

② 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-2)

試験機関 モンサント環境衛生研究所  
報告書作成年 1979年

検体の純度: % (原体)

供試動物: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537) を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は、DMSO に溶解し、0.1~100  $\mu$ L / プレートの範囲の6濃度で実施した。

用量設定根拠;

結果: 結果を表1に示した。

TA100菌株で、S-9 mixの存在下及び非存在下において復帰変異コロニー数がやや増加し、用量相関性も認められた。しかし、TA98、TA1535、TA1537菌株には変異原性反応は認められなかった。

一方、各菌株に対応する陽性対照物質では、全て著明な復帰変異コロニー数の増加を認めた。

TA100菌株に認められた反応は、検体の主成分ブタクロールの水溶解度を越えた濃度で認められたことから、検体中に含まれていた親水性の不純物による可能性があることが示唆された。

以上の結果により、検体は代謝活性化を含む本試験条件下でTA100菌株に対し、弱い復帰変異誘発性があるものと判断される。

表 1 結 果 (原報告書 RECORD1-4)

薬 物	濃度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩素置換型		フレームシフト型	
			TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照(DMSO)		—	8.0	81.0	5.0	23.0
非溶媒対照		—	4.0	125.0	4.0	13.0
検体	0.1	—	6.5	69.0	2.0	29.7
	0.4	—	6.7	92.3	3.3	20.7
	2	—	12.3	163.7	3.7	25.7
	10	—	10.0	238.7	4.7	28.3
	30	—	8.7*	153.0	3.3	10.3*
	100	—	0 *	4.3*	0 *	0 *
溶媒対照(DMSO)		+	12.5	82.3	2.0	40.3
非溶媒対照		+	7.0	75.0	5.0	43.0
検体	0.1	+	5.0	76.0	3.0	34.0
	0.4	+	4.0	70.0	4.7	27.7
	2	+	4.7	79.7	5.3	35.0
	10	+	4.0	199.3	2.7	33.0
	30	+	5.0	334.0	2.0	39.0
	100	+	0 *	130.0*	0 *	2.0*
陽性対照		—	408 a)	408 c)	55 e)	186 g)
		+	628 b)	228 d)	162 f)	2,271 h)

- a)  $\text{NaNO}_2$  10  $\mu$ g/プレート  
 b) トリス(2,3-ジプロモプロピル)リン酸 30  $\mu$ g/プレート  
 c) 4-ニトロキリン-N-オキシド\* 0.05  $\mu$ g/プレート  
 d) ベンゾ(a)ピレン 2  $\mu$ g/プレート  
 e) 9-アミナクリジン 30  $\mu$ g/プレート  
 f) 2-アミノアントラセン 30  $\mu$ g/プレート  
 g) 4-ニトロキリン-N-オキシド\* 0.1  $\mu$ g/プレート  
 h) 2-アセタミドフルオレン 30  $\mu$ g/プレート  
 \* 菌株の生育阻止を認める

③ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-3)

試験機関 モンサント環境衛生研究所  
報告書作成年 1979年

検体の純度:       %(分析用標準品)

試験方法:ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium*(TA98、TA100、TA1535、TA1537)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らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解し、0.03~30.0  $\mu$ L/プレートの範囲の6濃度で実施した。

用量設定根拠;

試験結果:結果を表1に示す。

10%S-9 mixの有無にかかわらず、検体による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。

表 1 結 果 (原報告書 P.8 Table3及びP.9 Table4)

薬 物	濃度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩素置換型		フレームシフト型	
			TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照(DMSO)		—	15.7	79.0	7.3	20.0
非溶媒対照		—	22.0	91.0	1.0	48.0
検 体	0.03	—	13.0	71.0	3.3	23.7
	0.12	—	12.0	58.7	7.7	18.3
	0.6	—	13.0	49.3	4.7	16.0
	3.0	—	12.7	64.0	6.3	15.0
	9.0	—	12.3	72.0	5.0	8.3
	30.0	—	13.0	77.0	5.0	17.0
溶媒対照(DMSO)		+	6.0	69.3	3.6	37.7
非溶媒対照		+	6.0	75.0	2.0	37.0
検 体	0.03	+	4.3	72.0	1.0	36.0
	0.12	+	6.3	74.3	2.7	31.0
	0.6	+	3.6	65.3	3.7	31.0
	3.0	+	6.3	83.3	4.7	33.7
	9.0	+	3.3	67.3	4.3	29.7
	30.0	+	6.3	45.7	2.3	31.0
陽性対照		—	3,861.0	3,841.0	2,516.0	204.0
		+	668.0	285.0	347.0	215.0

(申請者注) 表中の数値は、試験報告書中のカウント数を申請者が平均して求めた。

④ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-4)

試験機関 モンサント環境衛生研究所  
報告書作成年 1981年

検体の純度:       %(分析用標準品)

試験方法:ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100, TA98) 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10%、30%存在下及び非存在下でAmesらの方法を用いて変異原性を検定した。本試験では、通常のプレート法とプレインキュベーション法<sup>1)</sup>による検定を実施し、比較を行った。

用量設定根拠;

試験結果:結果を表1及び2に示した。

プレート法による検定において、S-9 mix濃度10%及び30%存在下でTA100株について復帰変異コロニー数の有意な増加がみられた。プレインキュベーション法においては、S-9 mix濃度30%のときにのみ有意な増加がみられた。S-9 mix非存在下では、いずれの方法でも復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。陽性対照物質は、S-9 mix存在下でも、非存在下でも著明な復帰変異を誘発したが、S-9 mix濃度が30%の場合には10%の場合よりも復帰変異コロニー数は少なかった。

以上の結果から、検体はTA100 株に対し、非常に高濃度の薬物代謝酵素系の存在下においてのみ、弱い復帰変異誘発能を示すと考えられる。

<sup>1)</sup> 検体、菌株培地、S-9 mixでの混合溶液(1:1:5)を調製し、30℃で20分間プレインキュベーションした後プレート法で検査した。

表 1 結 果: プレート法 (原報告書 P.13 TABLE7)

薬 物	濃 度 ( $\mu$ L/プレート)	復帰変異コロニー数/プレート					
		TA100			TA98		
		S-9 mix濃度			S-9 mix濃度		
		0%	10%	30%	0%	10%	30%
溶媒対照(DMSO) (n=9)		139.6	105.9	119.3	16.2	23.6	24.2
非溶媒対照(n=1)		202	164	141	20	30	25
ブタクロール (n=3)	0.01	126.0	119.0	139.7	17.7	30.0	19.7
	0.04	117.0	111.0	162.0	14.7	26.7	22.0
	0.20	120.3	120.3	157.7	17.3	20.0	21.7
	1.00	97.3	* 141.3	* 200.0	15.0	28.7	21.0
	3.00**	118.7	* 169.7	* 220.7	15.5	26.7	21.3
	10.00**	127.3	* 143.7	* 249.7	16.0	29.7	21.0
陽性対照 (n=1)	レベル1	201 a)	247 b)	208 b)	50 c)	1540 d)	156 d)
	レベル2	302 a)	785 b)	387 b)	96 c)	8380 d)	2230 d)
	レベル3	392 a)	1170 b)	456 b)	187 c)	10000 d)	5020 d)

\* 対照に比べ有意に大きい値

\*\* 水溶解度を越える濃度

- a) 4-ニトロキノリン-N-オキシド' レベル1 0.25  $\mu$ g ; レベル2 0.5  $\mu$ g , レベル3 0.75  $\mu$ g  
 b) ベンゾ'(a)ピレン レベル1 1  $\mu$ g ; レベル2 2  $\mu$ g , レベル3 3  $\mu$ g  
 c) 4-ニトロキノリン-N-オキシド' レベル1 0.01  $\mu$ g ; レベル2 0.05  $\mu$ g , レベル3 0.1  $\mu$ g  
 d) 2-アセチルアミノフルオレン レベル1 3  $\mu$ g ; レベル2 15  $\mu$ g , レベル3 30  $\mu$ g

表 2 結 果: プレインキューベーション法 (原報告書 P.14 TABLE8)

薬 物	濃 度 ( $\mu$ L/プレート)	復帰変異コロニー数/プレート					
		TA100			TA98		
		S-9 mix濃度			S-9 mix濃度		
		0%	10%	30%	0%	10%	30%
溶媒対照(DMSO) (n=9)		96.2	114.7	138.2	16.8	28.0	22.2
非溶媒対照(n=1)		104	134	130	15	23	15
ブタクロール (n=3)	0.01	97.7	87.7	151.3	14.3	26.5	18.7
	0.04	106.0	107.7	157.7*	15.3	22.0	29.0
	0.20	97.3	100.7	200.3*	19.7	22.5	16.3
	1.00	92.7	120.0	228.0*	13.0	20.0	24.7
	3.00**	94.0	126.0	258.0*	13.7	24.5	26.0
	10.00**	86.3	109.0	241.0*	13.7	22.7	26.7
陽性対照		580.6 a)	584.7 b)	337.7 b)	97 c)	8390 d)	5270 d)

\* 対照に比べ有意に大きい値

\*\* 水溶解度を越える濃度

- a) 4-ニトロキノリン-N-オキシド' 0.5  $\mu$ g  
 b) ベンゾ'(a)ピレン 2  $\mu$ g  
 c) 4-ニトロキノリン-N-オキシド' 0.1  $\mu$ g  
 d) 2-アセチルアミノフルオレン 30  $\mu$ g

⑤ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-5)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1981年

検体の純度: % (原体、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100) 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) の非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSO に溶解し、0.01~10  $\mu$ L/プレート の範囲の6濃度で実施した。再検定は13, 10及び5  $\mu$ L/プレートの3用量で実施した。いずれの場合も3連制で行なった。

用量設定根拠;

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は、初回検定のS-9 mix非存在下の条件でTA100菌株に対して最高濃度の10  $\mu$ L/プレートで復帰変異コロニー数を増加させた。再検定の結果、13、10及び5  $\mu$ Lの3濃度で復帰変異コロニー数を増加させた。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系の非存在下、本試験条件において復帰変異誘発能を有すると判断される。

表 1 結 果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.13及B.P.15)

	薬 物	濃 度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート
				塩基置換型
				TA100
初回検定	溶媒(DMSO)	20	—	132
	検 体	10	—	198 <sup>a)</sup> *
		3	—	125 <sup>a)</sup>
		1	—	122
		0.2	—	148
		0.04	—	153
		0.01	—	146
	陰性対照	—	—	105
陽性対照 2-NF	4 $\mu$ g	—	431	
再 検 定	溶媒(DMSO)	20	—	93
	検 体	13	—	214*
		10	—	181*
		5	—	134
	陰性対照	—	—	94
	陽性対照 2-NF	4 $\mu$ g	—	409

a) 検体は重層寒天上で油滴状の溶液となっていた。

\* t-検定  $p \leq 0.01$

2-NF:2-ニトロフルオレン



⑥ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-6)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1981年

検体の純度: % (原体、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100) 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) の非存在下で Ames らの方法を用い変異原性を検定した。検体は、DMSO に溶解し、0.01~10  $\mu$ L/プレートの範囲の6濃度で実施した。検定は3連制で行なった。

用量設定根拠;

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は、S-9 mix 非存在下の条件で TA100 菌株に対して最高濃度の 10  $\mu$ L/プレートで復帰変異コロニー数の増加を誘発しなかった。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系の非存在下、本試験条件において復帰変異誘発能を有さないものと判断される。

表 1 結 果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.12)

薬 物	濃 度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート
			塩基置換型
			TA100
溶媒(DMSO)	20	—	133
検 体	10	—	156
	3	—	137
	1	—	122
	0.2	—	134
	0.04	—	133
	0.01	—	142
陰性対照	—	—	105
陽性対照 2-NF	4 $\mu$ g	—	431

2-NF: 2-ニトロフルオレン

⑦ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-7)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1981年

検体の純度: % (原体、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100) 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) の非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSO に溶解し、0.01~10  $\mu$ L/プレート の範囲の6濃度で実施した。検定は3連制で行なった。

用量設定根拠;

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は、S-9 mix 非存在下の条件で TA100 菌株に対して最高濃度の 10  $\mu$ L/プレート で復帰変異コロニー数の増加を誘発しなかった。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系の非存在下、本試験条件において復帰変異誘発能を有さないものと判断される。

表 1 結果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.12)

薬物	濃度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート
			塩基置換型 TA100
溶媒(DMSO)	20	—	146
検体	10	—	153
	3	—	121
	1	—	105
	0.2	—	109
	0.04	—	125
	0.01	—	122
陰性対照	—	—	105
陽性対照 2-NF	4 $\mu$ g	—	431

2-NF: 2-ニトロフルオレン

⑧ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-8)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1981年

検体の純度: % (原体、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100) 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) の非存在下で Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSO に溶解し、0.01~10  $\mu$ L/プレート の範囲の6濃度で実施した。検定は3連制で行なった。

用量設定根拠;

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は、S-9 mix非存在下の条件でTA100菌株に対して最高濃度の10  $\mu$ L/プレートで復帰変異コロニー数の増加を誘発しなかった。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系の非存在下、本試験条件において復帰変異誘発能を有さないものと判断される。

表 1 結 果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.12)

薬 物	濃 度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート
			塩基置換型 TA100
溶媒(DMSO)	20	—	124
検 体	10	—	138
	3	—	125
	1	—	129
	0.2	—	121
	0.04	—	128
	0.01	—	131
陰性対照	—	—	105
陽性対照 2-NF	4 $\mu$ g	—	431

2-NF: 2-ニトロフルオレン

⑨ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-9)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1981年

検体の純度: % (原体、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100) 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) の非存在下で Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSO に溶解し、0.01~10  $\mu$ L/プレート の範囲の6濃度で実施した。検定は3連制で行なった。

用量設定根拠;

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は、S-9 mix非存在下の条件でTA100菌株に対して最高濃度の10  $\mu$ L/プレートで復帰変異コロニー数の増加を誘発しなかった。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系の非存在下、本試験条件において復帰変異誘発能を有さないものと判断される。

表 1 結 果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.12)

薬 物	濃 度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート
			塩基置換型 TA100
溶媒(DMSO)	20	—	129
検 体	10	—	140
	3	—	125
	1	—	125
	0.2	—	128
	0.04	—	118
	0.01	—	134
陰性対照	—	—	105
陽性対照 2-NF	4 $\mu$ g	—	431

2-NF: 2-ニトロフルオレン

⑩ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-10)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1980年

検体の純度: % (原体, )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100及びTA1535)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)の非存在下でAmesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSOに溶解し、0.01~10 μL/プレートの範囲の6濃度で実施した。再検定は13, 10及び5 μL/プレートの3用量で実施した。いずれの場合も3連制で行なった。

用量設定根拠;

判定基準: 3濃度以上で有意なコロニー数の増加 ( $p \leq 0.01$ )、かつ用量相関性が有意であった場合 ( $p \leq 0.01$ )に陽性と判断する。

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は初回検定でS-9 mix非存在下で TA100 菌株に対して復帰変異コロニー数の増加を示さなかったが、有意な用量相関性を示した。TA1535菌株に対して復帰変異コロニー数の増加は認められなかったが、用量相関性 ( $p \leq 0.02$ )が認められた。再検定で検体はTA100菌株に対して2濃度区において復帰変異コロニー数の増加と用量相関性を示したが、TA1535菌株に対しては復帰変異コロニー数の増加も用量相関性も認められなかった。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系非存在下、本試験条件下で復帰変異誘発能を有さないものと判断される。

表 1 結 果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.14及びP.17)

	薬 物	濃 度 (μL/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート	
				塩 基 置 換 型	
				TA100	TA1535
初回検定	溶媒(DMSO)	20	—	95	10
	検 体	10	—	123	18
		3	—	99	14
		1	—	94	10
		0.2	—	96	14
		0.04	—	79	10
		0.01	—	88	10
陰性対照	—	—	97	13	
陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 μg	—	884	—	
	9 mg	—	—	388	
再 検 定	溶媒(DMSO)	40	—	184	16
	検 体	13	—	230 <sup>a)</sup> *	20 <sup>a)</sup>
		10	—	211 <sup>a)</sup> *	22 <sup>a)</sup>
		5	—	190 <sup>a)</sup>	20 <sup>a)</sup>
	陰性対照	—	—	211	13
	陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 μg	—	599	—
9 mg		—	—	390	

a) 検体は重層寒天上で油滴状の溶液となっていた。

\* t-検定  $p \leq 0.01$  2-NF: 2-ニトロフルオレン

① 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-11)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1980年

検体の純度: % (原体、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100, TA1535) 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) の非存在下で Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSO に溶解し、0.01~10  $\mu$ L/プレート の範囲の6濃度で実施した。再検定は13、10及び5  $\mu$ L/プレートの3用量で実施した。いずれの場合も3連制で行なった。

用量設定根拠;

判定基準; 3濃度以上で有意なコロニー数の増加 ( $p \leq 0.01$ )、かつ用量相関性が有意であった場合 ( $p \leq 0.01$ ) に陽性と判断する。

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は初回検定で S-9 mix の非存在下で TA100 菌株に対して 10  $\mu$ L/プレート において復帰変異コロニー数の有意な増加を示したが、用量相関性の有意差は認められなかった。TA100 菌株を用いた再検定では 13 及び 10  $\mu$ L 濃度区において有意な増加を示したが、有意な用量相関性は認められなかった ( $p \leq 0.02$  では有意差が認められた)。TA1535 菌株に対しては初回検定で溶媒対照に対し復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系非存在下、本試験条件下で復帰変異誘発能を有さないものと判断される。

表 1 結果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.14及びP.16)

	薬物	濃度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート	
				塩基置換型	
				TA100	TA1535
初回検定	溶媒(DMSO)	20	—	96	8
	検体	10	—	132*	9
		3	—	97	10
		1	—	96	11
		0.2	—	102	10
		0.04	—	94	8
		0.01	—	112	11
	陰性対照	—	—	97	13
陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 $\mu$ g 9 mg	—	884 —	— 388	
再検定	溶媒(DMSO)	40	—	199	—
	検体	13	—	233 <sup>a)</sup> *	—
		10	—	248 <sup>a)</sup> *	—
		5	—	209 <sup>a)</sup>	—
	陰性対照	—	—	211	—
	陽性対照 2-NF	2 $\mu$ g	—	599	—

a) 検体は重層寒天上で油滴状の溶液となっていた。

\* t-検定  $p \leq 0.01$  2-NF: 2-ニトロフルオレン

⑫ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-12)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1980年

検体の純度: % (分析用標準品、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535) 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) の非存在下で Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSO に溶解し、0.01~10  $\mu$ L / プレートの範囲の6濃度で実施した。検定は3連制で行なった。

用量設定根拠;

試験結果: 結果を表1に示した。

検体はS-9 mix非存在下、10  $\mu$ L / プレートの濃度においても TA100 及び TA1535 いずれの菌株にも復帰変異コロニーの増加を誘発しなかった。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系非存在下、本試験条件下で復帰変異誘発能を有さないものと判断される。

表 1 結 果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.14)

	薬 物	濃 度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート	
				塩 基 置 換 型	
				TA100	TA1535
初回検定	溶媒(DMSO)	20	—	95	10
	検 体	10	—	93 <sup>a)</sup>	11
		3	—	85 <sup>a)</sup>	10
		1	—	86 <sup>a)</sup>	13
		0.2	—	98 <sup>a)</sup>	9
		0.04	—	87	8
		0.01	—	103	9
	陰性対照	—	—	97	13
陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 $\mu$ g 9 mg	—	884 —	— 388	

a) 検体は重層寒天上で油滴状の溶液となっていた。  
2-NF: 2-ニトロフルオレン

⑬ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-13)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1980年

検体の純度: % (原体、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100, TA1535) 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) の非存在下で Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSOに溶解し、0.01~10  $\mu$ L/プレートの範囲の6濃度で実施した。再検定は13、10及び5  $\mu$ Lの3用量で実施した。いずれの場合も3連制で行なった。

用量設定根拠;

判定基準; 3濃度以上で有意なコロニー数の増加 ( $p \leq 0.01$ )、かつ用量相関性が有意であった場合 ( $p \leq 0.01$ ) に陽性と判断する。

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は初回検定でS-9 mix非存在下で TA100及びTA1535菌株に対して10  $\mu$ L/プレートの濃度で有意な復帰変異コロニー数の増加を示した。TA1535菌株に対しては、用量相関性 ( $p \leq 0.01$ ) も認められた。再検定で検体は TA100菌株に対して3濃度区において復帰変異コロニー数の増加を示し、用量相関性も認められたが、TA1535菌株に対しては復帰変異コロニー数の増加も用量相関性も認められなかった。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系非存在下、本試験条件下で復帰変異誘発能を有するものと判断される。

表 1 結 果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.14, P.17及びP.20)

	薬 物	濃 度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート	
				塩 基 置 換 型	
				TA100	TA1535
初回検定	溶媒(DMSO)	20	—	95	10
	検 体	10	—	185*	39*
		3	—	106	13
		1	—	101	13
		0.2	—	97	10
		0.04	—	92	6
		0.01	—	93	12
	陰性対照	—	—	97	13
陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 $\mu$ g 9 mg	—	884 —	— 388	
再 検 定	溶媒(DMSO)	40	—	185	22
	検 体	13	—	342*	33
		10	—	274*	36
		5	—	251*	35
	陰性対照	—	—	211	13
	陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 $\mu$ g 9 mg	—	599 —	— 390

\* t-検定  $p \leq 0.01$  2-NF: 2-ニトロフルオレン



⑭ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-14)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1980年

検体の純度: % (原体、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100, TA1535) を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSO に溶解し、0.01~10  $\mu$ L / プレートの範囲の6濃度で実施した。再検定は13、10及び5  $\mu$ L / プレートの3用量で実施した。いずれの場合も3連制で行なった。

用量設定根拠;

判定基準; 3濃度以上で有意なコロニー数の増加 ( $p \leq 0.01$ )、かつ用量相関性が有意であった場合 ( $p \leq 0.01$ ) に陽性と判断する。

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は初回検定で S-9 mix 非存在下で TA100 菌株に対して復帰変異コロニー数の増加を示さなかったが、用量相関性 ( $p \leq 0.02$ ) が認められた。TA1535 菌株に対しては復帰変異コロニー数の増加も用量相関性も示さなかった。再検定で検体は TA100 菌株に対して13及び10  $\mu$ L / プレート濃度区において復帰変異コロニー数の増加を示したが、用量相関性は認められなかった。この陽性反応は、試験計画書で設定した濃度よりも高い濃度でのみ認められたもので、再検定を実施して確認する必要があると判断された。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系非存在下、試験計画書による本試験条件下においては、復帰変異誘発能を有さないものと判断される。

表 1 結 果 (3反復の平均値) (原報告書 P.15APPENDIX B 及びP.18)

	薬 物	濃 度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート	
				塩 基 置 換 型	
				TA100	TA1535
初回検定	溶媒(DMSO)	20	—	96	8
	検 体	10	—	121 <sup>a)</sup>	11 <sup>a)</sup>
		3	—	91 <sup>a)</sup>	11 <sup>a)</sup>
		1	—	102 <sup>a)</sup>	11 <sup>a)</sup>
		0.2	—	89 <sup>a)</sup>	11 <sup>a)</sup>
		0.04	—	68	15
		0.01	—	88	14
	陰性対照	—	—	97	13
陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 $\mu$ g 9 mg	—	884 —	— 388	
再 検 定	溶媒(DMSO)	40	—	156	—
	検 体	13	—	221 <sup>a)*</sup>	—
		10	—	218 <sup>a)*</sup>	—
		5	—	202 <sup>a)</sup>	—
	陰性対照	—	—	211	—
	陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 $\mu$ g 9 mg	—	599 —	— —

a) 検体は重層寒天上で油滴状の溶液となっていた。

\* t-検定  $p \leq 0.01$  2-NF: 2-ニトロフルオレン

⑮ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-15)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1980年

検体の純度: % (原体、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100, TA1535) 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) の非存在下で Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSOに溶解し、0.01~10  $\mu$ L/プレートの範囲の6濃度で実施した。再検定は13、10及び5  $\mu$ L/プレートの3用量で実施した。いずれの場合も3連制で行なった。

用量設定根拠:

判定基準; 3濃度以上で有意なコロニー数の増加 ( $p \leq 0.01$ )、かつ用量相関性が有意であった場合 ( $p \leq 0.01$ ) に陽性と判断する。

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は初回検定で S-9 mix 非存在下、TA100 菌株に対して 10  $\mu$ L/プレートの濃度で復帰変異コロニー数の有意な増加を示した。TA1535 菌株に対して復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。再検定で検体は TA100、TA1535 いずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数の増加も用量相関性も示さなかった。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系非存在下、本試験条件下で復帰変異誘発能を有さないものと判断される。

表 1 結果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.14及びP.18)

	薬物	濃度 ( $\mu$ L/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート	
				塩基置換型	
				TA100	TA1535
初回検定	溶媒(DMSO)	20	—	95	10
	検体	10	—	154 <sup>a)</sup> *	27 <sup>a)</sup>
		3	—	116 <sup>a)</sup>	13 <sup>a)</sup>
		1	—	127 <sup>a)</sup>	9 <sup>a)</sup>
		0.2	—	100 <sup>a)</sup>	11 <sup>a)</sup>
		0.04	—	101	11
		0.01	—	106	13
	陰性対照	—	—	97	13
	陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 $\mu$ g	—	884	—
9 mg		—	—	388	
再検定	溶媒(DMSO)	40	—	199	19
	検体	13	—	203 <sup>a)</sup>	12 <sup>a)</sup>
		10	—	183 <sup>a)</sup>	21 <sup>a)</sup>
		5	—	186 <sup>a)</sup>	20 <sup>a)</sup>
	陰性対照	—	—	211	13
	陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 $\mu$ g	—	599	—
9 mg		—	—	390	

a) 検体は重層寒天上で油滴状の溶液となっていた。

\* t-検定  $p \leq 0.01$  2-NF: 2-ニトロフルオレン

⑯ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-16)

試験機関 モンサント・リサーチ・コーポレーション  
報告書作成年 1980年

検体の純度: % (原体、 )

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100, TA1535) 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) の非存在下で Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体は、DMSOに溶解し、0.01~10 μL/プレートの範囲の6濃度で実施した。再検定は13、10及び5 μL/プレートの3用量で実施した。いずれの場合も3連制で行なった。

用量設定根拠;

判定基準; 3濃度以上で有意なコロニー数の増加 ( $p \leq 0.01$ )、かつ用量相関性が有意であった場合 ( $p \leq 0.01$ ) に陽性と判断する。

試験結果: 結果を表1に示した。

検体は初回検定でS-9 mix非存在下でTA100菌株に対して10 μL/プレートの濃度で有意な復帰変異コロニー数の増加を示し、有意な用量相関性も認められた。TA1535菌株に対しては復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量相関性もなかった。再検定で検体はTA100菌株に対して復帰変異コロニー数の増加も用量相関性も示さなかった。

以上の結果から、検体は薬物代謝酵素系非存在下、本試験条件下で復帰変異誘発能を有さないものと判断される。

表 1 結 果 (3反復の平均値) (原報告書 APPENDIX B P.14及びP.17)

	薬 物	濃 度 (μL/プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート	
				塩 基 置 換 型	
				TA100	TA1535
初回検定	溶媒(DMSO)	20	—	96	8
	検 体	10	—	127*	14
		3	—	105	10
		1	—	100	12
		0.2	—	110	8
		0.04	—	98	9
		0.01	—	78	10
	陰性対照	—	—	97	13
陽性対照 2-NF NaNO <sub>2</sub>	2 μg 9 mg	—	884 —	— 388	
再 検 定	溶媒(DMSO)	40	—	186	—
	検 体	13	—	226 <sup>a)</sup>	—
		10	—	206 <sup>a)</sup>	—
		5	—	205 <sup>a)</sup>	—
	陰性対照	—	—	211	—
陽性対照 2-NF	2 μg	—	599	—	

a) 検体は重層寒天上で油滴状の溶液となっていた。

\* t-検定  $p \leq 0.01$

2-NF: 2-ニトロフルオレン

⑰ 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 8-17)

試験機関 モンサント環境衛生研究所

[GLP対応]

報告書作成年 1994年

検体の純度: %(原体、 )

試験方法:ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537)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)の存在下および非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解し、15~1,500  $\mu$ g/プレートの範囲で5濃度とした。試験は3連制とし、2回行った。

用量設定根拠;

判定基準;3濃度以上で有意なコロニー数の増加( $p \leq 0.01$ )、かつ用量相関性が有意であった場合( $p \leq 0.01$ )に陽性と判断する。

試験結果:結果を表1、2、及び3に示した。

TA98、TA1535、TA1537菌株では S-9 mixの存在下及び非存在下ともに、TA100菌株ではS-9 mixの非存在下で、検体は復帰変異コロニー数を増加させなかった。TA100菌株のS-9 mixの存在下での最初の検定で 1,500  $\mu$ g/プレートの用量で復帰変異コロニー数の増加が観察されたが、有意な用量相関性は認められなかった。S-9 mixの存在下で実施した2回目の検定においては復帰変異コロニー数の増加が認められたが、3回目の検定においては再現性がなかった。

統計学的に有意な復帰変異コロニー数の増加が2回目検定でTA1535菌株のS-9 mixの非存在下で最低濃度の150  $\mu$ g/プレートで認められたが、最初の検定で観察されなかったことから、生物学的に意義のあるものではないと判断した。

一方、陽性対照として用いた4QNO、2AAF、B( $\alpha$ )P、亜硝酸ナトリウム、2AA、ACR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、検体は薬物代謝酵素系を含む本試験条件下で復帰変異原性は有しないものと判断される。

表 1 第1回検定の結果 (3反復の平均値)  
(原報告書 P.13 APPENDIX I及びP.20 APPENDIX II)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S-9 Mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩素置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照		-	98	16	24	9	
検体	15	-	95	11	20	7	
	50	-	97	13	24	7	
	150	-	84	12	18	6	
	500	-	86#	12#	20#	7#	
	1,500	-	-#	-#	-#	-#	
無溶媒対照			103	11	25	8	
溶媒対照		+	123	14	28	7	
検体	15	+	121	13	31	9	
	50	+	127	15	25	9	
	150	+	128	12	23	9	
	500	+	109	10	29	11*	
	1,500	+	112#	7#	30#	10#**	
無溶媒対照			137	16	41	9	
陽 性 対 照	4QNO	0.02 $\mu\text{g}$	-	164	...	28	...
		0.1 $\mu\text{g}$	-	427	...	67	...
		0.2 $\mu\text{g}$	-	1,060	...	240	...
	亜硝酸 ナトリウム	500 $\mu\text{g}$	-	...	165	...	...
		2,500 $\mu\text{g}$	-	...	486	...	...
		5,000 $\mu\text{g}$	-	...	1,330	...	...
	9AA	10 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	12
		50 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	211
		100 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	2,500
	B( $\alpha$ )P	0.2 $\mu\text{g}$	+	181	...	...	...
		1.0 $\mu\text{g}$	+	620	...	...	...
		2.0 $\mu\text{g}$	+	1,720	...	...	...
	2AA	1.0 $\mu\text{g}$	+	...	105	...	16
		5.0 $\mu\text{g}$	+	...	1060	...	52
		10.0 $\mu\text{g}$	+	...	1,150	...	198
	2AAF	3.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	129	...
		15.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	488	...
		30.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	1,430	...

注) 溶媒対照:ジメチルスルホキシド、検体処理群で用いたプレート当たりの同一用量で実施した検定(3用量、3連制)結果の平均値。

- # :生育阻害あり
- \* : (Bartlett's Test)  $p \leq 0.05$
- \*\* : (Bartlett's Test)  $p \leq 0.01$
- 4QNO :4-ニトロキノリン-N-オキシド
- 9AA :9-アミノアクリジン
- B( $\alpha$ )P :3,4-ベンツピレン
- 2AA :2-アミノアントラセン
- 2AAF :2-アセチルアミノフルオレン

表 2 第2回検定の結果 (3反復の平均値)  
(原報告書 P.13 APPENDIX I及びP.20 APPENDIX II)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩素置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照		-	133	30	30	17	
検体	15	-	117	40**	35	15	
	50	-	137	32	30	16	
	150	-	109	31	27	10	
	500	-	97#	29#	32	7#	
	1,500	-	-#	-#	-#	-#	
無溶媒対照			113	26	31	9	
溶媒対照		+	149	32	39	16	
検体	15	+	164	39	44	15	
	50	+	177*	28	40	15	
	150	+	147	38	41	12	
	500	+	172#	36	32	9	
	1,500	+	184***	29#	31#	11#	
無溶媒対照			126	48	28	14	
陽 性 対 照	4QNO	0.02 $\mu\text{g}$	-	153	...	34	...
		0.1 $\mu\text{g}$	-	402	...	63	...
		0.2 $\mu\text{g}$	-	1,150	...	132	...
	亜硝酸 ナトリウム	500 $\mu\text{g}$	-	...	150	...	...
		2,500 $\mu\text{g}$	-	...	486	...	...
		5,000 $\mu\text{g}$	-	...	2,270	...	...
	9AA	10 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	19
		50 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	125
		100 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	1,120
	B( $\alpha$ )P	0.2 $\mu\text{g}$	+	179	...	...	...
		1.0 $\mu\text{g}$	+	832	...	...	...
		2.0 $\mu\text{g}$	+	1,800	...	...	...
	2AA	1.0 $\mu\text{g}$	+	...	73	...	26
		5.0 $\mu\text{g}$	+	...	1,100	...	301
		10.0 $\mu\text{g}$	+	...	-#	...	-#
	2AAF	3.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	135	...
		15.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	797	...
		30.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	2,180	...

注) 溶媒対照:ジメチルスルホキシド、検体処理群で用いたプレート当たりの同一用量で実施した検定(3用量、3連制)結果の平均値。

# :生育阻害あり

\* : (Bartlett's Test)  $p \leq 0.05$

\*\* : (Bartlett's Test)  $p \leq 0.01$

4QNO : 4-ニトロキノリン-N-オキシド

9AA : 9-アミノアクリジン

B( $\alpha$ )P : 3,4-ベンゾピレン

2AA : 2-アミノアントラセン

2AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

表 3 第3回検定の結果 (3反復の平均値)

(原報告書 P.13 APPENDIX I TABLE3、4及びP.20 APPENDIX II TABLE 3、4)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩素置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照		-	...	...	...	...	
検体	15	-	...	...	...	...	
	50	-	...	...	...	...	
	150	-	...	...	...	...	
	500	-	...	...	...	...	
	1,500	-	...	...	...	...	
無溶媒対照			...	...	...	...	
溶媒対照		+	116	...	...	...	
検体	15	+	107	...	...	...	
	50	+	100	...	...	...	
	150	+	105	...	...	...	
	500	+	90	...	...	...	
	1,500	+	108#	...	...	...	
無溶媒対照			163	...	...	...	
陽 性 対 照	4QNO	0.02 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	...
		0.1 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	...
		0.2 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	...
	亜硝酸 ナトリウム	500 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	...
		2500 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	...
		5000 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	...
	9AA	10 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	...
		50 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	...
		100 $\mu\text{g}$	-	...	...	...	...
	B( $\alpha$ )P	0.2 $\mu\text{g}$	+	215	...	...	...
		1.0 $\mu\text{g}$	+	1,150	...	...	...
		2.0 $\mu\text{g}$	+	1,190	...	...	...
	2AA	1.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	...	...
		5.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	...	...
		10.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	...	...
2AAF	3.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	...	...	
	15.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	...	...	
	30.0 $\mu\text{g}$	+	...	...	...	...	

注) 溶媒対照:ジメチルスルホキシド、検体処理群で用いたプレート当たりの同一用量で実施した検定(3用量、3連制)結果の平均値。

# :生育阻害あり

\* : (Bartlett's Test)  $p \leq 0.05$

\*\* : (Bartlett's Test)  $p \leq 0.01$

4QNO : 4-ニトロキノリン-N-オキシド

9AA : 9-アミノアクリジン

B( $\alpha$ )P : 3,4-ベンツピレン

2AA : 2-アミノアントラセン

2AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

⑱ チャイニーズハムスター卵巣由来細胞系ヒポキサンチン-グアニン-フォスホリボシル転移酵素(CHO/HGPRT)を用いた *In Vitro* 遺伝子突然変異試験

(資料 8-18)

試験機関 モンサント環境衛生研究所  
報告書作成年 1983年

検体の純度: % (分析用標準品)

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣由来(CHO)細胞の *In Vitro* 培養系でのヒポキサンチン-グアニン-フォスホリボシル転移酵素(HGPRT) 遺伝子座位における突然変異誘発能を調べた。通常 CHO細胞は6-チオグアニン(6-TG)の毒性に対し感受性であるが、変異細胞は耐性を示す。したがって6-TG存在下において変異細胞はコロニーを形成するが変異しない細胞は死滅する。

至適濃度のAroclor誘導ラット肝ミクロソーム分画(S-9 mix)存在下及び非存在下において用量反応相関を判定する突然変異試験を実施した。突然変異試験では CHO細胞懸濁液に検体をS-9 mix存在下あるいは非存在下で処理した。同様にS-9 mix存在下での陽性対照としてベンゾ(a)ピレン(B(a)P)、またはジメチルニトロソアミン(DMS)、非存在下での陽性対照としてエチルメタンサルホン酸(EMS) の処理を行った。また、陰性対照区も設けた。

細胞毒性検査では、CHO細胞を3時間、エタノールに溶解した検体存在下で培養後、約200細胞を取り出し再度7~9日間培養した。培養した細胞をカウントし、コロニー形成率(C.E.)を求め、細胞毒性を示す相対生存率(R.S.)を以下の式で求めた。

$$\begin{aligned} \text{コロニー形成率(C.E.)} &= \frac{\text{コロニー形成数}}{\text{プレートした細胞数}} \\ \text{相 対 生 存 率(R.S.)} &= \frac{\text{C. E. (投与群)}}{\text{C. E. (陰性対照)}} \end{aligned}$$

遺伝子突然変異検定では、細胞毒性検定用に薬剤処理細胞約200細胞取り出すと同時に、 $10^6$ 個の細胞をプレートに取り、2~3日おきに遺伝子の表現型の発現期間として7~9日間継代培養した。その後、6-TGを含む培地に移し7~12日間培養した後、形成された変異体コロニー数を計測し、さらに6-TGを含まない培地で細胞毒性を検定した200細胞についてのC.E.を基に、以下の式による突然変異体発生率を求めた。

$$\text{突然変異体発生率(M.F.)} = \frac{\text{変異体コロニー数}}{\text{プレートした細胞数}} \times \frac{1}{\text{C. E.}}$$

統計学的解析はSneeとIrrの方法に基づき線形性に関する分散分析及び Studentのt-検定による対照群と処理群の組比較を行い、有意差検定を行った。



用量設定根拠;

試験結果: 結果を表1、2、及び3に示した。

変異原性確認本試験では、S-9 mix非存在下では $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、S-9 mix 2% 及び10%存在下では $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で細胞毒性が認められた。また、S-9 mix 10%存在下で検体濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ のみにおいて、統計学的に有意な突然変異体発生率(M.F.)の増加がみられた。一方、陽性対照群では明らかな突然変異体発生率の増加を示した。

この陽性反応を確認するために、S-9 mix非存在下及び10% 存在下で2回の再確認試験を実施した。1回目の試験で検体は統計学的に有意な用量相関は示さず、2回目の試験でS-9 mix非存在下で検体 $12\mu\text{g}/\text{mL}$ のみに突然変異体発生率の有意な増加が見られた。これは、2回のうち1回にだけ見られた増加であったため、検体の細胞毒性及び生存細胞集団中において突然変異細胞が分離される機会があったことに起因すると考えられた。また、これよりも高濃度の検体 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ では細胞毒性がみられても突然変異体の有意な増加はみられなかった。また、用量反応相関性について、統計学的解析を行った結果、S-9 mix非存在下及び存在下とも、検体濃度と突然変異体発生率の間に相関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体発生率の増加を示した。

以上の結果から、検体は本試験の条件において薬物代謝酵素系の存在下及び非存在下において遺伝子突然変異を誘発せず、遺伝子突然変異誘発性を有さないと判断される。

表 1 変異原性確認本試験の結果 (原報告書 P.A12 Table1)

薬 剤	濃 度 ( $\mu$ g/mL)	S-9 Mix の有無 (%)	細胞毒性 相対生存率 (R.S.)	変異原性	
				突然変異体発生率 ( $\times 10^{-6}$ )	統計処理結果 a)
陰性対照 (エタノール)	—	—	—	1.5	—
検 体	5	—	1.11	2.8	0.5038
	10	—	0.69	0.9	0.8377
	15	—	<0.0075	NP	NP
	20	—	<0.0075	NP	NP
	25	—	<0.0075	NP	NP
陽性対照 <sup>b)</sup> (EMS)	200	—	—	167.0	—
陰性対照 (エタノール)	—	+ 2%	—	3.1	—
検 体	10	+ 2%	1.07	6.6	0.7897
	20	+ 2%	0.89	<0.9	0.5300
	30	+ 2%	<0.0065	NP	NP
	40	+ 2%	<0.0065	NP	NP
	50	+ 2%	<0.0065	NP	NP
陽性対照 <sup>b)</sup> (B(a)P )	2	+ 5%	—	259.5	—
陰性対照 (エタノール)	—	+10%	—	<0.8	—
検 体	10	+10%	0.80	14.1	<0.0001*
	20	+10%	0.19	<0.90	1.0000
	30	+10%	<0.007	NP	NP
	40	+10%	<0.007	NP	NP
	50	+10%	<0.007	NP	NP
陽性対照 <sup>b)</sup> (B(a)P )	2	+10%	—	10.0	—

a) SneeとIrr の方法による統計処理。

b) 陽性対照:EMS; エチルメタンサルホン酸  
B(a)P ;ベンゾ(a)ピレン

NP:細胞毒性が高いため、実施せず。

表 2 変異原性確認試験の結果(再試験1回目) (原報告書 P.A13 Table2)

薬 剤	濃 度 ( $\mu$ g/mL)	S-9 Mix の有無 (%)	細胞毒性 相対生存率 (R.S.)	変異原性	
				突然変異体発生率 ( $\times 10^{-6}$ )	統計処理結果 a)
陰性対照 (エタノール)	—	—	—	14.0	—
検 体	3	—	1.18	10.0	0.8702
	6	—	1.13	14.5	0.7832
	9	—	1.02	6.4	0.6802
	12	—	0.33	2.8	0.2041
	15	—	0.069	<0.5	0.0418
陽性対照 <sup>b)</sup> (EMS)	200	—	—	124.5	—
陰性対照 (エタノール)	—	+10%	—	16.9	—
検 体	5	+10%	0.98	7.9	0.8358
	10	+10%	0.96	5.1	0.4697
	15	+10%	0.94	7.6	0.8661
	20	+10%	1.0	8.0	0.7009
	25	+10%	1.0	12.5	0.9701
陽性対照 <sup>b)</sup> (DMN)	200	+10%	—	915.7	—

a) SneeとIrr の方法による統計処理。

b) 陽性対照: EMS; エチルメタンスルホン酸  
DMN; ジメチルニトロソアミン

表 3 変異原性確認試験の結果(再試験2回目) (原報告書 P.A13 Table2)

薬 剤	濃 度 ( $\mu$ g/mL)	S-9 Mix の有無 (%)	細胞毒性 相対生存率 (R.S.)	変異原性	
				突然変異体発生率 ( $\times 10^{-6}$ )	統計処理結果 a)
陰性対照 (エタノール)	—	—	—	2.2	—
検 体	3	—	1.22	5.7	0.6658
	6	—	1.19	1.4	0.9220
	9	—	0.61	2.7	0.8544
	12	—	0.077	619.0	0.0377*
	15	—	0.024	10.0	0.5777
陽性対照 <sup>b)</sup> (EMS)	200	—	—	396.3	—
陰性対照 (エタノール)	—	+10%	—	2.8	—
検 体	5	+10%	0.93	5.4	0.6778
	10	+10%	0.95	3.8	0.5250
	20	+10%	0.90	1.1	0.5952
	30	+10%	0.53	6.1	0.1973
	40	+10%	0.34	1.2	0.6195
陽性対照 <sup>b)</sup> (DMN)	100	+10%	—	42.9	—

a) SneeとIrr の方法による統計処理。

b) 陽性対照: EMS; エチルメタンスルホン酸  
DMN; ジメチルニトロソアミン



以上の結果より、本試験の条件下において検体はSwiss-Webster系マウスの骨髓細胞中に小核を誘発せず、染色体異常誘発能は陰性であると判断される。

表 1 結 果 (原報告書 P.18 Table7及びP.19 Table8)

採取時間 (hr)	薬物	投与量	性	観察動物数	多染性赤血球計測数 (PCE)	小核のあるPCE数	正染性赤血球計測数	小核のある正染性赤血球	% PCE ± SD
48	陰性対照 (コーンオイル)	—	雄	8	4,000	10 (0.250)	2,797	3 (0.107)	41.8 ± 13.0
			雌	8	4,000	5 (0.125)	1,973	3 (0.152)	45.1 ± 4.3
	検体	250mg/kg	雄	8	4,000	3 (0.075)	3,796	6 (0.158)	30.6 ± 5.8
			雌	8	4,000	3 (0.075)	2,860	3 (0.105)	37.1 ± 7.0
		500mg/kg	雄	8	4,000	5 (0.125)	4,401	7 (0.159)	36.9 ± 16.3
			雌	8	4,000	5 (0.125)	2,583	0	39.1 ± 5.8
		1,000mg/kg	雄	8	4,000	8 (0.20)	5,109	15 (0.294)	26.8 ± 8.5
			雌	8	4,000	8 (0.20)	3,510	5 (0.142)	33.1 ± 8.0
	陽性対照 (TMP)	1,250mg/kg	雄	8	4,000	59* (1.475)	2,952 <sup>1)</sup>	4 <sup>1)</sup> (0.136)	33.6 ± 7.1 <sup>1)</sup>
			雌	8	4,000	60* (1.500)	3,023	10 (0.331)	35.1 ± 4.3
72	陰性対照 (コーンオイル)	—	雄	8	4,000	7 (0.175)	3,108	3 (0.097)	38.2 ± 13.0
			雌	8	4,000	9 (0.225)	3,094	5 (0.162)	37.9 ± 12.9
	検体	250mg/kg	雄	8	4,000	8 (0.200)	2,804	8 (0.285)	38.6 ± 10.2
			雌	8	4,000	11 (0.275)	2,701	2 (0.074)	40.4 ± 10.6
		500mg/kg	雄	8	4,000	4 (0.100)	2,636	4 (0.152)	39.6 ± 9.4
			雌	8	4,000	8 (0.200)	3,232	1 (0.031)	39.1 ± 16.0
		1,000mg/kg	雄	8	4,000	5 (0.125)	4,451	4 (0.090)	29.2 ± 9.3
			雌	8	4,000	13 (0.325)	3,617	1 (0.028)	34.2 ± 10.3
	陽性対照 (TMP)	1,250mg/kg	雄	8	4,000	11 (0.275)	3,966	4 (0.101)	32.2 ± 10.3
			雌	8	4,000	6 (0.150)	3,594	8 (0.223)	36.8 ± 14.5

( )内の数値はパーセント。

\* p<0.001

1) 1動物に骨髓と血液の混入と思われる高い正染性赤血球数の増加がみられたため、この動物を除外した。

② ラット骨髓細胞を用いた *In Vivo* 細胞遺伝学的試験

(資料 8-20)

試験機関      ヘイゼルトン研究所  
報告書作成年 1983年

検体の純度:    %(分析用標準品)

供試動物: Charles River CD系ラット、1群雌雄各6匹

試験方法: 検体をコーンオイルに混合し、0、75、250、750mg/kgの用量で腹腔内投与した。また、陽性対照物質として、マイトマイシンC(5mg/kg)を投与した。陽性対照群の動物は、投与24時間後に屠殺した。

細胞周期のさまざまな時期の細胞を得るため、検体投与、6、12、24、48時間後に雌雄各6匹を屠殺した。分裂中期像を得るため屠殺2時間前に2.0mg/kgのコルヒチンを全動物に投与した。

屠殺直後、動物の両大腿部から骨髓細胞を採取した。これらの細胞を処理し染色し、鏡検した。可能な限り、1群6匹のうち5匹から60の分裂中期像を検査した。1動物につき500細胞から分裂中期の細胞数を数え、分裂指数を判定した。

用量設定根拠;

試験結果: 結果を表1に示した。

試験中死亡例はなかったが、250及び750mg/kg群には、軟便、不活発、体重減少等の毒性徴候が認められた。

検体投与群は750mg/kgまで陰性(溶媒)対照群と比較し染色体異常の有意な増加は認められなかった。

750mg/kg群の12匹中6例のラットでは投与6時間後に分裂中期像の消失が見られたが、同時期の対照群11例中の2例に消失及び3例に低分裂指数が認められた。この投与6時間後の時点で、750mg/kg投与群の分裂指数は対照群に比較し有意な差はなく、また、分裂中期像は回復したので、分裂遅延あるいは毒性を示すものとは考えられなかった。こうしたことは経験上めずらしいことではなく、検体の投与に関連した変化とは考えられなかった。従って分裂遅延は認められず、投与48時間後の動物からは試料の採取は行わなかった。一方、陽性対照群では染色体異常細胞数及び、1細胞当りの異常数の対照に対して有意な増加が認められた。

以上の結果から、本試験の条件下において、検体はラットの骨髓細胞に対して細胞遺伝学的異常を誘発しないと判断される。

表 1 結 果 (原報告書 P.25 Table2)

投与後 時間	薬 物	投与量 (mg/kg)	分裂中期 像検査数	異 常 細胞数	異常の 総 数	異 常				
						染色体分 体型キヤップ*	染色体型 キヤップ*	染色体分 切断	染 色 体 切断	交 換
6時間	溶媒対照 (コーンオイル)	—	540	0	0	3	0	0	0	0
	検体	75	600	0	0	2	0	0	0	0
		250	540	3	3	2	0	3	0	0
750	360	2	2	2	2	2	1	0	1	
12時間	溶媒対照 (コーンオイル)	—	625	6	8	5	0	6	0	2
	検体	75	600	4	4	6	2	3	1	0
		250	600	7	8	11	1	7	1	0
750	600	0	0	0	0	0	0	0	0	
24時間	溶媒対照 (コーンオイル)	—	635	7	9	9	0	9	0	0
	検体	75	540	9	9	2	0	8	0	1
		250	540	3	3	5	0	3	0	0
		750	600	3	3	2	0	3	0	0
陽性対照 (マイトミン)	5	408	112	513 ↑	12	0	112	12	69	

異常数の平均をKruskal-Wallisのノンメトリック分散分析法で検定      ↑ ↓ : p < 0.05

\* 染色体分体型キヤップ及び染色体型キヤップは染色体異常として計測しない。

③ マウスにおける優性致死試験

(資料 8-21)

試験機関 インターナショナル・リサーチ・アント  
デベロップメント・コーポレーション  
報告書作成年 1984年

検体の純度: % (原体)

供試動物: Charles River CD-1系マウス、1群雄15匹、交配用雌 30匹×2

試験方法: 検体をアセトンに溶解し、100、1,000及び5,000ppm投与濃度で雄マウスに7週間にわたり混餌投与した。

同時に設けた陰性対照群には、溶媒のアセトンを混入した実験用標準飼料を与え、陽性対照群にはトリエチルメラミン(TEM)0.05mg/kgを第1交配直前の5日間腹腔内投与し、実験用標準飼料のみを与えた。

雄への検体投与終了後、検体投与していない性成熟に達した同系統で同じ供給元の処女マウスを無作為に2匹ずつ選択し、各雄マウスと7日間同居させた(第1交配)。同様に、この後さらに別の2匹の雌を7日間同居させた(第2交配)。

雌は交配のため雄と同居させた週の中日から数えて13日後に屠殺し、子宮を観察し、生存、死亡胚数及び位置、総着床数及び黄体数を記録した。試験期間中、全動物の死亡及び毒性の一般症状を観察し、体重を記録した。

雄は毎週個体別体重を測定し、一般症状を毎日2回観察した。第2交配の雌の子宮観察後、雌の全動物を屠殺し、肉眼的病理検査を実施した。

用量設定根拠;

試験結果: 結果を表1に示した。

試験期間中に、1,000ppm群で1例、5,000ppm群で1例の雄が死亡した。個体別の観察及び剖検において、検体投与と死亡の関連を示唆する所見はなかった。検体投与群の雄及び陽性対照群の雄の全般的な外見及び行動は、陰性対照群と同等であった。

5,000ppm群雄の体重は、7週間の投与期間を通じて、陰性対照群と比較し統計学的に有意な減少を示した( $p < 0.01$ )。100ppm及び1,000ppm群雄及び陽性対照群雄の体重は、陰性対照群と同等であった。

投与群、陽性対照群及び陰性対照群に割り当てた無投与の雌の外見、行動及び体重に群間差は無かった。第1交配時の1,000ppm群、第2交配時の陽性対照群及び100ppm群で1例ずつ、計3例の雌が死亡したが、原因は不明であった。

第1交配において、100、1,000及び5,000ppm投与群の子宮観察の所見は、陰性対照群と同等であった。

一方、陽性対照群では妊孕性指標及び母動物あたりの黄体数を除き、陰性対照群と比較して統計学的に有意な差が見られた。この有意差は、第1交配時のTEMによる染色体



異常の誘発を示すものであった。

第2交配において、陰性対照群における子宮観察の各項目の結果は、過去の対照データ及び第1交配時の陰性対照群の値と著しく異なっていた。このような変動の発生原因は明確にできなかった。したがって、第2交配時の陰性対照群のデータは、比較分析するには不適切と判断されたので、第2交配時の投与群のデータの解釈は難しいと思われる。投与群の子宮観察における次の検査項目が、妊娠20日時の過去の対照データから算出した正常値の範囲内にあった：生存胚数(胚児数)、死胚数、終着床数及び黄体数(全て1母動物あたり)。その他の子宮観察検査項目も前期検査結果から計算でき、また、第2交配時に優性致死誘発能を示唆する用量相関も認められないので、正常値の範囲内にあったと推察された。

以上の結果から、本試験の条件下において検体は、マウスにおいて優性致死を誘発せず、優性致死誘発能はないと判断される。

表 1 結 果 (原報告書 P.22 Table1~Table6及びP.28 Table7)

薬 剤	陰性対照 (基礎飼料のみ)	陽性対照 (TEM)	検 体			
			100ppm	1,000ppm	5,000ppm	
投与量	0	0.05mg/kg	100ppm	1,000ppm	5,000ppm	
動物数:						
雄	15	15	15	15	15	
a 雌	30	30	30	30	30	
b 雌	30	30	30	30	30	
中毒症状		陰性対照と 同等	陰性対照と 同等	陰性対照と 同等	陰性対照と 同等	
死亡率(%)						
雄	0	0	0	1/15(6.7)	1/15(6.7)	
a 雌	0	0	0	1/30(3.3)	0	
b 雌	0	1/30(3.3)	1/30(3.3)	0	0	
体重変化						
雄	5	5	5	5	2	
a 雌	13	12	13	14	15	
b 雌	9	7	12	11	11	
妊娠数						
a 雌	29	28	26	28	27	
b 雌	12	19	25	17	20	
着 床 所 見	平均黄体数					
	a	13.8	14.9	13.2	13.1	13.0
	b	12.2	13.7	12.9	13.6	13.4
	平均総着床数					
	a	12.3	10.7▽	11.6	11.8	11.8
	b	10.3	9.8	10.8	11.2	11.5
	平均生存胚数					
	a	11.2	7.6▽	10.9	11.2	11.3
	b	5.6	4.6	9.4	9.2	9.6
	初期吸収胚を もつ母獣数					
	a	11	27 △	13	12	9
	b	10	18	12	7	10
平均後期吸収 胚数						
a	1.5	4.1△	1.6	1.3	1.2	
b	1.2	3.5	1.6	2.0	1.7	
平均死胚数						
a	1.1	3.1△	0.7	0.6	0.5	
b	4.8	5.3	1.4▽	2.1	1.9▽	

Mann-Whitney検定法 ↑ ↓ : p < 0.05 △▽ : p < 0.01

a: 第1交配 b: 第2交配

### IRDCにおける過去の対照データ—Charles River CD<sup>®</sup>-1系マウス

#### 帝王切開時の母動物及び産児観察データの総括

動物数:	194
死亡動物数:	4
流産及び早産数:	0
帝王切開時検査動物数:	190
非妊娠動物数:	18
妊娠動物数:	172
吸収胚のみの母動物数:	6
生存胎児のある母動物数:	166
生存胎児／母動物:	10.7(7.6-11.6)
後期吸収胚／母動物:	0.3(0.1-0.4)
初期吸収胚／母動物:	0.9(0.2-3.0)
着床後死胚数／母動物:	1.2(0.6-3.2)
着床数／母動物:	11.9(10.7-12.6)
黄体数／母動物:	12.9(11.4-14.0)

( )—平均値の範囲

1984年4月7日に作成した過去の対照データ。1978年9月から1983年10月に終了した試験からのデータを含んでいる。



試験結果:結果を表1、2、及び3に示した。

染色体異常試験では、解析に用いたいずれの用量においても染色体異常を有する細胞の有意な増加は観察されなかった。核内倍加を示す細胞数の増加が、S-9 mix存在下での解析で 59.9及び60.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で観察されたが、核内倍加の誘発の機構、意義については明確に理解されていない。

S-9 mix非存在下及び存在下のいずれにおいても陽性対照薬剤は異常を含む中期像の出現頻度において溶媒対照に比較して統計学的に有意な増加を誘発した。

以上の結果から、代謝活性化を含む本試験条件下で、検体はCHO細胞に染色体異常を誘発せず、染色体異常誘発性を有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表 1 染色体異常試験の結果 (第1回) (原報告書 P.29 TABLE3及びP.35 TABLE9)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	観察 細胞数	S-9 Mixの 有無	染色体異常				異常を有 する細胞 頻度, %	2個以上 の異常 細胞頻度	有意差を 示す細胞 頻度, %	分裂指数 %
				ギャップ	切断	交換	その他				
溶媒対照	10.0	200	-	-	-	-	-	0.00	0.0	0.0	...
検体	1.88	200	-	7	-	-	-	0.00	0.0	0.0	...
	3.75	200	-	7	1	1	-	0.01	1.0	0.0	...
	7.50	200	-	14	-	-	-	0.00	0.0	0.0	...
	15.0 #	200	-	11	1	-	-	0.01	0.5	0.0	...
	29.9##	200	-	-	-	-	-	-	-	-	...
陽性対照	1.00	50	-	8	5	7	-	0.24	22.0*	2.0	...
溶媒対照	10.0	200	+	11	-	1	-	0.01	0.5	0.0	14.7
検体	3.75	200	+	8	-	1	-	0.01	0.5	0.0	17.1
	7.50	200	+	6	-	1	-	0.01	0.5	0.0	15.5
	15.0	200	+	5	-	-	-	0.00	0.0	0.0	16.6
	30.0 #	200	+	14	-	-	-	0.00	0.0	0.0	17.0
	60.0##	200	+	-	-	-	-	-	-	-	0.1
陽性対照	20.0	75	+	24	25	-	-	0.33	30.7*	2.7	6.0

処理8時間後に標本を採取した。

\* Fisher 直接確率検定法  $p < 0.01$

# 細胞毒性

## 重度の細胞毒性

溶媒対照: DMSO

陽性対照: 非代謝活性化 マイトマイシンC (MMC)

代謝活性化 シクロホスファミド (CP)

表 2 染色体異常試験の結果 (第2回) (原報告書 P.31 TABLE5及びP.37 TABLE11)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	観察 細胞数	S-9 Mixの 有無	染色体異常				異常を有 する細胞 頻度, %	2個以上 の異常 細胞頻度	有意差を 示す細胞 頻度, %	核内 倍加 %
				ギャップ	切断	交換	その他				
溶媒対照	10.0	200	-	5	-	1	-	0.01	0.5	0.0	-
検体	1.88	200	-	8	-	1	-	0.01	0.5	0.0	-
	3.75	200	-	8	-	-	-	0.00	0.0	0.0	-
	7.50	200	-	8	1	1	-	0.01	1.0	0.0	-
	15.0 #	200	-	12	-	-	-	0.00	0.0	0.0	-
	30.0##	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
陽性対照	1.00	50	-	10	8	18	-	0.52	30.0*	16.0*	-
溶媒対照	10.0	200	+	9	-	2	-	0.01	1.0	0.0	-
検体	7.50	200	+	8	2	2	-	0.02	2.0	0.0	-
	15.0	200	+	9	2	-	-	0.01	1.0	0.0	3.0
	30.0##	200	+	20	4	-	1	0.03	2.5	0.0	3.5
	60.0##	200	+	22	6	2	-	0.04	4.0	0.0	35.0**
陽性対照	2.5	50	+	18	10	12	1	0.48	40.0*	8.0*	-

処理20時間後に標本を採取した。

\* Fisher 直接確率検定法  $p < 0.01$

\*\* 核内倍加した細胞が増加

# 細胞毒性

## 重度の細胞毒性

溶媒対照: DMSO

陽性対照: 非代謝活性化 マイトマイシンC (MMC)

代謝活性化 シクロホスファミド (CP)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表 3 染色体異常確認試験の結果 (原報告書 P.33 TABLE7及びP.39 TABLE13)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	S-9 Mixの 有無	染色体異常				異常を有 する細胞 頻度, %	2個以上 の異常 細胞頻度	有意差を 示す細胞 頻度, %	核内倍加 %
				ギャップ	切断	交換	その他				
溶媒対照	10.0	200	-	14	2	-	-	0.01	0.5	0.5	...
検体	0.940	200	-	6	-	2	-	0.01	1.0	0.0	...
	1.88 #	200	-	4	-	1	-	0.01	0.5	0.0	...
	3.75 #	200	-	18	-	1	-	0.01	0.5	0.0	...
	7.50 #	200	-	31	3	-	-	0.02	1.5	0.0	...
	15.0 ##	200	-	-	-	-	-	-	-	-	...
陽性対照	0.08	50	-	12	9	5	-	0.28	24.0 *	2.0	...
溶媒対照	10.0	200	+	8	1	-	-	0.01	0.5	0.0	...
検体	15.0	200	+	17	4	-	-	0.02	1.5	0.5	-
	30.0	200	+	18	1	-	-	0.01	0.5	0.0	0.0
	59.9 #	200	+	29	2	4	-	0.03	3.0	0.0	12.5**
	79.9 ##	200	+	25	2	6	-	0.04	3.0	1.0	0.0
陽性対照	5.0	50	+	37	6	14	-	0.40	28.0 *	12.0 *	...

処理後の標本の採取: 非代謝活性化 処理後28時間  
代謝活性化 処理後20時間

\* Fisher 直接確率検定法  $p < 0.01$

\*\* 核内倍加した細胞が増加

# 細胞毒性

## 重度の細胞毒性

溶媒対照: DMSO

陽性対照: 非代謝活性化 マイトマイシンC (MMC)

代謝活性化 シクロホスファミド (CP)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

### 3) DNA損傷誘発性

#### ① 細菌を用いたDNA修復試験(Rec-Assay)

(資料 8-1)

試験機関 (財)残留農薬研究所  
報告書作成年 1980年

検体の純度: % (分析用標準品)

投与方法: 枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換修復機構保持株(H-17)と欠損株(M-45)を用い、賀田らのRec-Assay法でDNAの損傷の誘発性を検定した。

検体はDMSOに溶解し、1~100(%, v/v)の範囲の6濃度で実施した。

用量設定根拠;

試験結果: 結果を下表に示した。

(原報告書 P.5 表-1)

薬物	濃度 (%, v/v)	阻止帯 (mm)		差 (mm)
		M45	H17	
溶媒対照 (DMSO)		0	0	0
検体	1	0	0	0
	5	0	0	0
	10	0	0	0
	25	0	0	0
	50	0	0	0
	100	0	0	0
陰性対照 (カナマイシン)	10 $\mu$ g/disk	6	5	1
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.1 $\mu$ g/disk	8.5	2	6.5

検体投与群では最高濃度の100% (v/v)においても両株に生育阻止を認めなかった。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシンCでは、組換修復機構保持株(H17)に比べ修復機構欠損株(M45)に顕著な生育阻止帯を生じ、陰性対照として用いたカナマイシンでは両株に同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、検体は本試験の条件下においてDNA損傷の誘発性を有しないと判断された。





本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

また、個体別の肝細胞 *In Vitro* 試験では、2-AAFの濃度と平均グレイン数に用量相関が認められたが、検体投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験の条件下において検体はラット肝細胞に不定期DNA合成を誘発せず、DNA損傷の誘発性がないものと判断される。

表 1 結 果 (原報告書 P. 7 TABLE1)

	薬 物	投与量 (mg/kg)	平均グレイン数(NG) (平均±標準偏差)	平均修復細胞 %
投与 2時間後	検体	50	-4.6 ± 0.6	1
		200	-4.9 ± 0.6	2
		1,000	-4.7 ± 0.4	1
投与 12時間後	陰性対照 (コーンオイル)	—	-4.8 ± 0.1	1
	検体	50	-3.6 ± 0.2	2
		200	-5.3 ± 0.6	4
		1,000	-4.1 ± 0.7	5
	陽性対照 (2-アセチルアミノ フルオレン)	50	12.1 ± 1.6	76

表 2 個体別肝細胞(2-AAFに対する *In Vitro* 不定期DNA合成能)

(原報告書 P. 8 TABLE2)

検体 1,000mg/kg 投与後 培養した 肝細胞	2-AAF 濃度	個 体 別 動 物					
		118M1		118M2		118M3	
		平均グレイ ン数(NG)	平均修復 細胞 %	平均グレイ ン数(NG)	平均修復 細胞 %	平均グレイ ン数(NG)	平均修復 細胞 %
	0	-10.3	4	- 6.5	3	- 9.0	3
	0.05	14.2	70	3.9	49	38.7	91
	0.5	53.2	99	37.5	91	45.6	99
	5	49.0	98	37.5	97	65.1	99

(13) 生体の機能に及ぼす影響

ブタクロールの薬理試験

(資料 9-1)

試験機関

株式会社 実医研

[GLP対応]

報告書作成年

1991年

検体の純度:     %(原体)

中枢神経系に対する作用

① 雌雄のマウスにおける一般症状

供試動物: Crj:CD-1(ICR)系(SPF)マウス、6週齢、体重 雄 31.24~34.46g

雌 23.09~26.72g、1群雌雄各5匹

投与方法: 検体はCMC水溶液(1%)を用いて均一に懸濁した。0mg/kg(CMC)、125mg/kg、210mg/kg、350mg/kg、600mg/kg、1,000mg/kgの用量で検体を含む懸濁液を腹腔内投与した。

観察項目及び結果: 一般症状を観察した。マウスの行動は Irwin の方法に従って観察した。

350mg/kg群に受動態、反応性、自発運動の低下、眼瞼下垂が投与4~6時間後に雌雄で1、2例観察された。600mg/kg以上の投与群に認知力の低下、運動性の低下、自律神経系の抑制が認められた。1,000mg/kg投与群では、上記症状に加えて、中枢性興奮、苦悶反応、眼球突出、体温下降、流涙、軟便が観察され、4-24時間に雌雄全例が死亡した。

異常症状は投与後2-4時間後に認められたが、600mg/kgの投与群では立毛を除き投与後24時間以内に消失し、立毛は雌で72時間以内、雄で96時間以内に消失した。210mg/kg以下の投与群では異常は認められなかった。

② 雌雄のウサギにおける一般症状

供試動物: 日本白色種ウサギ、14週齢、体重 雄2.42~2.82kg 雌 2.56~2.90kg、

1群雌雄各3匹

投与方法: 検体は原液で0(生理食塩液)、1,000mg/kg、2,300mg/kg、5,000mg/kgの用量で強制経口投与した。検体投与前、ウサギは18時間絶食させた。

観察項目及び結果: Kirk, R. W.及び Steibergらの方法に基づき一般症状を観察した。

5,000mg/kg投与群で軽度の軟便が投与後6時間に雌雄各2例に観察されたが、投与翌日には消失した。1,000及び2,300mg/kg投与群では検体の投与に起因する異

常は認められなかった。

③ 雌雄のウサギの体温に対する作用

供試動物:日本白色種ウサギ、14週齢、体重 雄 2.37～2.82kg 雌 2.23～3.01kg、  
1群雌雄各2匹

投与方法:検体は原液で0mg/kg(生理食塩液)、1,000mg/kg、2,300mg/kg、5,000mg/kgの用量で  
強制経口投与した。検体投与前ウサギは18時間絶食させた。

検査項目及び結果:検体投与後0.5、1、2、3時間に直腸温を測定した。いずれの投与群においても  
検体の投与に起因する異常は認められなかった。

ウサギの呼吸及び循環器系に対する作用

供試動物:日本白色種ウサギ、15週齢、体重 雄2.67～3.10kg、1群各3匹

投与方法:検体は原液で、50mg/kg、150mg/kgの用量で静脈内投与した。

検査項目及び結果:呼吸、血流量、血圧、心拍数、心電図に対する影響をウレタン麻酔下  
(1.5g/kg,i.p.)で背位に固定したウサギを用い同一個体からポリグラフを用いて記録した。  
測定は検体投与前、直後、投与後10分、30分、1時間まで継続して測定した。  
150mg/kg投与群では一過性の呼吸数の増加また血圧、心拍数及び血流量の低下  
が認められた。50mg/kg投与群では異常は認められなかった。

自律神経系に対する作用

① 雌雄のウサギの瞳孔に対する作用

供試動物:日本白色種ウサギ、14週齢、体重 雄 2.37～3.02kg 雌 2.23～3.01kg、  
1群雌雄各2匹

投与方法:検体を原液で0mg/kg(生理食塩液)、1,000mg/kg、2,300mg/kg、5,000mg/kgの用量で  
強制経口投与した。検体投与前ウサギは18時間絶食させた。

検査項目及び結果:投与後5分、15分、30分、1時間に左右の瞳孔径を計測した。ウサギは固定器に  
固定し、40Wの白熱電球から1.5m離し両眼に等しい光量が当たるよう維持し、左右2回ず  
つ瞳孔径を瞳孔測定器(三田式)で計測した。

いずれの投与群においても検体の投与に起因する瞳孔径の異常値は認められな  
かった。

## ② 雄モルモットの摘出回腸に対する作用

供試動物: Std:Hartley系雄モルモット、8週齢、体重 雄450～500g、1群6匹

試験方法: 雄モルモットから摘出した標本を用いて、検体単独の影響、アゴニストで惹起した収縮に対する検体の影響を調べた。検体はマグネス管での終濃度が 0g/mL(ポリエチレングリコール400)、 $10^{-8}$ g/mL、 $10^{-7}$ g/mL、 $10^{-6}$ g/mL、 $10^{-5}$ g/mL、 $10^{-4}$ g/mLとなるようにポリエチレングリコール400溶液に懸濁調製し、調製液を0.2mL滴下した。アゴニスト収縮に対する影響についてはヒスタミン(終濃度 $2 \times 10^{-7}$ g/mL)、アセチルコリン(終濃度 $8 \times 10^{-7}$ g/mL)を滴下し、収縮能に対する作用を検索した。

結果:  $10^{-6}$ g/mL以上の濃度でアセチルコリン及びヒスタミンによる収縮に対する抑制がみとめられた。検体単独の抑制作用は認められなかった。

## 消化管に対する作用

雄ラットの炭末輸送能に対する作用

供試動物: Crj:CD(SD)系(SPF)雄ラット、6週齢、体重 120～189g、1群6匹

試験方法: 検体はCMC水溶液(1%)を用いて均一に懸濁した。0mg/kg(CMC)、314mg/kg、500mg/kg、790mg/kg、1,300mg/kgの用量の検体を含む懸濁液を腹腔内投与した。検体投与前ラットは18時間絶食させた。検体投与30分後に炭末、アラビアゴムの各10%懸濁液を1mL/100gの用量で強制経口投与した。炭末投与30分後にラットをクロロホルムで屠殺、小腸を摘出した。幽門部から炭末先端までの長さを測り、全小腸の長さに対する炭末移動距離の比率(%)を求めた。

結果: いずれの投与群においても小腸輸送能に検体の投与に起因する異常は認められなかった。

## 骨格筋に対する作用

雄ウサギの前頸骨筋に対する作用

供試動物: 日本白色種雄ウサギ、14週齢、体重 2.60～2.85kg、1群3匹

試験方法: ウレタン麻酔下(1.5g/kg,i.p.)でウサギの腓骨神経及び頸骨神経を露出、切断した。腓骨神経に双極電極を設置した。前頸骨筋上の皮膚を切開し、前頸骨筋の腱と血管を剥離し、腱に糸を付け、ストレンケージに繋ぎ、負位は10g位とした。間接刺激で0.1Hz、0.1msec.以下の短形波、直接刺激で0.1Hz、1msec.以上の短形波で、1v以下の刺激を加え、次第に刺激を強くし、反応が最大になるようにした。手術30分後に50、150mg/kg

の検体を原液で静脈内投与し、投与後1時間まで継続して検体の前頸骨筋に対する影響を測定した。

結 果:いずれの投与群においても投与後1時間の観察期間中に検体の投与に起因する異常は認められなかった。

## 血液に対する作用

### ① 雄ウサギの血液(溶血と凝固)に対する作用

供 試 動 物:日本白色種雄ウサギ、14週齢、体重 2.85kg

試 験 方 法:供試動物より心臓採血した血液を 2,000rpm、5分間遠心分離して上清を捨て、10倍量の生理食塩液で洗浄した。検体の濃度が 0g/mL、 $10^{-6}$ g/mL、 $10^{-5}$ g/mL、 $5 \times 10^{-5}$ g/mL、 $10^{-4}$ g/mL、 $5 \times 10^{-4}$ g/mL、 $10^{-3}$ g/mLの用量になるようCMC(1%)水溶液に懸濁した懸濁液 9.5mLとウサギ赤血球浮遊液 0.5mLとを混和し、38°Cで2時間反応させた後、2,000rpm、15分間遠心した上清を肉眼的に観察した。

結 果: $1 \times 10^{-3}$ g/mL群で軽度な溶血性、 $5 \times 10^{-4}$ g/mL群で軽微な溶血性が認められた。

### ② 雄ウサギの血液(凝固)に対する作用

供 試 動 物:日本白色種雄ウサギ、14週齢、体重 2.16~2.81kg、4群各3匹

試 験 方 法 :検体は原液で 0mg/kg(生理食塩液)、1,000mg/kg、2,300mg/kg、5,000mg/kgを強制経口投与した。検体投与前ウサギは18時間絶食させた。投与前、投与後10分、30分、1時間に耳動脈より採血した血液を3.13%クエン酸ナトリウム溶液で凝固防止した容器に採取し、遠心分離した血漿を用いてプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

結 果:各投与群で投与10分にプロトロンビン時間の短縮が認められたが、投与後30分には回復し、偶発的な変化と考えられた。いずれの投与群においても活性化トロンボプラスチン時間に変化は認められなかった。

中枢神経の変化は、毒性試験のほぼLD<sub>50</sub>値に相当する用量の検体を投与したマウスにおいてのみ認められたもので、ウサギの一般症状及び体温において変化は認められなかったことから、検体の多量投与による非特異的变化と考えられた。溶血性試験及び摘出回腸に対する作用においても高濃度でのみ変化が認められた。また呼吸・循環器及び血液凝固においても一過性の変化がみられたが、ウサギの瞳孔径に変化

が認められなかったことから、同様に非特異的変化と考えられた。さらに、ラットの小腸輸送能においても腹腔内投与のLD<sub>50</sub>値より高濃度を投与しても変化は認められなかった。

以上のように、検体は生理学的機能及び薬理学的反応に対して殆ど影響を及ぼしていない。観察された幾つかの変化は検体を大量に投与したことに起因する非特異的変化であると考えられ、検体の薬理学的作用は弱いものと考えられる。

ブタクロールの「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量(mg/kg) (g/L)	動物数/ 群	作用量 (mg/kg) (g/L)	無作用量 (mg/kg) (g/L)	結果の概要
<b>【中枢神経に及ぼす影響】</b>						
一般症状 マウス [Irwin法]	腹腔内 (CMC水溶 液1%)	0 125 210 350 600 1,000	雌雄 5	350	210	高用量群で所見が認められた。 死亡例:1,000mg/kg 5/5
一般症状 ウサギ [Kirk, Steiberg]	経口 (原液)	0 1,000 2,300 5,000	雌雄 3	特定できず	5,000	全群に症状が認められず。
体温 ウサギ 直腸温測定	経口 (原液)	0 1,000 2,300 5,000	雌雄 2	特定できず	5,000	直腸体温に変化は認められず。
<b>【呼吸、循環器系に及ぼす影響】</b>						
呼吸、血流量、 心拍数、心電図 ウサギ (ウレタン、麻酔)	静脈内 (原液)	50 150	雄 3	150	50	150群で投与直後～10分に 一過性の呼吸数増加、血 圧、心拍数、血流量の低下 が認められた。
<b>【自律神経系に及ぼす影響】</b>						
瞳孔径 ウサギ	経口 (原液)	0 1,000 2,300 5,000	雌雄 2	特定できず	5,000	瞳孔径に異常は認められ ず。
摘出回腸 モルモット		0 g/mL 10 <sup>-8</sup> 10 <sup>-7</sup> 10 <sup>-6</sup> 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-4</sup>	雄 6	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	≥10 <sup>-6</sup> でアセチンコリン、ヒス タミンによる収縮に対しての 収縮抑制が認められた。
<b>【消化管に及ぼす影響】</b>						
炭末輸送能 ラット	腹腔内 (CMC水溶 液1%)	0 314 500 790 1,300	雄 6	特定できず	1,300	炭末輸送能に異常は認め られず。
<b>【骨格筋に及ぼす影響】</b>						
前頸骨筋収縮 ウサギ(ウレタン麻酔)	静脈内 (原液)	50 150	雄 3	特定できず	150	前頸骨筋収縮に異常は認 められず。
<b>【血液に及ぼす影響】</b>						
溶血 ウサギ		0g/mL 10 <sup>-6</sup> 10 <sup>-5</sup> 5x10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-4</sup> 5x10 <sup>-4</sup> 10 <sup>-3</sup>	雄	5x10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	≥5x10 <sup>-4</sup> で影響が認めら れた。
凝固 ウサギ	経口 (原液)	0 1,000 2,300 5,000	雄 3	特定できず	5,000	検体の投与に起因する明 確な変化は認められず。

(14) 発がん性のメカニズム解明に関する特別試験

1) ラットを用いた二段階発がん試験

(資料 6-1)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1994年

目的:ブタクロールのSprague-Dawley系ラット腺胃における腫瘍発生に対する、イニシエーション作用及びプロモーション作用の有無を検索する目的で二段階発がん試験を実施した。

検体の純度:

供試動物:

投与期間:

投与方法 :

群構成と投与;

用量設定根拠;



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

体重変化;

摂餌量及び食餌効率;

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

検体摂取量；

飲水量；

血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査；

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日本モンサント株式会社にある。

病理組織学的検査；

胃腸管系の組織の処理；

以上の結果から、この試験の条件下においてブタクロールを慢性混餌投与試験において胃の腫瘍を誘発した投与量(3,000ppm)で投与しても、イニシエーション作用を示さないことが明らかになった。更に、確立したイニシエーターの投与と組み合わせると、ブタクロールの投与によってラットにおける胃の腫瘍発生が促進されることが明らかになった。この作用は、雌ラットにおいて認められ、しかも高投与量(3,000ppm)に限られていた。重要な点は、イニシエーターの投与と組み合わせなかった場合、ブタクロールの投与のみでは、腫瘍の発生は勿論、粘膜下過形成あるいはその他の前癌症状も認められなかったことである。このことから、この試験系においてブタクロールが腫瘍を誘発するには、あらかじめイニシエーションがなされていることが必要であり、加えて腫瘍の発生を促進する作用濃度は3,000ppmに限られており、閾値のある現象であることが明らかであった。

この試験の結果は、以前に実施したブタクロールの慢性混餌投与試験(資料5-3)の結果と近似していた。この試験の場合と同様、以前に実施した慢性混餌投与試験においても、腫瘍の発生は主として雌ラットに認められた。腫瘍発生が認められた胃の領域も、両方の試験に共通して胃底腺領域であり、用量も3,000ppmに限られていた。

二つの試験結果を総合的に考察すれば、ラットにおけるブタクロールによる胃の腫瘍発生は、イニシエーションを受けた細胞の増殖を促進する非遺伝毒性的な作用に基づいており、この促進作用は非常に高い用量(3,000ppm)でのみ発現すると結論できる。

(14) 発がん性のメカニズム解明に関する特別試験

1) ラットを用いた二段階発がん試験

表 1 腺胃における非腫瘍性及び腫瘍性病変 (原報告書 Appendix6, P.738およびP.739)

2) ラットにおける催腫瘍性機構に関する研究

(資料 6-2)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1995年

目的: 以前に実施したSprague-Dawley系ラットにおける2ヶ年慢性混餌投与試験(資料5-3)において認められた腺胃、甲状腺及び鼻甲介における腫瘍発生の機構を明らかにする目的でブタクロールをSprague-Dawley系ラット雌に慢性投与し、種々のパラメータを経時的に評価した。

なお、2009年食品安全委員会の追加資料要求に回答すべく実施した、病理学専門家パネル会合に際して、本研究の内容を引用する必要があったため、より詳細な概要を資料6-2-1及び資料6-10としてとりまとめ、本資料後に挿入した。

検体の純度:

供試動物:

投与期間:

投与方法:

用量設定の根拠:

試験項目及び結果:

生存時の観察

一般状態及び死亡率;

体重変化;

摂餌量;

検体摂取量;

飲水量;

血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査;



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

## 死後検査

臓器重量;

肉眼的病理検査;

病理組織学的検査;

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**表 1 計画殺動物** (原報告書 P.19 Sacrifice Schedule)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

腫瘍発生の機構解明のための検査

胃組織の細胞増殖活性及び粘膜の厚さ；

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**表 2 腫瘍発生機序解明のための評価項目の要約** (原報告書 P.20 Tissue Evaluation)

表 3 プタクロール混餌投与後のラット腺胃における細胞増殖及び  
胃底腺粘膜の厚さ、(対照群に対する%) (原報告書 P.37 Table1)

血清ガストリン;

図 1 プタクロール原体を3,000ppmで混餌投与したラットにおける  
血清ガストリン濃度(原報告書 P.39 Figure2)

対照群に対する百分率

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

胃分泌液pH;

**表 4 胃液のpHと酸排出量に対するブタクロール投与の影響** (原報告書 P.40 Table2)

ガストリン受容体結合;

グルタチオン濃度;

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**表 5 プタクロールを各投与量で混餌投与したラット雌腺胃におけるGSH濃度**  
(原報告書 P.41 Table3)

鼻部組織の細胞増殖；

**表 6 プタクロール投与後PCNAまたはBrdU分析用に染色したラット鼻部組織における細胞増殖の平均値。粘膜1mm当りの標識細胞数** (原報告書 翻訳P.41 表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日本モンサント株式会社にある。

甲状腺重量と甲状腺ホルモン濃度(TSH、 $T_3$ 、 $T_4$ )；

**表 7 甲状腺重量に対するブタクロール混餌投与の影響(11～15動物の平均±標準誤差)**  
(原報告書 P.47 Table7)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**図 2 血清TSH濃度に対するブタクロール混餌投与の影響(11-15動物の平均±標準誤差)**  
(原報告書 P.44 Figure3)

**表 8 血清T<sub>4</sub>濃度に対するブタクロール混餌投与の影響(11~15動物の平均±標準誤差)**  
(原報告書 P.45 Table5)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**表 9 血清T3濃度に対するブタクロール混餌投与の影響(11~15動物の平均±標準誤差)**  
(原報告書 P.46 Table6)

**表 10 肝臓T4-UDPGT活性に対するブタクロール混餌投与後の影響(5動物の平均±標準偏差)**  
(原報告書 P.48 Table8)

催腫瘍性機構に関する考察;

A. 胃

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

B. 鼻部

### C. 甲状腺

本試験によってブタクロール投与により誘発される胃、鼻腔、甲状腺腫瘍の発現機構及び過程が明らかになった。ここで得られた結果は、ラットの種に特異的な非遺伝毒性的機構が腫瘍形成に関与しており、その機構には明らかに閾値が存在することを強く支持していた。したがって、ラットにおける腫瘍形成に関与する機構は、最大耐量を超える用量を投与した慢性投与試験の実験条件下においてのみ作用する機構であり、ヒトの暴露条件下に外挿することは妥当ではないと考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

## 参考文献

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

2) 雌の SD ラットにおけるブタクロールによる腫瘍発生機序解明試験

-ブタクロールを 20 ヶ月間摂食させた Sprague-Dawley 系雌ラットにおける胃腫瘍性病変の解析-

(資料 6-2-1)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1994年

[申請者注:胃腫瘍性病変の診断名について明確にするため、220頁「ラットにおける催腫瘍性機構に関する研究」において病理組織検査として実施され、付表として添付されるアメリカンファンデーションの報告書について安全性評価資料として追加作成した。]

目 的: Sprague-Dawley系ラット雌におけるブタクロールの発がんメカニズムに関する試験において認められた胃腫瘍性病変について病理組織学的評価を実施した。

方 法:

結 果:

(1)進行性腫瘍



表1. 進行性腫瘍の形態学的特徴

(2)初期段階腫瘍

表2. 初期段階腫瘍の形態学的特徴

(3)非腫瘍性組織

表3. 非腫瘍性組織における病変

ブタクロールの3000ppmで誘発された腫瘍は概して胃粘膜上皮由来の腫瘍であった。具体的には、早期の高分化の神経内分泌病変から本来の細胞の主たる表現型の消失した未分化の進行性腫瘍までを含む胃カルチノイドであった。

10) ブタクロール長期投与 Sprague-Dawley 系ラットにおける胃病理組織学的検討

(資料 6-10)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1995年

[申請者注:胃腫瘍性病変の診断名について明確にするため、220頁「ラットにおける催腫瘍性機構に関する研究」において病理組織検査として実施され、付表として添付される榊大雄会医科学研究所の報告書について安全性評価資料として追加作成した。]

目 的: Sprague-Dawley系ラットを用いた3つの長期試験において認められた胃増殖性病変について病理組織学的検討を実施した。

評価対象試験:

方 法:

(1)ラットを用いた飼料混入投与による慢性毒性/発がん性併合試験

(2)ラットを用いた二段階発がん試験

(3)ラットにおける催腫瘍性機構- Sprague-Dawley系ラット雌におけるブタクロールの発がんメカニズムに関する試験

結 果:

(1)ラットを用いた飼料混入投与による慢性毒性／発がん性併合試験

表1. ラットを用いた飼料混入投与による慢性毒性／発がん性併合試験  
胃腫瘍の病理組織学的診断(再評価)

表2. ラットを用いた飼料混入投与による慢性毒性／発がん性併合試験  
胃病変(初期病変)の病理組織学的診断(再評価)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

(2)ラットを用いた二段階発がん試験

表3. ラットを用いた二段階発がん試験 胃病変の発現頻度

(3)ラットにおける催腫瘍性機構 - Sprague-Dawley系ラット雌におけるブタクロールの発がんメカニ  
ズムに関する試験

表4. ラットにおける催腫瘍性機構 - Sprague-Dawley系ラット雌におけるブタクロールの  
発がんメカニズムに関する試験 胃腫瘍の病理組織学的診断(再評価)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

ブタクロールはSprague-Dawley系の雌ラットに飼料中濃度3000ppmで長期間投与することにより腺胃に神経内分泌細胞の過形成、(悪性)神経内分泌細胞腫及び悪性混合腫(悪性神経内分泌細胞腫及び腺癌よりなる)を誘発させた。ブタクロールを飼料中濃度3000ppmで51週間投与したラットでは増殖性胃病変を全く認めなかったことより、その腫瘍発現には長期間の曝露を必要とすることが示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

- 10) アラクロールおよびブタクロールの投与によりラットにおいて誘発された胃腫瘍の病理学専門家によるパネルミーティングによる再評価

(資料 6-11)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成日

2009年

目的: アラクロール及びブタクロールで認められた胃腫瘍はいずれも神経内分泌細胞由来と考えられている。しかし、アラクロール及びブタクロールでは共に複数の長期毒性試験について、複数の機関にて病理組織診断の再評価が行なわれたため、同一と思われる腫瘍に対して種々の診断名が用いられている。そこでアラクロール及びブタクロールで認められた胃腫瘍が同一の機序で誘発されたものと考え、これら長期試験について一貫性のある診断を行なう目的で、病理学専門家によるパネルミーティングを開催し、アラクロール及びブタクロールにおける長期試験で認められた胃腫瘍について再評価を実施した。

評価対象組織:

表 1 パネルミーティングにて再評価した試験

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

方 法:

アラクロール及びブタクロールの長期試験において観察された胃の過形成及び腫瘍は、種々の増殖形態を示したものの、いずれも神経内分泌細胞由来(ECL 細胞)と判断された。これら胃腫瘍の大部分は浸潤性増殖を示したことから、悪性神経内分泌細胞腫と診断された。

長期試験において観察されたアラクロールとブタクロールの胃腫瘍の増殖形態について比較したところ、アラクロールの「ラットを用いた飼料混餌投与による反復経口投与毒性試験」で認められた胃腫瘍において、腺管様の形態学的バリエーション及び腺管成分の巻き込みの随伴性変化を示すものが多く認められる傾向にあった。しかし、アラクロール及びブタクロールともに胃腫瘍の形態学的バリエーションは間葉系及び混在型を示すものが主体をなし、概ね類似していた(表 2)。

表 2 長期試験で認められた胃病変の分類及び胃腫瘍の各増殖形態の発生頻度



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

パネルミーティングによる再評価結果に基づいた各種長期試験の胃腫瘍の発生頻度\*;

#### A. アラクロール

##### (1) ラットを用いた飼料混餌投与による反復経口投与毒性試験

表 3 ラットを用いた飼料混餌投与による反復経口投与毒性試験(オリジナル報告書)

表 4 ラットを用いた飼料混餌投与による反復経口投与毒性試験(パネルミーティングによる再評価)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

(2) ラットを用いた飼料混餌投与による反復投与毒性特別試験

表 5 ラットを用いた飼料混餌投与による反復投与毒性特別試験

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表 6 ラットを用いた飼料混餌投与による反復投与毒性特別試験(パネルミーティングによる再評価)

(3)Long-Evans 系ラットにおける胃の腫瘍のプロモーションに関する試験

B. ブタクロール

(1)SD ラットを用いた飼料混餌投与による慢性毒性/発がん併合試験

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

表 7 SD ラットを用いた飼料混餌投与による慢性毒性/発がん併合試験(オリジナル報告書)

表 8 SD ラットを用いた飼料混餌投与による慢性毒性/発がん併合試験  
(アメリカン・ヘルス・ファウンデーションによる再評価)

表 9 SD ラットを用いた飼料混餌投与による慢性毒性/発がん併合試験  
(パネルミーティングによる再評価)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

(2) 雌の SD ラットにおけるブタクロールによる腫瘍発生機構の解明のための試験

(3) ラットを用いた二段階発がん試験

付表 1 胃神経内分泌細胞由来の増殖性病変及び腫瘍の分類と形態学的バリエーションの区分

3) ラット胃組織切片の遡及的再評価

(資料 6-3)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1994年

目的: 本試験の目的は、以前にバイオダイナミクス社において実施、評価された Sprague-Dawley系ラットにおけるブタクロールの2ヶ年慢性混餌投与試験(資料5-3)において採取された保存胃組織を再評価することであった。2ヶ年試験においては、高用量(3,000ppm)群の雌に比較的高頻度で、また同群の雄に非常に低頻度で腺胃腫瘍が認められた。再評価の主たる目的は胃腫瘍の組織学的特徴と細胞起源を明らかにするとともに、高用量群の胃腫瘍誘発過程における前駆病変あるいは随伴病変の有無ならびに中用量(1,000ppm)群におけるこれらの変化の有無を確認することであった。

評価対象組織:

方 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日本モンサント株式会社にある。

結 果:

本再評価の結果、ブタクロール投与により誘発されたと考えられる胃の腫瘍性病変は高用量群にのみ認められ、特に雌では、肉眼的にも観察される未分化の胃癌ならびに顕微鏡的に観察される胃カルチノイド及び神経内分泌細胞の前腫瘍性過形成が観察された。この胃発癌過程における唯一の初期病変が神経内分泌細胞の過形成であったことと、肉眼的に観察された腫瘍の一部において神経内分泌細胞を示すマーカー(NSE数例及びクロモグラニン1例)が認められたことから、総合的に本腫瘍は、悪性の高度に未分化な胃カルチノイドであると考えられた。

雄の高用量群における原報の腫瘍1例については雌の腫瘍とは別のものと思われ、形態学的な特徴から総合的に判断して神経鞘腫であろうと暫定的に診断された。偶発性のものの可能性もあるが、このような腫瘍例が集められればその範囲内での形態学上の差であることも考えられ、すでに述べたような雌でみられた腫瘍型の変種かもしれない。雌においてみられた初期病変と類似する病変が雄では1例にしかみられなかったこと、雌と同じ型の腫瘍が雄では1例しかないことから、ブタクロールに関連する腫瘍発現は極端に雌に偏っていることが明白であった。

さらに、中用量群の雌雄において進行性腫瘍ならびに胃カルチノイドの初期病変や前駆的な神経内分泌細胞病巣が全く認められなかったことから、ブタクロールの作用には明らかな閾値が存在することが示唆された。



表 1 ブタクロール混餌投与ラットに認められた胃腫瘍の特性 (原報告書 P.23 TABLE I)

表 1 プタクロール混餌投与ラットに認められた胃腫瘍の特性(続き)

表 2 ブタグルロール混餌投与ラットにおいて観察された追加初期病変の特徴 (原報告書 P.25 TABLE II)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**表 3 プタクロールを混餌投与したラットの腺胃粘膜における前癌病変、  
初期腫瘍及び腫瘍性病変の発生頻度 (原報告書 P. 26 TABLE III)**

4) 雌ラットにおける胃壁細胞の定量

(資料 6-4)

試験機関

報告書作成年 1996年

目的:ブタクロール及びアラクロールは、それぞれ、3,000ppmまたは126 mg/kg/日の用量で慢性混餌投与するとラットにおいて胃に腫瘍を形成した。この催腫瘍性過程に関与するメカニズムを研究する広範な試験研究計画の結果、胃酸を分泌している壁細胞の著しい減少を伴う胃底腺領域の進行性の粘膜萎縮が胃腫瘍形成過程の引き金であることが判明している。この試験は、壁細胞の減少を定量することによって、アラクロールとブタクロールの間の壁細胞消失に関する相関関係を確認し、更に壁細胞減少に関するブタクロール投与の用量反応を確立するために実施した。

評価対象組織:

方 法:

## 統計解析:

ブタクロールとアラクロールの試験の胃粘膜における壁細胞の細胞/mmの数の平均を表1に示した。

対照群と比較して統計学的に有意( $p \leq 0.001$ )な壁細胞数の減少(およそ82%)が、22ヶ月間にわたり3,000ppmの用量でブタクロールを混餌投与したラットに認められた。1,000ppmの用量でブタクロールを投与したラットにおいて、壁細胞数の軽度な減少(およそ22%)が観察されたが、統計学的には有意ではなかった。これは、26ヶ月にわたり1,000 ppmのブタクロールを投与した雌ラットにおいて、粘膜の厚さに軽度の減少が認められ、胃酸分泌が僅かに減少したが、胃液のpHの上昇、高ガストリン血症及び腫瘍の発生には至らなかった以前の試験における観察所見と一致している。100ppmでブタクロールを投与した動物の壁細胞数は、本質的に対照群と同等であった。

同様に、126mg/kg/日に相当する用量で1年間アラクロールを混餌投与したラットにおいて、対照群と比較しておよそ93%壁細胞数が減少した。この変化は、 $p \leq 0.001$ で統計学的に有意であった。

ブタクロールとアラクロールの長期にわたる高用量投与に関連するラットにおける胃腫瘍形成には、腫瘍形成を促進するガストリンの栄養効果が関与していることが既に明らかになっている。壁細胞の広範な損失を伴う胃底腺粘膜の萎縮は、これら2種の化合物の高用量投与に引き続いてラットの胃に認められる顕著な所見である。壁細胞の損失は、胃液のpHの上昇を伴う低塩酸症を引き起こし、更にガストリン分泌の増加を誘発する。ブタクロールまたはアラクロールを投与したラットの胃底腺における胃粘膜の測定の結果、胃の腫瘍形成が認められる用量で粘膜の厚さが減少することが確認されていた。壁細胞の定量的結果、これまでの試験で認められた所見の延長として、高用量のブタクロールとアラクロールの長期にわたる投与に続いて起こるラットの胃の胃底腺領域における壁細胞の広範な減少が確認され、ブタクロールについては、明らかな用量相関と閾値の存在が確認された。アラクロールについては胃の腫瘍形成が認められた用量のみ評価したが、統計学的に有意な壁細胞の減少が確認され、ブタクロールと同じ機構が腫瘍発生に関与していることが示された。

以上の結果は、ブタクロールとアラクロールの長期にわたる高用量投与に関連する胃腫瘍形成に関して既に公表されているメカニズムを更に支持するとともに、そのメカニズムに関する明らかな閾値の存在を示すものである。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**表 1 壁細胞の群平均値** (原報告書 P.13 Table1)

**図 1 壁細胞計数に用いた胃底腺切片** (原報告書 P.14 Figure1)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

図 2 壁細胞計数の位置 (原報告書 P.14 Figure2)



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

5) ラット胃及び鼻部組織における細胞増殖に対する影響

(資料 6-5)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1994年

目的: Sprague-Dawley系ラット雌の胃粘膜の細胞増殖及び粘膜の厚さ、ならびに鼻甲介粘膜の細胞増殖に対するブタクロールの混餌投与の影響を経時的に評価する目的で、BrdU検出法による免疫組織化学的検索を行った。

検体の純度:

供試動物:

投与期間:

投与方法:

群構成と投与、採取組織;

用量設定根拠;

投与期間中の観察:

一般状態及び死亡率;

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

体重変化；

摂餌量及び食餌効率；

検体摂取量；

飲水量；

血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査；

肉眼的病理検査；

臓器重量；

組織試料の評価；

胃組織の調製；

鼻部組織の調製；

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

細胞増殖の検出；

標識細胞の定量；

胃組織；

**表 1 ラット腺胃における細胞増殖に対するブタクロール混餌投与の影響**  
(原報告書 P.18 Evaluation of Proliferative Activity: Stomach)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

粘膜の厚さの測定；

**表 2 ラット腺胃における粘膜の厚さに対するブタクロール混餌投与の影響**  
(原報告書 P.19 Mucosal Thickness)

鼻部組織；

表 3 鼻甲介嗅上皮領域及び呼吸上皮領域における細胞増殖に対するブタクロール混餌投与の影響  
(原報告書 P.20 Evaluation of Proliferative Activity: Nasal Turbinates)

胃底腺粘膜頸部の増殖性領域における細胞増殖が61日間の投与後わずかに増加したが、121日間の投与後には認められなかった。一方、胃底腺粘膜基底部分における細胞増殖は、両方の投与期間において増加を示した。ブタクロールを3,000ppmの用量で61日間投与後基礎飼料を60日間与えたラットにおいては胃底腺粘膜頸部または胃底腺粘膜基底部分いずれの領域においても細胞増殖の程度に有意な変化は認められず、この変化が可逆的なものであることを示していた。61日間及び121日間の投与後認められた胃底腺粘膜の厚さの減少についても症状が回復する傾向が認められたが、60日間の基礎飼料摂取では対照群の程度にまでは回復しなかった。粘膜の厚さの減少として認められた粘膜の萎縮が、修復的な増殖反応を引き起こすと考えられ、おそらく胃底腺で認められた細胞増殖活性の増加の原因となっている。胃底腺粘膜においては胃腺頸部が通常増殖性領域であるにもかかわらず、頸部よりも基底部分において細胞増殖活性が高い原因は判明していないが、増殖細胞が損傷した粘膜を補修するために下に移行し、正常に分化しないことが原因としては考えられる。また、エンテロクロマフィン様 [Entero-chromaffin-like(ECL)]細胞のような他の細胞の存在が基底部分の細胞増殖反応に関わっている可能性も考慮する必要がある。

3,000ppm濃度のブタクロールを121日間投与し、鼻部組織における細胞増殖の程度を評価した結果、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

対照群ラットの鼻部組織嗅上皮に認められる細胞増殖の約2倍近い増殖がブタクロールによって引き起こされることが判った。しかしながら、この細胞増殖の増加は、3,000ppm濃度のブタクロールを61日間混餌投与後基礎飼料を60日間与えると回復が認められた。投与群と対照群の間に、呼吸上皮における細胞増殖の差は認められずこの試験においては細胞増殖の増加は嗅上皮に限られていた。対照群ラットにおける標識細胞核の数は、呼吸上皮に比べ嗅上皮の方がおよそ8倍も高い値を示した。

#### 参考文献

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

6) ラット胃粘膜の細胞増殖に対する影響

(資料 6-6)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1994年

目的:ラット胃粘膜の細胞増殖に対するブタクロールの影響を評価するために、以前に実施した「F344ラットにおける13週間亜急性経口毒性試験(資料4-1)」において採取した胃の保存パラフィンブロックを用いて、増殖細胞核抗原[Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA)]による免疫組織学的検索を行った。

方法:

PCNA陽性細胞の定量化;

粘膜の厚さの測定;

有意差検定;

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

結 果:

以上の結果から、ブタクロールは3,000ppm群において胃底腺底部の細胞増殖活性を促進することが示唆された。ブタクロールの腺胃における細胞増殖活性の無作用量は、雌雄とも1,000ppmであると判定した。



7) マウス胃粘膜の細胞増殖に対する影響

(資料 6-7)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1994年

目的: CD-1系マウス雌の胃粘膜の細胞増殖及び粘膜の厚さに対するブタクロールの混餌投与の影響を経時的に評価する目的で、増殖細胞核抗原[Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA)]による免疫組織化学的検索を行った。

検体の純度:

供試動物:

投与期間:

投与方法:

投与期間中の観察:

一般状態及び死亡率;

体重変化;

摂餌量及び食餌効率;

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

検体摂取量；

飲水量；

血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査；

組織試料の評価；

組織試料の採取及び調製；

標識細胞の定量；

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**表 1 マウス腺胃における細胞増殖に対するブタクロール混餌投与の影響**  
(原報告書 P.16 Evaluation of Proliferative Activity)

粘膜の厚さの測定;

**表 2 マウス腺胃における粘膜の厚さに対するブタクロール混餌投与の影響**  
(原報告書 P.17 Mucosal Thickness)

最長60日間にわたりブタクロールを2,000ppmの濃度で投与したマウスにおいて、胃底腺及び幽門腺いずれの領域においても一貫性のある細胞増殖の増加は認められなかった。胃底腺頸部においてわ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

ずかな増加が認められたが、基底部では増加は認められず、また粘膜における毒性の徴候も認められず、ラットにおいて細胞増殖及び粘膜に対する毒性が一貫して認められたことは対照的であった。

8) アカゲザルの胃における細胞増殖に対する影響

(資料 6-8)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1995年

目的: アカゲザル雌の胃粘膜の細胞増殖及び粘膜の厚さに対するブタクロール投与の影響を評価する目的で、増殖細胞核抗体[Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA)]による免疫組織化学的検索を行った。この試験の投与の部分は で実施し、胃粘膜の細胞増殖及び粘膜の厚さに関する分析は で実施した。

検体の純度:

供試動物:

投与期間:

投与方法:

用量設定根拠;

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率;

体重変化;

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

摂餌量及び飲水量；

検体の投与量；

血清生化学及び血液学的検査；

剖 検；

病理組織学的検査；

表 1 プタクロールの細胞増殖に対する影響:サルー腺胃 (原報告書 P.4 Table1)

予備試験及び本試験のいずれに供試したサルにおいても、胃の細胞増殖及び粘膜の厚さに検体の投与に関連する変化が認められなかったことは、ラットにおいて確認されている検体投与の影響とは対照的であった。ラットにおいては、頸部の細胞増殖活性の有意な増加及び粘膜の厚さの減少が、投与30日後に既に観察され、その後も一貫した胃底腺基底部及び頸部の細胞増殖活性の有意な増加と粘膜の厚さの減少が継続することが確認されている(資料6-2、5)。このように、ラットの試験で用いた用量より高く、またラットの最大耐量の2~4倍と考えられる用量を30日間にわたり投与したサルにおいて、検体の胃に対する影響が認められなかったことから、ラットにおいてプタクロールが誘発した胃の変化はラットの種に特異的であることが強く示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

9) ラット腺胃及び肝におけるグルタチオンに対する影響

(資料 6-9)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1993年

目的:ラットの腺胃及び肝における酸化型(GSSG)及び還元型(GSH)グルタチオンのレベルに対するブタクロール投与の急性的影響を経時的及び性差との関連から調査する目的で実施した。

検体の純度:

供試動物:

投与方法:

用量設定根拠;

実際の投与量;



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

動物の飼育:

試料採取及び組織の調製:

組織調製;

グルタチオンの分析;

結 果:

ブタクロールによって引き起こされる肝中GSHの涸渇の機構は不明であるが、おそらくブタクロールもしくはブタクロール代謝物と特定のGSHとの抱合体生成が関連していると考えられる。ブタクロール投与ラット雌において肝中GSHレベルは、徐々に回復し、24時間後には対照群と同等になるが、おそらくこれは、グルタチオン合成が増加したことによると考えられる。以前に実施したSprague-Dawley系ラットにおける2ヶ年慢性混餌投与試験(資料5-3)において、3,000ppmの用量群雌ラットに胃の腫瘍の発生が比較的高頻度で認められたが、雄ラットでは1例のみであった。このように、ラットの胃におけるGSHレベルとブタクロールの催腫瘍性との間には明らかな相関が認められるが、胃のGSHレベルが上昇する機構は明らかではない。しかしながら、ブタクロール投与ラットにおけるGSHの対照群に対する増加は、ラットの肝で観察されたGSHの涸渇の結果起こるグルタチオン合成の増加によるものではないことは明らかである。肝と胃におけるGSHへの影響の違いは、これら2種類の臓器におけるブタクロール代謝の差を示唆している可能性がある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**表 1 プタクロールの単回経口投与(279mg/kg)の雌ラットの肝におけるGSH濃度に対する影響**  
(原報告書 P.26 Table3)

**表 2 プタクロールの単回経口投与(279mg/kg)の雌ラットの肝におけるGSSG濃度に対する影響**  
(原報告書 P.27 Table4)

**表 3 プタクロールの単回経口投与(279mg/kg)のラットの腺胃におけるGSH濃度に対する影響**  
(原報告書 P.28 Table5及びP.30 Table7)

2. 原体混在物及び代謝物

代謝物の変異原性試験

ブタクロール 代謝物 19(CP91431)、20(CP91432) 及びアラクロール 代謝物(CP76095、CP76096、CP76097)の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料10-1)

試験機関 モンサント環境衛生研究所  
報告書作成年 1985年

検 体: ブタクロール及びアラクロールの合成代謝物5種

モンサント社 コード番号	抄録中 番号	由 来	化 学 名	純 度
CP76095 <sup>1)</sup> T850004	—			
CP76096 <sup>1)</sup> T850005	—			
CP76097 <sup>1)</sup> T850006	—			
CP91431 <sup>2)</sup> T850007	19			
CP91432 <sup>2)</sup> T850008	20			

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100) 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らの方法を用いて変異原性を検定した。検体はジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解し、10～10,000 $\mu$ g/プレート の範囲で6濃度実施した。試験は3連制とし、1回実施した。

用量設定根拠;

試験結果: 結果を表1～5に示した。

アラクロールの合成代謝物3種類及びアラクロール/ブタクロールに共通な合成代謝物20(CP91432)はS-9 mixの有無にかかわらず、菌株の生育阻害を起こさない最高投与量10,000 $\mu$ g/プレートにおいても、TA100、TA98両株に復帰変異コロニー数を増加させなかった。アラクロール/ブタクロールに共通な合成代謝物19(CP91431)は、高濃度でコロニー数の減少が認められたが、非復帰変異株に対する明らかな作用は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた既知の変異原物質は、S-9 mixを必要とする場合も必要としない場合もTA100、TA98両株についてすべて著明な復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果から、代謝活性化を含む本実験条件下ではアラクロール合成代謝物3種類CP76095、CP76096、CP76097及びブタクロール/アラクロール共通合成代謝物 CP91431及びCP91432の変異原性は陰性であると判断する。

表 1 CP76095の試験結果

(原報告書 P.AI2 APPENDIX I TABLE1、P.AI5 TABLE4、P.AI7 TABLE6、P.AI9 TABLE8、P.AII3 APPENDIX II TABLE2、P.AII6 TABLE5、P.AII8 TABLE7及びP.AII10 TABLE9)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート (SD) <sup>a)</sup>	
			塩素置換型	フレームシフト型
			TA100	TA98
対照(DMSO)		—	100.9(10.9)	16.1( 4.6)
CP76095	10	—	96.3( 7.8)	13.3( 1.5)
	40	—	94.0( 2.0)	16.0( 3.6)
	200	—	96.0( 4.0)	13.3( 0.6)
	1,000	—	98.3(17.2)	12.7( 1.5)
	3,000	—	97.0( 7.8)	18.0( 3.0)
	10,000	—	116.0(11.1)*	12.3( 4.0)
対照(DMSO)		+	91.6( 7.9)	23.1( 5.0)
CP76095	10	+	82.0(16.7)*	28.7( 5.0)
	40	+	91.3( 3.2)	24.0(11.4)
	200	+	84.0( 5.6)	24.0( 5.6)
	1,000	+	93.7( 8.1)	25.0( 6.2)
	3,000	+	90.7( 9.9)	20.0( 3.5)
	10,000	+	84.3( 9.3)	25.0( 7.5)
陽性対照 <sup>b)</sup>	レベル1	—	134	30
	レベル2	—	207	51
	レベル3	—	372	116
	レベル1	+	113	358
	レベル2	+	522	510
	レベル3	+	761	797

a): 3連制の平均値(標準偏差)

b): 陽性対照

		レベル1	レベル2	レベル3
TA100;	—S-9 Mix 4-ニトロキリン-N-オキシド*	0.005 $\mu\text{g}$	0.025 $\mu\text{g}$	0.05 $\mu\text{g}$
	+S-9 Mix ベンゾ(a)ピレン	0.0002mg	0.001mg	0.002mg
TA98 ;	—S-9 Mix 4-ニトロキリン-N-オキシド*	0.01 $\mu\text{g}$	0.05 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$
	+S-9 Mix 2-アセチルアミノフルオレン	0.003mg	0.015mg	0.03mg

\* 片側t-検定:  $p < 0.05$ で対照より統計学的に有意差あり。

表 2 CP76096の試験結果

薬物	濃度 ( $\mu$ g/プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート (SD) <sup>a)</sup>	
			塩素置換型	フレームシフト型
			TA100	TA98
対照(DMSO)		—	100.9(10.9)	16.1( 4.6)
CP76096	10	—	96.3(16.3)	16.3( 3.2)
	40	—	93.3(13.3)	8.7( 2.9)**
	200	—	91.7( 6.7)	11.7( 4.0)*
	1,000	—	98.3( 6.4)	13.3( 2.5)
	3,000	—	103.3( 9.0)	13.3( 1.5)
	10,000	—	89.6( 6.9)	19.5( 2.1)
対照(DMSO)		+	91.6( 7.9)	23.1( 5.0)
CP76096	10	+	88.0( 2.6)	22.0( 6.0)
	40	+	89.7(22.7)	24.3( 4.0)
	200	+	86.0( 7.2)	28.0( 1.7)
	1,000	+	89.7( 9.2)	28.7( 2.1)
	3,000	+	77.3( 6.4)*	24.3( 5.7)
	10,000	+	76.3( 6.8)*	26.7( 3.2)
陽性対照 <sup>b)</sup>	レベル1	—	134	30
	レベル2	—	207	51
	レベル3	—	372	116
	レベル1	+	113	358
	レベル2	+	522	510
	レベル3	+	761	797

表 3 CP76097の試験結果

薬物	濃度 ( $\mu$ g/プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート (SD) <sup>a)</sup>	
			塩素置換型	フレームシフト型
			TA100	TA98
対照(DMSO)		—	100.9(10.9)	16.1( 4.6)
CP76097	10	—	97.0(12.5)	15.3( 5.7)
	40	—	88.7(18.6)	14.7( 8.1)
	200	—	94.7( 1.5)	18.7( 4.5)
	1,000	—	94.0(16.4)	16.7( 2.9)
	3,000	—	93.0( 7.9)	11.7( 4.0)
	10,000	—	102.7(16.1)	9.0( 1.7)**
対照(DMSO)		+	91.6( 7.9)	23.1( 5.0)
CP76097	10	+	89.7(11.9)	23.7( 2.1)
	40	+	87.0( 5.3)	28.3( 9.5)
	200	+	100.3(13.7)	29.3(12.0)
	1,000	+	94.3(24.0)	25.0( 3.5)
	3,000	+	76.0( 8.2)*	22.0( 7.8)
	10,000	+	103.0( 6.1)	20.3( 6.1)
陽性対照 <sup>b)</sup>	レベル1	—	134	30
	レベル2	—	207	51
	レベル3	—	372	116
	レベル1	+	113	358
	レベル2	+	522	510
	レベル3	+	761	797

a): 3連測の平均値(標準偏差)

b): 陽性対照

		レベル1	レベル2	レベル3
TA100;	—S-9 Mix 4-ニトロキリソ-N-オキシド'	0.005 $\mu$ g	0.025 $\mu$ g	0.05 $\mu$ g
	+S-9 Mix ベンゾ(a)ピレン	0.0002mg	0.001mg	0.002mg
TA98;	—S-9 Mix 4-ニトロキリソ-N-オキシド'	0.01 $\mu$ g	0.05 $\mu$ g	1 $\mu$ g
	+S-9 Mix 2-アセチルアミノフルオレン	0.003mg	0.015mg	0.03mg

\* 片側t-検定: p < 0.05で対照より統計学的に有意差あり。

\*\* 片側t-検定: p < 0.01で対照より統計学的に有意差あり。

表 4 CP91431(ブタクロール代謝物19)の試験結果

(原報告書 P.AI3 APPENDIX I, TABLE2, P.AI6 TABLE5, P.AI8 TABLE7, P.AI10 TABLE9, P.AII4 APPENDIX II, TABLE3, P.AII7 TABLE6, P.AII9 TABLE8及びP.AII11 TABLE10)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート (SD) <sup>a)</sup>	
			塩素置換型	フレームシフト型
			TA100	TA98
対照(DMSO)		—	100.9(10.9)	16.1(4.6)
CP91431	10	—	106.3(0.6)	15.3(1.5)
	40	—	105.3(16.0)	13.0(3.6)
	200	—	95.7(11.5)	14.3(3.1)
	1,000	—	75.7(4.0)**	12.0(4.4)
	3,000	—	73.7(12.7)**	11.0(4.4)*
	10,000	—	69.0(14.7)**	6.7(2.5)**
対照(DMSO)		+	91.6(7.9)	23.1(5.0)
CP91431	10	+	94.7(7.0)	25.0(6.6)
	40	+	90.3(8.1)	26.0(2.6)
	200	+	80.7(9.6)	18.3(4.0)
	1,000	+	59.7(9.3)**	24.0(1.0)
	3,000	+	55.7(16.9)**	13.0(4.0)**
	10,000	+	54.0(2.6)**	12.3(4.2)**
陽性対照 <sup>b)</sup>	レベル1	—	134	30
	レベル2	—	207	51
	レベル3	—	372	116
	レベル1	+	113	358
	レベル2	+	522	510
	レベル3	+	761	797

a): 3連制の平均値(標準偏差)

b): 陽性対照

		レベル1	レベル2	レベル3
TA100;	—S-9 Mix 4-ニトロキリン-N-オキシド*	0.005 $\mu$ g	0.025 $\mu$ g	0.05 $\mu$ g
	+S-9 Mix ベンゾ(a)ピレン	0.0002mg	0.001mg	0.002mg
TA98;	—S-9 Mix 4-ニトロキリン-N-オキシド*	0.01 $\mu$ g	0.05 $\mu$ g	1 $\mu$ g
	+S-9 Mix 2-アセチルアミノフルオレン	0.003mg	0.015mg	0.03mg

\* 片側t-検定:  $p < 0.05$ で対照より統計学的に有意差あり。

\*\* 片側t-検定:  $p < 0.01$ で対照より統計学的に有意差あり。

表 5 CP91432(ブタクロール代謝物20)の試験結果

(原報告書 P.AI3 APPENDIX I, TABLE2, P.AI6 TABLE5, P.AI8 TABLE7, P.AI10 TABLE9, P.AI14 APPENDIX II, TABLE3, P.AI19 TABLE8, P.AI111 TABLE10, P.AI4 APPENDIX I, TABLE3及びP.AI15 APPENDIX II, TABLE4)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/プレート)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート (SD) <sup>a)</sup>	
			塩素置換型	フレームシフト型
			TA100	TA98
対照(DMSO)		—	100.9(10.9)	16.1( 4.6)
CP91432	10	—	109.0( 8.7)	11.0( 5.3)*
	40	—	106.0( 9.5)	14.0( 2.0)
	200	—	110.3(17.8)	11.0( 4.4)
	1,000	—	126.3( 8.5)**	11.0( 6.1)*
	3,000	—	121.3(12.9)*	11.0( 3.5)
	10,000	—	114.0(17.3)	9.0( 2.6)*
対照(DMSO)		+	91.6( 7.9)	23.1( 5.0)
CP91432	10	+	85.7(15.4)	19.3( 0.6)
	40	+	100.0(13.5)	28.7( 5.5)
	200	+	104.7(18.8)	22.0( 5.2)
	1,000	+	89.0(13.7)	27.7( 6.0)
	3,000	+	88.3(10.2)	17.0( 5.6)*
	10,000	+	80.3( 8.1)	20.3( 0.4)
陽性対照 <sup>b)</sup>	レベル1	—	134	30
	レベル2	—	207	51
	レベル3	—	372	116
	レベル1	+	113	358
	レベル2	+	522	510
	レベル3	+	761	797
対照(DMSO)		—	82.7( 6.5)	
CP91432 (再試験)	500	—	79.3( 7.4)	
	1,000	—	84.3(10.2)	
	3,000	—	84.7( 3.1)	
陽性対照 <sup>b)</sup> (再試験)	レベル1	—	116	
	レベル2	—	242	
	レベル3	—	426	

a): 3連制の平均値(標準偏差)

b): 陽性対照

TA100; —S-9 Mix 4-ニトロキノリン-N-オキシド<sup>c)</sup>  
 +S-9 Mix ベンゾ(a)ピレン  
 TA98; —S-9 Mix 4-ニトロキノリン-N-オキシド<sup>c)</sup>  
 +S-9 Mix 2-アセチルアミノフルオレン

レベル1

0.005  $\mu$ g  
0.0002mg

レベル2

0.025  $\mu$ g  
0.001mg  
0.01  $\mu$ g  
0.003mg

レベル3

0.05  $\mu$ g  
0.002mg  
1  $\mu$ g  
0.03mg

\* 片側t-検定:  $p < 0.05$ で対照より統計学的に有意差あり。

\*\* 片側t-検定:  $p < 0.01$ で対照より統計学的に有意差あり。



3. 製剤

① 32%乳剤

(1) 急性毒性

1) ブタクロール乳剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 1-B-1)

試験機関 バイオダイナミクス社  
報告書作成年 1979年

[申請者注] 本試験は 32%乳剤の急性経口毒性試験成績の代替

検体の純度: 60%乳剤

[組成] ブタクロール原体 ; %  
有機溶剤、乳化剤等; %

供試動物: Sprague Dawley系アルビノラット(体重、雄 209~254g、雌 190~230g)、1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

投与方法: 約18時間絶食させたラットに検体を原液のまま、経口挿管法により投与した。

観察・検査項目: 中毒症状及び死亡を14日間観察した。死亡動物につき、組織臓器の肉眼的病理検査を行なった。

結果:

投与方法	経口挿管法
投与量(mg/kg)	1,000、1,400、2,000、 2,800、4,000
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (信頼限界)	雌雄 2,800 (2,500~3,100)
死亡開始時間 及び終了時間	6~24 時間~6 日
症状発現及び 消失時間	0、24 時間
死亡例の認められなかつ た最高投与量 (mg/kg)	—

中毒症状として、運動失調、赤色鼻汁、腹部尿着染、立毛、嗜眠、腹部の糞便による着染、腹痛、一般的失調がみられた。解剖所見では肺、肝臓、脾臓、腸の変色または斑点及び胃腸の膨満、かつ色液の充満等がみられた。

2) ブタクロール乳剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 1-B-2)

試験機関 株式会社ボツリサーチセンター  
[GLP対応]

報告書作成年 1993年

検体の純度: 32%乳剤

[組成] ブタクロール原体 ; %

有機溶剤、乳化剤等; %

供試動物: ICR系 SPFマウス(Crj:CD-1)、7週齢(体重、雄 28.0~32.8g、雌 22.6~26.6g)

1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

投与方法: 投与4時間前より絶食させたマウスに、検体を原液のまま、投与量に応じて液量を変えながら金属製胃ゾンデを用い単回経口投与した。

観察・検査項目: 中毒症状及び生死を14日間観察した。体重測定を検体投与前、投与後1、2、3、7、10及び14日に行った。死亡動物については死亡時の体重を測定した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行なった。

結果:

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	1,000、1,800、3,200、4,200 5,600、10,000
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 4,604(4,126~5,138) 雌 5,657(4,583~6,983)
死亡開始時間 及び終了時間	1~4日
症状発現及び 消失時間	投与直後~6日
死亡例の認められなかつ た最高投与量 (mg/kg)	雌雄 3,200

3,200mg/kg以下の投与群では、雌雄とも異常は認められなかった。死亡は4,200mg/kg以上の投与群で投与翌日から4日にかけてみられた。死亡動物では、投与後2時間から翌日にかけて多数例の動物で異常歩行を示し、その後振戦、自発運動の減少、腹臥位または呼吸数の減少などを呈して死亡した。また、粗毛や紅涙

を呈する動物もみられた。

生存動物では、4,200mg/kg投与群の雌雄各1例および5,600mg/kg投与群で生存した雌1例に投与翌日から5日にかけて異常歩行、自発運動の減少、粗毛または紅涙がみられたが、投与後6日までに全て回復した。

また、死亡動物を含む一部の投与群の雌雄小数例で投与当日に投与直後の流涎や投与後1時間から6時間にかけての下腹部被毛の汚れ(下痢によるものと思われる)がみられた。

解剖所見では、死亡動物のほとんどに肝臓の退色が見られ、一部の動物では脾臓や腎臓の退色もみられた。他には、空腸の暗赤色内容物貯留や盲腸の暗赤色点が小数例にみられた。生存動物では4,200mg/kg投与群の雄2例で肝臓の退色が、5,600mg/kg投与群で生存した雌1例で肝臓及び脾臓の軽度な腫大がみられた。

3) ブタクロール乳剤のウサギにおける急性経皮毒性試験

(資料 1-B-3)

試験機関 バイオダイナミックス社  
報告書作成年 1979年

[申請者注] 本試験は32%乳剤の急性経口毒性試験成績の代替

検体の純度: 60%乳剤

[組成] ブタクロール原体 ; %  
有機溶剤、乳化剤等; %

供試動物: New Zealand White 系アルビノウサギ(体重、雄2.3~2.4kg、雌 2.3~2.4kg)  
1群雌雄各2羽

観察期間: 14日間

投与方法: 検体を原液のまま、ウサギの露出皮膚面に塗布し、胴を包帯で包んだ。

観察・検査項目: 投与24時間後、胴体から包帯を取り外し、検体を払拭して皮膚の毒性症状を観察した。  
中毒症状及び死亡を14日間観察した。

結果:

投与方法	経皮塗布
投与量(mg/kg)	2,000
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (信頼限界)	雌雄 >2,000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡なし
症状発現及び 消失時間	0、14日
死亡例の認められなかつ た最高投与量(mg/kg)	雌雄 2,000

中毒症状として運動失調、微振戦、運動減少を投与日に観察したが、運動減少以外の症状はその後みられなかった。また、数例に鼻汁を14日間観察した。皮膚の毒性症状として、適用部位に紅斑、浮腫を観察した。

4) ブタクロール乳剤ラットにおける急性吸入毒性試験

(資料 1-B-4)

試験機関 バイオダイナミックス社  
報告書作成年 1981年

[申請者注] 本試験は 32%乳剤の急性経口毒性試験成績の代替

検体の純度:ブタクロール60%乳剤

[組成] ブタクロール原体 ; %  
有機溶剤、乳化剤等; %

供試動物:Sprague Dawley系ラット(体重、雄 210~298g、雌 204~260g)、1群雌雄各5匹

観察期間:14日間

暴露方法:検体を直接空気噴霧ノズルに注入し、噴霧器に流速19L/分で乾燥空気を通して、エアゾールを作り、希釈せずに暴露チャンバーに導入した。全身暴露で4時間暴露を行った。暴露期間中、1時間ごとに4.5L/分で1分間チャンバー内空気を採取し、有効成分濃度を分析した。また、Casellaカスケード・インパクターを用い、暴露期間中30分おきにサンプルを採取して粒子サイズの分析を実施した。

暴露条件;

設定濃度(mg/L)	37、24、20、15、14、5.4
実際濃度(mg/L)	2.74、1.53、1.48、1.08、1.16、0.69
粒子分布	
$\leq 10 \mu\text{m}$	81%
$> 10 \mu\text{m}$	19%
空気力学的質量中位径	1.34 $\mu\text{m}$ (2.74 mg/L群) 2.30 $\mu\text{m}$ (1.53 mg/L群) 1.86 $\mu\text{m}$ (1.48 mg/L群) 2.11 $\mu\text{m}$ (1.08 mg/L群) 3.30 $\mu\text{m}$ (1.16 mg/L群) 2.37 $\mu\text{m}$ (0.69 mg/L群)
呼吸可能な粒子( $\leq 10 \mu\text{m}$ )の割合	81%以上(81~96%)
チャンバー容積	0.1 m <sup>3</sup>
チャンバー内通気量	19 L/分
暴露条件	4時間 全身暴露

観察・検査項目：暴露中及び暴露後14日間、中毒症状、生死及び体重を記録した。全供試動物の肉眼的病理検査を行なった。

試験結果：

投与方法	吸入
LC <sub>50</sub> (mg/L)	雌雄1.63mg/L (95%信頼限界1.21~2.20mg/L)
死亡開始及び終了時間	2日目~6日目
症状発現及び消失時間	暴露15分~14日 1.48mg/L以下では回復がみられた。
死亡例の認められなかった 最高暴露気中濃度(mg/L)	—

中毒症状としては、流涙、鼻汁、運動減少等が暴露中にみられ、その後、呼吸器系障害及び神経筋障害が観察された。剖検では肺の変色、肝臓の変色がみられた。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

1) ウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料 2-B-2)

試験機関 バイオダイナミックス社(米国)

報告書作成年 1978年3月22日

1979年8月6日 改訂

[申請者注] 本試験は 32%乳剤の急性経口毒性試験成績の代替

検体の純度: 60%乳剤

[組成] ブタクロール原体 ; %

有機溶剤、乳化剤等; %

供試動物: New Zealand White系ウサギ(体重 2.3~2.9kg)、1群6羽

観察期間: 3日間

投与方法: ウサギの背部の刈毛した皮膚の左右1ヶ所(6.25cm<sup>2</sup>)の右側を擦過し、左側を非擦過とし、それぞれ検体 0.5mLを塗布した。

観察項目: 塗布24及び72時間後に紅斑、痂皮及び浮腫の有無につき観察し、バイオダイナミックス社の評点表に従い評価した。

結果: 観察した刺激性変化の採点は次頁の表のとおりである。採点は、Draize法により判定した。

(原報告書 P.3 TABLE1)

項 目			最高 評点	曝露後時間	
				24時間	72時間
動物番号 590F	非擦過部	紅斑/痂皮	4	2	3
		浮腫	4	3	2
	擦過部	紅斑/痂皮	4	2	3
		浮腫	4	3	2
動物番号 591F	非擦過部	紅斑/痂皮	4	2	2
		浮腫	4	2	2
	擦過部	紅斑/痂皮	4	2	2
		浮腫	4	2	2
動物番号 596M	非擦過部	紅斑/痂皮	4	2	3
		浮腫	4	2	2
	擦過部	紅斑/痂皮	4	2	3
		浮腫	4	3	2
動物番号 597F	非擦過部	紅斑/痂皮	4	2	3
		浮腫	4	2	2
	擦過部	紅斑/痂皮	4	2	3
		浮腫	4	2	2
動物番号 598F	非擦過部	紅斑/痂皮	4	2	4
		浮腫	4	2	2
	擦過部	紅斑/痂皮	4	2	4
		浮腫	4	3	2
動物番号 593F	非擦過部	紅斑/痂皮	4	2	3
		浮腫	4	2	2
	擦過部	紅斑/痂皮	4	2	3
		浮腫	4	1	1
6羽の合計	非擦過部	紅斑/痂皮	24	12	18
		浮腫	24	13	12
	擦過部	紅斑/痂皮	24	12	14
		浮腫	24	18	12
6羽の平均	非擦過部	紅斑/痂皮	4	2.0	3.0
		浮腫	4	2.2	2.0
	擦過部	紅斑/痂皮	4	2.0	3.0
		浮腫	4	2.3	2.0

塗布24及び72時間後の観察で、極く軽度から中等度の浮腫が認められた。皮膚一次刺激性反応指数(Draize評点)は4.6であった。

以上の結果より、ブタクロール60%乳剤はウサギの皮膚に対し、Draize評点で1~4の刺激性を示した。



2) ウサギにおける眼刺激性試験

(資料 2-B-1)

試験機関	バイオダイナミックス社
報告書作成年	1978年6月28日
	1979年5月15日 改訂
	1979年8月6日 改訂

[申請者注] 本試験は32%乳剤の急性経口毒性試験成績の代替

検体の純度:ブタクロール60%乳剤

[組成] ブタクロール原体 ; %

有機溶剤、乳化剤等; %

供試動物:New Zealand White系ウサギ、1群6羽

観察期間:14日間

投与方法:検体を片眼に0.1mL点眼した。洗浄は行わなかった。点眼しなかった眼を対照とした。

観察項目:処理1、2、3、4、7、10及び14日後に角膜、虹彩、結膜を観察し、バイオダイナミックス社の  
評点表に従い評価した。

結果:観察した刺激性変化の採点は次頁の表のとおりである。採点は、Draize法により判定した。

(原報告書 P.3 TABLE1)

動物番号	項目	最高評点	観察時期(日)							
			1	2	3	4	7	10	14	
動物番号123	角膜	不透明度	4	1	2	2	1	1	0	0
		損傷域	4	4	4	4	4	4	0	0
		斑点	4	4	4	4	4	4	0	0
		潰瘍	4	4	4	1	1	0	0	0
	虹彩	2	0	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	3	3	2	2	1	0	0
		浮腫	4	3	2	2	2	2	0	0
		分泌物	3	2	2	1	1	1	0	0
		壊死又は潰瘍	N <sup>1)</sup>	N	N	0	0	0	0	0
	動物番号136	角膜	不透明度	4	0	0	0	0		
損傷域			4	0	0	0	0			
斑点			4	0	0	0	0			
潰瘍			4	0	0	0	0			
虹彩		2	2	0	0	0				
結膜		発赤	3	1	0	0	0			
		浮腫	4	1	1	0	0			
		分泌物	3	0	0	0	0			
		壊死又は潰瘍	N	N	0	0				
動物番号137		角膜	不透明度	4	2	2	2	1	1	0
	損傷域		4	4	1	1	4	4	0	0
	斑点		4	4	4	4	4	4	0	0
	潰瘍		4	4	2	1	1	0	0	0
	虹彩	2	2	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	2	1	2	1	2	0	0
		浮腫	4	3	2	2	2	2	0	0
		分泌物	3	2	1	1	1	1	0	0
		壊死又は潰瘍	N	N	0	N	N	0	0	0
	動物番号138	角膜	不透明度	4	1	+2)	0	0	0	
損傷域			4	4	4	0	0	0		
斑点			4	4	3	0	0	0		
潰瘍			4	0	0	0	0	0		
虹彩		2	2	0	0	0	0			
結膜		発赤	3	3	1	1	0	0		
		浮腫	4	4	2	0	0	0		
		分泌物	3	2	0	0	0	0		
		壊死又は潰瘍	N	0	0	0	0	0		
動物番号139		角膜	不透明度	4	1	2	2	1	1	0
	損傷域		4	4	4	1	4	4	0	0
	斑点		4	4	4	4	4	4	0	0
	潰瘍		4	4	3	1	1	0	0	0
	虹彩	2	2	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	3	2	2	1	1	0	0
		浮腫	4	2	1	1	1	1	0	0
		分泌物	3	1	1	1	0	0	0	0
		壊死又は潰瘍	N	N	0	0	0	0	0	0
	動物番号141	角膜	不透明度	4	1	0	0	0		
損傷域			4	4	0	0	0			
斑点			4	4	2	0	0			
潰瘍			4	1	0	0	0			
虹彩		2	2	0	0	0				
結膜		発赤	3	2	0	0	0			
		浮腫	4	2	0	0	0			
		分泌物	3	1	0	0	0			
		壊死又は潰瘍	N	0	0	0	0			
6羽の合計 <sup>3)</sup>		660	194	128	90	82	82	0	0	
6羽の平均 <sup>3)</sup>		110	32.3	21.3	15	13.7	13.7	0	0	

- 1) 壊死又は潰瘍あり
- 2) 正常な光沢の軽微な濁り
- 3) Draize法による評価点

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

3日後に2眼が回復、1眼は4日後、その他の3眼は10日後にそれぞれ回復した。試験期間中、各動物に観察された症状のDraize法による評点の最高値の平均は38であった。

以上の結果より、ブタクロール60%乳剤はウサギの眼に対し、Draize評点で0～4の刺激性を示したが、これらの刺激性は、検体投与後10日目には全て消失した。

(3)皮膚感作性

1) モルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 3-B-1)

試験機関 バイオダイナミックス社  
報告書作成年 1984年

[申請者注] 本試験は 32%乳剤の急性経口毒性試験成績の代替

検体の純度: 60%乳剤

[組成] ブタクロール原体 ; %  
有機溶剤、乳化剤等; %

供試動物: Hartley albino系モルモット(体重、雄 304~368g、雌 303~386g)

試験群		供試動物	投与
IA 群	陰性対照群	雌雄各 5 匹	感作、惹起とも生理食塩水(希釈せず)を投与
IB 群	陰性刺激性対照群	雌雄各 3 匹	感作、惹起とも生理食塩水(希釈せず)を投与
IIA 群	陽性対照群	雌雄各 5 匹	感作、惹起とも DNCB を投与
IIB 群	陽性刺激性対照群	雌雄各 3 匹	惹起のみ DNCB を投与
IIIA 群	検体投与群	雌雄各 5 匹	感作、惹起とも検体を投与
IIIB 群	検体刺激性対照群	雌雄各 3 匹	惹起のみ検体を投与

観 察 期 間: 感作3週間その後2週間をはさみ、惹起3週間

方 法: [Buehler 変法]

本試験に先立ち、用量範囲決定試験として、動物 6 匹に 100、50、25 及び 10%の供試薬剤を、さらに別の動物 12 匹に 5.0、2.5、1.0 及び 0.5%の供試薬剤を経皮投与した。その結果に基づき、感作暴露の濃度を 10%、惹起暴露の濃度を 1.0%とした。

感 作; 背部を刈毛し、検体の 10%水溶液 0.4mLを背部の右側に閉塞貼付法により1回6時間ずつ週 3回、3週間にわたり処理した。陽性対照群には DNCB 0.5%エタノール溶液 0.4mLを同様に処理した。

惹 起; 最終感作の2週間後に検体の 1%水溶液 0.4mLを閉塞貼付法により感作暴露と反対に背部の左側に1回6時間処理した。陽性対照群には DNCB 0.3%エタノール溶液 0.4mLを同様に処理した。

刺激性対照動物; 刺激性による反応と感作性による反応を区別するため無処理の動物に惹起暴露と同じ手順により薬剤(検体及び陽性対照)を処理した。

陰性対照; 感作暴露、惹起暴露とも陰性対照として蒸留水を処理した。

観 察 項 目 : 感作暴露、惹起暴露後24及び48時間後に適用部位の紅斑及び浮腫の有無等を肉眼的に観察した。

結 果 :

(原報告書 P.15 TABLE III)

	投与群	投与後時間	皮膚反応発現動物数							検査動物数	
			0	±	1	2	3	浮腫	壊死		痂皮
陰性対照群	I A	24	10	0	0	0	0	0	0	0	10
		48	10	0	0	0	0	0	0	0	10
陰性刺激性対照群	I B	24	6	0	0	0	0	0	0	0	6
		48	6	0	0	0	0	0	0	0	6
陽性対照群	II A	24	0	0	0	8	2	10	0	0	10
		48	0	0	2	8	0	10	0	0	10
陽性刺激性対照群	II B	24	5	1	0	0	0	0	0	0	6
		48	6	0	0	0	0	0	0	0	6
誘	検体投与群	24	0	3	6	1	0	3	0	0	10
		48	2	6	2	0	0	1	0	0	10
発	検体刺激性対照群	24	5	1	0	0	0	0	0	0	6
		48	5	1	0	0	0	0	0	0	6

検体処理群において1回目の感作暴露の後、極く軽度の刺激性反応がみられ、2回目、3回目の後中等度の刺激性反応がみられた。この反応は一部の動物では高度に達した。非刺激性濃度の検体を処理した惹起暴露において感作性が確認された。

一方 DNCB 処理群でも非刺激性濃度において感作性が確認され、また陰性対照群では反応はみられなかった。

以上の結果より、ブタクロール60%乳剤の本試験条件下における皮膚感作性は陽性であると判断する。

② 10%粒剤

(1) 急性毒性

1) ブタクロール粒剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 1-D-1)

試験機関 株式会社ボゾリサーチセンター

[GLP対応]

報告書作成年 2001年

検体の純度: 10%粒剤

[組成] ブタクロール原体 ; %

鉱物質微粉等 ; %

供試動物: Crj:CD(SD)IGSラット(7週齢、体重:雄 186~207g、雌 153~167g)、1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

投与方法: 検体を蒸留水に懸濁し、約16時間絶食させたラットに1回強制経口投与した。

対照群には蒸留水のみを同様に投与した。

観察・検査項目: 中毒症状及び死亡を14日間観察した。体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10及び14日に測定した。試験終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経口
性別	雌雄
投与量(mg/kg)	0、2,000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雌雄 >2,000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び 消失時間	発現例なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2,000
死亡例の認められなかった最 高投与量 (mg/kg)	2,000

試験期間中、中毒症状及び死亡例は認められなかった。また、体重並びに剖検所見に特記すべき変化は認められなかった。

2) ブタクロール粒剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 1-D-2)

試験機関 株式会社ボゾリサーチセンター

[GLP対応]

報告書作成年 2001年

検体の純度: 10%粒剤

[組成] ブタクロール原体 ; %

鋳物質微粉等 ; %

供試動物: Crj:CD(SD)IGSラット(7週齢、体重:雄 211~237g、雌 175~196g)、1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

投与方法: 検体を蒸留水で湿らせて、刈毛した背部皮膚に24時間塗布した。

観察・検査項目: 中毒症状及び生死を14日間観察した。体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10及び14日に測定した。試験終了時の全動物について適用部位を含む組織の肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経皮
性別	雌雄
投与量(mg/kg)	0、2,000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雌雄 >2,000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	発現例なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2,000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄 2,000

試験期間中、中毒症状及び死亡例は認められなかった。また、体重並びに投与部位の皮膚を含めた剖検所見にも特記すべき変化は認められなかった。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

1) ウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料 2-D-2)

試験機関 株式会社ボゾリサーチセンター

[GLP対応]

報告書作成年 2001年

検体の純度: 10%粒剤

[組成] ブタクロール原体 ; %

鋳物質微粉等 ; %

供試動物: 日本白色種ウサギ(18週齢、体重: 3.29~3.50kg)、1群雌3匹

観察期間: 72時間

投与方法: 微粉末とした検体0.5gを刈毛したウサギの背部の皮膚(2.5cm四方)に同量の注射用水で湿らせてから貼付した。貼付時間は4時間とし、皮膚に残った検体は注射用水を用いて拭き取った。

観察項目: 検体除去1、24、48時間及び72時間後に投与部位の刺激性変化(紅斑・痂皮、浮腫)を観察し、Draizeの基準に従って採点した。

結果: 観察期間中にすべてのウサギの皮膚に刺激性変化(評点はすべて0点)は認められなかった。また、一般状態及び体重に検体投与に関連した影響は認められなかった。

以上の結果より、ブタクロール10%粒剤はウサギの皮膚に対して「無刺激物」と結論された。



2) ウサギにおける眼刺激性試験

(資料 2-D-1)

試験機関 株式会社ボゾリサーチセンター

[GLP対応]

報告書作成年 2001年

検体の純度: 10%粒剤

[組成] ブタクロール原体 ; %

鉍物質微粉等 ; %

供試動物: 日本白色種ウサギ(15週齢、体重: 2.43~2.82kg)、非洗眼群; 雌3匹、洗眼群; 雌3匹

観察期間: 7日間観察

投与方法: 微粉末とした検体0.1gを、非洗眼群及び洗眼群の計6匹の左眼に投与した。洗眼群については投与30秒後に100mLの微温湯で30秒間洗眼した。

観察項目: 投与1、24、48、72及び96時間後に、その後は投与7日後まで1日1回、角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Draizeの基準に従って採点した。

結果: 観察した刺激性変化の採点は次頁の表のとおりである。

(原報告書 Appendix 1、2、3及び4)

項目			最高 評点	適用後時間										
				時間					日					
				1	24	48	72	96	5	6	7			
非洗眼群	動物 番号 1101	角膜 混濁	程度	4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
			面積	4	1	3	2	1	1	1	1	1	0	
		虹彩			2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
			浮腫	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	動物 番号 1102	角膜 混濁	程度	4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
			面積	4	1	3	2	0	0	0	0	0	0	
		虹彩			2	0	1	0	0	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0
			浮腫	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	動物 番号 1103	角膜 混濁	程度	4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
			面積	4	1	3	2	1	1	1	1	0	0	
		虹彩			2	0	1	0	0	0	0	0	0	
結膜		発赤	3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	
		浮腫	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
		分泌物*	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
合計			110**	41	82	41	12	12	12	12	5	0		
平均				13.7	27.3	13.7	4.0	4.0	4.0	4.0	1.7	0		
洗眼群*** (3匹 平均)	角膜 混濁	程度	4	1.0	1.0	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0	0		
		面積	4	1.0	3.0	1.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0	0		
	虹彩			2	0	0.3	0	0	0	0	0	0		
	結膜	発赤	3	1.0	2.0	1.0	0.7	0	0	0	0	0		
		浮腫	4	1.0	1.0	0	0	0	0	0	0	0		
		分泌物*	3	2.0	1.0	0.3	0	0	0	0	0	0		
合計			110**	13.0	24.7	11.0	4.7	3.3	3.3	0	0			

\*: 農林水産省の指針では要求されていない

\*\* : Draize 法による個体別最高評価点

\*\*\* : 適用後時間毎の平均値は、申請者が個体別採点表より算出した。

非洗眼群では、角膜混濁、虹彩の異常、結膜発赤、結膜浮腫、眼脂分泌が認められた。これらの反応は投与7日後に全て消失した。平均値の最大値は27.3であった。

洗眼群では、角膜混濁、虹彩の異常、結膜発赤、結膜浮腫、眼脂分泌が認められた。これらの反応は投与6日後に全て消失した。平均値の最大値は24.7であった。

以上の結果より、ブタクロール10%粒剤はウサギの眼に対し「中等度の刺激性あり」と結論された。また、洗眼によりわずかに刺激性が軽減されるものと考えられた。

(3)皮膚感作性

1) モルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 3-D-1)

試験機関 株式会社ボゾリサーチセンター

[GLP対応]

報告書作成年 2001年

検体の純度: 10%粒剤

[組成] ブタクロール原体 ; %

鉍物質微粉等 ; %

供試動物: ハートレー系モルモット(7週齢、体重: 339~429g)

検体感作群; 雌20匹、検体非感作群; 雌10匹

観察期間: 30日間観察

方法: Buehler 法

投与量設定根拠;

感作; 感作開始日(0日)に、あらかじめ刈毛・剃毛した左側胴部の皮膚に、直径2.5cmのパッチに25%濃度の検体0.2mLを塗布し、6時間閉塞貼付した。同様の操作を7日毎に合計3回実施した。また、非感作群には溶媒である注射用水を同様に投与した。

惹起; 最終感作の14日後に、あらかじめ刈毛・剃毛した右側胴部の皮膚に、検体感作群及び非感作群について、直径2.5cmのパッチに25%濃度の検体0.2mLを塗布し、6時間閉塞貼付した。

観察項目: 検体除去24及び48時間後に、投与部位の紅斑及び浮腫の有無等を肉眼的に観察し、

Magnusson & Kligmanの評価基準により採点した。

皮膚反応の評価表

皮膚反応の程度	評点
肉眼的に変化なし	0
散在性又は斑状の紅斑	1
中等度びまん性紅斑	2
強い紅斑と浮腫	3

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

結果:各観察時間における結果を下表に示す。

(原報告書 Table1及び添付資料1)

群			供試動物数	感作反応動物数										陽性率	
				24 時間後					48 時間後					24 時間	48 時間
				皮膚反応評点					皮膚反応評点						
				0	1	2	3	計	0	1	2	3	計		
検体	感作	惹起													
	25% 検体	25% 検体	20	20	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0/20	0	0
	溶媒*	25% 検体	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0
陽性対照	1% DNCB	0.25% DNCB	10	0	0	10	0	10/10	2	4	4	0	8/10	100	80
	溶媒**	0.25% DNCB	5	5	0	0	0	0/5	5	0	0	0	0/5	0	0

\*:注射用水 \*\*:エタノール

検体感作群及び検体非感作群で皮膚反応は認められなかった。

なお、直近に実施したモルモットの陽性対照物質(DNCB:2,4-ジニトロクロロベンゼン)に対する感受性の確認試験(2000年5月9日~2000年8月23日)では、陽性率は100%であった。

一般状態及び体重では検体投与に関連した影響は認められなかった。

以上の結果より、ブタクロール10%粒剤の本試験条件下における皮膚感作性は陰性であると判断する。

4. 参考:

クロロアセトアニリド系除草剤アラクロール[2-クロロ-2,6'-ジエチル-N-(メキシメチル)アセトアニリド]は、ブタクロールと近似の構造類縁体であり、どちらの化合物もラットを用いた慢性混餌投与/発がん性試験において、鼻部、甲状腺及び胃の腫瘍の発生頻度の増加を誘発した。アラクロールとブタクロールの催腫瘍性には共通の作用機序が関与していると考えられる。アラクロールにおける疫学的調査及び発がんメカニズムに関する試験研究結果を参考として以下に示す。

(1)疫学調査

1) アラクロール製造工場労働者の疫学的調査

(資料 11-1)

試験機関

報告書作成年 1995年

目的:動物実験においてLong-Evans系ラットに認められた胃、甲状腺及び鼻部の腫瘍、及び眼病変がアラクロール暴露によってヒトにおいても発現するかどうかを確認するために疫学調査を実施した。

アラクロールは1969年以来、                    州                    の単一の製造工場で製造されてきている。この工場において主としてアラクロールに長期にわたり暴露した労働者が多数存在することが確認された。以下の理由から、この労働者の集団は、除草剤散布者や農業従事者に比べ、アラクロールへの暴露量が高いと考えられた。

- 1) 工場における1日の暴露量は、散布時の暴露量を上回る。
- 2) 製造は年間を通じて行われているが、農作業としてのアラクロール散布は、春の植え付け前の数週間に限られている。典型的な農業従事者は年に数日アラクロールを散布し、散布業者の場合も2~3週間の散布期間である。

加えて、1968年から1976年の特定できない期間にわたり、工場の飲料水源がアラクロールに汚染されていたため、工場労働者の暴露は更に高いと考えられた。この労働者を対象とする3つの疫学調査を実施し、眼に対する影響、死亡率及びがん罹患率について評価を行った。

表 1 Long-Evans系ラットを用いた動物実験のアラクロール投与量(mg/kg)と農薬散布者及び工場労働者の推定暴露量の比較 (原報告書 P.27 Table1)

① アラクロールの眼科的調査

調査の設計段階で先ずLong-Evans(L-E)系ラットにおける毒性試験を眼科専門獣医が再検討し、126mg/kg/日の用量のアラクロール投与による L-E系ラットの眼に対する一次的影響が虹彩、毛様体及び脈絡膜を含むぶどう膜に発現すると結論した。更に、臨床眼科医の意見に基づき、L-E系ラットのぶどう膜への影響に対応するヒト初期病変は色素分散症候群(PDS)であると結論し、PDSは色素が虹彩の中後部から消失し、角膜、毛様小帯、水晶体及び虹彩上に沈着する病変と定義した。

方 法:

対象の選択;

眼科検査;

結果を表2に示した。

PDSの基準に適合する眼障害が非暴露群の1例にみられたが、PDSは暴露群には全くみられなかった(RR=0.0、95%信頼区間 0~24.3)。PDS以外の眼障害の罹患率は暴露群と非暴露群との間に差がなかった。全体として、眼科的健康状態は両群でほぼ同等であった。しかし、視力に影響しない程度の軽度の水晶体混濁が診断された頻度は、暴露群の方がやや低かった。

本調査では、アラクロールを投与したL-E系ラットに観察された眼病変に相当する最も初期のヒトにおける病変に焦点を合わせた。調査対象としたアラクロールに暴露した工場労働者にはこのような病変は認められず、他の眼疾患の罹患率も上昇していなかった。調査対象には工場で暴露の度合いが最も高い職場で働いていた労働者が含まれていたこと、及び本調査までの潜伏期が少なくとも17年(平均20年)あったことを考えると、L-E系ラットでみられた眼病変が、工場または農作業中にアラクロールに暴露したヒトに発症するとは考えられない。

表 2 眼科的異常の相対危険率(RR) (原報告書 P.28 Table2)

	眼	暴露群	非暴露群	RR	95%信頼区間
PDS 角膜欠陥	両	0	1	0.0	0.0~24.3
	右	30	19	1.0	0.5~2.0
	左	31	21	0.9	0.5~1.8
角膜内皮の色素沈着	右	27	18	0.9	0.5~1.9
	左	32	18	1.1	0.6~2.3
緑内障の疑い	右	1	1	0.6	0.0~49.2
	左	0	0	0.0	-
白内障皮質部混濁	右	3	8	0.2	0.0~0.9
	左	4	6	0.4	0.1~1.7
核性混濁 水晶体後囊下	両	7	8	0.5	0.2~1.7
	右	3	2	0.9	0.1~11.4
	左	1	3	0.2	0.0~2.6
網膜 網膜変性	右	29	21	0.8	0.4~1.7
	左	34	28	0.7	0.4~1.3
黄斑 黄斑変性	右	5	3	1.0	0.2~6.9
	左	5	5	0.6	0.1~2.7

\*暴露群被験者 135人、非暴露群被験者 84人

② アラクロール死亡率調査

方 法:



結果を表3と4に示した。

工場労働者のコホート全体に対するSMRは全死因、または全てのがんによる死因についても 州の死亡率と同等であった(表3)。鼻部、胃または甲状腺腫瘍に因る死亡は1例もなかった。最初の就業から15年以内は職業に関連するがん発症の可能性は低い期間であるが、その間のSMRは、全原因については0.4、がんによる死亡については0.0であった。アラクロール暴露が中または高に分類された仕事に従事していた労働者及び、アラクロールが飲料水に混入していたと考えられる期間に工場で働いていた労働者についてもSMRの上昇は認められなかった(表4)。

この研究はアラクロール製造工場労働者の死亡率に焦点を絞った。これら労働者の死亡率は 州の一般人口の死亡率と同等で、鼻、甲状腺、胃及び肺がんによる死亡はなかった。調査対象の年齢が若く死亡率が低い(2.2%)ので、実際の死亡例または期待値は低く、そのためSMRは正確ではない。しかし、少なくとも21年間の追跡期間におけるこれらの調査対象における死亡率は非常に良好であると結論できる。

表 3 1962～1990年の 工場全労働者(1,054人)の  
標準化死亡率(SMR) (原報告書 P.29 Table3)

死因(ICD8)	検出例数	期待値	SMR	95%信頼区間
全死因 (0～999)	24	32.6	0.7	0.5～1.1
全てのがん (140～209)	6	7.1	0.9	0.3～1.8
虚血性心臓疾患 (410～414)	4	6.4	0.6	0.2～1.6
外部因子 (800～999)	12	11.7	1.0	0.5～1.8
雇用開始 15 年後の死亡率(550 人)				
全死因	4	11.0	0.4	0.1～0.9
全てのがん	0	3.2	0.0	0.0～1.2
虚血性心臓疾患	1	3.2	0.3	0.0～1.7
外部因子	2	1.7	1.2	0.1～4.2

+ 注—全従業員で鼻、胃、甲状腺の腫瘍に起因する死亡数は、期待値で全体それぞれ0.06、0.18、0.04  
雇用開始15年後では、それぞれ 0.02、0.08、0.01に対し、実際はゼロであった。

表 4 1968～1990年のアラクロール暴露中等度または高度職場において、  
または工場飲料水を介して暴露した労働者(795人)の標準化死亡率(SMR)  
(原報告書 P.30 Table4)

死因(ICD8)	検出例数	期待値	SMR	95%信頼区間
全死因 (0～999)	21	27.2	0.8	0.5～1.2
全てのがん (140～209)	6	5.9	1.0	0.4～2.2
虚血性心臓疾患 (410～414)	4	5.4	0.7	0.2～1.9
外部因子 (800～999)	11	9.6	1.1	0.6～2.1
雇用開始 15 年後の死亡率(550 人)				
全原因	3	8.4	0.4	0.1～1.0
全がん	0	2.4	0.0	0.0～1.5
虚血性心臓疾患	1	2.4	0.4	0.0～2.3
外部因子	2	1.3	1.5	0.2～5.5

+ 注—アラクロール暴露職場または飲料水を介して暴露した労働者で鼻、胃、甲状腺の腫瘍に起因する死亡数は、期待値が全体でそれぞれ0.05、0.16、0.03暴露開始15年後では、それぞれ0.02、0.06、0.01に対し、実際にはゼロであった。

### ③ アラクロールのがん罹患率調査

方 法:

結果を表5と6に示した。

全アラクロール暴露労働者において検出されたがんの数は18例、期待値は11.9例であった。期待値より検出数の方がやや上回ったのは大腸がん及び慢性骨髄性白血病(CML)の例数が期待値より多かったためである。CML2例のうちの1例は最初の雇用後4年以内に発見されたので、おそらく雇用された時に症状発現前ではあるが既に罹患していたと思われる。残り1例については、例数不足のため因果関係の評価は不可能であった。

大腸がんについては、就業履歴から4例中1例のアラクロール暴露量は無視できる程度だったことが判明した。残りの3例中では、頻度の高いアラクロール高度暴露が考えられる製造部門を主な職場としていたのは1例のみである。他の2例は、間歇的なアラクロール高度暴露が考えられる管理保守業務を主な職場としていた。暴露の度合いの高い製造労働者の比率が少なかった事実は、もしアラクロールと大腸がんの間に真の関連があるとすれば予想に反する結果である。大腸がんに関する知見は、原因不明の発症率上昇の一例と思われた。大腸がんが化学物質と関連づけられた知見はない。大腸がんは、州の統計に基づけば工場労働者の間で発生が予想されるがんの中で第2位を占め、またこの

種の調査研究では特定の部位のがんが予期されたよりやや多く発生することは珍しくない。大腸がんに関する知見は偶発的であると考えるのが最も妥当である。

L-E系ラットで見られた腫瘍である鼻部、胃及び甲状腺の腫瘍は発症しなかった。他の部位のがんでは、肺がん、乳がん及びメラノーマの例数のみが期待された1.0またはそれ以上に達していたが、これらのがんの発症率は上昇していなかった。

最初の暴露後15年目のSIRでは期待値3.3例に対し検出数5例であった(SIR=1.5、95%信頼区間0.5~3.5例)。例数が少ないため部位別の解析はできなかった。最初の暴露後0~15年目のSIR(13例、期待値8.6例、SIR=1.5、95%信頼区間0.8~2.6)は暴露後15年目のSIRとほぼ同じであった。両期ともSIRの軽度(両期間同程度)の上昇は、例数が少ないことから偶発的な変動である可能性や、州一般人口と労働者のがん発症の確認の差などの因子を反映している可能性も考えられる。後者の可能性は、毎年の健康診断の受診率が工場労働者では一般人口をはるかに上回る100%であることによって裏付けられる。

表6にアラクロール高暴露と判定された職場の労働者及び飲料水にアラクロールが混入していると考えられる時期に工場にいた労働者のがん罹患率を示す。これらの労働者のSIRは全期間でも最初の暴露後15年目でもアラクロール暴露群全体のSIRに非常に近かった。

表 5 1970~1990年にアラクロールに暴露した全労働者(943人)の標準化がん罹患率(SIR) (原報告書 P.31 Table5)

がんの部位	検出例数	期待値	SIR	95%信頼区間
全てのがん(140-171、173-199、M9850-9980)	18	11.9	1.5	0.9~2.4
大腸がん(153、154、159.0)	4	1.2	3.4	0.9~8.3
肺がん(162)	0	1.4	0.0	0~2.7
乳がん(174)	1	1.1	0.9	0~5.2
慢性骨髄性白血病(M9863、M9869)	2	0.1	22.2	2.7~80.3
暴露開始15年後のSIR(386人)				
全てのがん	5	3.3	1.5	0.5~3.5
大腸がん	2	0.4	4.6	0.6~18.1
肺がん	0	0.6	0.0	0~6.1
乳がん	0	0.2	0.0	0~18.4
慢性骨髄性白血病	1	0.0	—	—

+ 注—アラクロールに暴露した従業員で鼻、胃、甲状腺の腫瘍に起因する死亡数は、期待値が全体でそれぞれ0.03、0.2、0.4、暴露開始15年後ではそれぞれ0.01、0.1、0.1に対し、実際にはゼロであった。

表 6 1968～1990年のアラクロール高暴露の職場においてまたは工場飲料水を介して  
暴露した労働者(677人)の標準化がん罹患率(SIR) (原報告書 P.32 Table6)

がんの部位	検出例数	期待値	SIR	95%信頼区間
全てのがん	14	10.3	1.4	0.7～2.3
大腸がん	3	1.1	2.7	0.6～8.0
肺がん	0	1.3	0.0	0～2.8
乳がん	1	0.8	1.3	0～7.0
慢性骨髄性白血病	2	0.1	25.0	3.0～90.3
暴露開始 15 年後の SIR(382 人)				
全てのがん	5	3.3	1.5	0.5～ 3.5
大腸がん	2	0.4	4.7	0.6～16.8
肺がん	0	0.6	0.0	0～ 6.1
乳がん	0	0.2	0.0	0～ 18.4
慢性骨髄性白血病	1	—	—	—

+ 注—アラクロールに暴露した従業員で鼻、胃、甲状腺の腫瘍に起因する死亡数は、期待値が全体でそれぞれ0.03、0.2、0.4、暴露開始15年後ではそれぞれ0.01、0.1、0.1に対し、実際にはゼロであった。

総合考察: 毒性学的知見に加えて、アラクロールに暴露したヒトにおける疫学データを得ることが望ましいことから、アラクロール工場労働者を対象とした3つの疫学的調査研究を実施した。最高暴露群の臨床検査では眼に対する影響は検出されず、死亡率及びがん罹患率の調査では Long-Evans系ラットにおいて催腫瘍性が認められた部位である鼻部、胃または甲状腺における腫瘍は1例も認められなかった。対象とした労働者は、除草剤散布者の暴露をはるかに上回る年間を通じた暴露を受けている。実際に工場労働者の暴露量は、農業従事者の年間暴露量の10,000倍以上にあたると考えられる。作物残留や飲料水の汚染を通じた一般人口における経口暴露の可能性は、農作業中の暴露より更に低い。従って、工場労働者において健康影響及び死亡率の増加が認められなかったことから、たとえアラクロールに暴露したとしても非常に低い暴露の可能性しかない一般人口に対し、悪影響を及ぼす可能性はほとんどないと考えられる。

2) アラクロール製造工場労働者の疫学的研究:追加調査

(資料 11-2)

試験機関

報告書作成年 1995年

目的:既に終了しているがん罹患率調査(資料 11-1、③)で観察された大腸がん罹患率の上昇の追跡調査及びアラクロール製造工場労働者におけるがん発症パターン、特にラットにおける慢性混餌投与試験において観察されたがん発生部位(甲状腺、胃、鼻部)、の継続調査を目的として、アラクロールを1968年から製造している工場における労働者のコホート研究の追加調査を実施した。この調査では、3年間(1991-1993年)の追跡期間を追加し、がん罹患率と死亡率に関する研究において得られた結果を再度確認した。

方法:

表1 労働者の性別、アラクロール暴露状況、および追跡状況による分布

(原報告書 P.26 Table1)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

死亡率／罹患率の追跡調査；

州健康登録との比較；

暴露評価；

疫学的分析；

結 果：

死亡率調査；基準を満足した労働者は1,036名で製造工程または飲料水を通じアラクロールに暴露した可能性があった。これらの労働者における全死因による死亡率は、コホート全体についても(27例、期待値40.1、SMR=0.7、95%CI 0.4-1.0)、また、5年以上の暴露と15年以上の最初の暴露からの期間がある労働者についても(4例、期待値11.1、SMR=0.4、CI 0.1-0.9)、州の死亡率よりも低かった。がんによる死亡率(8例、期待値9.3、SMR=0.9、95%CI 0.4-1.7)は州の死亡率と同等で、5年以上の暴露のある労働者(3例、期待値4.8、SMR=0.6、95%CI 0.1-1.8)及び15年以上の最初の暴露からの期間がある労働者において(1例、期待値5.1、SMR=0.2、95%CI 0-1.1)、ややもしくは中等度のがんによる死亡率の低下がみられた。

個別のがん、心臓疾患、及び事故に対するSMRを表2に示した。実験動物における慢性混餌投与試験において発生頻度の増加が観察された3種類のがん、胃、甲状腺及び鼻部のがんによる死亡は1例もなかった。観察された8例のがんによる死亡は、8種類の部位に分散し、特定のがんと関連を示す結果はなかった。

表2 アラクロールに暴露（職場および飲料水）した可能性のある従業員における  
各種死因に対する標準化死亡率(SMR\*) (原報告書 P.28 Table3)

死因	全従業員			暴露期間5年以上/ 最初の暴露から15年以上		
	死亡例数/ 期待値	標準化 死亡率 SMR	95%信頼 区間	死亡例数/ 期待値	標準化 死亡率 SMR	95%信頼 区間
全死因(0-999)	27/40.1	0.7	0.4-1.0	4/11.1	0.4	0.1-0.9
胃がん(151)	0/0.2	-	-	0/0.1	-	-
甲状腺がん(193)	0/0.04	-	-	0/0.01	-	-
肺がん(162)	1/2.5	0.4	0-2.2	0/1.1	-	-
大腸がん(153, 154)	1/1.0	-	-	0/0.3	-	-
乳がん(174)	0/0.5	-	-	0/0.1	-	-
前立腺がん(185)	0/0.2	-	-	0/0.1	-	-
腎臓がん(189)	0/0.3	-	-	0/0.1	-	-
白血病(204-207)	1/0.5	-	-	0/0.1	-	-
脳腫瘍(191, 192)	0/0.7	-	-	0/0.2	-	-
ホジキン病(201)	0/0.2	-	-	0/0.03	-	-
メラノーマ(172)	0/0.3	-	-	0/0.1	-	-
虚血性心臓疾患(410-3)	4/7.8	0.5	0.1-1.3	1/2.9	0.3	0-1.9
事故(800-949)	9/6.6	1.4	0.6-2.6	0/1.1	-	-

+ SMRと95%信頼区間は、死亡例もしくは期待値が1を越えた場合のみ計算した。

がん罹患率調査;基準を満足した労働者は白人男女1,025名で製造工程または飲料水を通じアラクロールに暴露した可能性があった。SHRIとの照合の結果、調査期間中に37例のがんの発症が認められ、その内13例は、多くが子宮頸がん(9例)か皮膚がん(2例)である上皮内がん、そして、24例が23人に発症した浸潤性がんであった。罹患率は浸潤性がん(膀胱がんの例外を除き)に基づくのがん罹患率であること、及び集団ベースの上皮内がんの診断、特に子宮頸がんと皮膚メラノーマには疑問があることから、上皮内がんはこの調査には含めなかった。

1969-1993年の調査期間において、がん罹患率(SIR)は州一般人口よりもアラクロール労働者においてわずかに高く(24例、期待値17.1、SIR=1.4、95%CI 0.9-2.1)、また、暴露期間及び最初の暴露からの期間の違いによって変動した(表3参照)。5年未満の暴露期間と最初の暴露からの期間が15年未満の労働者において、SIRが上昇した(10例、期待値5.1、SIR=2.0、95%CI 0.9-3.6)。5年以上の暴露期間の労働者(13例、期待値10.2、SIR=1.3、95%CI 0.7-2.2)及び最初の暴露からの期間が15年以上の労働者(9例、期待値7.8、SIR=1.2、95%CI 0.5-2.2)においては、期待値と同等のがんの発症が観察された。1991-1993年の追加の追跡調査期間中には、5.3の期待値に対し6例のがんが観察された(SIR=1.1、95%CI 0.4-2.5)



表3 アラクロールに暴露(職場および飲料水)した可能性のある従業員における  
全がんの標準化罹患率(SIR) (原報告書 P.30 Table5)

暴露期間/ 最初の暴露からの期間	労働者数 <sup>a</sup>	人一年 <sup>a</sup>	罹患例数/ 期待値	標準化罹患率 SIR	95% 信頼区間
<5年間/<15年間	1,024 <sup>b</sup>	6,540	10/5.1	2.0	0.9 - 3.6
<5年間/15年間以上	193	917	1/1.9	0.5	0 - 2.9
5年間以上/<15年間	481	3,930	5/4.3	1.2	0.4 - 2.7
5年間以上/15年間以上	386	2,268	8/5.9	1.4	0.6 - 2.7
合計	1,025	13,654	24/17.1	1.4	0.9 - 2.1

a - 労働者数はグループ間で相互に排他的な関係ではないが、人一年は相互に排他的な関係にある。

b - 労働者1例が、5年間の暴露もしくは最初の暴露から15年間の期間の条件を満たした後に 研究対象地域に移住した。

特定のがんに対するSIRをアラクロール暴露労働者全員及び5年以上の暴露期間と15年以上の最初の暴露からの期間の労働者についてまとめた。鼻部、胃、及び甲状腺におけるがんの発症は、それぞれ、0.04、0.3及び0.5という低い期待値に対し、1例も認められなかった。ほとんどの主要ながん発症部位について、労働者における罹患率は 州の一般人口における罹患率と同等であった。いくつかのがん発症部位について、期待値よりもわずかに観察例が増加したが、それらの部位におけるがんは、5年以上の暴露期間と15年以上の最初の暴露からの期間の労働者において、眼に見えて増加したり減少したりすることはなかった。1991-1993年の追加追跡調査期間における大腸がんのSIRは観察例0、期待値0.6を反映している。

1,025名のアラクロール製造労働者の内、701名(68%)が高暴露の可能性ありと分類された。これら的高暴露には、職業暴露と1968-1975年の想定された飲料水暴露が含まれていた。がん罹患率は、これら的高暴露労働者と 州の一般人口とで同等であった(18例、期待値14.6、SIR=1.2、95%CI 0.7-2.0)。飲料水の汚染が1974-1975年だけであったと仮定した分析の結果も同様な結果を示した(17例、期待値12.9、SIR=1.3、95%CI 0.8-2.1)。5年以上暴露し、少なくとも最初の暴露から15年間の期間のある労働者においてはがんの発症は4例、期待値は4.2であった(SIR=1.0、95%CI 0.3-2.4)。

特定のがんに対する分析の結果は、ほとんどの部位についてがんの発症なしか1例のみ、そして、大腸がん、慢性骨髄性白血病(CML)、ホジキン病、及びメラノーマについてわずかな増加を示し、その例数は、それぞれ3例、2例、2例及び2例であった。しかし、5年以上の暴露期間と15年以上の最初の暴露からの期間の労働者に、CMLまたはホジキン病の発症はなかった。CMLの発症例の内1例は、工場に雇用されてからすぐに診断されており、CMLの発病過程を考慮すると、 工場に雇用される前に病因があることが示唆される。5年以上暴露し、少なくとも最初の暴露から15年間の期間のある労働者における大腸がんの発症は、2例、期待値0.6であった(SIR=3.6、95%CI 0.4-12.9)。

412名のアラクロール製造のみに携わった労働者に焦点を当て、がん、大腸がん及びCMLの解析をさらに実施した。これらの労働者の多くは、製剤及び包装工程に従事してお

り、毎日、高暴露を受ける可能性が継続的であった。5年未満の暴露期間の労働者においてはがんの発症は7例、期待値4.5 (SIR=1.6、95%CI 0.6-3.2)、5年以上の暴露期間の労働者においてはがんの発症は2例、期待値2.1 (SIR=1.0、95%CI 0.1-3.4)であった。大腸がんの期待値0.6に対し、発症は0、CMLの期待値0.1に対し、発症は1例であった。

**総合考察:**この追加調査期間中、0.6の期待値に対し新たな大腸がんの発症は確認されず、先に報告された例数/期待値の比率は低下した。製剤及び包装工程に従事した労働者において大腸がんの発症が確認されていないこと、及び、アラクロールの代謝と排泄に大腸があまり関与していないことと併せて、今回の調査結果から、このコホートに観察された大腸がんとアラクロール暴露との因果関係はないとの解釈を支持していると考えられる。

この調査の主要な限界は、がん発症例数と死亡例が少ないことである。コホートはまだ比較的若く、追跡期間が比較的短い。もうひとつの限界は、現在も方法論が確立していない経皮職業暴露推計の難しさと工場の飲料水からの暴露に起因する暴露量の誤った分類の可能性である。

これらの限界はあるものの、得られた結果は、アラクロールに関連する健康リスクを評価する上で有用であると考えられる。この製造工場のコホートは、アラクロールに暴露した労働者のなかでも特徴的な集団である。アラクロールに暴露した労働者の大部分は、年間に数日もしくは数週間、農作業に従事し暴露するだけである。初期の製造工程における比較的高い毎日の暴露は農業場面における暴露を桁違いに上回っていたと推計されている。

これまでに集積された製造労働者における疫学データからは、アラクロール暴露に関連する検出できるほどの有害性は認められていない。

(2) 発がん性のメカニズム解明に関する特別試験

1) ラット及びマウスの選択臓器における細胞増殖に対するアラクロールの影響

(資料 参考-1)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1991年

目的:アラクロールによって誘発された腫瘍の発生メカニズムと細胞増殖の関連を考察するために、ラットの鼻甲介、甲状腺、肝臓及び腺胃におけるアラクロールの細胞増殖に対する影響を検討した。さらに、アラクロールはLong-Evans系ラットで鼻部腫瘍を誘発するが、マウスでは催腫瘍性を示さないため、アラクロールのラット鼻甲介の細胞増殖に対する影響をマウスと比較した。アラクロールが鼻部組織の細胞毒性を誘発するかどうかについても特に検討を行った。

検体の純度:

供試動物:

投与期間:

試験設計及び投与手順:

用量設定根拠；

検査項目：

細胞増殖の判定；

細胞毒性の検体(追加試験)；

結 果：

初回試験；

追加試験1;

追加試験2;

アラクロールは、ラットの鼻甲介の嗅部において、用量相関性のある細胞増殖の増加を引き起こすが、呼吸部では引き起こさなかった。この増加は、ラットにおける腫瘍発生のデータと相関関係があった。この反応はラットの他の組織にもマウスの鼻甲介にも認められなかった。また、この反応はアラクロールの投与を停止することにより回復した。細胞増殖率の増加は、自然発生性の突然変異の頻度を増加させ、その結果腫瘍発生を引き起こす。従って、これらの結果は、アラクロールが非遺伝毒性的細胞増殖依存機構により催腫瘍性作用を誘発する可能性があることを示唆するものである。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**図 1 ラット鼻甲介の呼吸部-嗅部結合における細胞増殖に対するアラクロールの影響**  
(原報告書 P.28 Figure1)

**図 2 ラット肝臓における細胞増殖に対するアラクロールの影響** (原報告書 P.29 Figure2)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**図 3 ラット腺胃における細胞増殖に対するアラクロールの影響** (原報告書 P.30 Figure3)

**図 4 ラット甲状腺における細胞増殖に対するアラクロールの影響** (原報告書 P.31 Figure4)

**図 5 Long-Evans系雌ラットの鼻甲介中の嗅部における細胞増殖に対する  
アラクロールの60日間混餌投与影響** (原報告書 P.32 Figure5)

**図 6 Long-Evans系雌ラットの鼻甲介中の嗅部における細胞増殖に対する  
回復期間の影響** (原報告書 P.33 Figure6)



図 7 CD-1系雌マウスの鼻甲介中の呼吸部における細胞増殖に対する  
アラクロールの10及び60日間混餌投与の影響 (原報告書 P.36 Figure9)

図 8 CD-1系雌マウスの鼻甲介中の嗅部における細胞増殖に対する  
アラクロールの10及び60日間混餌投与の影響 (原報告書 P.37 Figure10)

2) ラットの選択臓器における細胞増殖に対するアラクロールの影響

(資料 参考-2)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1993 年

目的:アラクロールによって誘発された腫瘍の発生メカニズムと細胞増殖の関連を考察するために、以前に実施した試験(資料 参考-1)の結果に基づき、ラットにおける鼻甲介、腺胃及び甲状腺の組織の細胞増殖に対するアラクロールの作用を更に解明した。

検体の純度:

供試動物:

投与期間:

試験設計及び投与手順:

結 果：  
死 亡 率；  
最終体重；  
検体摂取量；

細胞増殖の評価：  
鼻 甲 介；

腺 胃；

甲 状 腺；

化学物質による細胞増殖が、遺伝毒性のない化学物質の発がん過程に関与していることはすでに証明されている(Schulte-Hermann et al., 1981; Farber, 1979)。アラクロールには、有意な遺伝毒性あるいは変異原性の報告はなく、鼻甲介や腺胃における細胞増殖のような閾値の存在する非遺伝子障害性の過程が、腫瘍発生の機序に重要な役割を果たしていることが、この試験の結果から示唆された。

#### 参考文献

**図 1 10日間アラクロール暴露の鼻甲介嗅部における細胞増殖に対する影響**

(原報告書 P.22 Figure1)

**図 2 120日間アラクロール暴露の鼻甲介嗅部における細胞増殖に対する影響**

(原報告書 P.23 Figure2)

**図 3 10日間アラクロール暴露の腺胃における細胞増殖に対する影響**

(原報告書 P.24 Figure3)



**図 4 120日間アラクロール暴露の腺胃における細胞増殖に対する影響**

(原報告書 P.25 Figure4)

**図 5 10日間アラクロール暴露の甲状腺における細胞増殖に対する影響**  
(原報告書 P.26 Figure5)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**図 6 120日間アラクロール暴露の甲状腺における細胞増殖に対する影響**

(原報告書 P.27 Figure6)

3) ラットの肝臓及び鼻甲介におけるアラクロールDNA共有結合

(資料 参考-3)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1994年

目的:ラットに投与した $^{14}\text{C}$ -アラクロールの、*in vivo*における肝臓と鼻甲介のDNAへの共有結合を測定する。

検 体:

供 試 動 物:

試 験 方 法:

投 与 量;

DNAの分離/純度/放射濃度;

タンパクの分離;

結 果:

表 1 共有結合した放射能(平均値) (原報告書 P.22 Table2及びP.23 Table3)

表 2 組織への共有結合指数の計算(補正なし) (原報告書 P.24 Table4及びP.26 Table6)

表 3 組織への共有結合指数の計算(補正後) (原報告書 P.25 Table5及びP.27 Table7)

肝臓には、有意なDNAへの結合は認められなかった(CBIは $-0.13 \pm 0.89$ と計算された)鼻甲介には極めて僅かな結合が認められ、CBIは自動抽出の場合 $1.47 \pm 1.00$ 、手動抽出の場合 $1.66 \pm 1.24$ と計算された。しかし、この結合程度は従来文献に報告されている種々の既知の発癌性物質に対する値と比較して極めて低いものである。従って、本データはアラクロールのLong-Evans系ラットを用いた飼料混入投与による慢性毒性試験で見られた鼻甲介の腫瘍発生に対する作用メカニズムを説明するものでなく、このデータには生物学的な有意性はないものと結論された。

4) ラットの鼻甲介組織におけるアラクロールのタンパク共有結合

(資料 参考-4)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1995年

目的: Long-Evans系ラットを用いた飼料混入投与による慢性毒性試験において、投与に関連する腫瘍の発生がラットの鼻部に認められた。ラットの鼻部組織は、アラクロールを代謝物 ( ) の前駆体である4-アミノ-3,5-ジエチルフェノールへと代謝する酵素を含んでいることが知られている (Feng and Patanella, 1988; Li et al., 1990; 1992)。そのものはキノイミンであって、細胞のタンパク質との反応性が高いため、組織からの単離は難しい。

この試験では新たな分析法を用いてラットの鼻部タンパク質に対するアラクロールの結合の特性を確認し *in vivo*において生成したアラクロール-タンパク付加体の分析によって、結合した求電子的代謝物の由来を解明した。特に催腫瘍性の疑われる との結合能に注目した。

検体の純度:

供試動物:

投与期間:

投与方法:

用量設定の根拠:

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率;

組織の特徴;

試料調製と酸加水分解;

加水分解物のHPLC;

本試験の結果から、ラットの鼻部組織に生成するアラクロールの主要なタンパク付加体はキノニン、  
に由来するものであったことがわかった。これはラットの鼻部はアラクロールを に代謝することが  
できるという現在の仮説を支持している(Feng and Patanella, 1998; Gant et al., 1988; Li et al., 1992) と  
構造の似通った物質、たとえばN-アセチルベンゾキノニンイミンは細胞毒性をもっている(Fernando et al.,  
1980; Gant et al., 1988; Albano et al., 1985; Ecker et al., 1989)。

ラットの鼻部組織において が生成することはアラクロールによるラットにおける鼻部腫瘍の誘導に関  
わる極めて重要なステップであると考えられるが、以前に実施した試験から、アラクロールの への代謝  
活性化は種依存性の高い現象であることも明らかになっている。ラットの鼻部組織はアラクロールを の  
前駆体、DEAフェノールに変換する能力がサルの鼻部組織の能力に比べて30倍も高い。ラットの鼻部組織  
はアラクロールをDEA フェノールに変換する能力がヒトの鼻部組織の能力に比べて24,000倍も高い(Asbury  
et al., 1994)。

本試験の結果は生体内において の生成を実証し、*in vitro*での代謝試験の結果と合わせて、アラク  
ロールによる発がんメカニズムが非常に種特異的なものでありラットがヒトにおけるリスク評価においては適切  
なモデルでないことを示唆している。

#### 参考文献



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

5) ラットの鼻甲介組織における細胞毒性に及ぼすアラクロールの影響に関する試験

(資料 参考-5)

試験機関

[GLP対応]

報告書作成年 1995 年

目的: アラクロール及び代謝物がLong-Evans系ラットの鼻甲介の移植片に対して細胞毒性を示すかどうかを *in vitro* で検討した。細胞毒性の反応は培地中において誘起される細胞内マーカー(例えば酸性ホスファターゼ)の放出を測定して、検定した。

試験設計:

検体:

試験方法:

検体の調製;

供試動物;

組織の移植片の調製;

移植片の培養;

酸性ホスファターゼの測定;

統計解析；

結 果：

アラクロールは、鼻部組織の嗅部の移植片に対し、1mM及び5mMの両濃度とも細胞障害を誘起したが、呼吸部の移植片は細胞障害を示さなかった。この部位特異性は、細胞増殖反応で見られた部位特異性と一致していた。従って、この試験の結果から、細胞毒性がアラクロール投与後のラットの鼻部組織に見られた細胞増殖と関連があることが示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社にある。

**表 1 嗅部の酸性ホスファターゼの放出量(対照区に対する百分率)**

(原報告書 P.23 TABLE1)

**表 2 呼吸部の酸性ホスファターゼの放出量(対照区に対する百分率)**

(原報告書 P.24 TABLE2)