

## 10. 変異原性

### (1) CYAP 原体の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 10-1)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

報告書作成年：1976年

検体：CYAP 原体

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2 *hcr*-株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。S9 mix 非存在下では 100、1000 および 10000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA1535 および WP2 *hcr*-株) または 100、500 および 1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA98、TA100、TA1537 および TA1538 株)、S9 mix 存在下では 10、100 および 1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 3 濃度で試験を実施した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は 2 連制とし、プレート法で試験を 1 回行った。

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、 $\beta$ -プロピオラクトン、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-アミノアントラセンでは、各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、CYAP 原体は代謝活性化の有無にかかわらず本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断した。

(表中の数値は、2連の平均値<sup>1)</sup>)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2 <sub>hcr</sub>	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	80	36	16	16	8	10	
CYAP 原体	100	-	118	16	31	13	7	13	
	500	-	116	NT	NT	14	8	10	
	1000	-	119	29	24	10	11	7	
	10000	-	NT	0	23	NT	NT	NT	
陽性 対照	AF-2	0.05	-	1474	NT	NT	NT	NT	NT
		0.1	-	NT	NT	NT	643	NT	NT
		0.25	-	NT	NT	2246	NT	NT	NT
	$\beta$ -PL	50	-	NT	1319	NT	NT	NT	NT
	9-AA	200	-	NT	NT	NT	NT	>10000	NT
	2-NF	50	-	NT	NT	NT	NT	NT	2640
溶媒対照 (DMSO)	0	+	123	10	18	20	6	9	
CYAP 原体	10	-	169	11	30	26	8	17	
		+	133	10	18	22	9	15	
	100	-	169	13	18	26	3	15	
		+	140	10	24	18	10	12	
	1000	-	134	10	22	25	7	10	
		+	142	9	22	16	7	12	
陽性 対照	2-AA	-	283	9	NT	35	26	26	
		+	2458	331	NT	2236	487	2233	
	AF-2	0.05	-	1021	NT	NT	NT	NT	NT
		0.1	-	NT	NT	NT	265	NT	NT
		0.25	-	NT	NT	1578	NT	NT	NT

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

$\beta$ -PL :  $\beta$ -プロピオラクトン

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-NF : 2-ニトロフルオレン

2-AA : 2-アミノアントラセン

NT : 試験せず

申請者注 1) : 2連の平均値は報告書には記載されていないが、個別データより算出して記載した。

(2) CYAP 原体の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 10-2)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：1989 年

検体：CYAP 原体

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は 2 連制とし、プレインキュベーション法で本試験を 2 回、追加試験を 1 回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁以降の表に示した。

ネズミチフス菌においては S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの濃度においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、大腸菌において、S9 mix の存在下および非存在下ともに復帰変異コロニー数が濃度依存的に増加し、5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  では溶媒対照群の 2 倍を若干越える値を示した。追加試験を行った結果、復帰変異コロニー数は濃度依存的に増加したが、10000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  まで実施しても、S9 mix の存在下で溶媒対照値の 2.1 倍、非存在下で溶媒対照値の 2.6 倍の軽微な増加に留まった。

なお、陽性対照として用いた *N*-エチル-*N*-ニトロ-*N*-ニトログアニジン、2-ニトロフルオレン、9-アミノアクリジン、アジ化ナトリウム、メタンスルホン酸メチル、ベンゾ[a]ピレン、2-アミノアントラセンでは、各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、CYAP 原体は代謝活性化存在下および非存在下の WP2uvrA 株に対して弱い復帰変異誘発性を有すると判断した。

本試験 1

表中の数値は2連の平均値

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	92	16	17	33	10	10	
CYAP 原体	100	-	116	12	19	27	10	10	
	200	-	129	12	15	18	9	11	
	500	-	133	15	21	18	6*	10	
	1000	-	138	9	21	23	2*	7	
	2000	-	67*	5*	32	14	2*	T	
	5000	-	T	T	38	T	T	T	
陽性 対照	MMS	200	-	411	NT	NT	NT	NT	NT
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	NT	349	NT	NT	NT	NT
	ENNG	2	-	NT	NT	315	NT	NT	NT
	2-NF	1	-	NT	NT	NT	268	NT	NT
		2	-	NT	NT	NT	NT	NT	655
9-AA	80	-	NT	NT	NT	NT	1168	NT	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	80	9	19	49	19	29	
CYAP 原体	100	+	97	14	23	34	16	26	
	200	+	98	16	22	36	9	25	
	500	+	110	11	25	43	8	18	
	1000	+	79	9	29	42	2	16	
	2000	+	43*	6	33	18*	T	9*	
	5000	+	T	T	48	T	T	T	
陽性 対照	BP	5	+	732	NT	NT	535	242	275
	2-AA	2	+	NT	228	NT	NT	NT	NT
		20	+	NT	NT	550	NT	NT	NT

MMS : メタンサルホン酸メチル

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

ENNG : *N*-エチル-*N*'-ニトロ-*N*-ニトログアニジン

2-NF : 2-ニトロフルオレン

9-AA : 9-アミノアクリジン

BP : ベンゾ[a]ピレン

2-AA : 2-アミノアントラセン

\* : 致死作用が認められた

T : 致死作用のため復帰変異コロニー数計数不可

NT : 試験せず

本試験 2

表中の数値は2連の平均値

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	95	11	24	24	7	20	
CYAP 原体	100	-	107	19	20	28	7	18	
	200	-	99	6	21	25	10	13	
	500	-	116	9	21	15	9	7	
	1000	-	133	7	20	17	8*	7	
	2000	-	86*	4*	36	11	4*	T	
	5000	-	T	T	36	T	T	T	
陽 性 対 照	MMS	200	-	291	NT	NT	NT	NT	NT
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	NT	416	NT	NT	NT	NT
	ENNG	2	-	NT	NT	357	NT	NT	NT
	2-NF	1	-	NT	NT	NT	240	NT	NT
		2	-	NT	NT	NT	NT	NT	708
9-AA	80	-	NT	NT	NT	NT	1377	NT	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	72	12	25	45	15	27	
CYAP 原体	100	+	84	13	27	39	10	27	
	200	+	80	6	27	33	16	25	
	500	+	99	5	23	40	10	25	
	1000	+	94	17	35	36	6	19	
	2000	+	35*	4	44	9*	T	8	
	5000	+	T	T	52	T	T	T	
陽 性 対 照	BP	5	+	732	NT	NT	711	247	178
	2-AA	2	+	NT	236	NT	NT	NT	NT
		20	+	NT	NT	663	NT	NT	NT

MMS : メタンサルホン酸メチル

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

ENNG : *N*-エチル-*N*-ニトロ-*N*-ニトログアニジン

2-NF : 2-ニトロフルオレン

9-AA : 9-アミノアクリジン

BP : ベンゾ[a]ピレン

2-AA : 2-アミノアントラセン

\* : 致死作用が認められた

T : 致死作用のため復帰変異コロニー数計数不可

NT : 試験せず

追加試験

表中の数値は2連の平均値

(3) CYAP 原体のチャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞 (CHO-K1) を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 10-3)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：1989 年

検体：CYAP 原体

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの卵巣由来培養細胞 (CHO-K1) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で検体の染色体異常誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、S9 mix 存在下では 6 時間、非存在下では 24 時間および 48 時間細胞を処理した。染色体異常の観察は 1 濃度あたり 100 個 (倍数体については 400 個) の分裂中期像について行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

S9 mix 非存在下では、0.122g/mL (24 時間処理群) および 0.0730g/mL (48 時間処理群) において染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の有意な増加が認められた。S9 mix 存在下では 0.0973~0.195g/mL において構造異常を有する細胞の出現頻度の有意かつ濃度依存的な増加が認められ、倍数体を有する細胞の出現頻度も有意に増加した。なお、陽性対照として用いたマイトマイシン C およびベンゾ[a]ピレンは構造異常を有する細胞の出現頻度を明らかに増加させた。

以上の結果より、CYAP 原体は代謝活性化存在下および非存在下のチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-K1) に対して染色体異常誘発性を有すると判断した。



薬物	濃度 (g/mL)	処理時間 (h)	S9 mix の有無	観察細胞数	構造異常								異常細胞数 (%)	倍数体細胞 (%)	細胞増殖率 (%)	
					ギャップ	染色分体型		染色体型		断片化	多重異常	ギャップを含む				ギャップを除く
						切断	交換	切断	交換							
溶媒対照 (DMSO)	0	24	-	100	0	3	1	0	0	0	0	4	4	3.8		
CYAP 原体	0.0243	24	-	100	2	0	0	0	0	0	0	2	0	3.3		
	0.0486	24	-	100	3	2	0	0	0	0	4	2	2.8			
	0.0730	24	-	100	3	5	0	1	0	0	9	6	4.0			
	0.122	24	-	100	10	20	2	1	0	0	26**	18**	2.5			
陽性対照 (MMC)	0.005	24	-	100	1	12	27	3	1	0	0	38**	37**	2.0		
溶媒対照 (DMSO)	0	48	-	100	1	4	0	0	0	0	0	3	2	5.3	100	
CYAP 原体	0.0243	48	-	100	1	1	0	0	0	0	0	2	1	3.0	105	
	0.0486	48	-	100	4	3	0	0	0	0	0	6	3	1.0	66.8	
	0.0730	48	-	100	10	29	1	0	0	0	0	25**	19**	2.3	43.0	
	0.122	48	-	Tox	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24.7	
陽性対照 (MMC)	0.005	48	-	100	11	19	31	1	0	0	1	52**	47**	2.0	68.4	
溶媒対照 (DMSO)	0	6-18 <sup>a</sup>	+	100	1	0	3	2	0	0	0	4	3	1.8	100	
CYAP 原体	0.0486	6-18 <sup>a</sup>	+	100	5	1	2	2	0	0	0	9	5	7.5**	80.7	
	0.0973	6-18 <sup>a</sup>	+	100	3	9	10	1	0	0	0	20**	17**	11.0**	64.8	
	0.146	6-18 <sup>a</sup>	+	100	8	14	13	0	0	0	0	23**	22**	7.3**	40.9	
	0.195	6-18 <sup>a</sup>	+	100	6	16	17	0	1	0	0	29**	26**	5.0**	13.3	
陽性対照 (BP)	0.063	6-18 <sup>a</sup>	+	100	6	13	61	13	1	0	0	55**	55**	2.8	78.8	

多重異常：10個以上の異常を有する細胞

MMC：マイトマイシンC

BP：ベンゾ[a]ピレン

a：検体で6時間処理し、培地交換後さらに18時間培養。

Tox：毒性が強く分裂中期像がないため観察不可。

\*\*：P < 0.01 ( $\chi^2$ 検定)

(4) CYAP 原体のマウスを用いた小核試験

(資料 10-4)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：1989 年

検体：CYAP 原体

検体純度：

供試動物：ICR 系雄マウス、9 週齢、体重 34.8~46.2 g (経時変化試験)、  
36.7~44.2 g (用量依存性試験)、1 群 5 匹

試験方法：検体をコーンオイルに溶解し、10 mL/kg の投与液量で 1 回経口投与した。

経時変化試験では検体を 600 mg/kg の割合で投与後 24、48、72 時間に、用量依存性試験では検体を 150、300、600 mg/kg の割合で投与後 24 時間に、各動物から大腿骨の骨髓を採取した。スライドグラス上にメタノールで固定後、5%ギムザ溶液で染色して骨髓標本作製した。各個体あたり 1000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球の出現頻度を調べた。また、骨髓に対する細胞毒性を調べるために、各個体あたり 1000 個の全赤血球 (多染性赤血球および正染性赤血球) を観察し、多染性赤血球の割合を調べた。

溶媒対照群はコーンオイルを、陽性対照群はシクロホスファミド 80 mg/kg を 1 回経口投与した。

投与量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体投与群では、経時変化試験および用量依存性試験とも、いずれの標本作製時間、いずれの投与量においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。また、いずれの標本作製時間、いずれの投与量においても骨髓細胞に対する毒性の指標である多染性赤血球の割合に有意な減少は認められなかった。

一方、陽性対照のシクロホスファミド投与群では小核を有する多染性赤血球の出現頻度に明らかな増加が認められた。

以上の結果より、CYAP 原体は本試験条件下においてマウス骨髓多染性赤血球に対して小核を誘発せず、染色体異常誘発性は有しないと判断した。

試験	薬物	投与量 (mg/kg)	採取 時間	使用 動物数	PCE/(PCE+NCE) (%) <sup>a)</sup> (平均±SD)	MNPCE (%) <sup>b)</sup> (平均±SD)
経時変化試験	溶媒対照 (コーンオイル)	0 <sup>c)</sup>	24	5	42.9±3.3	0.12±0.04
	CYAP 原体	600	24	5	41.5±6.0	0.14±0.13
			48	5	40.1±3.8	0.14±0.11
			72	5	48.4±10.7	0.16±0.09
	陽性対照 (CP)	80	24	5	30.3±6.7**	5.12±2.54**
用量依存性試験	溶媒対照 (コーンオイル)	0 <sup>c)</sup>	24	5	46.9±7.0	0.10±0.10
	CYAP 原体	150	24	5	51.2±4.8	0.14±0.05
		300	24	5	47.9±7.5	0.08±0.13
		600	24	5	52.8±6.5	0.18±0.13
	陽性対照 (CP)	80	24	5	30.7±8.0*	3.26±1.15**

PCE : 多染性赤血球、

NCE : 正染性赤血球

MNPCE : 多染性赤血球 1000 個のうち小核を有する多染性赤血球の出現頻度

CP : シクロホスファミド

a) \* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$  (t 検定)

b) \*\* :  $p < 0.01$  (Kastenbaum-Bowman の方法)

c) 10 mL/kg

(5) CYAP 原体の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 10-1)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

報告書作成年：1976 年

検体：CYAP 原体

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換修復機構欠損株 (M-45) および野生株 (H-17) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

両菌株を寒天培地上にストリークし、検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して溶液 0.02 mL を直径 10 mm のろ紙に添加して、ストリークの開始点に置いた。一晚培養後、菌の生育阻止帯の長さを測定した。試験は 1、5、10、25、50 および 100% (v/v) の 6 濃度で、1 連制で試験を 1 回実施した。

試験結果：結果を下表に示した。

薬物	濃度 (%)	S9 mix の有無	阻止帯 (mm)		差 (mm)
			M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)	0 <sup>a)</sup>	—	0	0	0
CYAP 原体	1	—	<1	0	<1
	5	—	<1	0	<1
	10	—	<1	0	<1
	25	—	<1	0	<1
	50	—	<1	0	<1
	100	—	<1	0	<1
陰性対照 (カナマイシン)	10 µg/ ディスク	—	8	5.5	2.5
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.1 µg/ ディスク	—	11	1	10

a) 20 µL/ディスク

検体は、いずれの濃度においても H-17 株と M-45 株の間にほとんど生育阻止帯を認めなかった。一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、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、CYAP 原体は本試験条件下において DNA 損傷誘発性を有しないと判断した。

(6) CYAP 原体の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 10-5)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：1988 年

検体：CYAP 原体

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換修復機構欠損株 (M-45) および野生株 (H-17) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。両菌株の孢子を調製し、S9 を添加または無添加で寒天培地に加えて孢子プレートを作成した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、溶液 0.01 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、2 日間培養後、生じた菌の生育阻止円径を測定し阻止帯の差を求めた。試験は 2 連制で、試験を 2 回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表 1 および表 2 に示した。

S9 mix 非存在下では、M-45 株において 100  $\mu\text{g}$ /ディスク以上の濃度で、また、H-17 株においては 5000  $\mu\text{g}$ /ディスク以上の濃度で検体による生育阻止帯が認められた。S9 mix 存在下では、M-45 株において 100  $\mu\text{g}$ /ディスク以上の濃度で検体による生育阻止帯が認められたが、H-17 株では 10000  $\mu\text{g}$ /ディスクの濃度においても生育阻止帯は認められなかった。S9 mix 存在下および非存在下ともに、検体処理により H-17 株と M-45 株の生育阻止帯の間に明瞭な差 (3 mm 以上) が認められ、結果の再現性が認められた。なお、陽性対照として用いたマイトマイシン C またはステリグマトシスチンでは両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシンでは同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、CYAP 原体は代謝活性化存在下および非存在下の本試験条件下において DNA 損傷誘発性を有すると判断した。

表1 S9 mix 非存在下

表中の数値は2連の平均値

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ ディスク)	試験1			試験2		
		阻止円径 (mm)		差 <sup>a)</sup> (mm)	阻止円径 (mm)		差 <sup>a)</sup> (mm)
		M-45	H-17		M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)	0	<8	<8	0	<8	<8	0
CYAP 原体	100	9.6	<8	1.6	12.9	<8	4.9
	200	12.3	<8	4.3	14.1	<8	6.1
	500	12.8	<8	4.8	15.4	<8	7.4
	1000	14.1	<8	6.1	15.5	<8	7.5
	2000	14.4	<8	6.4	16.6	<8	8.6
	5000	16.1	9.5	6.6	17.0	9.9	7.1
	10000	16.1	10.4	5.7	17.7	10.5	7.2
陰性対照 (カナマイシン)	3	21.4	20.4	1.0	20.5	21.3	-0.8
陽性対照 (マイトマイシンC)	0.3	46.1	33.2	12.9	49.7	33.3	16.4

a) : (M-45株における阻止円径) - (H-17株における阻止円径)

表2 S9 mix 存在下

表中の数値は2連の平均値

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ ディスク)	試験1			試験2		
		阻止円径 (mm)		差 <sup>a)</sup> (mm)	阻止円径 (mm)		差 <sup>a)</sup> (mm)
		M-45	H-17		M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)	0	<8	<8	0	<8	<8	0
CYAP 原体	100	10.9	<8	2.9	11.7	<8	3.7
	200	10.7	<8	2.7	12.3	<8	4.3
	500	11.5	<8	3.5	12.3	<8	4.3
	1000	11.2	<8	3.2	13.3	<8	5.3
	2000	11.6	<8	3.6	13.0	<8	5.0
	5000	12.8	<8	4.8	14.3	<8	6.3
	10000	15.2	<8	7.2	16.1	<8	8.1
陰性対照 (カナマイシン)	3	18.9	20.2	-1.3	20.5	20.8	-0.3
陽性対照 (ステリグマト シスチン)	3	14.5	<8	6.5	14.2	<8	6.2

a) : (M-45株における阻止円径) - (H-17株における阻止円径)

(7) CYAP 原体のラット肝細胞を用いた *in vivo* / *in vitro* 不定期 DNA 合成試験

(資料 10-6)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：1989 年

検体：CYAP 原体

検体純度：

供試動物：Sprague-Dawley 系雄ラット、7~8 週齢、体重 249~333 g、1 群 3 匹

試験方法：検体をコーンオイルに溶解し、200 mg/kg の投与量で 1 回経口投与した。投与 3、12 および 24 時間後に肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流した後、摘出した肝細胞を分離した。10%牛胎児血清を含むウィリアムス E 培地で培養した肝細胞を、<sup>3</sup>H-チミジンを添加した培地中で 4 時間培養し、さらに非標識チミジンを含むウィリアムス E 培地中で 16 時間培養した。その後、細胞をエタノール：酢酸 = 3：1 で固定し、オートラジオグラフィ用標本を作製した。

肝細胞を 1 匹あたり 50 個（各群 150 個）観察し、核と同じ面積の細胞質粒子数を差し引いた正味の核内粒子数が 5 個以上の細胞を、DNA の修復が起こっている（不定期 DNA 合成（UDS）陽性細胞）と判断し、UDS 陽性細胞の割合が 20% を超えた場合に陽性と判定した。また正味の核内粒子数について検体処理群と溶媒対照群の一元配置分散分析を実施した。

投与量設定根拠：

結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、3 時間処理および 12 時間処理によって肝細胞生存率を有意に低下させたが、いずれの処理時間においても、正味の核内粒子数の有意な増加は認められず、UDS 陽性細胞の割合も溶媒対照群と比較して差は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-アセチルアミノフルオレンは正味の核内粒子数および UDS 陽性細胞の割合を明らかに増加させた。

以上の結果より、CYAP 原体は本試験条件下においてラット肝細胞に不定期 DNA 合成を誘発せず、DNA 損傷性を示さないと判断した。



薬剤	投与量 (mg/kg)	処理 時間 (時間)	動物 数	肝細胞生存率% (平均値±SD)	正味の 核内粒子数 <sup>a)</sup> (平均値±SD)	UDS 陽性細胞 <sup>b)</sup> (計)
溶媒対照 (コーン オイル)	0 <sup>c)</sup>	12	3	80.3	-0.9±3.2	2/50
				72.0	-2.7±3.8	0/50
				85.2	-2.5±3.3	1/50
				(79.2±6.7)	(-2.0±1.0)	(3/150)
CYAP 原体	200	3	3	38.6	-2.0±4.1	2/50
				47.2	-2.0±3.3	0/50
				66.3	-6.4±5.0	0/50
		(50.7±14.2)*	(-3.5±2.5)	(2/150)		
		12	3	68.7	-2.7±4.1	1/50
				64.7	-2.1±3.3	1/50
	50.8			-2.2±3.6	0/50	
	(61.4±9.4)*	(-2.3±0.3)	(2/150)			
	24	3	79.4	-1.8±3.1	0/50	
			85.1	-3.0±3.6	2/50	
			80.4	-3.1±3.5	1/50	
	(81.6±3.0)	(-2.6±0.7)	(3/150)			
陽性対照 (2-AAF)	50	12	3	81.3	23.3±5.0	50/50
				82.6	20.1±5.4	50/50
				59.6	16.1±7.0	46/50
				(74.5±12.9)	(19.8±3.6)**	(146/150)

a) 各動物より 50 個の細胞を観察

b) 正味の核内粒子数を 5 個以上持つ細胞数/観察細胞数

c) 5 mL/kg

2-AAF: 2-アセチルアミノフルオレン

\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01 (一元配置分散分析)

(8) CYAP 原体のマウスを用いた宿主経路試験および細菌を用いた復帰突然変異試験  
(資料 10-1)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

報告書作成年：1976年

検体：CYAP 原体

検体純度：

供試動物：ICR 系雄マウス、7 週齢、体重  $32.4 \pm 1.8$  g、1 群 6 匹

試験方法：検体を 100 および 200 mg/kg の投与量でマウスに 24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。2 回目の投与直後、ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* G46 株) を腹腔内に注入し、その 3 時間後に腹腔内菌液を回収し、突然変異率を求めた。溶媒対照にはコーンオイル、陽性対照にはジメチルニトロソアミン (DMN) を用いた。

また、ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*S. typhimurium* G46 株) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 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。試験は 2 連制とし、100、500、1000 および 10000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 4 濃度で、プレート法で 1 回行った。陽性対照として  $\beta$ -プロピオラク톤を用いた。

投与量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体投与群では溶媒対照群と比較して、突然変異率の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群の DMN では溶媒対照群と比較して突然変異率の有意な増加が認められた。また、G46 株を用いた *in vitro* における復帰突然変異試験の結果は陰性であった。

以上の結果より、CYAP 原体は本試験条件下で突然変異誘発性を有しないと判断した。

表 1 宿主經由試験成績

表中の数値は3連の平均値

薬物	総投与量 (mg/kg/日 × 回数)	復帰変異 菌数/mL	生存菌数 × 10 <sup>8</sup> /mL	復帰変異菌数/生存菌数 × 10 <sup>8</sup>	
				平均値±標準偏差	
溶媒対照 (コーン オイル)	0 <sup>a)</sup>	19.17	65.5	0.29	0.42±0.13
		24.17	39.9	0.61	
		27.50	48.9	0.56	
		20.00	52.3	0.38	
		15.00	51.9	0.29	
		19.17	49.9	0.38	
CYAP 原体	100 × 2	30.83	36.7	0.84	0.49±0.20
		28.33	57.8	0.49	
		12.50	55.0	0.23	
		25.00	48.8	0.51	
		26.67	65.5	0.41	
		26.67	61.4	0.43	
	200 × 2	17.50	32.4	0.54	0.59±0.18
		14.17	26.0	0.54	
		15.00	41.9	0.36	
		20.00	34.8	0.57	
		22.50	37.2	0.60	
		33.33	36.1	0.92	
陽性対照 (DMN)	50	2320.00	32.2	72.05	115.38±51.04**
		4033.33	53.7	75.11	
		5253.33	42.7	123.03	
		5893.33	34.0	173.33	
		7890.00	44.1	178.91	
		4136.67	59.2	69.88	

\*\* : p < 0.01 (Aspin-Welch の t 検定、両側)

a) 20 mL/kg

DMN : ジメチルニトロソアミン

表 2 復帰突然変異試験 (*S. typhimurium* G46 株)

濃度 (µg/プレート)	CYAP 原体					β-プロピオ ラクトン
	0	100	500	1000	10000	1000
復帰変異コロニー数 /プレート	2	5	3	2	7	112
	2	1	3	4	10	127

### 1 1. 生体機能への影響に関する試験

#### CYAP 原体の生体機能への影響に関する試験

(資料 1-3)

文献名：応用薬理(1971) 5(1) 75-86

検 体：CYAP 原体

検体純度：

マウスおよびネコの中樞神経系に対する作用

#### (1) マウスの一般症状および行動に対する作用

供試動物：dd系雄マウス、体重；約 20 g、1群各 10 匹

投与方法：検体を Sorpoll200 で乳化した後に注射用生理食塩水で希釈し、胃ゾンデによる経口投与および腹腔内投与を行った。投与液量は 10 mL/kg とし、投与量は経口投与は 500、800、1000、2000 および 3000 mg/kg、腹腔内投与は 500、600、800、1000、2000 および 3000 mg/kg とした。全ての群において生死を 72 時間観察した。また、1000 mg/kg 群においては、生死および一般症状を 72 時間観察した。

結 果：経口投与では、500 mg/kg の投与量では死亡は認められなかったが、800、1000、2000 および 3000 mg/kg の投与量でそれぞれ 4、5、8 および 10 例が死亡した。1000 mg/kg 群では、投与後 30 分より自発運動減少、呼吸促進がみられ、投与後 60 分には呼吸困難、間代性痙攣が出現し、次に流涎、軟便、全身性振戦を呈した。投与後 160 分より死亡例が出現した。  
腹腔内投与では 500 mg/kg の投与量では死亡は認められなかったが、600、800、1000、2000 および 3000 mg/kg の投与量でそれぞれ 3、5、6、8 および 10 例が死亡した。1000 mg/kg 群では、投与後 5 分から自発運動減少、呼吸困難、流涎、間代性痙攣、全身性振戦および硬直性麻痺状を呈し、投与後 20 分には死亡する例を認めた。

#### (2) ネコの脳波および脳局所循環に対する作用

供試動物：ネコ、体重；2~4 kg

投与方法：検体を 1/10 量の Sorpoll200 で乳化後、生理的食塩水で希釈し静脈内投与した。

脳波は投与量 1、5 および 10 mg/kg で測定した。皮質脳波を真鍮のビスを電極として感覚野より、また、深部脳波を海馬に挿入したエナメル線を用い双

極誘導により記録した。

脳血流は投与量 1、5 および 10 mg/kg で測定した。萩原氏によるダブルサーミスター法に従い、深部脳波誘導電極と対側の海馬並びに視床下部腹内側核にダブルサーミスターを挿入して実施し、また同部の温度を併せて測定した。

結果：脳波；皮質脳波では、1 mg/kg 投与では変化を認めなかったが、5 mg/kg 以上の投与において、一過性の低振幅速波が投与直後から出現した。海馬波では、10 mg/kg の投与でも著明な変化はなかった。

脳局所血流量に対する作用；海馬の血流量は、10 mg/kg の投与でも変化を示さなかった。視床下部腹内側核の血流量では、1 mg/kg 投与に影響はなかったが、5 mg/kg 投与で一過性の血流増加が認められ、10 mg/kg 投与ではその増加が強められた。増加の持続時間は 5 mg/kg 投与と 10 mg/kg 投与で同程度であった。

### (3) *In vitro*におけるマウス脳コリンエステラーゼ (ChE) に対する作用

供試動物：マウス

試験方法：マウス脳における ChE 調製法および ChE 活性測定方法は村野等の方法に準拠した。生成した酢酸を 1/100 N 水酸化ナトリウムで適定し、10 分間における 1/100 N 水酸化ナトリウム消費量を ChE 活性値とした。反応開始と同時に検体を  $2.3 \times 10^{-6}$ 、 $2.3 \times 10^{-5}$ 、 $2.3 \times 10^{-4}$ 、 $2.3 \times 10^{-3}$  および  $2.3 \times 10^{-2}$  M の濃度で添加してその効果を調べた。また、エゼリンの抑制効果と比較した。

結果：検体添加による ChE 抑制は特異的に観察され  $7 \times 10^{-3}$  M で約 50%であった<sup>1)</sup>。エゼリンの抑制と比較すると、検体の  $2.3 \times 10^{-6}$  M では殆ど抑制はみられないが、エゼリンでは  $2.3 \times 10^{-6}$  M で約 70%が抑制され、検体の  $2.3 \times 10^{-5}$  M では 10%の抑制であったが、エゼリンの  $2.3 \times 10^{-5}$  M では 83.4%の抑制であった。検体のマウス脳における ChE 活性抑制はエゼリンに比し遙かに弱かった。

### ラットの骨格筋に及ぼす作用

#### (1) ラット神経筋接合部に対する作用

供試動物：ドンリュウ系雄ラット、体重；250～300 g

申請者注 1)：ChE を 50%抑制する濃度について

報告書本文中には「抑制%は  $7 \times 10^{-4}$  M で約 50%」と記載されているが、報告書の表中の数値より 50%抑制濃度は  $7 \times 10^{-3}$  M が正しいと判断した。

試験方法：摘出横隔神経 - 横隔膜標本を Bübring 法に準拠して作製した。栄養液は 37°C、混合ガス (5% CO<sub>2</sub>、95% O<sub>2</sub>) 飽和の Krebs-bicarbonate 液を用いた。神経刺激には白金電極を、筋直接刺激には銅電極を用いて、持続時間 0.1 ~ 3 msec、頻度 0.1/sec、強度 10~15V の矩形波電気刺激を 1 分間隔で交互に加えた。検体は 1 × 10<sup>-6</sup>、5 × 10<sup>-6</sup>、1 × 10<sup>-5</sup> および 5 × 10<sup>-5</sup> g/mL の濃度で適用した。

結果：検体の 10<sup>-6</sup> g/mL 以下の適用では、筋直接刺激および間接刺激による横隔膜収縮には影響を与えなかった。5 × 10<sup>-6</sup> g/mL 適用で直接刺激による収縮は軽度ながら抑制され、その効果は 10<sup>-5</sup> g/mL 適用で著明となった。一方、間接刺激では収縮が増強され、その効果は 5 × 10<sup>-5</sup> g/mL で著明となった。

ネコおよびウサギの循環器系に対する作用

(1) ネコの血圧および心電図に対する作用

供試動物：ネコ、体重；2~4 kg

投与方法：検体を 1/10 量の Sorpol1200 で乳化後、生理的食塩水で希釈し静脈内投与した。

血圧・心電図は投与量 1、5、10 および 20 mg/kg で測定した。股動脈に挿入したポリカニューレを電気血圧計に導き大腿動脈血圧を描記し、また、心電図撮影は右前肢と左後肢に固定した針電極より第 II 誘導法により行った。

結果：血圧は 1 mg/kg 投与で変化がなかったが、5 mg/kg 以上の投与において一時的に降下した。血圧降下は脊髄ネコでも正常ネコと同程度に認められ、アトロピン前投与により遮断されなかった。また、検体はノルアドレナリンの血圧上昇作用およびアセチルコリンの血圧下降作用には影響を与えなかった。心電図には 20 mg/kg 投与によっても変化を認めなかった。

(2) ウサギの心房および心室に対する作用

供試動物：ウサギ、体重；約 3 kg

試験方法：心臓を摘出し Ringer-Locke 液で血液を洗浄後に心房標本を作製した。同一心臓から右心室筋条片を作製し、パルス幅 2 msec、強さ 15V の矩形波電気刺激を 1 分間 60 回与えた。栄養液は 30°C、混合ガス (5% CO<sub>2</sub>、95% O<sub>2</sub>) 飽和の Ringer-Locke 液を用いた。検体は液槽内の終濃度が 1 × 10<sup>-8</sup>、7 × 10<sup>-8</sup>、1 × 10<sup>-7</sup>、3 × 10<sup>-7</sup>、7 × 10<sup>-7</sup> および 1 × 10<sup>-6</sup> g/mL となるよう適用した。

結 果：検体の  $10^{-8}$  g/mL 以下の適用では心房の拍動数および収縮力に影響はなかった。それより高い濃度を適用しても拍動数には影響を与えなかったが、収縮力は抑制された。この抑制作用は適用後 30 分後にほぼ平衡に達し、抑制の程度は  $7 \times 10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $3 \times 10^{-7}$  および  $7 \times 10^{-7}$  g/mL でそれぞれ 10、18、32 および 60% で、 $10^{-6}$  g/mL の適用後に心房運動は完全に停止した。この検体による心房収縮抑制作用はアトロピン  $10^{-5}$  g/mL 適用による影響を受けなかった。一方、ノルアドレナリン  $10^{-7}$  およびアセチルコリン  $3 \times 10^{-7}$  g/mL による心房筋収縮亢進および抑制作用は、検体の  $10^{-7}$  g/mL の前適用により影響を受けなかった。

心室筋の収縮力は検体の  $10^{-8}$  g/mL 適用により 20% 抑制され心房筋に対する作用に比しやや程度が強かった。ノルアドレナリンの心室筋収縮に対し検体は心房と同様に影響を与えなかった。

心房および心室筋収縮は検体の  $10^{-6}$  g/mL の適用で著明に抑制されたが、その溶媒相当量の Sorpol1200 単独適用では影響はなかった。

#### ウサギの自律神経系に対する作用

##### (1) ウサギの角膜および結膜に対する作用

供試動物：ウサギ、体重；2.5～3.5 kg

投与方法：検体をオリーブ油に 0.1% から 50% の濃度で溶解し、その 0.2 mL を片側眼の結膜嚢に点眼した。他側眼にはオリーブ油のみを点眼し対照とした。また、2% コカインと反応を比較した。

角膜中心部への刺激は先端を寒天で被覆した 1/4 注射針中のマンドリンを用いて行った。

結 果：検体 25% 以下の溶液では影響を認めなかった。50% 溶液では角膜および結膜反射を抑制し、その程度は 2% コカインと同程度であった。しかし、瞳孔の形状変化、結膜充血・炎症、催涙は観察されなかった。

#### ウサギの消化器に対する作用

##### (1) ウサギの摘出腸管に対する作用

供試動物：ウサギ、モルモット

試験方法：ウサギでは回盲部より口側の 10～15 cm の腸管を摘出し、タイロード液で内容物を洗浄し、2～3 cm に切った組織を 37°C、 $O_2$  飽和のタイロード液槽内に懸垂し、Magnus 法により運動および緊張を観察した。検体は液槽内の終濃度が  $1 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-7}$  および  $1 \times 10^{-6}$  g/mL となるよう適用した。

モルモットの摘出腸管標本をリンガー液を用いて作製し、その緊張を同様に測定した。腸管のヒスタミン収縮に対する作用も検討した。

結果：検体の  $10^{-8}$  g/mL 以下の適用に影響は見られなかった。 $3 \times 10^{-8}$  g/mL で腸管運動の振幅緊張および収縮緊張性は 10~20%抑制され、 $3 \times 10^{-7}$  g/mL では 50%抑制され、 $10^{-6}$  g/mL では腸管運動は強く抑制され完全に停止する例も認められた。検体による抑制はフェノキシベンザミンにより阻止されなかった。

検体はウサギ腸管のアセチルコリンおよび  $Ba^{2+}$  収縮並びにモルモット腸管のヒスタミン収縮に対して明らかな弛緩効果を示した。しかし、これら 3 薬物による腸管収縮に対する検体の  $3 \times 10^{-7}$  g/mL の弛緩は、それぞれの薬物に対し約 50%であり、本検体が抗アセチルコリン、抗  $Ba^{2+}$ 、または抗ヒスタミン作用を有するとはいい難い。

#### ウサギの動脈平滑筋に対する作用

##### (1) ウサギ摘出耳殻血管に対する作用

供試動物：ウサギ、体重；3~4 kg

試験方法：ヘパリン投与後頸動脈切断で放血死させた後 De La Lande 等の方法に従い摘出耳殻中心動脈灌流標本を作製した。摘出動脈の灌流はシャープ動脈内持続注入ポンプを用い、 $37^{\circ}\text{C}$ 、混合ガス (5%  $\text{CO}_2$ 、95%  $\text{O}_2$ ) 飽和の Krebs-bicarbonate 溶液約 5 mL/min で行った。検体の  $10^{-4}$ ~ $10^{-1}$  g/mL の濃度液を調製し、0.1 mL を灌流中に注入するか、または一定濃度の検体を含む灌流液にて環流することで動脈内腔より検体を作用させるか、あるいは正常 Krebs 溶液にて灌流しながら液槽内に検体を投与して動脈外側壁から作用させた。

結果：検体の  $10^{-1}$  g/mL 濃度液 0.1 mL を灌流液中に注入したところ、灌流圧および tonus に影響を与えなかった。

検体の  $10^{-3}$  g/mL を含む Krebs 液で 10~20 分間環流しても灌流圧および tonus に影響を与えなかった。しかし、ノルアドレナリンの灌流による灌流血圧の上昇は検体の  $10^{-1}$  g/mL 液 0.1 mL の注入により一過性に抑制された。検体の  $10^{-3}$  g/mL を血管外側壁から適用しても灌流圧および tonus に影響を与えなかった。ノルアドレナリンの血管外側壁からの適用による灌流血圧の上昇は、血管内から検体の  $10^{-2}$  および  $10^{-1}$  g/mL 液 0.1 mL を灌流液内に注入すると明らかに抑制された。



以上の結果、検体は ChE 阻害作用のほか、非特異的筋弛緩作用を有すると考えられた。ChE 阻害作用はエゼリンに比し遙かに弱かった。

サイアノックスの「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	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要	
中枢神経系	一般状態	マウス 経口 (Sorpoll200 および生理食 塩水)	500、800、 1000、 2000、 3000	雄 10	1000 でのみ症状 観察		30 分後に自発運動 減少、呼吸促進 60 分後に呼吸困難、 間代性痙攣、流涎、 軟便、全身性振戦 800、1000、2000 お よび 3000 mg/kg で それぞれ 4、5、8 お よび 10 例死亡	
		腹腔内 (Sorpoll200 および生理食 塩水)	500、600、 800、 1000、 2000、 3000	雄 10	1000 でのみ症状 観察		5 分後に自発運動減 少、呼吸困難、流涎、 間代性痙攣、全身性 振戦、硬直性麻痺 600、800、1000、2000 および 3000 mg/kg でそれぞれ 3、5、6、 8 および 10 例死亡	
	脳波	ネコ 静脈内 (Sorpoll200 および生理食 塩水)	1、5、10	雌雄 匹数不 明	5	1	皮質脳波；一過性の 低振幅速波 海馬波；変化無し	
	脳局所血流量 (海馬、 視床下部腹 内側核)	ネコ 静脈内 (Sorpoll200 および生理食 塩水)	1、5、10	雌雄 匹数不 明	5	1	海馬；変化無し 視床下部腹内側 核；一過性の血流量 増加	
脳コリンエ ステラーゼ	マウス	<i>In vitro</i>	2.3×10 <sup>-6</sup> 2.3×10 <sup>-6</sup> 2.3×10 <sup>-4</sup> 2.3×10 <sup>-3</sup> 2.3×10 <sup>-2</sup> M	—	2.3×10 <sup>-6</sup> M で 10% 抑制エ ゼリン の 2.3× 10 <sup>-6</sup> M で は 90%抑 制	2.3 ×10 <sup>-6</sup> M	検体の脳のコリン エステラーゼ活性 抑制はエゼリンに 比し遙かに弱い	
骨格筋	電気刺激に よる筋収縮 への効果	ラット	<i>In vitro</i>	1×10 <sup>-6</sup> 、 5×10 <sup>-6</sup> 、 1×10 <sup>-5</sup> 、 5×10 <sup>-5</sup> g/mL	—	5×10 <sup>-6</sup> g/mL	1×10 <sup>-6</sup> g/mL	筋直接刺激による 収縮は抑制された。 神経刺激による収 縮は増強された。
循環器系	血圧、 心電図	ネコ	静脈内 (Sorpoll200 および生理食 塩水)	1、5、10、 20	雌雄 匹数不 明	5	1	血圧；降下、アトピン 前投与で遮断され ず、ノアドレナリンの上 昇／アセチルコリンの降下 作用に影響せず 心電図；検体投与に よる影響なし

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
循環器系 心房および 心室筋収縮	ウサギ	<i>In vitro</i> (Sorpoll200)	$1 \times 10^{-8}$ 、 $7 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $3 \times 10^{-7}$ 、 $7 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ g/mL	—	$7 \times 10^{-8}$ g/mL	$< 1 \times 10^{-8}$ g/mL	心房筋；拍動数に検体処理の影響なし。収縮は用量依存性に抑制され、アトレンの $10^{-6}$ g/mLで影響されず。NAD <sup>+</sup> レリンおよびアセチルコリンの作用は検体の前処理で影響されず。心室筋；心房筋に比しより強く作用、NAD <sup>+</sup> レリンの作用は検体の前処理で影響されず。
自律神経系 角膜および 結膜反射	ウサギ	点眼 (オリーブ油)	0.1、0.5、 1.0、10、 25、50%	雌雄 匹数不 明	50%	25%	角膜および結膜反射を2%コカインと同程度に抑制。瞳孔の形状変化、結膜異常、催涙を認めず。
消化器系 摘出腸管 自動運動	ウサギ	<i>In vitro</i> (Sorpoll200)	$1 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ g/mL	—	$3 \times 10^{-8}$ g/mL	$1 \times 10^{-8}$ g/mL	腸管運動の振幅緊張および収縮緊張性の抑制、フェニハミンにより阻止されない。
消化器系 摘出腸管 アゴニスト に対する作用	ウサギ モット	<i>In vitro</i> (Sorpoll200)	詳細な記 載なし	—	詳細な 記載 なし	詳細な 記載なし	ウサギ腸管のアセチルコリンおよびBa <sup>2+</sup> 収縮並びにモット腸管のヒスタミンによる収縮に対し弛緩効果を示したが、検体の $3 \times 10^{-7}$ g/mLの弛緩はそれぞれに対し約50%であり、検体が抗アセチルコリン、抗Ba <sup>2+</sup> または抗ヒスタミン作用を有するとはいい難い。
動脈平滑筋 耳殻血管	ウサギ	<i>In vitro</i> (Sorpoll200)	血管内； $1 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-1}$ 血管外； $1 \times 10^{-3}$ g/mL	—	血管内； ； $> 1 \times 10^{-1}$ g/mL 血管外； 血管外； $1 \times 10^{-3}$ g/mL ； $> 1 \times 10^{-3}$ g/mL	血管内； $1 \times 10^{-1}$ g/mL 血管外； $1 \times 10^{-3}$ g/mL	検体は灌流圧およびtonusに影響を与えなかった。しかし、NAD <sup>+</sup> レリンによる灌流血圧の上昇は検体により抑制された。

12. 解毒法および治療

CYAPの Mausおよびラットにおける中毒の解毒試験

(資料 12)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1973年

検体：CYAP原体

検体純度：

供試動物：dd系雄マウス、6~7週齢、1群12匹

SD系雄ラット、7週齢、1群10匹

投与方法：検体を Tween-80 液で 10%懸濁液として使用した。治療薬には硫酸アトロピン、プラリドキシムヨウ化メチル(2-PAM)、Trimethylene pyridine-4-aldoxime methyl morpholine dibromide (TPMM)、還元型グルタチオン (GSH) を生理食塩水に溶解して使用した。動物に検体の致死量に近い量、マウス：1500 mg/kg、ラット：1000 mg/kg を経口投与し、直ちに解毒剤を腹腔内あるいは皮下注射した。

(I) マウスにおけるアトロピン、2-PAM、GSH 単独もしくはそれらの併用による効果

試験方法：検体 1500 mg/kg を経口投与直後にアトロピン (皮下注射)、2-PAM、GSH (腹腔内注射) を処置し、24 時間後における生存率を求めた。

結果：次表に示した。

アトロピン (SC) (mg/kg)	解毒剤		生存数	生存率 (%)
	2-PAM (IP) (mg/kg)	GSH (IP) (mg/kg)		
0	0	0	7/60	11.7
5	0	0	4/12	33.3
10	0	0	4/12	33.3
20	0	0	6/12	50.0
40	0	0	6/12	50.0
0	25	0	6/12	50.0
0	50	0	7/12	59.0
0	0	50	1/12	8.3
0	0	100	4/12	33.3
0	0	200	4/12	33.3
10	50	0	9/12	75.0
10	0	100	11/12	91.6
10	50	100	8/12	66.7

SC：皮下注射

IP：腹腔内注射

各解毒剤の単独処置（アトロピン 5～40 mg/kg、2-PAM 25、50 mg/kg、GSH 100、200 mg/kg）によりいずれも生存率を上昇させ、ある程度の解毒効果を示した。それらを併用したときは単独処置に比し良好な解毒効果を示したが、三者併用による効果は十分でなかった。

中毒症状では解毒剤無処置の場合、著明な全身性の運動失調、呼吸困難、流涎、眼脂分泌、振戦、間代性痙攣などを発現し、死亡の大部分が4時間以内に認められたのに対し、アトロピン処置群ではいずれの投与群でも流涎、眼脂分泌など腺分泌亢進に対する抑制効果を示し、呼吸も正常に近く4時間以内の死亡例は認められなかった。2-PAM および GSH 処置群では症状の改善は明らかでなかったが致死時間は明らかに遅延した。4時間以内の死亡はアトロピン 5 mg/kg、アトロピン・GSH 群および 2-PAM 50 mg/kg 群に各 1 例認めただけでなかった。

(II) ラットにおけるアトロピン、2-PAM、TPMM、GSH の単独効果

試験方法：検体 1000 mg/kg をラットに経口投与直後にそれぞれの解毒剤を腹腔内に処置した。

結果：次表に示した。

アトロピン (mg/kg)	動物数	症状*1				生存率 (%)	
		振戦	流涎	運動失調	その他*2	4時間後	24時間後
0	20	+++	+++	++	+++	60	10
100	10	-~±	-	-~±	-	100	50
50	10	-	-	-~±	-	100	100
25	10	-~±	-	-~±	-	100	40
10	10	±	-	-~±	-	100	40
5	10	±	-~±	-~±	-	100	20
2.5	10	+	+	±	±	100	0
1	10	++	+	±	+	100	20

\*1：検体投与4時間後の症状

-：症状なし      ++：重度  
±：軽度          +++：極度  
+：中等度

\*2：流涎、眼球突出、立毛および呼吸困難

解毒剤	処置量 (mg/kg)	動物数	症状*1				生存率 (%)	
			振戦	流涎	運動失調	その他*2	4 時間後	24 時間後
なし	0	20	+++	+++	++	+++	60	10
2-PAM	50	10	++	+++	+	++	80	30
	100	10	++	+++	±~+	++	100	20
TPMM	200	10	±~+	+++	±	+	100	0
	400	10	±	±	±	±~+	100	0
	800	10	-	-~±	-~±	-~±	100	40
GSH	500	10	+++	+++	++	+++	60	40

\*1: 検体投与 4 時間後の症状

-: 症状なし      ++: 重度  
±: 軽度            +++: 極度  
+: 中等度

\*2: 流涎、眼球突出、立毛および呼吸困難

アトロピン 1~100 mg/kg の処置では 4 時間以内における中毒症状の改善は著明であり、50 mg/kg において 24 時間後全例生存し、生存率でも著明な効果が認められた。2-PAM では症状の改善と延命効果を認めたに過ぎなかったが、TPMM は症状改善にも著明な効果を表した。一方、GSH は 500 mg/kg の投与においてその効果は期待できなかった。

本試験において 24 時間生存し得た動物はいずれも全身性運動失調が著明で呼吸不規則であり、触診により体温降下が認められた。

### (Ⅲ) ラットにおけるアトロピン、2-PAM、GSH の併用効果

試験方法: 検体 1000 mg/kg を経口投与直後にそれぞれの解毒剤を併用した。

結果: 次表に示した。

アトロピン (mg/kg)	解毒剤		生存率 (%)	
	2-PAM (mg/kg)	GSH (mg/kg)	4 時間後	24 時間後
0	0	0	60	10
5	50	0	100	20
10	50	0	100	40
10	0	500*1	100	60
25	50	0	100	90
25	0	500*1	100	60
25	0	500 × 2*2	100	80
100	100	0	0	

\*1: 検体投与 4 時間後に処置

\*2: 検体投与 30 分前および投与 4 時間後に処置

2-PAM の効果はアトロピンの 5 および 10 mg/kg との併用によっては明らかではないが、25 mg/kg を併用したとき最も高い生存率を示し 2-PAM の有効性が認められた。また、GSH も単独処置に比べてアトロピンの併用時生存率の上昇がみられた。これらの生存ラットにおける 24 時間後の中毒症状は前記単独処置の場合とほぼ同様であった。

以上の結果、アトロピンはマウス・ラットとも CYAP による中毒症状に対して明らかな拮抗作用を示し、優れた延命効果とともに生存率の上昇をもたらした。2-PAM、GSH はマウスにおいて明らかな延命効果を示すがラットでは不十分であった。TPMM はラットにおいて著明な症状改善を示し、本試験では生存率の上昇は得られなかったが他薬剤との併用によりその効果は十分期待し得ると考えられた。

アトロピン、2-PAM、GSH の併用による効果はそれぞれの単独処理よりも明らかに有効であり、検体の中毒に対する解毒治療の可能性を示すと考えてよく、他の物理的、薬理的処置、例えば胃洗浄（誤飲のとき）、人工呼吸、強心剤投与などの併用はそれらの効果をさらに著明なものにすると考えられた。

### 13. 補足試験







#### 14. 参考資料



















B. 代謝物を用いた試験成績

<代謝物>

(1) CYAP 代謝物 DM-CYAP(カリウム塩)のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代1)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2011年

検体：CYAP 代謝物 DM-CYAP(カリウム塩) (desmethyl-cyanox(potassium salt))

検体純度：

供試動物：ICR系雌マウス、週齢は報告書に記載なし、体重；23.1～27.2 g、1群3匹

観察期間：7日間

試験方法：検体 1000 mg/kg 投与群を設け、その死亡率から LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し、単回経口投与した。投与前約 20 時間および投与後 4 時間絶食させた。

観察・検査項目：症状観察は、投与後 4 時間までは経時的に、その後は毎日 1 回行った。試験終了時の全生存動物について剖検し、組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	1000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	> 1000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし
症状発現および 消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1000

中毒症状および剖検において異常は認められなかった。

(2) CYAP 代謝物 DM-CYAP(カリウム塩)の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代2)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2010年

検体：CYAP 代謝物 DM-CYAP (カリウム塩) (desmethyl-cyanox(potassium salt))

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は1連制とし、プレインキュベーション法で試験を1回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。また、いずれの菌株においても菌の生育阻害および検体の析出は認められなかった。

一方、S9 mix 非存在下の各菌株に対する陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、S9 mix 存在下の陽性対照として用いた 2-アミノアントラセンでは明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、CYAP 代謝物 DM-CYAP (カリウム塩) は、代謝活性化の有無にかかわらず本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断した。

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	—	81	10	21	31	6
DM-CYAP	15	—	77	7	25	22	4
	50	—	110	11	14	19	5
	150	—	69	7	11	23	8
	500	—	72	13	13	14	8
	1500	—	96	11	23	22	6
	5000	—	83	6	31	20	3
陽性対照		—	540 <sup>a)</sup>	285 <sup>b)</sup>	101 <sup>a)</sup>	366 <sup>c)</sup>	397 <sup>d)</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	+	88	10	26	30	18
DM-CYAP	15	+	64	4	20	35	13
	50	+	71	3	24	25	13
	150	+	116	3	25	32	16
	500	+	97	10	30	43	5
	1500	+	82	3	23	30	8
	5000	+	88	8	36	29	22
陽性対照		+	548 <sup>e)</sup>	180 <sup>f)</sup>	457 <sup>g)</sup>	191 <sup>h)</sup>	109 <sup>f)</sup>

陽性対照物質

- a) 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド 0.01  $\mu\text{g}/$ プレート
- b) アジ化ナトリウム 0.5  $\mu\text{g}/$ プレート
- c) 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド 0.1  $\mu\text{g}/$ プレート
- d) 9-アミノアクリジン 80  $\mu\text{g}/$ プレート
- e) 2-アミノアントラセン 1  $\mu\text{g}/$ プレート
- f) 2-アミノアントラセン 2  $\mu\text{g}/$ プレート
- g) 2-アミノアントラセン 10  $\mu\text{g}/$ プレート
- h) 2-アミノアントラセン 0.5  $\mu\text{g}/$ プレート

(3) CYAP 代謝物 4 CP の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代3)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2010年

検体：CYAP 代謝物 4 CP (*p*-cyanophenol)

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は 2 連制とし、プレインキュベーション法で用量設定試験を 1 回、本試験を 1 回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の存在の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数が溶媒対照群の 2 倍以上に、かつ用量依存的に増加させることはなかった。

一方、S9 mix 非存在下の各菌株に対する陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、S9 mix 存在下の陽性対照として用いた 2-アミノアントラセンでは明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、CYAP 代謝物 *p*-cyanophenol は、代謝活性化の有無にかかわらず本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断した。





本試験

表中の数値は2連の平均値

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	—	98	12	17	22	9
<i>p</i> -cyanophenol	156	—	103	13	19	18	8
	313	—	94	9	21	14	9
	625	—	83	13	18	17	9
	1250	—	78	13	14	13	7
	2500	—	72	9	17	12	5
	5000	—	0*	0*	16	0*	0*
陽性対照		—	581 <sup>a)</sup>	368 <sup>b)</sup>	108 <sup>e)</sup>	391 <sup>c)</sup>	403 <sup>d)</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	+	86	12	21	33	15
<i>p</i> -cyanophenol	78.1	+	81	NT	NT	NT	21
	156	+	92	9	25	27	19
	313	+	90	5	20	26	16
	625	+	90	9	18	27	16
	1250	+	79	9	16	25	17
	2500	+	61*	8	21	25	5*
5000	+	NT	0*	13	0*	NT	
陽性対照		+	622 <sup>e)</sup>	202 <sup>f)</sup>	400 <sup>e)</sup>	225 <sup>h)</sup>	126 <sup>f)</sup>

陽性対照物質

- a) 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド 0.01  $\mu\text{g}/$ プレート
- b) アジ化ナトリウム 0.5  $\mu\text{g}/$ プレート
- c) 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド 0.1  $\mu\text{g}/$ プレート
- d) 9-アミノアクリジン 80  $\mu\text{g}/$ プレート
- e) 2-アミノアントラセン 1  $\mu\text{g}/$ プレート
- f) 2-アミノアントラセン 2  $\mu\text{g}/$ プレート
- g) 2-アミノアントラセン 10  $\mu\text{g}/$ プレート
- h) 2-アミノアントラセン 0.5  $\mu\text{g}/$ プレート

NT: 試験せず

\*: 生育阻害あり

(4) CYAP 代謝物 CA-CYAP のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代 4)

試験機関：住化テクノサービス株式会社

報告書作成年：2012 年

検 体：CYAP 代謝物 CA-CYAP (COOH-cyanophos)

検体純度：

供試動物：ICR 系雌マウス、8 週齢、体重；22.6~24.8 g、1 群 3 匹

観察期間：7 日間

試験方法：2 用量の検体投与群を設け、それらの死亡率から LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し、投与液量 10 mL/kg の割合で単回経口投与した。

投与前 20 時間および投与後 4 時間絶食させた。

観察・検査項目：症状観察は、投与後 4 時間までは経時的に、その後は毎日 1 回行った。

死亡動物および試験終了時の全生存動物について剖検し、組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	300、1000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	> 1000
死亡開始および 終了時間	投与後 1 日から開始 投与後 1 日に終了
症状発現および 消失時間	投与後 10 分から発現 投与後 1 日に終了
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	300
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	300

中毒症状としては、1000 mg/kg 群で投与後 10 分より呼吸不規則、投与後 30 分より腹臥、投与後 1 時間より失調性歩行が認められた。これらの症状は投与後 1 日までに回復した。剖検において、1000 mg/kg 群の死亡動物 1 例に胃粘膜赤色巣散在が観察されたが、観察期間終了時の生存動物では、検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

(5) CYAP 代謝物 CA-CYAP の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代5)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2012年

検体：CYAP 代謝物 CA-CYAP (COOH-cyanophos)

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は2連制とし、プレインキュベーション法で用量設定試験を1回、本試験を1回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を溶媒対照群の2倍以上に、かつ用量依存的に増加させることはなかった。

一方、S9 mix 非存在下の各菌株に対する陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、S9 mix 存在下の陽性対照として用いた 2-アミノアントラセンでは明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、CYAP 代謝物 CA-CYAP は、代謝活性化の有無にかかわらず本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断した。



本試験

(表中の数値は2連の平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	—	97	12	21	19	13
CA-CYAP	156	—	85	13	18	13	7
	313	—	83	8	19	22	12
	625	—	82	13	25	24	10
	1250	—	87	14	24	16	10
	2500	—	117	12	29	20	8
	5000	—	131	13	30	19	17
陽性対照		—	518 <sup>a)</sup>	301 <sup>b)</sup>	72 <sup>a)</sup>	348 <sup>c)</sup>	596 <sup>d)</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	+	86	11	25	29	16
CA-CYAP	156	+	78	7	30	32	16
	313	+	81	13	29	33	21
	625	+	109	13	23	27	19
	1250	+	89	5	27	32	9
	2500	+	107	9	35	30	14
	5000	+	126	11	36	24	5
陽性対照		+	646 <sup>a)</sup>	218 <sup>f)</sup>	386 <sup>g)</sup>	205 <sup>h)</sup>	142 <sup>f)</sup>

陽性対照物質

- a) 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド 0.01  $\mu\text{g}/$ プレート
- b) アジ化ナトリウム 0.5  $\mu\text{g}/$ プレート
- c) 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド 0.1  $\mu\text{g}/$ プレート
- d) 9-アミノアクリジン 80  $\mu\text{g}/$ プレート
- e) 2-アミノアントラセン 1  $\mu\text{g}/$ プレート
- f) 2-アミノアントラセン 2  $\mu\text{g}/$ プレート
- g) 2-アミノアントラセン 10  $\mu\text{g}/$ プレート
- h) 2-アミノアントラセン 0.5  $\mu\text{g}/$ プレート

(6) CYAP 代謝物 CYO のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代6)

試験機関：住化テクノサービス株式会社

報告書作成年：2012 年

検体：CYAP 代謝物 CYO (Cyanoxon)

検体純度：

供試動物：ICR 系雌マウス、8 週齢、体重；21.4~28.0 g、1 群 3 匹

観察期間：7 日間

試験方法：2 用量の検体投与群を設け、それらの死亡率から LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し、単回強制経口投与した。投与液量は 10 mL/kg とした。投与前約 20 時間および投与後 4 時間絶食させた。

観察・検査項目：症状観察は、投与後 4 時間までは経時的に、その後は毎日 1 回行った。死亡動物および試験終了時の全生存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
投与量 (mg/kg)	50、300
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	50 < LD <sub>50</sub> < 300
死亡開始および 終了時間	投与後 10 分から開始 投与後 10 分に終了
症状発現および 消失時間	投与後 3 分から発現 投与後 1 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	< 50 (全ての投与群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	50

中毒症状としては、50 mg/kg 群で失調性歩行および呼吸不規則が、300 mg/kg 群で間代性痙攣が認められた。

剖検では、検体投与による影響は認められなかった。

(7) CYAP 代謝物 CYO の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代7)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2012 年

検体：CYAP 代謝物 CYO (Cyanoxon)

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は 2 連制とし、プレインキュベーション法で用量設定試験を 1 回、本試験を 1 回行った。

用量設定根拠；

試験結果：結果を次頁以降の表に示した。

S9 mix 存在下および非存在下ともに、TA100 株および WP2uvrA 株において、溶媒対照群の 2 倍を越える濃度依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。その他の菌株については、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの濃度においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

なお、S9 mix 非存在下の各菌株に対する陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、S9 mix 存在下の陽性対照として用いた 2-アミノアントラセンでは明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、CYAP 代謝物 CYO は、代謝活性化存在下および非存在下の TA100 株および WP2uvrA 株に対して復帰変異誘発性を有すると判断した。





本試験

(表中の数値は2連の平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	—	88	12	23	25	9
CYO	156	—	105	8	15	21	11
	313	—	101	11	24	20	6
	625	—	142	11	33	25	7
	1250	—	178	13	41	22	5
	2500	—	227	9	57	16	3
	5000	—	328	13	102	17	9
陽性対照		—	558 <sup>a)</sup>	274 <sup>b)</sup>	101 <sup>a)</sup>	357 <sup>c)</sup>	468 <sup>d)</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	+	96	9	23	31	13
CYO	156	+	108	9	26	32	17
	313	+	114	10	32	34	17
	625	+	142	8	40	27	13
	1250	+	187	8	69	27	15
	2500	+	247	13	86	38	13
	5000	+	393	12	125	30	9
陽性対照		+	652 <sup>e)</sup>	189 <sup>f)</sup>	367 <sup>g)</sup>	213 <sup>h)</sup>	128 <sup>f)</sup>

陽性対照物質

- a) 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド 0.01  $\mu\text{g}/$ プレート
- b) アジ化ナトリウム 0.5  $\mu\text{g}/$ プレート
- c) 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド 0.1  $\mu\text{g}/$ プレート
- d) 9- アミノアクリジン 80  $\mu\text{g}/$ プレート
- e) 2- アミノアントラセン 1  $\mu\text{g}/$ プレート
- f) 2- アミノアントラセン 2  $\mu\text{g}/$ プレート
- g) 2- アミノアントラセン 10  $\mu\text{g}/$ プレート
- h) 2- アミノアントラセン 0.5  $\mu\text{g}/$ プレート

C. その他試験成績

(1) CYAP およびその代謝物のヒト組換えコリンエステラーゼ阻害試験

(資料 代8)

試験結果：結果を次表に示した。

CYAP およびその代謝物 CYO では用量依存性のあるヒト組換え ChE の阻害活性が認められ、 $IC_{50}$  はそれぞれ 178 および 53.5  $\mu\text{M}$  であった。DM-CYAP、CA-CYAP、4CP ではヒト組換え ChE の阻害活性は認められなかった。一方、陽性対照化合物として用いたフィゾスチグミンの  $IC_{50}$  は 0.11  $\mu\text{M}$  となり、明瞭な阻害活性が認められた。

以上の結果より、CYAP およびその代謝物 CYO においてヒト組換え ChE 阻害活性が認められたが、その他の代謝物によるヒト組換え ChE 阻害活性は認められなかった。

本試験

(表中の数値は 3 連の平均値)

検体	濃度	阻害率 (%)	IC <sub>50</sub> 値
CYAP	1 mM	98	178 μM
	100 μM	20	
	10 μM	0	
	1 μM	0	
CYO	1 mM	96	53.5 μM
	100 μM	59	
	10 μM	21	
	1 μM	8	
DM-CYAP	1 mM	7	> 1.0 mM
	100 μM	4	
	10 μM	5	
	1 μM	5	
CA-CYAP	1 mM	19	> 1.0 mM
	100 μM	9	
	10 μM	6	
	1 μM	5	
4CP	5 mM	21	> 5.0 mM
	1 mM	8	
	100 μM	2	
	10 μM	1	
陽性対照 フィゾスチグミン	-	-	0.11 μM

(2) CYAP 原体および CYAP 代謝物 CYO のラットを用いた飼料混入による 4 週間反復経口投与  
毒性試験

(資料 代9)

試験目的: CYAP 代謝物 CYO と CYAP の亜急性投与による毒性比較に先立ち、CYO のコリンエステラーゼ活性阻害作用について検討した。本試験では CYO をラットへ反復経口投与して脳および赤血球コリンエステラーゼ活性の測定を行い、その阻害作用の程度を検討するとともに、同作用の投与期間の長期化に伴う変化や性差も検討した。加えて、本代謝物によるコリンエステラーゼ活性阻害以外の毒性発現の有無についても検討した。また、CYAP についても同様の検討を行った。

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡率; 一般状態および生死を毎日観察した。

いずれの群においても死亡および検体投与に起因する変化はなかった。

体重変化；投与期間中、週1回あるいは2回の頻度で体重を測定した。

いずれの群においても異常は認められなかった。

摂餌量；投与期間中、週1回あるいは2回の頻度で摂餌量を測定した。

いずれの群においても異常は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

検体	投与期間 (日)	投与量 (ppm)								
		雄			雌			雄+雌		
		2	10	20	2	10	20	2	10	20
CYAP	7	0.2	1.1	2.1	0.2	1.0	2.0	0.2	1.0	2.1
	14	0.2	1.0	2.2	0.2	1.0	1.9	0.2	1.0	2.0
	28	0.2	0.9	1.8	0.2	0.9	1.8	0.2	0.9	1.8

検体	投与期間 (日)	投与量 (ppm)								
		雄			雌			雄+雌		
		1	6	12	1	6	12	1	6	12
CYO	7	0.1	0.6	1.3	0.1	0.6	1.1	0.1	0.6	1.2
	14	0.1	0.6	1.2	0.1	0.5	1.1	0.1	0.6	1.2
	28	0.1	0.5	1.1	0.1	0.6	1.0	0.1	0.5	1.0

単位：mg/kg/日

血液学的検査；28日間投与動物の全例について、投与期間終了後に腹大動脈から血液を採取し、以下の項目を測定した。

赤血球数、白血球数、血小板数、ヘマトクリット値、血色素量、平均赤血球血色素量、平均赤血球容積、平均赤血球血色素濃度、白血球分類、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、フィブリノーゲン量

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

検体	検査項目	検査 時期 (日)	投与量 (ppm)					
			雄			雌		
			1	6	12	1	6	12
CYO	好中球数	28	144	↑194	157	148	85	78
	プロトロンビン時間	28	104	107	106	97	↓91	94

Dunnnett 検定または Steel 検定 (いずれも両側) を用いて対照群との有意差検定を行った (↑↓: p < 0.05)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値。

CYAP 投与ではいずれの投与量においても対照群との差は認められなかった。  
 CYO 投与では、6 ppm 群の雄で好中球数の有意な高値が、雌でプロトンピン時間の有意な低値がそれぞれ認められたが、いずれも投与量との関連がなく検体投与に起因した変化とは考えられなかった。

血液生化学的検査；28 日間投与動物の全例について、血液学的検査用試料と同時に採取した血液から得られた血漿を用い、以下の項目を測定した。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ (ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、血糖、総蛋白、アルブミン、アルブミン/グロブリン比、乳酸脱水素酵素 (LDH)、クレアチンキナーゼ、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、総ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、無機リン、カルシウム

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

検体	検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)					
			雄			雌		
			2	10	20	2	10	20
CYAP	ALP	28	80	↓67	101	114	96	85
	LDH	28	152	↑194	132	199	162	147

検体	検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)					
			雄			雌		
			1	6	12	1	6	12
CYO	無機リン	28	112	111	112	127	↑131	↑133

Dunnett 検定または Steel 検定 (いずれも両側) を用いて対照群との有意差検定を行った (↑↓:  $p < 0.05$ , ↓:  $p < 0.01$ )。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値。

CYAP 投与では 10ppm 群の雄で ALP の有意な低値および LDH の有意な高値が認められたが、いずれも投与量との関連はなく検体投与に起因した変化とは考えられなかった。

CYO 投与では 6 および 12 ppm 群の雌で無機リンの有意な高値が認められたが、軽微な変化であり、本変化と関連するような腎臓や甲状腺、骨などの諸臓器に対する影響は認められなかったことから毒性学的意義はないものと考えられた。

コリンエステラーゼ活性；7、14 および 28 日間投与動物それぞれ全例について、それぞれの投与期間終了後に腹大動脈から血液を採取し、屠殺後に脳を摘出した。得

られた赤血球および脳のコリンエステラーゼ活性値 (ChE) を測定した。

結果を次表に示した。

赤血球および脳 ChE 値

検体	検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)								
			雄 (n=4)			雌 (n=4)			雄+雌 (n=8)		
			2	10	20	2	10	20	2	10	20
CYAP	赤血球 ChE	7	73	↓62	↓59	98	83	82	85	↓71	↓69
		14	102	85	↓47	99	69	↓48	100	77	↓47
		28	98	90	80	83	80	↓54	90	84	↓65
	脳 ChE	7	103	95	↓83	95	↓91	↓75	99	↓93	↓78
		14	95	↓83	↓62	97	↓88	↓56	96	↓85	↓59
		28	97	88	70	101	↓82	↓61	100	↓85	↓66

検体	検査項目	検査時期 (日)	投与量 (ppm)								
			雄 (n=4)			雌 (n=4)			雄+雌 (n=8)		
			1	6	12	1	6	12	1	6	12
CYO	赤血球 ChE	7	77	79	↓61	88	107	63	82	92	↓62
		14	92	91	↓48	92	84	↓60	92	87	↓55
		28	101	96	↓54	78	↓63	↓30	88	78	↓41
	脳 ChE	7	108	98	↓81	97	93	↓77	102	95	↓79
		14	97	94	↓69	103	97	↓77	100	96	↓73
		28	96	84	75	101	93	↓58	99	↓88	↓67

Dunnett 検定または Steel 検定 (いずれも両側) を用いて対照群との有意差検定を行った (↓: p < 0.05, ↓↓: p < 0.01)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

太枠は統計学的に有意かつ対照群と比較して 20%以上の低下(表中の数値として 80 以下の値)

対照群における赤血球および脳 ChE 値 (雌雄別, n=4)

検査項目	検査時期 (日)	雄	雌
赤血球 ChE	7	1099 ± 215.1	910 ± 143.2
	14	928 ± 205.9	1111 ± 246.6
	28	889 ± 228.4	1103 ± 224.8
脳 ChE	7	14.4 ± 1.09	15.5 ± 0.25
	14	14.7 ± 1.24	14.2 ± 0.45
	28	15.2 ± 0.29	14.7 ± 1.05

単位: U/L (赤血球)、U/g (脳)

ChE に対する影響について、本試験では JMPR の基準をもとに統計学的に有意な 20%以上の阻害を毒性影響と判断した<sup>1)</sup>。その結果、CYAP および CYO 投与ともに毒性学的意義のある ChE 阻害について、その発現用量や程度には雌雄で顕著な差はなかった。また、対照群においてこれら活性値を比較しても、その値に性差はなかった。これらのことから、本試験では ChE に対する影響についてより正確に評価するため、例数を増加する目的で雌雄を合計して評価した。

CYAP 投与では 10 ppm 以上で赤血球あるいは脳 ChE の毒性学的意義のある低値が認められた。CYO 投与では 12 ppm のみで赤血球および脳 ChE の毒性学的意義のある低値が認められた。

この ChE 阻害について各投与期間で比較すると、いずれの検体においてもその最小毒性量および無毒性量には投与期間の延長に伴う低下は認められなかった。CYAP 投与では、これまでのラットを用いた3ヵ月以上の反復投与試験(資料6-2、6-3、7、8-1)における ChE 阻害の最小毒性量 [10~40 ppm (0.3~2.9 mg/kg/日)] および無毒性量 [3~10 ppm (0.1~0.8 mg/kg/日)] は、より短期投与である本試験でのこれら値 [最小毒性量: 10 ppm (0.9 mg/kg/日), 無毒性量: 2 ppm (0.2 mg/kg/日)] と比較して低値とは言えず、さらに、これらのうち ChE を経時的に測定した試験(資料6-2、7、8-1)においても同活性の阻害作用には反復投与による増悪化は認められなかった。なお、本試験の CYAP 投与の赤血球 ChE において投与7日では 10 ppm 以上で、投与14日以降は 20 ppm のみで 20%以上の有意な低値が認められ、投与期間によりその発現用量が異なった。しかしながら、投与14および28日の値は統計学的に有意ではなかったものの、いずれも 20%程度の低値を示しており、反復投与に伴ってその影響が軽減したとは考えられなかった。以上のことから、他の有機リン剤同様<sup>2)</sup>、CYAP における ChE 阻害は、短期投与で発現し、投与期間の延長に伴って増悪化はしないものと考えられた。また、代謝物である CYO についても本試験における ChE の阻害は投与期間を通して 12 ppm のみで発現しており、反復投与に伴う最小毒性量および無毒性量の低下は認められなかった。このことから、CYAP 同様、代謝物である CYO による ChE 阻害についても投与期間の延長による増悪化はないものと考えられた。

1) Pesticide residues, Guideline for the preparation of toxicological working papers for the WHO Core Assessment Group of the Joint Meeting on Pesticide Residues, Geneva, December 2000.

2) Fenitrothion および azinphos-methyl

(Pesticide residues in food 2007, Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, FAO Plant Production and Protection Paper, 2007)

Chlorpyrifos-methyl

(Pesticide residues in food-2009 evaluations, Part II - Toxicological, Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, 2011)



臓器重量；28日間投与動物の全例について、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。なお、左右の臓器は合わせて測定した。

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

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示した。

検体	検査項目	投与量 (ppm)						
		雄			雌			
		1	6	12	1	6	12	
CYO	最終体重	97	96	100	105	103	101	
	腎臓	絶対重量	113	99	104	106	103	104
		対体重比	↑117	104	104	100	99	102
	子宮	絶対重量	—	—	—	↑161	114	97
		対体重比	—	—	—	↑153	112	94

Dunnett 検定または Steel 検定（いずれも両側）を用いて対照群との有意差検定を行った（↑:  $p < 0.05$ , ↑↑:  $p < 0.01$ ）。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値。

CYAP 投与ではいずれの投与量においても対照群との差は認められなかった。CYO 投与では、1 ppm 群の雄において腎臓の相対重量の有意な高値が、同群の雌において子宮の絶対および相対重量の有意な高値がそれぞれ認められたが、いずれもいずれも投与量との関連がなく検体投与に起因した変化とは考えられなかった。

肉眼的病理検査；7、14 および 28 日間投与動物それぞれ全例について、それぞれの投与期間終了後に剖検を行った。

いずれにおいても検体投与による影響は認められなかった。

以上のように、本試験では CYAP とその代謝物である CYO について脳および赤血球 ChE に対する影響を検討するとともに、これ以外の毒性発現の有無についても検討した。その結果、CYAP および CYO 投与のいずれにおいても ChE 阻害のみが毒性影響として認められ、両被験物質の毒性の特徴に差はないものと考えられた。さらに、この ChE 阻害作用には性差や投与期間延長による増悪化はないと考えられた。したがって、CYAP および CYO を同じ投与量で雄あるいは雌ラットへ短期間反復経口（混餌）投与し、その結果生じる脳および赤血球 ChE 阻害を指標とすることで、これらの毒性の相対的な強さを比較することが可能と考えられた。また、本試験における無毒性量は、28 日間投与、雌雄合計で CYAP : 2 ppm (0.2 mg/kg/日)、CYO : 6 ppm (0.5 mg/kg/日) であった。

(3) CYAP 原体および CYAP 代謝物 CYO のラットを用いた飼料混入による 4 週間反復経口投与  
毒性試験

(資料 代10)

試験目的：先に実施した CYAP および CYO の亜急性投与による毒性比較試験（資料・代9）  
では、CYAP および CYO のいずれも、脳および赤血球コリンエステラーゼの活性  
阻害のみが認められ、この他に毒性影響は認められなかった。また、同試験で  
は検体を 7、14 および 28 日間にわたり雌雄ラットへ反復経口投与したが、これ  
らコリンエステラーゼ活性の阻害には投与期間延長に伴う増悪化や性差はなか  
った。以上のことから、本試験では CYAP および CYO における毒性の相対的な強  
さを比較する目的で、これら検体をそれぞれ同じ投与量で 28 日間、雌のみに反  
復経口投与して脳および赤血球コリンエステラーゼ活性を測定し、その影響に  
ついて比較した。

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；一般状態および生死を毎日観察した。

いずれの群においても死亡および症状の発現はなかった。

体重変化；投与期間中、週 1 回の頻度で体重を測定した。

いずれの群においても異常は認められなかった。

摂餌量；投与期間中、週1回の頻度で摂餌量を測定した。

いずれの群においても異常は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

検体	投与量 (ppm)		
	5	10	20
CYAP	0.4	0.9	1.7
CYO	0.4	0.9	1.8

単位：mg/kg/日

コリンエステラーゼ活性；全動物について、投与期間終了後に腹大動脈から血液を採取し、屠殺後に脳を摘出した。得られた赤血球および脳のコリンエステラーゼ活性値 (ChE) を測定した。

結果を次表に示した。

検査項目	投与量 (ppm)					
	CYAP			CYO		
	5	10	20	5	10	20
赤血球 ChE (U/L)	86	↓74	↓37	↓81	↓64	↓37
脳 ChE (U/g)	93	↓83	↓57	99	↓84	↓61

Dunnett 検定または Steel 検定 (いずれも両側) を用いて対照群との有意差検定を行った (↓:  $p < 0.05$ 、↓↓:  $p < 0.01$ )

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値

太枠は統計学的に有意かつ対照群と比較して 20%以上の低下(表中の数値として 80 以下の値)

コリンエステラーゼ活性に対する影響について、本試験では JMPR の基準をもとに統計学的に有意な 20%以上の阻害を毒性影響と判断した<sup>\*</sup>。すなわち、CYAP および CYO ともに、脳では 20 ppm、赤血球では 10 ppm 以上で毒性学的意義のある

\* Pesticide residues, Guideline for the preparation of toxicological working papers for the WHO Core Assessment Group of the Joint Meeting on Pesticide Residues, Geneva, December 2000.

コリンエステラーゼ活性の低値が認められ、その発現用量には差はなかった。さらに、この毒性影響と判断した値について両検体間で比較したところ (Student の t 検定, 有意水準 5%), いずれにおいても統計学的有意差は認められなかった。このことから、CYAP および CYO によるコリンエステラーゼ活性阻害については発現用量だけでなく、その程度についても差がないものと考えられた。

以上のように、本試験では CYAP および CYO ともに脳で 20 ppm、赤血球で 10 ppm 以上からコリンエステラーゼ活性の阻害が認められ、その発現用量に差はなかった。さらに、その活性阻害の程度にも差はなかった。従って、CYAP および CYO の毒性の相対的な強さに差はないものと考えられた。また、本試験における無毒性量は、CYAP : 5 ppm (0.4 mg/kg/日)、CYO : 5 ppm (0.4 mg/kg/日) であった。

(4) CYAP 原体および CYAP 代謝物 CYO のラットを用いた小核試験

(資料 代9)

試験目的：CYAP 原体および CYAP 代謝物 CYO のラットを用いた飼料混入による 4 週間反復経口投与毒性試験（資料 代9）の動物を用いて、CYAP 原体および CYAP 代謝物 CYO の小核試験を実施した。

試験結果：結果を次頁の表に示した。

CYAP 原体および CYAP 代謝物 CYO のラットを用いた飼料混入による 4 週間反復経口投与毒性試験の報告書（資料 代 9）に記載の通り、CYAP 投与群の 10 ppm 以上で赤血球コリンエステラーゼ活性の、20 ppm で脳コリンエステラーゼ活性の毒性学的意義のある低値が認められ、CYO 投与群の 12 ppm で赤血球および脳コリンエステラーゼ活性の毒性学的意義のある低値が認められたことから、いずれも充分高用量まで動物が検体に曝露していると考えられた。

CYAP および CYO 投与群では、雌雄とも、いずれの投与期間、いずれの投与量においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。雌の CYAP 投与群（2 ppm、28 日間）の小核出現頻度において、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な差が認められたが、小核の低値に因るものであり、毒性学的に意義のあるものとは考えられなかった。また、CYAP および CYO 投与群の、いずれの投与期間、いずれの投与量においても骨髓細胞に対する毒性の指標である多染性赤血球の割合に有意な減少は雄では認められなかった。雌では、CYAP 投与群（10ppm、28 日間）で有意な増加が認められ、CYO 投与群（2ppm、14 日間）で有意な減少が認められたが、用量依存性は認められず、いずれも検体による影響ではないと考えられた。

一方、陽性対照のシクロホスファミド投与群では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に明らかな増加が認められた。

以上の結果より、CYAP 原体および CYAP 代謝物 CYO は本試験条件下においてラット骨髓多染性赤血球に対して小核を誘発せず、染色体異常誘発性は有しないと判断した。

観察結果 (雄)

薬物	投与量 (ppm)	投与 期間	使用 動物数	PCE/(PCE+NCE) (%) <sup>a)</sup> (平均±SD)	MNPCE (%) <sup>b)</sup> (平均±SD)
溶媒対照 (コーンオイル)	0	7日	4	83.4±6.09	0.25±0.173
CYAP 原体	2	7日	4	83.9±8.74	0.18±0.171
	10	7日	4	84.5±7.56	0.13±0.096
	20	7日	4	86.8±4.25	0.20±0.163
CYO	1	7日	4	84.6±8.00	0.28±0.150
	6	7日	4	82.2±6.44	0.25±0.058
	12	7日	4	77.7±5.24	0.20±0.141
陽性対照 (CP)	60 mg/kg	- <sup>c)</sup>	3	39.8±14.52** <sup>d)</sup>	2.47±1.206** <sup>d)</sup>
溶媒対照 (コーンオイル)	0	14日	4	87.6±8.18	0.08±0.096
CYAP 原体	2	14日	4	84.3±4.78	0.23±0.150
	10	14日	4	76.5±17.61	0.23±0.096
	20	14日	4	87.6±2.46	0.20±0.163
CYO	1	14日	4	75.5±11.80	0.13±0.126
	6	14日	4	80.0±9.50	0.13±0.096
	12	14日	4	86.8±9.16	0.23±0.222
溶媒対照 (コーンオイル)	0	28日	4	67.4±18.80	0.13±0.096
CYAP 原体	2	28日	4	62.7±23.29	0.20±0.141
	10	28日	4	49.3±18.98	0.03±0.050
	20	28日	4	57.6±8.73	0.20±0.216
CYO	1	28日	4	71.0±7.19	0.15±0.058
	6	28日	4	52.6±8.17	0.15±0.100
	12	28日	4	74.2±8.24	0.20±0.115

PCE : 多染性赤血球、 NCE : 正染性赤血球

MNPCE : 多染性赤血球 1000 個のうち小核を有する多染性赤血球の出現頻度

CP : シクロホスファミド

a) \*\*: p < 0.01 (t 検定)

b) \*\*: p < 0.01 (Kastenbaum-Bowman の方法)

c) 1 回投与、骨髄採取時間は投与後 24 時間

d) 溶媒対照群 (7 日) と比較した。

観察結果 (雌)

薬物	投与量 (ppm)	投与 期間	使用 動物数	PCE/(PCE+NCE) (%) <sup>a)</sup> (平均±SD)	MNPCE (%) <sup>b)</sup> (平均±SD)
溶媒対照 (コーンオイル)	0	7日	4	77.3±11.94	0.18±0.096
CYAP 原体	2	7日	4	87.6±5.47	0.18±0.096
	10	7日	4	84.3±4.91	0.18±0.126
	20	7日	4	68.5±8.11	0.08±0.096
CYO	1	7日	4	80.1±5.28	0.33±0.222
	6	7日	4	75.8±5.58	0.15±0.173
	12	7日	4	79.4±7.94	0.30±0.115
陽性対照 (CP)	60 mg/kg	- <sup>c)</sup>	3	51.3±7.17* <sup>d)</sup>	3.90±0.100** <sup>d)</sup>
溶媒対照 (コーンオイル)	0	14日	4	75.7±6.39	0.20±0.183
CYAP 原体	2	14日	4	80.5±11.53	0.20±0.183
	10	14日	4	85.0±7.21	0.25±0.058
	20	14日	4	71.0±11.25	0.15±0.173
CYO	1	14日	4	57.4±11.40*	0.15±0.100
	6	14日	4	79.6±13.22	0.10±0.082
	12	14日	4	79.4±13.02	0.20±0.082
溶媒対照 (コーンオイル)	0	28日	4	50.2±7.23	0.30±0.082
CYAP 原体	2	28日	4	53.3±16.72	0.10±0.000*
	10	28日	4	65.0±7.98*	0.23±0.050
	20	28日	4	46.2±21.97	0.15±0.173
CYO	1	28日	4	46.2±17.29	0.23±0.206
	6	28日	4	52.0±6.61	0.23±0.171
	12	28日	4	55.1±7.32	0.23±0.050

PCE : 多染性赤血球、

NCE : 正染性赤血球

MNPCE : 多染性赤血球 1000 個のうち小核を有する多染性赤血球の出現頻度

CP : シクロホスファミド

a) \* : p < 0.05 (t 検定)

b) \* : p < 0.05、\*\* : p < 0.01 (Kastenbaum-Bowman の方法)

c) 1 回投与、骨髄採取時間は投与後 24 時間

d) 溶媒対照群 (7 日) と比較した。



D. 製剤を用いた試験成績

1. CYAP 50%乳剤

(1) CYAP 50%乳剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 製1-1)

試験機関：(株) ポゾリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1986年

検体：CYAP 50%乳剤 (サイアノックス乳剤)

検体純度：50%乳剤

[組成]	CYAP	50.0%
	乳化剤、有機溶剤等	50.0%

供試動物：SD系ラット、7週齢、体重；雄 220～238 g、雌 148～172 g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：6用量の検体投与群を設け、それらの死亡率から Probit 法により LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体を注射用蒸留水に懸濁し、投与液量 10 mL/kg の割合で単回経口投与した。

対照群には注射用蒸留水のみを同様に投与した。投与前約 16 時間絶食させた。

観察・検査項目：症状観察は、投与後 6 時間までは経時的に、その後は毎日 1 回行った。

体重測定は、投与直前、投与後 1、2、3、7、10 および 14 日に実施した。

死亡動物および試験終了時の全生存動物について剖検し、組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、700、910、1180、1540、2000、2600
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1210 (981～1494) 雌 1589 (1296～1918)
死亡開始および 終了時間	投与後 4 時間から開始 投与後 4 日に終了
症状発現および 消失時間	投与後 5 分から発現 投与後 8 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 700 (全ての投与群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 700 雌 1180

中毒症状としては、700 mg/kg 群では雌雄で投与後 5 分より自発運動減少、投与

後 15 分より振戦、流涎、呼吸数減少および深大、1 時間より流涙が認められ、その後血涙も認められた。投与後 2 日以降には粗毛を呈す動物も認められた。投与量を増すにしたがい腹臥姿勢、皮膚の蒼白化も認められた。これらの症状は生存動物では投与後 4~8 日に回復した。体重では投与後 3 日まで減少あるいは増加抑制がみられたが、その後は順調に増加した。剖検において、死亡例には肺、胃、小腸、大腸に暗赤色斑あるいは暗赤色内容物、肝臓の退色および胸腺の暗赤色斑が観察されたが、観察期間終了時の生存動物では、検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

(2) CYAP 50%乳剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 製1-2)

試験機関：(株) ポリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1986年

検体：CYAP 50%乳剤 (サイアノックス乳剤)

検体純度：50%乳剤

[組成] CYAP 50.0%  
 乳化剤、有機溶剤等 50.0%

供試動物：ICR系マウス、7週齢、体重；雄 26.9～32.6 g、雌 21.8～25.8 g、  
 1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：7用量の検体投与群を設け、それらの死亡率から Probit 法により LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体を注射用蒸留水に懸濁し、投与液量 10 mL/kg の割合で単回経口投与した。  
 対照群には注射用蒸留水のみを同様に投与した。投与前約 16 時間絶食させた。

観察・検査項目：症状観察は、投与後 6 時間までは経時的に、その後は毎日 1 回行った。

体重測定は、投与直前、投与後 1、2、3、7、10 および 14 日に実施した。

死亡動物および試験終了時の全生存動物について剖検し、組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、620、810、1050、1370、1780、2310、3000
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1820 (1476～2246) 雌 1839 (1501～2216)
死亡開始および 終了時間	投与後 2 時間から開始 投与後 3 日に終了
症状発現および 消失時間	投与後 5 分から発現 投与後 2 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 620 (全ての投与群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 1050 雌 1370

中毒症状としては、620 mg/kg 群では雌雄で投与後 5 分より自発運動減少、投与後 15 分より呼吸数減少および深大が認められ、投与量を増すにしたがい腹臥姿

勢、流涙、流涎も認められた。これらの症状は生存例では投与後 2 日までに回復した。体重では投与後 3 日まで減少あるいは増加抑制が認められたが、その後は順調に増加した。剖検において、死亡例の肺に暗赤色斑、胃の腺胃部に暗赤色斑散在、小腸に暗赤色内容物が観察されたが、観察期間終了時の生存動物では、検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

(3) CYAP 50%乳剤のラットにおける経皮毒性試験

(資料 製1-1)

試験機関：(株) ボゾリサーチセンター  
[GLP 対応]

報告書作成年：1986年

検体：CYAP 50%乳剤 (サイアノックス乳剤)

検体純度：50%乳剤

[組成] CYAP 50.0%  
乳化剤、有機溶剤等 50.0%

供試動物：SD系ラット、7週齢、体重；雄 225～254 g、雌 164～186 g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

投与方法：検体の原液を 2.0 mL/kg の割合で前日に刈毛した背部皮膚 (4 × 5 cm) に塗布し、リント布とサージカルテープで被覆・固定した。24 時間後にリント布を除去し、温水で塗布部位を清拭した。対照群には注射用蒸留水を用いて同様に処置した。

観察・検査項目：症状観察は、投与後6時間までは経時的に、その後は毎日1回行った。

体重測定は、投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に実施した。

観察期間終了時に生存していた全ての動物について剖検し、肉眼的病理所見を記録した。

結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	0、2000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雌雄共 > 2000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし
症状発現および 消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000

死亡および中毒症状は認められなかった。また、適用部位の皮膚に刺激性変化およびその他の異常は認められなかった。

体重ならびに剖検においても検体投与による影響は認められなかった。

(4) CYAP 50%乳剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 製1-3)

試験機関：(株) ボゾリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1986年

検体：CYAP 50%乳剤 (サイアノックス乳剤)

検体純度：50%乳剤

[組成]	CYAP	50.0%
	有機溶剤、乳化剤等	50.0%

供試動物：日本白色種雄ウサギ、14週齢、体重；2.50～2.70 kg、6匹

観察期間：10日間

投与方法：刈毛した背部を2.5 cm × 2.5 cm づつ4部位に分け、頭部側の左右に検体および500倍希釈液各0.5 mLをリント布を用いて貼付し、油紙と弾性包帯で被覆・固定した。尾部側左右は無処置対照としてリント布のみを貼付し同様に処置した。適用後4時間にリント布を除き適用部位を蒸留水で清拭した。

観察項目：検体および500倍希釈液の除去1、24、48および72時間後、その後は10日まで毎日1回紅斑と浮腫の徴候を観察し、農林水産省ガイドライン(1985年)に従って採点した。刺激の程度はDraize法に準拠して評価した。

結果：観察した刺激性変化の採点結果を次頁の表1および2に示した。

検体では非常に軽度の紅斑および浮腫が全例に観察されたが、時間の経過と共に軽減し5日に消失した。6例中2例では適用部位に硬結がみられた後に落屑し10日に回復した。

500倍希釈液の適用において刺激性は観察されなかった。

以上の結果から、CYAP 50%乳剤はウサギの皮膚に対して、軽度の刺激性ありと判断された。500倍希釈液はウサギの皮膚に対して、刺激性はないと判断された。

表1 CYAP 50%乳剤のウサギの皮膚に対する局所反応の強さ

動物 番号	項目	最高値	曝露後時間					
			1時間	24時間	48時間	72時間	4日	5日以降
1	紅斑・痂皮	4	1	2	2	1	1	0
	浮腫	4	1	2	2	1	0	0
2	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	1	2	1	1	1	0
	浮腫	4	1	2	1	1	0	0
4	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	1	1	1	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0	0
合計*	紅斑・痂皮	24	6	5	4	2	2	0
	浮腫	24	6	4	3	2	0	0
平均値*	紅斑・痂皮	4	1.0	0.8	0.7	0.3	0.3	0
	浮腫	4	1.0	0.7	0.5	0.3	0	0

\*：合計および平均値は申請者が算出した。

表2 500倍希釈液のウサギの皮膚に対する局所反応の強さ

動物 番号	項目	最高値	曝露後時間（時間または日）					
			1時間	24時間	48時間	72時間	4日	5日以降
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0
合計*	紅斑・痂皮	24	0	0	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0	0	0
平均値*	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0

\*：合計および平均値は申請者が算出した。

(5) CYAP 50%乳剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 製1-4)

試験機関：(株) ボンリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1986年

検体：CYAP 50%乳剤 (サイアノックス乳剤)

検体純度：50%乳剤

[組成]	CYAP	50.0%
	乳化剤、有機溶剤等	50.0%

供試動物：日本白色種雄ウサギ、14週齢、体重；2.54～3.07 kg、

非洗眼群 6匹、洗眼群 3匹、検体 500倍希釈液 (非洗眼) 群 6匹

観察期間：72時間

投与方法：左眼に検体あるいは500倍希釈液0.1 mLを適用し、右眼は無処置対照眼とした。非洗眼群では、適用後の洗眼を実施しなかった。洗眼群では、適用2～3分後に、200 mLの微温湯で洗眼した。

観察項目：検体の非洗眼および洗眼群は適用1、24、48および72時間後、その後は13日まで1日1回刺激性を観察した。500倍希釈液群では適用1、24、48および72時間後に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、農林水産省ガイドライン(1985年)に従って採点し、刺激性の程度はFederal Register (1972年)の刺激性の評価分類を参考に評価した。

結果：観察した刺激性変化の採点結果を表1、2および3に示した。

検体の非洗眼群において、適用後1あるいは24時間に角膜混濁、虹彩充血、結膜発赤および腫脹が認められ、虹彩および結膜の変化は6日までに消失した。角膜では適用後72時間ないし4日に血管新生が観察されたが13日に消失した。検体洗眼群では、角膜混濁、虹彩充血、結膜発赤および腫脹が認められ、虹彩および結膜の変化は6日までに消失した。角膜では適用後72時間に混濁部分に血管新生が観察され、混濁は10日に、血管新生は13日に消失した。検体500倍希釈液(非洗眼)群では、眼粘膜に刺激性反応は認められなかった。

以上の結果から、CYAP 50%乳剤はウサギの眼に対して非常に強い刺激性または腐食性があると判断され、洗眼効果は認められなかったが、500倍希釈液には刺激性はないと判断された。



表1 CYAP 50%乳剤のウサギの眼に対する局所反応の強さ（非洗眼群）

項目			最高 評点	適用後時間（時間または日）														
				1	24	48	72	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	11日	12日	13日	
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜 混濁	程度	4	1	1	1	1*	1*	1*	1*	0*	0*	0*	0*	0*	0	
		虹 彩	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			浮腫	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	動物 番号 2	角膜 混濁	程度	4	1	1	1	1	1*	1*	1*	1*	1*	0*	0*	0*	0	0
		虹 彩	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
			浮腫	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	動物 番号 3	角膜 混濁	程度	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		虹 彩	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
動物 番号 4	角膜 混濁	程度	4	1	1	1	1	1*	1*	1*	1*	0*	0*	0*	0*	0	0	
	虹 彩	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	結膜	発赤	3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		浮腫	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
動物 番号 5	角膜 混濁	程度	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	虹 彩	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	結膜	発赤	3	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		浮腫	4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
動物 番号 6	角膜 混濁	程度	4	1	1	1	1*	1*	1*	1*	1*	0*	0*	0*	0*	0	0	
	虹 彩	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	結膜	発赤	3	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
		浮腫	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
合計*	角膜 混濁	程度	24	6	6	6	6	4	4	4	3	1	0	0	0	0	0	
	虹 彩	12	3	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	結膜	発赤	18	4	10	6	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0		
		浮腫	24	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
平均値**	角膜 混濁	程度	4	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7	0.7	0.7	0.5	0.2	0	0	0	0		
	虹 彩	2	0.5	1.0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	結膜	発赤	3	0.7	1.7	1.0	0.7	0.5	0.3	0	0	0	0	0	0			
		浮腫	4	1.2	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

\*：血管新生を示す

\*\*：合計および平均値は申請者が算出した。

表 2 CYAP 50%乳剤のウサギの眼に対する局所反応の強さ (洗眼群)

項目		最高 評点	適用後時間 (時間または日)													
			1	24	48	72	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	11日	12日	13日
洗眼群 (3匹 平均)	角膜混濁 程度	4	1.0	1.0	1.0	1.3*	1.3*	1.0*	1.0*	0.7*	0.7*	0.3*	0*	0**	0**	0
	虹彩	2	0	0.7	0.7	0.3	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	結膜 発赤	3	1.0	2.0	2.0	1.7	0.7	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
	結膜 浮腫	4	3.3	0.7	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : 3例中2例に血管新生を認めた。

\*\* : 3例中1例に血管新生を認めた。

表 3 500倍希釈液のウサギの眼に対する局所反応の強さ (非洗眼群)

項目			最高 評点	適用後時間 (時間)				
				1	24	48	72	
非 洗 眼 群	動物 番号 11	角膜混濁 程度	4	0	0	0	0	
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
	動物 番号 12	角膜混濁 程度	4	0	0	0	0	
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
	動物 番号 13	角膜混濁 程度	4	0	0	0	0	
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
	動物 番号 14	角膜混濁 程度	4	0	0	0	0	
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
	動物 番号 15	角膜混濁 程度	4	0	0	0	0	
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
	動物 番号 16	角膜混濁 程度	4	0	0	0	0	
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0

(6) CYAP 50%乳剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 製1-5)

試験機関：(株) ポリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1986年

検体：CYAP 50%乳剤 (サイアノックス乳剤)

検体純度：50%乳剤

[組成]	CYAP	50.0%
	乳化剤、有機溶剤等	50.0%

供試動物：Hartley 系雌モルモット、投与開始時週齢；7 週齢、

投与開始時体重；314～416 g、1 群 10～20 匹

観察期間：感作開始後 24 日間

試験操作：[Maximization 法]

投与量設定根拠；

感作 (皮内)；肩甲骨上を刈毛・剃毛し、下記の投与液を用いて 3 対の皮内投与 (0.05 mL/ 部位) を行った。陽性対照群には 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) を用いた。

- 検体処置群
- 1) Freund's Complete Adjuvant (FCA) と注射用蒸留水の等量混合物
  - 2) 検体の 3% 乳化液
  - 3) 検体の 6% 乳化液と FCA の等量混合物

- 陽性対照群
- 1) FCA と注射用蒸留水の等量混合物
  - 2) DNCB の 0.1% オリーブ油溶液
  - 3) DNCB の 0.2% FCA 溶液と注射用蒸留水の等量混合物

感作 (経皮)；皮内投与後 6 日に、肩甲骨上に 10% ラウリル硫酸ナトリウム含有ワセリン 0.2 g を塗布して前処理した。塗布後 24 時間にこの部位をエーテルでふきとり、検体原液または 1% DNCB オリーブ油溶液 0.2 mL を 48 時間閉塞貼布した。対照群については注射用蒸留水を同様に処置した。

惹起；皮内投与後 21 日に左右側胴部を刈毛・剃毛し、左側胴部に検体の 30% 乳化液または 0.01% DNCB オリーブ油溶液 0.1 mL を 24 時間閉塞貼布した。右側には溶媒を同様に処置した。

観察項目：惹起後 24、48 および 72 時間に皮膚反応の有無等を肉眼的に観察し、Magnusson and Kligman の評価表に従い判定した。

結果：各観察時間において感作変化が認められた動物数次表に示した。  
 検体感作群において軽度の紅斑が認められ、24 時間後の陽性率は 10%であった。  
 一方、陽性対照の DNCB 感作群においては、全例に軽度から強度の紅斑または強度の浮腫が認められた。

以上の結果から、CYAP 50%乳剤の皮膚感作性は Maximization 法において陽性であると判断した。

群	感作	惹起	供試動物数	感作反応動物数												陽性率					
				24 時間後					48 時間後					72 時間後					24 時間	48 時間	72 時間
				皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計			
0	1	2	3	0	1	2	3		0	1	2	3		0	1	2	3				
検体	皮内： 3%検体	30% 検体	20	18	2	0	0	2/20	19	1	0	0	1/20	19	1	0	0	1/20	10%	5%	5%
	経皮： 検体原液																				
陽性対照	皮内： 溶媒	30% 検体	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0%	0%	0%
	経皮： リト布のみ																				
陽性対照	皮内： 0.1% DNCB	0.01% DNCB	20	0	3	13	4	20/20	0	6	11	3	20/20	0	15	4	1	20/20	100%	100%	100%
	経皮： 1%DNCB																				
陽性対照	皮内： 溶媒	0.01% DNCB	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0%	0%	0%
	経皮： 溶媒																				

検体：CYAP 50%乳剤、DNCB：2,4-ジニトロクロロベンゼン  
 皮膚反応評点（0：肉眼的に変化なし、1：軽度またはまばらな紅斑、2：中等度の紅斑、3：強度紅斑および浮腫）

2. CYAP 40%水和剤

(1) CYAP 40%水和剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 製 2-1)

試験機関：(株) ポリサーチセンター  
[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検 体：CYAP 40%水和剤 (サイアノックス水和剤)

検体純度：40%水和剤

[組成]	CYAP	40.0%
	鉱物質微粉等	60.0%

供試動物：SD 系ラット、7 週齢、体重；雄 216～236 g、雌 140～166 g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

試験方法：6 用量の検体投与群を設け、それらの死亡率から Probit 法により LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体を注射用蒸留水に懸濁し、投与液量 10.0 mL/kg の割合で単回経口投与した。対照群には注射用蒸留水のみを同様に投与した。投与前約 16 時間絶食させた。

観察・検査項目：症状観察は、投与後 6 時間までは経時的に、その後は毎日 1 回行った。

体重測定は、投与直前、投与後 1、2、3、7、10 および 14 日に実施した。

観察期間終了時に生存していた全ての動物について剖検し、肉眼的病理所見を記録した。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	0、880、1250、1770、2500、3540、5000
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1715 (1298～2264) 雌 2395 (1870～3135)
死亡開始および 終了時間	投与後 2 時間から開始 投与後 4 日に終了
症状発現および 消失時間	投与後 5 分から発現 投与後 5 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 880 (全ての投与群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 880 雌 1250

中毒症状としては、自発運動減少、振戦、流涎、呼吸減少および深大、腹臥姿勢および流涙が 880 mg/kg 群で投与後 15 分より、1250 mg/kg 以上の群では投与

後 5 分より認められた。これらの症状は生存例では投与後 5 日以内に回復した。  
2500 mg/kg 群雄 1 例に眼球の一部白色化が投与後 7 日から観察期間終了時まで認められた。

体重減少あるいは増加抑制が投与後 3 日まで、全投与群で認められたが、その後は順調に増加した。

剖検において、死亡例では肺に暗赤色斑、胃の腺胃部に暗赤色斑、小腸に暗赤色内容物が認められた。生存例では、2500 mg/kg 群雄 1 例に眼球の一部白色化が観察されたことを除き異常は認められなかった。

(2) CYAP 40%水和剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 製 2-2)

試験機関：(株) ポリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検 体：CYAP 40%水和剤 (サイアノックス水和剤)

検体純度：40%水和剤

[組成]	CYAP	40.0%
	鉱物質微粉等	60.0%

供試動物：ICR 系マウス、7 週齢、体重；雄 28.2~32.9 g、雌 22.0~25.7 g、

1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

試験方法：7 用量の検体投与群を設け、それらの死亡率から Lichfield-Wilcoxon 法により LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体を注射用蒸留水に懸濁し、投与液量 10 mL/kg の割合で単回経口投与した。

対照群には注射用蒸留水のみを同様に投与した。投与前約 16 時間絶食させた。

観察・検査項目：症状観察は、投与後 6 時間までは経時的に、その後は毎日 1 回行った。

体重測定は、投与直前、投与後 1、2、3、7、10 および 14 日に実施した。

観察期間終了時に生存していた全ての動物について剖検し、肉眼的病理所見を記録した。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	0、1350、1750、2280、 2960、3850、5000、6500
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 4800 (3429~6720) 雌 6100 (5259~7076)
死亡開始および 終了時間	投与後 1 時間から開始 投与後 5 日に終了
症状発現および 消失時間	投与後 5 分から発現 投与後 9 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 1350 (すべての投与群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 2280 雌 3850

中毒症状としては、自発運動減少、呼吸数減少および深大が 1350 mg/kg 群で投

与後 30 分より、1750 mg/kg 投与以上で投与後 15 分より認められた。また、流涙、腹臥姿勢、粗毛、振戦、間代性痙攣、皮膚の蒼白化も認められた。

これらの症状は生存例では投与後 9 日以内に回復した。

体重減少あるいは増加抑制が投与後 3 日まで、1350 mg/kg 投与群の雌を除く投与群で認められ、6500 mg/kg 投与群の雌では、投与後 7 日まで体重減少が認められたが、その後は順調に増加した。

剖検では、死亡例の肺および腺胃に暗赤色斑、肝臓の退色が観察されたが、生存例に異常は認められなかった。



(3) CYAP 40%水和剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 製 2-1)

試験機関：(株) ボゾリサーチセンター  
[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検 体：CYAP 40%水和剤 (サイアノックス水和剤)

検体純度：40%水和剤

[組成]	CYAP	40.0%
	鉱物質微粉等	60.0%

供試動物：SD 系ラット、7 週齢、体重；雄 258~277 g、雌 180~196 g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を注射用蒸留水に懸濁し、2000 mg/kg を投与液量 2.0 mL/kg の割合で刈毛後 24 時間の背部皮膚 (4 × 5 cm) に塗布し、リント布とサージカルテープで被覆・固定した。投与後 24 時間にリント布を除去し、温水で塗布部位を清拭した。対照群には注射用蒸留水を用いて同様に処置した。

観察・検査項目：症状観察は、投与後 6 時間までは経時的に、その後は毎日 1 回行った。

体重測定は、投与直前、投与後 1、2、3、7、10 および 14 日に実施した。

観察期間終了時に生存していた全ての動物について剖検し、肉眼的病理所見を記録した。

結 果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	0、2000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雌雄共 > 2000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし
症状発現および 消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000

一般状態に異常を認めなかった。また、適用部位の皮膚に刺激性変化およびその他の異常は認められなかった。体重では検体投与による影響は認められなかった。剖検においても異常はみられなかった。

(4) CYAP 40%水和剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 製2-3)

試験機関：(株) ボゾリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1987年

検体：CYAP 40%水和剤 (サイアノックス水和剤)

検体純度：40%水和剤

[組成]	CYAP	40.0%
	鉱物質微粉等	60.0%

供試動物：日本白色種雄ウサギ、15週齢、体重；2.62～2.95 kg、6匹

観察期間：72時間

投与方法：背部を2.5 cm × 2.5 cm ずつの2部位に分け、左側に検体500 mg をリント布にのせ、同量の蒸留水で湿らせてから貼付し、油紙と弾性包帯で被覆・固定した。右側は無処置対照としてリント布のみを貼付し同様に被覆・固定した。適用後4時間にリント布を除去し適用部位を蒸留水で清拭した。

観察項目：検体の除去1、24、48および72時間後に紅斑と浮腫の徴候を観察し、農林水産省ガイドライン(1985年)に従って採点した。刺激の程度はDraize法に準拠して評価した。

結果：観察した刺激性変化の採点結果を次頁の表に示した。

いずれの観察時期においても刺激性は認められなかった。

以上の結果から、CYAP 40%水和剤はウサギの皮膚に対して、刺激性はないと判断された。

表 CYAP 40%水和剤のウサギの皮膚に対する局所反応の強さ

動物 番号	項目	最高値	曝露後時間			
			1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計*	紅斑・痂皮	24	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0
平均値*	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

\*：合計および平均値は申請者が算出した。

(5) CYAP 40%水和剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 製2-4)

試験機関：(株) ボソリサーチセンター  
[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検 体：CYAP 40%水和剤 (サイアノックス水和剤)

検体純度：40%水和剤

[組成]	CYAP	40.0%
	鉱物質微粉等	60.0%

供試動物：日本白色種雄ウサギ、15 週齢、体重；2.78～2.96 kg、  
非洗眼群 6 匹、洗眼群 3 匹

観察期間：72 時間

投与方法：左眼に検体 100 mg を適用し、右眼は無処置対照眼とした。非洗眼群では、適用後の洗眼を実施しなかった。洗眼群では、適用 2～3 分後に、200 mL の微温湯で洗眼した。

観察項目：適用 1、24、48 および 72 時間後に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、農林水産省ガイドライン (1985 年) に従って採点し、刺激性の程度は Federal Register (1972 年) の刺激性の評価分類を参考に評価した。

結 果：観察した刺激性変化の採点結果を表 1 および 2 に示した。

非洗眼群において、適用後 1 あるいは 24 時間に角膜混濁、結膜発赤および腫脹、虹彩充血が認められ、角膜および虹彩の変化は 48 時間までに、結膜の変化は 72 時間までに消失した。

洗眼群では結膜発赤および腫脹が認められたが 24 時間までに消失した。

以上の結果から、CYAP 40%水和剤はウサギの眼に対して、わずかな刺激性があると判断されたが、洗眼により刺激性が軽減するものと考えられた。

表1 CYAP 40%水和剤のウサギの眼に対する局所反応の強さ（非洗眼群）

項目		最高 評点	適用後時間（時間）					
			1	24	48	72		
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	1	0
			浮腫	4	1	0	0	0
	動物 番号 2	角膜混濁	程度	4	0	1	0	0
		虹 彩		2	0	0	1	0
		結膜	発赤	3	0	1	1	0
			浮腫	4	1	1	0	0
	動物 番号 3	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	1	0
			浮腫	4	1	1	0	0
	動物 番号 4	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
	動物 番号 5	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	0	0
			浮腫	4	1	1	0	0
	動物 番号 6	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
合計*	角膜混濁	程度	24	0	1	0	0	
	虹 彩		12	0	0	1	0	
	結膜	発赤	18	5	4	3	0	
		浮腫	24	6	3	0	0	
平均値*	角膜混濁	程度	4	0	0.2	0	0	
	虹 彩		2	0	0	0.2	0	
	結膜	発赤	3	0.8	0.7	0.5	0	
		浮腫	4	1.0	0.5	0	0	

\*：合計および平均値は申請者が算出した。

表 2 CYAP 40%水和剤のウサギの眼に対する局所反応の強さ (洗眼群)

項 目			最高 評点	適用後時間 (時間)			
				1	24	48	72
洗眼群 (3匹平均)	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1.0	0	0	0
		浮腫	4	1.0	0	0	0

(6) CYAP 40%水和剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 製 2-5)

試験機関：(株) ポリサーチセンター  
[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検 体：CYAP 40%水和剤 (サイアノックス水和剤)

検体純度：40%水和剤

[組成]	CYAP	40.0%
	鉱物質微粉等	60.0%

供試動物：Hartley 系雌モルモット、投与開始時週齢；7 週齢、  
投与開始時体重；300~430 g、1 群 10~20 匹

観察期間：感作開始後 24 日間

試験操作：[Maximization 法]

投与量設定根拠；

感作 (皮内)；肩甲骨上を刈毛・剃毛し、下記の投与液を用いて 3 対の皮内投与 (0.05 mL/部位) を行った。陽性対照物質には 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) を用いた。対照群については溶媒を用いて同様に処置した。

検体処置群 1) Freund's Complete Adjuvant (FCA)  
2) 検体の 1%液  
3) 検体の 2%液と FCA の 1:1 の混合物

陽性対照群 1) FCA  
2) DNCB の 0.1%オリーブ油溶液  
3) DNCB の 0.2% FCA 溶液と注射用蒸留水の 1:1 の混合物

感作 (経皮)；皮内投与後 6 日に、肩甲骨上を刈毛および剃毛し、10%ラウリル硫酸ナトリウム含有ワセリン 0.2 g を塗布して前処理した。その翌日、同部位に 30%液または 1% DNCB オリーブ油溶液 0.2 mL を 48 時間閉塞貼付した。対照群については注射用蒸留水またはオリーブ油を同様に処置した。

惹起； 皮内感作後 21 日に左右側胸部を刈毛・剃毛し、左側胸部に検体の 30%液または 0.01% DNCB オリーブ油溶液 0.1 mL を 24 時間閉塞貼付した。右側には溶媒を同様に処置した。

観察項目：惹起後 24、48 および 72 時間に皮膚反応の有無等を肉眼的に観察し、Magnusson and Kligman の評価表に従い判定した。

結果：各観察時間において感作変化が認められた動物数を次表に示した。

検体感作群において、全例に軽度から中等度の紅斑、1例に痂皮形成が認められた。一方、陽性対照のDNCB感作群においては、軽度の紅斑から強度の紅斑および浮腫、5例に痂皮形成が認められた。

以上の結果から、CYAP 40%水和剤は本試験条件下 (Maximization法) で皮膚感作性ありと判断した。

群	感作	惹起	供試動物	感作反応動物数												陽性率					
				24時間後					48時間後					72時間後					24時間	48時間	72時間
				皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計			
				0	1	2	3		0	1	2	3		0	1	2	3				
検体	皮内： 1%検体 経皮： 30%検体	30% 検体	20	0	9	11	0	20/20	0	10	10	0	20/20	1	15	4	0	19/20	100%	100%	95%
	皮内： 溶媒 経皮： 溶媒	30% 検体	20	20	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0/20	0%	0%	0%
陽性 対照	皮内： 0.1%DNCB 経皮： 1%DNCB	0.01% DNCB	10	0	1	3	6	10/10	0	2	5	3	10/10	0	3	7	0	10/10	100%	100%	100%
	皮内： 溶媒 経皮： 溶媒	0.01% DNCB	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0%	0%	0%

検体：CYAP 40%水和剤、DNCB：2,4-ジニトロクロロベンゼン

皮膚反応評点 (0：肉眼的に変化なし、1：軽度またはまばらな紅斑、2：中等度の紅斑、3：強度紅斑および浮腫)



### 3. CYAP 3%粉剤

#### (1) CYAP 3%粉剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 製3-1)

試験機関：(株) ポゾリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1987年

検体：CYAP 3%粉剤 (サイアノックス粉剤)

検体純度：3%粉剤

[組成]	CYAP	3.0%
	鉱物質微粉等	97.0%

供試動物：CD系ラット、7週齢、体重；雄 214~234 g、雌 150~168 g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：2用量の検体投与群を設け、それらの死亡率からLD<sub>50</sub>値を求めた。

投与方法：検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて強制単回経口投与した。投与量は10 mL/kgとした。対照群には5%アラビアゴム水溶液のみを同様に投与した。

観察・検査項目：症状観察は、投与後6時間までは経時的に、その後は毎日1回行った。

体重測定は、投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に実施した。

観察期間終了時に生存していた全ての動物について剖検し、肉眼的病理所見を記録した。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、2500、5000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雌雄共 > 5000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし
症状発現および 消失時間	投与後15分から発現 投与後1日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 2500 (全ての投与群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000

死亡は認められなかった。

中毒症状としては、2500および5000 mg/kg群で雌雄に関係なく投与後15分より自発運動減少、振戦、流涎、呼吸数減少および深大が認められた。これらの

症状は投与後 1 日までに回復した。

体重では投与後 3 日まで増加抑制がみられたが、その後は順調に増加した。

剖検において、検体投与による影響は認められなかった。

(2) CYAP 3%粉剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 製3-2)

試験機関：(株) ポリサーチセンター  
[GLP 対応]  
報告書作成年：1987年

検体：CYAP 3%粉剤 (サイアノックス粉剤)

検体純度：3%粉剤

[組成] CYAP 3.0%  
 鉱物質微粉等 97.0%

供試動物：ICR系マウス、7週齢、体重；雄 27.0~31.6 g、雌 20.0~23.5 g、  
1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：2用量の検体投与群を設け、それらの死亡率からLD<sub>50</sub>値を求めた。

投与方法：検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。投与液量は10 mL/kgとした。対照群には5%アラビアゴム水溶液のみを同様に投与した。

観察・検査項目：症状観察は、投与後6時間までは経時的に、その後は毎日1回行った。体重測定は、投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に実施した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について剖検し、肉眼的病理所見を記録した。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、2500、5000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雌雄共 > 5000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし
症状発現および 消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000

死亡および中毒症状は認められなかった。

体重および剖検においても検体投与による影響は認められなかった。

(3) CYAP 3%粉剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 製3-3)

試験機関：(株) ポリサーチセンター  
[GLP 対応]

報告書作成年：1987年

検体：CYA 3%粉剤 (サイアノックス粉剤)

検体純度：3%粉剤

[組成] CYAP 3.0%  
 鉱物質微粉等 97.0%

供試動物：CD系ラット、7週齢、体重；雄240～256g、雌160～172g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

投与方法：検体を0.4g/100gの割合で5%アラビアゴム水溶液に懸濁（ペースト状）し、前日に刈毛した背部皮膚（4×5cm）に塗布後、リント布とサージカルテープで被覆・固定した。24時間後にリント布を除去し、温水で塗布部位を清拭した。対照群には5%アラビアゴム水溶液のみを同様に処置した。

観察・検査項目：症状観察は、投与後6時間までは経時的に、その後は毎日1回行った。

体重測定は、投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に実施した。

観察期間終了時に生存していた全ての動物について剖検し、肉眼的病理所見を記録した。

結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	0、2000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雌雄共 > 2000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし
症状発現および 消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000

死亡および中毒症状は認められなかった。また、適用部位の皮膚に刺激性変化およびその他の異常は認められなかった。

体重ならびに剖検においても、検体投与による影響は認められなかった。

(4) CYAP 3%粉剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 製3-4)

試験機関：(株) ポリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1987年

検体：CYAP 3%粉剤 (サイアノックス粉剤)

検体純度：3%粉剤

[組成]	CYAP	3.0%
	鉱物質微粉等	97.0%

供試動物：日本白色種雄ウサギ、15週齢、体重；2.79～3.18 kg、6匹

観察期間：72時間

投与方法：刈毛した背部を 2.5 cm × 2.5 cm ずつの 2 部位に分け、左側に検体 500 mg をリント布にのせ、同量の蒸留水で湿らせて貼付し、油紙と弾性包帯で被覆・固定した。右側は無処置対照としてリント布のみを貼付し同様に被覆・固定した。適用後 4 時間後にリント布を除去し適用部位を蒸留水で清拭した。

観察項目：検体の除去 1、24、48 および 72 時間後に紅斑と浮腫の徴候を観察し、農林水産省ガイドライン (1985 年) に従って採点した。刺激の程度は Draize 法に準拠して評価した。

結果：観察した刺激性変化の採点結果を次頁の表に示した。

全例共に検体投与による刺激性は観察されなかった。

以上の結果から、CYAP 3%粉剤はウサギの皮膚に対して、刺激性はないと判断された。

表 CYAP 3%粉剤のウサギの皮膚に対する局所反応の強さ

動物 番号	項目	最高値	曝露後時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計*	紅斑・痂皮	24	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0
平均値*	紅斑・痂皮	4	0.0	0.0	0.0	0.0
	浮腫	4	0.0	0.0	0.0	0.0

\*：合計および平均値は申請者が算出した。

(5) CYAP 3%粉剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 製3-5)

試験機関：(株) ポリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1987年

検体：CYAP 3%粉剤 (サイアノックス粉剤)

検体純度：3%粉剤

[組成]	CYAP	3.0%
	鉱物質微粉等	97.0%

供試動物：日本白色種雄ウサギ、15週齢、体重；2.79～3.19 kg、  
非洗眼群 6匹、洗眼群 3匹

観察期間：72時間

投与方法：左眼に検体 100 mg を適用し、右眼は無処置対照眼とした。非洗眼群では、適用後の洗眼を実施しなかった。洗眼群では、適用 2～3 分後に、200 mL の微温湯で洗眼した。

観察項目：適用 1、24、48 および 72 時間後に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、農林水産省ガイドライン (1985 年) に従って採点し、刺激性の程度は Federal Register (1972 年) の刺激性の評価分類を参考に評価した。

結果：観察した刺激性変化の採点結果を表 1 および 2 に示した。  
非洗眼群・洗眼群共に刺激性反応は認められなかった。

以上の結果から、CYAP 3%粉剤はウサギの眼に対して、刺激性はないと判断した。

表1 CYAP 3%粉剤のウサギの眼に対する局所反応の強さ（非洗眼群）

項目			最高 評点	適用後時間（時間）					
				1	24	48	72		
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
		虹 彩		2	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	0	0	0	0	
			浮腫	4	0	0	0	0	
		動物 番号 2	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			虹 彩		2	0	0	0	0
	結膜		発赤	3	0	0	0	0	
			浮腫	4	0	0	0	0	
	動物 番号 3		角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			虹 彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0	
			浮腫	4	0	0	0	0	
		動物 番号 4	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			虹 彩		2	0	0	0	0
	結膜		発赤	3	0	0	0	0	
			浮腫	4	0	0	0	0	
	動物 番号 5		角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			虹 彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0	
			浮腫	4	0	0	0	0	
		動物 番号 6	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			虹 彩		2	0	0	0	0
	結膜		発赤	3	0	0	0	0	
			浮腫	4	0	0	0	0	

表2 CYAP 3%粉剤のウサギの眼に対する局所反応の強さ（洗眼群）

項目			最高 評点	適用後時間（時間）			
				1	24	48	72
洗眼群 (3匹平均)	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0



(6) CYAP 3%粉剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 製3-6)

試験機関：(株) ポリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検 体：CYAP 3%乳剤 (サイアノックス粉剤)

検体純度：3%粉剤

[組成]	CYAP	3.0%
	鉱物質微粉等	97.0%

供試動物：Hartley 系雌モルモット、投与開始時週齢；7 週齢、

投与開始時体重；340~432 g、1 群 10~20 匹

観察期間：感作開始後 30 日間

試験操作：[Buehler 法]

投与量設定根拠；

感作； 刈毛・剃毛した左側胴部に、検体の 50%液または 1% DNCB オリーブ油溶液の 0.2 mL を直径 2.5cm のパッチに塗布し、7 日間間隔で 3 回、それぞれ 6 時間閉塞貼付した。各貼付の終了後に適用部位を蒸留水で清拭した。

惹起； 最終感作の 14 日後に動物の右側胴部皮膚を刈毛・剃毛し、検体の 50%液または 0.25% DNCB オリーブ油溶液の 0.2 mL を直径 2.5cm のパッチに塗布し、6 時間閉塞貼付した。貼付終了後、適用部を蒸留水で清拭した。

観察項目：惹起後 24 および 48 時間に適用部位を肉眼的に観察し、Magnusson and Kligman の評価法に従って判定した。

結 果：各観察時間において感作変化が認められた動物数を次表に示した。

検体感作群においては全例とも皮膚に変化は認められなかった。一方、陽性対照の DNCB 感作群においては、全例に軽微ないし軽度の紅斑が認められた。

以上の結果から、CYAP 3%粉剤は本試験条件下では皮膚感作性は陰性と判断した。

群	感作	惹起	供 試 動 物	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				計	皮膚反応評点				計		
				0	1	2	3		0	1	2	3			
検体	50% 検体	50% 検体	20	20	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0/20	0%	0%
	溶媒	50% 検体	20	20	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0/20	0%	0%
陽性 対照	1% DNCB	0.25% DNCB	10	0	6	4	0	10/10	1	7	2	0	9/10	100%	90%
	溶媒	0.25% DNCB	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0%	0%

検体：CYAP 3%粉剤、DNCB：2,4-ジニトロクロロベンゼン

皮膚反応評点（0：肉眼的に変化なし、1：軽度またはまばらな紅斑、2：中等度の紅斑、3：強度紅斑および浮腫）