修復試験及び復帰突然変異試験

(資料 35)

試験機関

[非GLP]

報告書作成年 1978年

検体及び純度 :

方 法 :

1) 細菌を用いたDNA修復試験

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、DNAの損傷の誘発性を検定した。

検体はDMSOに溶解し、直径10 mmのろ紙に0.02 mLを染ませて寒天培地上に置いた。

2) 細菌を用いた復帰突然変異試験

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌*Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100及びトリプトファン要求性の大腸菌*E. coli* WP2*hcr*株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解した。

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

結 果 : 1) 細菌を用いたDNA修復試験

薬 物	濃 度	阻 止 域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
対 照 (DMSO)		0	0	0
チオベンカルブ	221 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	0	0	0
	1105	0	0	0
	2210	0	0	0
	5526	0	0	0
	11050	0	0	0
	22100	0	0	0
	20 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	0	0	0
	100	0	0	0
	200	0	0	0
	500	0	0	0
	1000	0	0	0
	2000	0	0	0
	20 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	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 (Kanamycin)	10 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	6	4	2
陽 性 対 照 (Mitomycin C)	0.1 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	10	1	9

注：報告書ではチオベンカルブの処理濃度が%表記であることから、% (v/v) と解釈し、被験物質の純度および比重 ($1.167 \text{ g}/\text{cm}^3$) から申請者が算出した。

いずれの検体投与群でも、両株に生育阻止を認めなかった。一方陽性対照のMitomycin Cでは両株の間に明らかな生育阻止の差が生じた。

以上の結果より、これらの検体はDNA損傷の誘発性が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クミアイ化学工業株式会社にある。

2) 細菌を用いた復帰突然変異試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mixの 有無	復帰変異コロニー数/Plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2 hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
対照 (DMSO)		-	41	13	122	4	9	19
			24	16	127	3	12	13
チオベンカルブ	10	-	31	8	114	7	8	25
			38	15	142	3	8	21
	50	-	30	18	142	4	7	24
			30	13	117	3	14	14
	100	-	30	17	141	5	9	23
			32	17	120	4	10	14
	500	-	31	22	128	1	2	16
			32	9	125	1	9	8
	1000	-	35	12	138	0	12	14
			40	13	139	4	13	12
5000	-	39	23	160	3	9	19	
		44	15	186	1	10	15	
対照 (DMSO)		+	31	17	112	5	13	15
			24	16	145	5	11	24
チオベンカルブ	10	+	23	12	117	7	10	20
			33	13	131	7	10	16
	50	+	26	14	143	8	12	14
			24	13	128	9	11	8
	100	+	31	21	155	10	9	24
			27	15	122	6	11	21
	500	+	32	19	98	6	14	8
			15	5	112	7	17	17
	1000	+	22	16	105	3	9	15
			22	15	105	5	5	19
5000	+	22	11	109	2	10	9	
		40	20	128	1	12	13	
2-amino- anthracene	10	-	29	15	162	12	11	39
			36	16	154	13	14	36
	10	+	108	392	>2000	454	>2000	>2000
陽性対照		-	>2000 ^a	756 ^b	1100 ^c	>10000 ^d	>3000 ^e	542 ^f
			>2000	876	1116	>10000	>3000	492

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

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mixの 有無	復帰変異コロニー数/Plate						
			塩基置換型			フレームシフト型			
			WP2hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
対照 (DMSO)		-	38	20	146	9	10	26	
			48	27	148	2	7	32	
	10	-	38	7	132	3	8	21	
			39	20	161	8	10	17	
	50	-	33	10	113	1	7	14	
			24	21	141	3	10	14	
	100	-	37	15	113	11	12	22	
			32	12	118	7	10	18	
	500	-	36	11	121	5	7	22	
			43	16	121	10	9	20	
	1000	-	27	13	131	6	13	17	
			34	17	130	7	16	18	
	5000	-	34	14	153	3	5	18	
			38	12	157	9	9	24	
	対照 (DMSO)		+	23	16	138	7	9	16
				29	14	140	8	12	15
	10	+	36	11	142	10	8	20	
			37	11	124	5	20	17	
	50	+	25	14	105	1	13	16	
			45	16	101	6	17	25	
	100	+	44	18	87	6	17	26	
			46	10	117	6	10	28	
	500	+	29	13	74	6	8	17	
			24	15	102	9	10	15	
	1000	+	42	17	87	7	9	24	
			33	19	107	3	13	18	
	5000	+	33	8	121	3	13	14	
			28	13	106	4	12	8	
	2-amino- anthracene	10	-	32	13	165	10	16	53
				35	9	191	16	9	36
10		+	263	418	>3000	682	>3000	>3000	
			220	442	>3000	682	>3000	>3000	
陽性対照		-	>2000 ^a	718 ^b	>1000 ^c	>10000 ^d	>2000 ^e	478 ^f	
			>2000	916	>1000	>10000	>2000	492	

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

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mixの 有無	復帰変異コロニー数/Plate						
			塩基置換型			フレームシフト型			
			WP2hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
対照 (DMSO)		-	38	20	146	9	10	26	
			48	27	148	2	7	32	
	10	-	31	20	117	8	12	19	
			27	14	131	6	11	18	
	50	-	29	22	130	4	7	26	
			41	8	126	4	7	28	
	100	-	28	9	114	3	17	24	
			43	16	124	5	9	22	
	500	-	34	12	121	9	11	23	
			35	11	139	4	14	16	
	1000	-	32	10	136	11	9	26	
			15	13	111	6	12	17	
	5000	-	40	10	124	4	11	21	
			29	9	137	7	9	21	
	対照 (DMSO)		+	23	16	138	7	9	16
				29	14	140	8	12	15
	10	+	34	16	163	7	9	22	
			30	14	145	5	10	26	
	50	+	27	12	120	6	2	25	
			33	16	156	4	8	25	
	100	+	42	10	172	3	9	25	
			30	12	150	11	10	15	
	500	+	32	20	177	7	11	16	
			29	11	149	2	13	14	
	1000	+	37	12	211	3	3	17	
			35	8	170	2	8	15	
	5000	+	27	11	157	9	8	12	
			25	24	187	2	9	13	
	2-amino- anthracene	10	-	32	13	165	10	16	53
				35	9	191	16	9	36
10		+	263	418	>3000	682	>3000	>3000	
			220	442	>3000	682	>3000	>3000	
陽性対照		-	>2000 ^a	718 ^b	>1000 ^c	>10000 ^d	>2000 ^e	478 ^f	
			>2000	916	>1000	>10000	>2000	492	

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

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

チオベンカルブはS-9Mix非存在下において5mg/plateの濃度でTA100株に復帰変異コロニー数のわずかな増加を誘起した。

しかしそれ以外の株では復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

また、原体中不純物2種はS-9Mixの存在の有無にかかわらず、いずれの株においても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, β -propiolactone, 9-aminoacridine, 2-nitrofluoreneでは明らかな復帰変異コロニー数の増加を認めた。

以上の結果よりチオベンカルブはS-9Mixの非存在下で、TA100株に非常に弱い復帰変異誘発性を有するものと判断される。

2種の原体中不純物は本試験条件下において、復帰変異誘発性は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クマイ化学工業株式会社にある。

6) 原体混在物の細菌を用いたDNA修復試験及び復帰突然変異試験

(資料 36)

試験機関

[非GLP]

報告書作成年 1979年

検体及び純度 :

方 法 :

1) 細菌を用いたDNA修復試験

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、DNAの損傷の誘発性を検定した。

検体はDMSOに溶解し、直径10 mmのろ紙に0.02 mLを染ませて寒天培地上に置いた。

2) 細菌を用いた復帰突然変異試験

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E. coli* WP2hcr株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解した。

結 果 :

1) 細菌を用いたDNA修復試験

薬 物	濃 度	阻 止 域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
対 照 (DMSO)		0	0	0
検 体	229 $\mu\text{g}/\text{disk}$	0	0	0
	573	0	0	0
	1146	0	0	0
	2293	0	0	0
	5731	0	0	0
	11460	0	0	0
	22920	0	0	0
陰 性 対 照 (Kanamycin)	10 $\mu\text{g}/\text{disk}$	4.5	4.5	0
陽 性 対 照 (Mitomycin C)	0.1 $\mu\text{g}/\text{disk}$	8	1	7

注: 報告書ではチオベンカルブの処理濃度が%表記であることから、被験物質の純度および比重 (1.167 g/cm³) から申請者が算出した。

検体投与群では両株に生育阻止を認めなかった。

一方陽性対照のMitomycin Cでは両株の間に明らかな生育阻止の差が生じた。

以上の結果より本検体はDNA損傷の誘発性が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クミアイ化学工業株式会社にある。

2) 細菌を用いた復帰突然変異試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mixの 有無	復帰変異コロニー数/Plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
対照 (DMSO)		-	10	30	119	7	6	32
			21	16	123	9	14	18
検体	10	-	8	18	110	6	7	21
			17	13	125	3	10	30
	50	-	17	17	106	7	18	40
			19	17	126	4	12	23
	100	-	11	21	116	2	17	29
			4	17	125	8	8	24
	500	-	11	12	60	3	4	20
			15	15	55	1	9	13
	1000	-	16	12	52	0	11	10
			12	12	46	1	15	16
	5000	-	9	16	67	3	12	21
			12	13	57	1	9	26
対照 (DMSO)		+	13	22	133	10	14	23
			19	11	107	9	14	16
検体	10	+	12	13	117	2	13	25
			14	28	125	4	15	29
	50	+	11	20	110	6	18	22
			3	20	100	7	18	26
	100	+	17	24	57	4	9	22
			7	11	88	5	14	13
	500	+	7	17	47	1	16	18
			10	10	38	2	14	11
	1000	+	13	21	39	2	12	19
			12	9	49	3	15	15
	5000	+	11	15	65	0	9	16
			11	11	58	1	8	17
2-amino- anthracene	10	-	12	25	178	23	31	72
			15	28	164	21	25	65
	10	+	71	282	>2000	218	>2000	>2000
			64	264	>2000	266	>2000	>2000
陽性対照		-	1768 ^a	1062 ^b	1008 ^c	>10000 ^d	>2000 ^e	417 ^f
			1308	1052	1226	>10000	>2000	407

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

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

検体は代謝活性化を含め5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の濃度においても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, β -propiolactone, 9-aminoacridin, 2-nitrofluoreneではすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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クミアイ化学工業株式会社にある。

7) 原体混在物の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 37)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1985年

検体及び純度：

方 法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA97, TA1537及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E. 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(S-9 Mix)の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。検体はDMSOに溶解した。

陽性対照として下記の薬剤を用いた。

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

ENNG : 1-Ethyl-2-nitro-3-nitrosoguanidine

ACR : 9-Aminoacridine

ICR-191 : 2-Methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)aminopropylamino) acridine

2-AA : 2-Aminoanthracene

結 果 : データはTable 1及びTable 2に示した。

検体は代謝活性化を含め投与限界である3200 μ g/plateの濃度においても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, ENNG, ACR, ICR-191, 2-AAではすべて検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

Table 1 (S-9 Mix無添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate										
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA97	TA97			
DMSO#	-----	143	166	22	22	22	24	23	6	9	102	114
Test sub.	50	154	168	22	21	12	27	20	10	9	129	111
	100	150	144	22	18	25	22	19	7	6	116	125
	200	166	137	18	18	10	17	17	7	3	117	154
	400	144	152	22	21	24	12	11	3	2	143	144
	800	107*	142*	18*	13*	18	16	18*	9*	4*	105*	110*
	1600	0*	0*	0*	0*	5*	2*	0*	0*	0*	0*	0*
	3200	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
-- Positive Control --												
AF-2	0.01	498	498	141	136							
ENNG	0.1						670	626				
ACR	5			148	157					981	724	
ICR-191	80											
ICR-191	0.2										557	570

Solvent Control

* Observed of Cell Killing

Table 2 (S-9 Mix 添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate											
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97
DMSO#	-----	139	121	19	11	33	22	32	37	12	16	161	124
Test sub.	50	128	137	17	11	24	22	35	33	12	19	166	167
	100	141	117	12	11	18	21	32	27	11	15	184	146
	200	112	134	13	20	19	26	45	36	14	18	142	120
	400	129	153	19*	13*	27	25	40	26	17	10	165*	139*
	800	88*	96*	13*	6*	33*	17*	27	18	11*	3*	94*	104*
	1600	0*	0*	0*	1*	2*	1*	0*	0*	0*	0*	12*	1*
	3200	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
--- Positive Control ---													
2-AA	0.5	600	563					512	524			481	411
	2			277	284					140	137		
	40					1309	1122						

Solvent Control
* Observed of Cell Killing

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

8) 親化合物及び代謝分解物の細菌を用いたDNA修復試験

(資料 38)

試験機関

[非GLP]

報告書作成年 1975年

検体及び純度：チオベンカルブ

方法：枯草菌*Bacillus subtilis*の組換え修復機構保持株(H-17)と欠損株(M-45)を用い、DNAの損傷の誘発性を検定した。

検体はDMSOに溶解した。

結果：

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
対照 (DMSO)		0	0	0
チオベンカルブ	10	0	1	-1
	100	0	0	0
	1,000	0	0	0
	10,000	0	0	0
	10	0	0	0
	100	0.5	0	0.5
	1,000	2.5	1.5	1
	10,000	2.5	0.5	2
陽性対照 (Mitomycin C)	0.1	12	3	9

チオベンカルブ及び
のいずれも10,000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ においても両株に有意な生育阻止帯差を認めなかった。

一方陽性対照のMitomycin Cでは両株に明らかな生育阻止の差が生じた。

以上の結果より、チオベンカルブ及び

はDNA損傷の誘発性が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クミアイ化学工業株式会社にある。

9) 親化合物及び代謝分解物の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 39)

試験機関

[非GLP]

報告書作成年 1975年

検体及び純度：チオベンカルブ

方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1536, TA1537, TA1538, TA1535及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E. coli* WP2hcr⁺, WP2hcr⁻株を用い, Amesらの方法で変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解した。

結果：

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mixの 有無	復帰変異コロニー数/Plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA1535	WP2hcr ⁺	WP2hcr ⁻	TA1536	TA1537	TA1538
対照 (DMSO)			10	1	3	0	9	13
チオベンカルブ	100	—	2	6	8	0	4	10
	1,000	—	5	4	7	0	9	16
	100	—	7	4	8	0	9	14
	1,000	—	11	4	14	0	14	21
陽性対照 ¹⁾	100	—		13	67			
	10,000	—	>1000			>1000		
陽性対照 ²⁾	100	—					2	83

1) β -propiolactone 2) 4-nitroquinoline-N-Oxide

チオベンカルブ及び のいずれも1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の濃度においても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 β -propiolactone, 4-nitroquinoline-N-oxideでは, 明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より, チオベンカルブ及び
のと判断される。

は本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないも

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

10) 代謝分解物の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 40)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1985年

検体及び純度：

方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA97, TA1537及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E. coli* WP2uvrA株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。検体はDMSOに溶解した。

陽性対照として下記の薬剤を用いた。

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

ENNG : 1-Ethyl-2-nitro-3-nitrosoguanidine

ACR : 9-Aminoacridine

ICR-191 : 2-Methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl) aminopropylamino) acridine

2-AA : 2-Aminoanthracene

結果：データはTable 1～Table 12に示した。

は代謝活性化の条件下で、TA100株において、復帰変異コロニー数の増加が認められた。

その他の代謝物では、最高濃度においても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, ENNG, ACR, ICR-191, 2-AAではすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、
ると判断される。

は代謝活性化の条件下でTA100株に対し復帰変異誘発性を有す

ものと判断される。

は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しない

Table 1 (S-9 Mix無添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate											
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA97	TA97				
DMSO#	-----	122	106	16	10	26	21	17	15	5	2	114	98
Test sub.	25	129	129	20	17	18	11	24	27	10	6	101	92
	50	130	117	17	18	19	19	23	25	7	6	85	91
	100	116	121	15	27	21	14	22	20	2	7	118	79
	200	108	110	18	26	15	15	24	25	8	4	97	111
	400	85*	64*	16	18	8	14	26	18	3	4	118*	105*
	800	39*	36*	3*	3*	10*	17*	12*	14*	8*	1*	99*	114*
	1600	0*	7*	0*	0*	3*	11*	2*	3*	0*	0*	36*	36*
-- Positive Control --													
AF-2	0.01	467	493			183	178						
	0.1							562	542				
ENNG	5			158	132								
ACR	80									824	749		
ICR-191	0.2											924	840

Solvent Control

* Observed of Cell Killing

Table 2 (S-9 Mix 添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate											
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA1537	TA97				
DMSO#	---	134	129	18	22	24	28	43	43	17	11	131	120
Test sub.	25	144	118	17	14	28	21	40	36	8	4	136	153
	50	139	124	14	13	18	28	36	31	10	19	133	150
	100	126	129	14	12	26	16	36	39	15	8	134	138
	200	132	135	15	7	27	17	25	28	4	9	120	98
	400	92*	74*	13	15	21	15	23	30	6	5	100	119
	800	33*	30*	9*	11*	19	6	25*	20*	8*	5*	114*	116*
	1600	30*	15*	2*	0*	15	15	15*	13*	1*	1*	104*	105*
--- Positive Control ---													
2-AA	0.5	730	647					610	435			327	294
	2			303	318					257		352	
	40					1223	1182						

Solvent Control

* Observed of Cell Killing

Table 3 (S-9 Mix無添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate											
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA97	TA97				
DMSO#	-----	122	106	16	10	26	21	17	15	5	2	114	98
Test sub.	200	107	108	18	23	25	24	30	18	6	3	110	125
	400	124	139	13	27	27	24	13	10	3	10	108	137
	800	117	120	25	15	17	15	16	15	1	5	130	93
	1600	116	125	19	19	16	29	17	18	5	7	80	104
	3200	96	112	20	24	32	16	12	16	2	2	46	73
	6400	57	61	12	9	18	11	6	8	1	0	45	20
	12800	0	0	0	2	5	9	2	2	0	0	2	1
-- Positive Control --													
AF-2	0.01	467	493			183	178						
	0.1							562	542				
ENNG	5			158	132								
ACR	80									824	749		
ICR-191	0.2											924	840
# Solvent Control												924	840

Table 4 (S-9 Mix 添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate											
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA97	TA97				
DMSO#	---	134	129	18	22	24	28	43	43	17	11	131	120
Test sub.	200	118	143	16	14	21	22	37	50	13	5	126	130
	400	122	125	12	25	29	30	38	41	15	13	120	142
	800	125	131	14	12	19	31	32	21	11	12	119	131
	1600	120	124	21	10	20	14	36	40	5	11	146	119
	3200	127	109	15	17	21	23	42	26	5	3	119	122
	6400	70*	72*	15*	9*	16	18	15	22	1	2	75*	99*
	12800	16*	20*	4*	2*	18	12	9*	3*	0	1	32*	15*
--- Positive Control ---													
2-AA	0.5	730	647					610	435			327	294
	2			303	318					257		352	
	40					1223	1182						

Solvent Control

* Observed of Cell Killing

Table 5 (S-9 Mix無添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate											
		TA100	TA1535	WP2uvrrA	TA98	TA1537	TA97	TA97	TA97				
DMSO#	-----	118	129	25	21	18	19	18	24	10	3	103	109
Test sub.	200	124	119	22	21	23	13	22	22	4	3	122	121
	400	134	135	24	28	17	24	17	15	1	7	101	107
	800	134	132	36	22	14	20	16	23	3	7	117	130
	1600	130	121	28	21	10	20	20	24	10	3	125	127
	3200	143	155	26	19	18	20	15	21	2	5	112	124
	6400	120	110	23	20	14	10	23	20	0	2	96	114
	12800	5*	4*	2*	2*	4*	9*	7*	6*	1*	0*	16*	44*
--- Positive Control ---													
AF-2	0.01	612	601			177	171						
	0.1							646	624				
ENNG	5			183	157								
ACR	80							692	714				
ICR-191	0.2									932		1121	

Solvent Control

* Observed of Cell Killing

Table 6 (S-9Mix 添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate										
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA1537	TA97			
DMSO#	-----	98	116	19	14	16	36	38	14	21	124	126
Test sub.	200	125	144	11	20	29	35	49	11	9	146	139
	400	136	134	15	18	19	49	30	15	11	130	137
	800	105	122	13	12	22	41	40	9	21	141	117
	1600	129	102	14	16	22	40	51	7	13	123	137
	3200	121	127	16	20	15	44	46	17	8	94	123
	6400	125	123	12	10	17	44	27	8	4	115	122
	12800	35*	55*	9*	7*	13*	16*	12*	3*	6*	64*	65*
--- Positive Control ---												
2-AA	0.5	901	1081				845	684			773	654
	2			122	138				483			512
	40					971	968					
# Solvent Control												
* Observed of Cell Killing												

Table 7 (S-9 Mix無添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate											
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA97	TA97				
DMSO#	-----	118	129	25	21	18	19	18	24	10	3	103	109
Test sub.	500	118	133	30	28	19	13	18	27	6	4	121	98
	1000	135	146	24	43	16	9	22	31	8	3	123	116
	2000	159	156	43	37	17	16	26	21	8	11	78	108
	4000	137	141	38	32	8	11	12	29	4	8	106	103
	8000	96	133	27	16	11	10	14	25	6	8	104	116
	16000	17	50	11	15	5	2	5	8	1	2	57	55
	32000	20	28	13	19	5	6	4	6	0	0	48	69
--- Positive Control ---													
AF-2	0.01	612	601		177	171							
	0.1							646	624				
ENNG	5			183	157								
ACR	80								692	714			
ICR-191	0.2											932	1121
# Solvent Control													

Table 8 (S-9Mix 添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate											
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA1537	TA97				
DMSO#	---	98	116	19	14	16	25	36	38	14	21	124	126
Test sub.	500	111	129	13	17	26	19	34	26	15	18	134	138
	1000	111	135	17	21	24	31	38	40	13	16	135	148
	2000	130	116	17	16	24	19	36	33	16	23	134	130
	4000	106	103	16	23	16	20	38	43	11	12	134	169
	8000	87	90	12	11	12	20	42	57	6	8	156	147
	16000	5	8	21	13	10	9	7	3	2	4	136	116
	32000	0	4	3	15	14	9	10	5	0	1	134	165
--- Positive Control ---													
2-AA	0.5	901	1081					845	684			773	654
	2			122	138					483			512
	40					971	968						
# Solvent Control													

Table 9 (S-9 Mix無添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate												
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	
DMSO#	-----	89	15	10	15	15	15	31	21	12	12	18	77	86
Test sub.	125	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	250	109	96	12	13	15	23	39	26	9	9	7	108	108
	500	121	96	13	16	18	12	25	22	15	15	13	105	90
	1000	85	88	11	8	17	17	35	17	5	5	8	105	115
	2000	96	89	22	19	14	15	20	22	14	14	12	123	92
	4000	104	103	12	19	14	11	30	16	12	7	7	95	87
	8000	95	109	10	17	14	14	20	24	7	9	9	95	107
	16000	118	141	27	13	13	16	19	22	10	12	103	103	84
--- Positive Control ---														
AF-2	0.01	462	447	117	145									
ENNG	0.1							486	484					
ACR	5			93	122									
ICR-191	80									732	619			
ICR-191	0.2											801		906
# Solvent Control NT : Not Tested														

Table 10 (S-9Mix 添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate											
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97
DMSO#	-----	142	122	14	13	20	18	47	51	33	13	135	151
Test sub.	125	115	146	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	250	207	253	7	11	31	24	59	43	22	20	146	161
	500	470	373	12	19	19	28	41	40	16	17	131	154
	1000	528	550	8	15	19	19	49	36	22	17	137	166
	2000	533	513	18	20	21	17	55	34	18	22	143	145
	4000	437	509	11	6	17	20	46	40	18	16	138	144
	8000	445	523	16	20	28	22	42	42	14	26	148	158
	16000	440	415	14	23	21	21	35	40	16	5	142	141
-- Positive Control --													
2-AA	0.5	455	452					564	575			320	373
	2			317	329			278			250		
	40					919	857						
# Solvent Control NT : Not Tested													

Table 11 (S-9 Mix無添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate										
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA97	TA97			
DMSO#	-----	119	18	12	18	27	24	24	5	2	81	91
Test sub.	10	113	17	19	23	10	27	14	10	2	86	91
	20	103	15	11	23	10	23	15	6	4	95	89
	40	135	19	21	24	18	21	24	2	3	77	86
	80	118	17	16	15	15	18	14	5	7	102	80
	160	8*	0*	0*	10*	16*	13*	4*	2*	0*	13*	10*
	320	0*	0*	0*	6*	17*	8*	8*	0*	0*	10*	25*
	640	6*	0*	0*	16*	14*	5*	14*	0*	2*	14*	19*
--- Positive Control ---												
AF-2	0.01	481	435	185	198							
	0.1						523	583				
ENNG	5		120	98								
ACR	80								475	536		
ICR-191	0.2										977	936
# Solvent Control												
* Observed of Cell Killing												

Table 12 (S-9 Mix 添加)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant Colonies per Plate											
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA97
DMSO#	-----	142	122	11	12	18	17	25	31	10	13	134	131
Test sub.	10	144	125	7	15	25	22	22	28	6	5	123	126
	20	147	139	11	9	19	8	36	26	10	10	139	116
	40	125	112	8	12	18	17	27	14	9	4	147	138
	80	101	111	9	14	17	10	17	18	5	8	120	119
	160	80	108	9	6	14	22	22	19	1*	7*	106	129
	320	83*	74*	2*	7*	14*	18*	12*	18*	5*	5*	85*	93*
	640	70*	35*	2*	3*	20*	19*	12*	13*	3*	9*	102*	104*
--- Positive Control ---													
2-AA	0.5	455	452					384	409			342	347
	2			170	182					103	116		
	40					1131	931						

Solvent Control

* Observed of Cell Killing

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

1 1). 代謝分解物の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 41)

試験機関

[非GLP]

報告書作成年 1983年

検体及び純度 :

方 法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1537, TA1538, TA98, TA1535, TA100及びトリプトファン要求性大腸菌 *E. Coli* WP2uvrA株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。検体はDMSOに溶解した。陽性対照として下記の薬剤を用いた。

ENNG : N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

9ACR : 9-Aminoacridine

2NF : 2-Nitrofluorene

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

2AT : 2-Aminoanthracene

B(a)P : Benzo(a)pyrene

結 果 : データは次ページに示した。検体は代謝活性化を含め10,000 µg/plateの濃度においても、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ENNG, 9ACR, 2NF, AF-2, 2AT, B(a)Pはすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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クミアイ化学工業株式会社にある。

結 果 :

薬 物	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mixの 有 無	復帰変異コロニー数/Plate					
			塩 基 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA1538
対 照 (DMSO)	/	-	168	7	16	21	10	14
			147	5	16	32	7	18
検 体	10	-	161	4	17	32	9	11
			160	3	15	22	4	20
	50	-	142	7	18	23	12	12
			169	5	13	31	6	18
	100	-	166	4	16	28	5	19
			167	7	21	26	7	14
	500	-	159	5	13	24	7	20
			146	4	19	22	6	11
	1000	-	151	7	19	30	9	11
			143	3	11	22	6	19
	5000	-	18*	0*	11	10*	1*	0*
			34	0*	18	6*	2*	0*
	10000	-	4*	0*	0*	3*	0*	0*
			7*	0*	0*	0*	0*	0*
対 照 (DMSO)	/	+	149	6	18	38	9	45
			153	6	20	36	8	33
検 体	10	+	120	7	14	45	8	32
			114	8	16	31	6	28
	50	+	182	6	14	42	6	25
			180	7	14	39	5	38
	100	+	169	7	15	44	5	27
			178	5	26	41	7	25
	500	+	85	5	17	34	5	24
			87	6	26	35	6	18
	1000	+	44*	5	15	28	2*	4*
			37*	3	19	31	4*	7*
	5000	+	0*	1*	16	1*	5*	6*
			0*	0*	13	2*	3*	5*
	10000	+	0*	0*	0*	0*	0*	0*
			0*	0*	0*	0*	0*	0*
陽 性 対 照	S9Mixを 必要と しないもの	名 称	AF-2	ENNG	AF-2	AF-2	9ACR	2NF
		濃度($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	5	0.01	0.1	80	2
		コロニー数 plate	810 736	404 413	377 390	540 568	596 491	687 612
	S9Mixを 必要と するもの	名 称	B(a)P	2AT	2AT	B(a)P	B(a)P	B(a)P
		濃度($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5	2	80	5	5	5
		コロニー数 plate	1028 1120	74 89	810 750	870 761	108 101	282 344

* 菌株の生育阻止を認めた。