

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(11) 120週間反復経口投与毒性及び発がん性

1) ラットを用いた飼料混入投与による120週間反復経口投与毒性/発がん性併合試験

(資料No. 21)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：

検体の純度：	% (原体)	年2月7日分析
[経時的分析結果]	%	年4月2日分析
	%	年9月13日分析
	%	年6月24日分析
	%	年9月26日分析
	%	年3月9日分析
	%	年9月21日分析

供試動物：F344系ラット

第1試験；開始時6～7週齢、群平均体重；雄141～142 g、雌116～118 g、1群雌雄各75匹

第2試験；開始時7週齢、群平均体重116 g、1群雌65匹

第1試験では各群雌雄各5匹を18、27及び52週間投与後、各群雌雄各10匹を104週間投与後の中間屠殺動物に配分した。

第2試験は雌のコリンエステラーゼ (ChE) 活性に対する無毒性量を求める目的で、第1試験の約1年間経過後に追加試験として開始した。各群15匹は13週間隔の血液ChE活性測定、及び108週間投与後の脳ChE活性測定の対象動物とした。残りの各群50匹は第1試験で検体の発がん性が示された場合に病理組織学的検査を行うものとした。後述のように、第1試験の結果から検体の発がん性が示されなかったため、第2試験の結果は検体摂取量(1～108週)及びChE活性についてのみ記載している。

投与期間：第1試験 120週間( 年8月8日～ 年12月16日)

第2試験 122週間( 年10月9日～ 年11月3日)

投与方法：第1試験では0、0.1、1.5及び22.5 mg/kg/day、第2試験では0及び0.025 mg/kg/dayの投与量になるように検体を飼料に混入し、第1試験では120週間、第2試験では122週間にわたって随時摂取させた。検体を混入した飼料は週1回調製した。検体の飼料中濃度は直近の体重及び摂餌量に基づき決定した。飼料中濃度の変更は第1試験では投与24週まで週1回、第2試験では投与26週まで週1回、その後は両試験とも1～4週に1回の頻度で行った。

用量設定根拠：報告書に記載なし。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日観察し、触診を週1回行った。検体投与に関連すると考えられる症状において有意な差を示した代表週を下表に示す。さらに、すべての統計学的に有意な変化を下表に示す。

所見	検査週	性別及び投与量(mg/kg/day)							
		雄				雌			
		0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001  
(Fisherの直接確率法)

表中の数値は当該所見を呈した生存動物の割合(%)

22.5 mg/kg/day群雌において投与16週以後、泌尿生殖器の湿潤または汚れ、及び眼窩周囲の汚れまたは眼脂が高頻度に観察された。これらの所見はコリンエステラーゼ活性阻害に伴う副交感神経系の過剰刺激によるものと考えられることから、検体投与の影響と判断された。

肛門周囲の汚れが投与期間を通じて全群で認められ、投与39～73週に対照群及び投与群で発生頻度が顕著に増加した。雄では本所見は投与39～43週に対照群で最高の発生頻度を示したものの、その後は投与群における発生頻度が対照群を上回り、投与58週以後には対照群では2～3例の発生であったが、投与群ではなお高頻度で認められた。本所見は22.5 mg/kg/day群で最も持続的に認められた。雌では本所見の発生頻度は雄よりも低く、全群でほぼ同時期から認められ始めたが、22.5 mg/kg/day群で最も顕著かつ持続的であった。22.5 mg/kg/day群で認められた肛門周囲の汚れについても副交感神経系の過剰刺激によるものと考えられることから、検体投与の影響と判断された。

<申請者注：22.5 mg/kg/day群雌において泌尿生殖器の湿潤は投与期間を通じて高値が観察され、統計学的に有意な差は投与16週から104週まで散見された。眼窩周囲の汚れも投与期間を通じて高値が観察され、統計学的に有意な差は投与17週から106週まで散見された。肛門周囲の汚れが投与期間を通じて全群で認められ、雄では本所見は投与39～43週に各投与群で有意な発生頻度の減少が認められたが、その後は投与群における発生頻度が対照群を上回り、投与48週以後には全ての投与群で有意な発生頻度の増加が認められた。22.5 mg/kg/day

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

群では投与69週まで有意な発生頻度の増加が認められた。肛門周囲の汚れは雌においては投与43週から73週まで有意な増加が観察された。報告書では、22.5 mg/kg/day群のみ検体投与の影響としているが、1.5 mg/kg/day群においても赤血球あるいは脳のコリンエステラーゼ活性の抑制が観察されていることから、1.5 mg/kg/day群の雄に認められた肛門周囲の汚れについても検体投与の影響と判断された。>

試験終了時の死亡率は下表のとおりであり、検体投与群と対照群の間に死亡率の差を認めなかった。

試験 投与量 (mg/kg/day)	第1試験								第2試験	
	0		0.1		1.5		22.5		0	0.025
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雌	雌
動物数*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

上段は死亡数、下段は死亡率

第1試験では121~122週後の間に解剖を行った。

第2試験では108週後に解剖を行った。

\*：途中解剖動物数を除く、ただし採血時死亡動物を含む。

体重変化；投与開始から投与26週まで週1回、その後は2週に1回、すべての生存動物の体重を測定し、体重増加量を算出した。

対照群と比べ統計学的有意差または傾向の認められた検査時期を次に示す。

検査時期	性別及び投与量(mg/kg/day)					
	雄			雌		
	0.1	1.5	22.5	0.1	1.5	22.5

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01(Studentのt検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの

<>：有意差は認められないが、参考値として記載した

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

22.5 mg/kg/day群雌で全投与期間(投与0~120週)の体重増加量が対照群よりも増加傾向を示した。また、22.5 mg/kg/day群雄で投与26~78週の体重増加量が増加した。

1.5及び0.1 mg/kg/day群雌雄では検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。

<申請者注>

摂餌量及び食餌効率；すべての生存動物の摂餌量を毎週ケージ毎(1ケージ当たり5匹飼育)に測定した。食餌効率は投与13週まで毎週算出し、さらに、投与開始から投与104週まで13または26週ごとに算出した。

摂餌量について対照群と比べ統計学的有意差または傾向の認められた検査時期を下表に示す。

検査時期	投与量(mg/kg/day)					
	雄			雌		
	0.1	1.5	22.5	0.1	1.5	22.5

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001

(Studentのt検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの

<>：有意差は認められないが、参考値として記載した。

22.5 mg/kg/day群雄で投与期間を通じて摂餌量が対照群に比較して有意な増加または増加傾向を示し、全投与期間(1~120週)の摂餌量が有意に増加した。22.5mg/kg/day群雌では投与期間の後半に摂餌量の増加または増加傾向が認められ、全投与期間の摂餌量が増加した。

1.5及び0.1 mg/kg/day群雌雄では摂餌量について検体投与に関連した変化はなかった。

食餌効率については、いずれの投与群の雌雄でも投与による影響はなかった。

飲水量；各群5ケージの動物(1ケージ当り5匹を飼育)について、投与1、12、25、51、77及び101週にそれぞれ5日間の飲水量を測定し、1日当りの飲水量を算出した。

対照群と比べ統計学的有意差または傾向の認められた検査時期を下表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検査時期 (週)	投与量 (mg/kg/day)					
	雄			雌		
	0.1	1.5	22.5	0.1	1.5	22.5

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001 (Studentのt検定)  
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの  
 <>：有意差は認められないが、参考値として記載した

22.5 mg/kg/day群雌で投与期間を通じて飲水量が減少または減少傾向を示し、  
 22.5及び1.5 mg/kg/day群雄でも投与1週に飲水量が減少した。  
 22.5及び1.5 mg/kg/day群雄で投与51及び101週に飲水量の増加が認められた  
 が、これらの変化は一貫性がないことから、偶発的なものと考えられた。  
 1.5 mg/kg/day群雌及び0.5 mg/kg/day群雌雄では検体投与に関連したと思わ  
 れる変化は認められなかった。

検体摂取量；摂餌量より算出した実際の投与期間中の平均検体摂取量は下表のとおり  
 であり、想定した検体投与量とほぼ一致した。

投与量(mg/kg/day)		0.025	0.1	1.5	22.5
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	—	0.10	1.5	22.6
	雌	0.02517	0.10	1.5	22.6

血液学的検査；12、25、51及び102週間投与後(それぞれ18、27、52及び104週間投与後  
 の中間屠殺動物)及び120週間投与後に各群雌雄各10匹を対象として、眼窩静  
 脈叢より採血し以下の項目について検査した。

ヘモグロビン濃度(Hb)、赤血球数、総白血球数、白血球百分比(好中球、リン  
 パ球、好酸球、好塩基球、単球)、ヘマトクリット値(PCV)、血小板数、平均赤  
 血球血色素濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)、網赤血球数数(12、102及び120  
 週間投与後のみ)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた検査時期を下表に示す。

検査 時期 (週)	検査項目	投与量(mg/kg/day)					
		雄			雌		
		0.1	1.5	22.5	0.1	1.5	22.5

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001(Studentのt検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの

\*：対照群の測定値が0であるため、当該投与群の測定値を記載

22.5及び1.5 mg/kg/day群雄で12週間投与後にヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数及び総白血球数(リンパ球数)が減少した。

22.5 mg/kg/day群雄で102週間投与後にヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度及び赤血球数が減少し、平均赤血球容積が増加した。これらの変化は一般状態不良の2例の測定値に起因し、これらの数値を除外した場合に統計学的有意差は認められなかった。

<申請者注：

>

したがって、すべての投与群の雌及び0.1 mg/kg/day群雄では投与に関連した変化はなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

血液生化学的検査；血液学的検査と同時期（最終の121週間投与後の検査を除く）に血液学的検査に用いた同じ動物から採血し、得られた血漿または血清を用いて以下の項目について検査した。

尿酸、血糖、総蛋白、血漿蛋白電気泳動分画（アルブミン、グロブリン $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2、 $\beta$ 、 $\gamma$ ）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アルカリホスファターゼ（AP）、ビリルビン、直接ビリルビン、コレステロール、ナトリウム、カリウム、カルシウム、塩素、クレアチニン、尿酸、無機リン、乳酸脱水素酵素（LDH）、クレアチンホスホキナーゼ（CPK）

対照群と比べ統計学的有意差の認められた検査時期を下表に示す。

検査 時期 (週)	検査項目	性別及び投与量(mg/kg/day)					
		雄			雌		
		0.1	1.5	22.5	0.1	1.5	22.5

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001 (Studentのt検定)  
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検査 時期 (週)	検査項目	性別及び投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		0.1	1.5	22.5	0.1	1.5	22.5

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001 (Studentのt検定)  
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検査時期 (週)	検査項目	性別及び投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		0.1	1.5	22.5	0.1	1.5	22.5

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001 (Studentのt検定)  
表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの

22.5 mg/kg/day群雌雄で12週週間投与後にアルカリホスファターゼ活性が減少し、雌で25週週間投与後、雄で51週週間投与後にも本変化が認められた。本変化は投与に関連すると思われるが、毒性学的意義は不明である。22.5 mg/kg/day群雌雄で25週週間投与後に尿酸が増加した。

<申請者注：

>  
したがって、1.5及び0.5 mg/kg/day群雌雄では投与に関連した変化はなかった。

コリンエステラーゼ (ChE) 活性検査；

第1試験では血液学的検査と同時期(120週週間投与後を除く)に血液学的検査に用いた同じ動物から採血し、さらに、17週週間投与後(18週週間投与後の中間屠殺動物)及び38週週間投与後(52週週間投与後の中間屠殺動物)から、第2試験では13、26、39、52、65、78、91及び104週週間投与後に各群8匹から採血した。  
また、第1試験では18、27、52及び104週週間投与後の中間屠殺動物から、第2試験では108週週間投与後の屠殺動物のうち各群8匹から脳を採取した。  
これらの血液及び脳を用いて以下の項目を測定した。

血漿アセチルコリンエステラーゼ (AChE)、血漿ブチリルコリンエステラーゼ (BChE)、赤血球AChE、赤血球BChE(12及び38週週間投与後を除く)、脳AChE、脳BChE

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

対照群と比べ統計学的有意または傾向の認められた検査時期を下表に示す。

第1試験

検査 時期 (週)	検査項目	投与量(mg/kg/day)					
		雄			雌		
		0.1	1.5	22.5	0.1	1.5	22.5

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001 (Studentのt検定)  
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの  
 < >：有意差は認められないが、参考値として記載した

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

第2試験

検査時期 (週)	検査項目	投与量 (mg/kg/day)
		0.025

統計学的有意差: ↑↓:  $p < 0.05$ 、↑↓:  $p < 0.01$ 、↑↓:  $p < 0.001$  (分散分析)  
表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの  
< >: 有意差は認められないが、参考値として記載した

22.5 mg/kg/day群雌雄で投与期間を通じて血漿アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 及びブチリルコリンエステラーゼ (BChE) 活性、赤血球AChE活性、並びに脳AChE及びBChE活性が顕著に減少し、検体投与の影響であると判断された。

1.5 mg/kg/day群雌雄で投与期間を通じて血漿AChE及びBChE活性、並びに赤血球AChE活性が減少した。脳コリンエステラーゼ (ChE) 活性については、52及び104週間投与後に雌雄でBChE活性が減少し、52週間投与後に雌でAChE活性が減少し、検体投与との影響であると判断された。

0.1 mg/kg/day群雌雄では投与期間を通じて血漿AChE及びBChE活性が減少したが、赤血球及び脳ChE活性の変化は認められなかった。血漿AChE及びBChE活性の減少については、毒性学的意義は認められなかった。

0.025 mg/kg/day群雌でも血漿ChE活性の減少が認められたが、全投与期間の平均阻害率はAChEで13%、BChEで15%であり、毒性学的意義は認められなかった。

血漿及び赤血球ChE活性の阻害には用量依存性が認められた。また、血漿ChE活性の阻害の程度は雄よりも雌で大きかったが、雄でも投与期間の経過とともに顕著になった。

< 申請者注:  
>

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

尿検査；血液学的検査と同時期(120週間投与後を除く)に血液学的検査に用いた同じ動物を対象として、代謝ケージを用い16時間蓄尿で以下の項目について検査した。

外観、量、pH、比重、総還元物質、糖、蛋白質、ケトン体、胆汁色素、ウロビリリン、血色素、沈査

検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。

眼科学的検査；投与開始前に全動物を対象として、25、50、78及び102週間投与後に22.5 mg/kg/day群及び対照群のそれぞれ雌雄各20匹を対象として検査した。

検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。

臓器重量；中間屠殺動物及び投与終了時のすべての生存動物を対象として、以下の臓器について重量を測定し、同時に対体重比を算出した。

副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、下垂体、脾臓、精巣、甲状腺と上皮小体(固定後)

対照群と比べ統計学的有意の認められた検査時期を次表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検査 時期 (週)	検査項目		投与量 (mg/kg/day)						
			雄			雌			
			0.1	1.5	22.5	0.1	1.5	22.5	

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001(分散分析)  
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの

22.5及び1.5 mg/kg/day群雄において104及び120週間投与後に甲状腺の重量及び/または対体重比の増加が認められた。

その他にも対照群と比較して有意な変化が散見されたが、軽度であるか、用量依存性がないか、あるいは投与期間を通じた一貫した傾向がないことから、偶発的なものと考えられた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

肉眼的病理検査；途中死亡、切迫屠殺及び中間屠殺動物、並びに投与終了時のすべての生存動物について検査した。

検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。

病理組織学的検査；上記の肉眼的病理検査を行った動物を対象として、以下の臓器について病理組織学的検査を行った。

副腎、骨、脳、盲腸、結腸、十二指腸、眼球と視神経、ハーダー腺、心臓、回腸、空腸、腎臓、肝臓、肺(含主気管支)、リンパ節(頸部と腸間膜)、乳腺(尾側及び頭側)、食道、卵巣、膵臓、下垂体、前立腺、唾液腺、座骨神経、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺と上皮小体、気管、膀胱、子宮頸部、子宮、肉眼的病変部

#### [非腫瘍性病変]

認められた主要な非腫瘍性病変を表2に示す。

投与に関連した所見は前胃及び脾臓に認められた。

前胃については、投与105週から投与終了までの途中死亡・切迫屠殺動物において、雌雄ともに潰瘍が認められ、22.5 mg/kg/day群雌雄で関連病変(棘細胞増生、過角化症、粘膜下肉芽組織及び上皮過形成)の発生頻度の有意な増加または増加傾向を示した。最終屠殺動物の雌でも潰瘍が関連病変の棘細胞増生、過角化症及び粘膜下肉芽組織とともに観察され、これらの関連病変の発生頻度は22.5 mg/kg/day群で統計学的に有意に増加した。

脾臓については、最終屠殺動物の22.5 mg/kg/day群雌で前胃の変化に関連して、髓外造血の発生頻度が有意に増加した。

<申請者注:

>

#### [腫瘍性病変]

認められたすべての腫瘍性病変を表3に示す。

検体投与に関連した変化は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

＜申請者注：腫瘍発生頻度の全動物に対して統計検定を実施したところ、全動物において、22.5 mg/kg/day群雄で単球細胞性白血病及び雌で皮膚・皮下の線維腫の発生頻度が有意に増加した。

単球細胞性白血病の発生頻度(雄全動物：22.5 mg/kg/day)を下表に示す。

全動物	所見\検査動物数	65	65	64	65	65	65	65	65

(B)：良性腫瘍 (M)：悪性腫瘍

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓↓：p<0.01(Fisherの直接確率法、申請者実施)

( )：腫瘍発生数/検査動物数(%)

単球細胞性白血病はFisherラットに特有の加齢に伴って発生する造血器系腫瘍であり、背景データの発生頻度として10～72%とされており<sup>1)</sup>、雄のみの発生であることから、検体投与とは関連性のない偶発性変化であると判断した。

皮下の線維腫及び線維肉腫の発生頻度(雌全動物：22.5 mg/kg/day)を下表に示す。

全動物	所見\検査動物数	65	65	64	65	65	65	65	65

(B)：良性腫瘍 (M)：悪性腫瘍

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓↓：p<0.01(Fisherの直接確率法、申請者実施)

全動物において22.5 mg/kg/day群雌で皮膚・皮下の線維腫の発生頻度が有意に増加したが、悪性の線維肉腫との合算した線維腫/線維肉腫の発生頻度では、有意な差ではなく、かつ対照群との差もわずかであることから、検体投与との関連性のない偶発性変化であると判断された。>

以上、ダイアジノン原体のラットを用いた飼料混入投与による120週間反復経口投与毒性並びに発がん性試験における影響として、22.5 mg/kg/day群で臨床症状(眼窩周囲の汚れ・眼脂、泌尿生殖器の湿潤・汚れ及び肛門周囲の汚れ)、体重、摂餌量及び飲水量の変化、血液学的(ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数、リンパ球数の減少並びに平均赤血球容積が増加)及び生化学的变化(アルカリホスファターゼ活性の減少)、血漿、赤血球及び脳ChE活性の阻害、甲状腺重量の増加、並びに病理組織学的変化として前胃の潰瘍、棘細胞増生、過角化症、粘膜下肉芽組織及び上皮過形成及び脾臓の髓外造血が認められた。1.5 mg/kg/day群では臨床症状、飲水量の変化、血液学的変化、血漿、赤血球及び脳ChE活性の阻害、並びに甲状腺重量の増加が認められ、0.1及び0.025 mg/kg/day群では血漿ChE活性の阻害が認められた。投与による影響は雄よりも雌で顕著であった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ChE活性の測定結果の解釈では、赤血球または脳ChE活性の阻害が信頼性のある毒性の指標とされている<sup>1)</sup>。血漿ChE活性の阻害については、本酵素の生理学的作用が不明であり<sup>1)</sup>、顕著または完全に阻害された場合でも明確な症状を示さないことが本試験(52及び102週間投与後の22.5 mg/kg/day群雄)やその他の報告<sup>2) 3)</sup>で認められていることから、その毒性的意義は疑わしい。血漿ChE活性はChE阻害剤の投与に対する非常に高感度な指標であり、低用量のChE阻害剤の混餌投与であっても本酵素の軽度の阻害が生じる。軽度の血漿ChE活性の阻害は症状を伴わず、関連する病理学的変化がないことから、軽度の血漿ChE活性の減少(20%以下)はChE阻害剤が適切に吸収されたことを示唆するが、毒性影響の指標ではないと考えられる。したがって、無毒性量は血漿ChE活性の20%の減少のみが認められる用量とし、第1及び2試験のChE測定結果の回帰分析に基づき、無毒性量は雄で0.07 mg/kg/day、雌で0.03 mg/kg/dayであると算出された。

また、催腫瘍性はないものと判断した。

<申請者注：



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

参考文献

- 1) De Bruin, 1976, Biochemical Toxicology of Environmental Agents, Elsevier, pp. 981-1031
- 2) Clitherow, J.W. et al., 1963, Nature 199 p1000
- 3) Frawley, J.P. et al., 1952, J. Pharm. Exptl. Therap., 105 p.156
- 4) Boorman, G.A. et al., 1990, Pathology of the Fischer rat. 374-379
- 5) Office of pesticide programs science policy on the use of data on Cholinesterase inhibition for risk assessments of organophosphorous and carbamate pesticides, US EPA, August 18, 2000





表1. 一般状態(続き)


統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001(Fisherの直接確率法)  
表中の数値は当該所見を呈した生存動物の割合(%)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表1. 一般状態(続き)


統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、↑↓：p<0.001 (Fisherの直接確率法)  
表中の数値は当該所見を呈した生存動物の割合(%)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2. 非腫瘍性病変

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
途中死亡・切迫殺53~104週										

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01(Fisherの直接確率法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2. 非腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
途中死亡・切迫殺 105週～投与終了										

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↑↓：p<0.01(Fisherの直接確率法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2. 非腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
途中死亡・切迫殺 105週〜投与終了										
途中 計画殺 104週										

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01(Fisherの直接確率法)



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2. 非腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別		雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)		0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
最終 計画 殺											

統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2. 非腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
最終計画殺										
全動物										

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01(Fisherの直接確率法)申請者実施

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2. 非腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別		雄				雌				
		投与量 (mg/kg/day)		0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5	
全動物												

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01(Fisherの直接確率法)申請者実施

表 2. 非腫瘍性病変(続き)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
全動物										

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↑：p<0.01(Fisherの直接確率法)申請者実施

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 3. 腫瘍性病変

転帰	臓器	性別		雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)		0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
途中死亡・切迫殺											

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
途中死亡・切迫殺										

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別		雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)		0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
途中死亡・ 切迫殺											

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
途中死亡・切迫殺										

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法)

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
途中計画殺										
52週										

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法)



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌				
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5	
途中計画殺104週											

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌				
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5	
最終 計画 殺											

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別		雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)		0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
最終 計画 殺											

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
最終 計画 殺										

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別		雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)		0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
全動物											

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法、申請者実施)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別		雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)		0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
全動物											

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↑ : p<0.01(Fisherの直接確率法、申請者実施)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌				
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5	
全動物											

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法、申請者実施)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別		雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)		0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
全動物											

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↑ : p<0.01(Fisherの直接確率法、申請者実施)



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表3. 腫瘍性病変(続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (mg/kg/day)	0	0.1	1.5	22.5	0	0.1	1.5	22.5
全動物										
	合計									

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 統計学的有意差 : ↑↓ : p<0.05、↑↑↓ : p<0.01(Fisherの直接確率法、申請者実施)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2) イヌを用いた経口投与による慢性毒性試験

(資料No. 23)

試験機関：  
報告書作成年

<申請者注：

>

検体の純度：25%水和剤（製剤組成不明、有効成分含量

<

>

供試動物：雑種イヌ 1群2匹（0、4.6、23.1mg/kg/day群は雌雄各1匹、9.3 mg/kg/day群は雌2匹）

投与期間：46週間または27週間

投与量	性/投与期間	
対照群	♀；27週	♂；46週
4.6 mg/kg/day <sup>注</sup>	♀；46週	♂；46週
9.3 mg/kg/day <sup>注</sup>	♀；27週	♀；27週
23.1 mg/kg/day <sup>注</sup>	♀；27週	♂；27週

注：投与開始時の投与量、投与期間中の投与量は下表に記載した。

投与期間中の投与量

4.6 <sup>注</sup>		9.3		23.1	
投与量	投与量	投与週	投与量	投与週	投与量
1-12週	4.6	1-5	9.3	1-2	23.1
13	5.3	5-11	0	3-11	0
14-16	4.6	12-	4.6	12	6.9
17-46	4.3	13	5.3	13	8.0
		14-16	4.6	14-16	6.9
		17-26	4.3	17-26	6.5

注：投与開始時の投与量

投与方法：検体(25%水和剤)を純度分析し、ダイアジノン純度を換算し所定量の検体をカプセルに封入し、経口的に投与した。投与は原則として1週間に6日間行った。上表のごとく、動物の一般状態の悪化により9.3 mg/kg/day群では投与5-11週に、23.1 mg/kg/day群では投与3-11週に、検体投与を中止した。

観察・検査項目及び結果：

一般症状及び死亡率；一般症状及び生死を毎日観察した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検体投与群及び対照群とも試験期間中に死亡動物を認めなかった。

23.1 mg/kg/day群において雌雄ともに投与2週後以降、検体投与に関連した中毒症状（食欲不振、体重減少、沈鬱）が認められた。そのため、投与3週～11週までの間を休薬期間とした。休薬期間中、毒性症状は軽減したため、投与12週以降投薬を開始したが、上表のごとく投与用量を暫時削減した。投与27週に屠殺した。

9.3 mg/kg/day群においても雌雄ともに投与5週後以降、体重減少、食欲不振、軟便が認められた。投与6週～11週までの間を休薬期間とした。休薬期間中、毒性症状は軽減したため、投与12週以降投薬を開始したが、上表のごとく投与用量を暫時削減した。投与27週に屠殺した。

4.6 mg/kg/day群には、雌2例とも検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。投与46週に屠殺した。

体重変化；投与期間中毎週1回、全動物の体重を測定した。

23.1 mg/kg/day群においては投与2週後以降、9.3 mg/kg/day群においては投与5週後以降、検体投与に関連した体重減少または低下が認められた。4.6 mg/kg/day群においては検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。

摂餌量；各動物の摂餌量を週1回測定した。

23.1 mg/kg/day群においても投与2週後以降、食欲不振が認められた。9.3 mg/kg/day群においても投与5週後以降食欲不振が認められたが、休薬期間中、摂餌量は回復した。

血液学的検査；投与開始前、投与90日後、投与180日後及び投与終了時に全動物を対象として、以下の項目について検査した。

23.1 mg/kg/day群の雄1匹、9.3 mg/kg/day群の雌1匹は、投与163日後にも検査を行った。

沈降反応、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、白血球数、白血球百分比、シリングテスト

各検査項目とも検体投与に関連づけられる変化は認められなかった。

血液生化学的検査；血液検査と同時に全動物を対象として、尿素窒素、肝機能（プロムスルファレイン試験）について検査した。

各検査項目とも検体投与群と対照群の間に検体投与に関連づけられる差は認

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

められなかった。

尿検査；血液検査、血液生化学的検査と同時に全動物を対象として、以下の項目について検査した。

色調、pH、比重、糖、蛋白質、胆汁色素、潜血、沈渣

各検査項目とも検体投与に関連づけられる変化は認められなかった。

コリンエステラーゼ活性検査；毎週1回、全動物を対象として、血漿コリンエステラーゼ活性及び赤血球コリンエステラーゼ活性を測定した。脳コリンエステラーゼ活性は投与終了時に全動物を対象として測定した。

赤血球、血漿及び脳ChE活性の対照群に対する割合を下表に示す<sup>注</sup>

項目	投与量 (mg/kg/day)		
	4.6	9.3	23.1

表中の数値は変動の日安として対照群を100とした場合の値を示したもの（申請者計算）統計検定実施せず。

注：血漿及び設計ChEは投与期間中の平均値

23.1 mg/kg/day群では投与2週後以降、血漿コリンエステラーゼ活性及び赤血球コリンエステラーゼ活性の明らかな阻害が認められ、対照群に対する血漿コリンエステラーゼ活性及び赤血球コリンエステラーゼ活性は全試験期間の平均で、それぞれ79%、87%であった。脳コリンエステラーゼ活性は対照群に対し52%であった。

9.3 mg/kg/day群でも投与2週後以降、血漿コリンエステラーゼ活性及び赤血球コリンエステラーゼ活性の明らかな阻害が認められ、対照群に対する血漿コリンエステラーゼ活性及び赤血球コリンエステラーゼ活性は全試験期間の平均で、それぞれ88%、89%であった。脳コリンエステラーゼ活性は対照群に対し47%であった。

4.6 mg/kg/day群では試験期間中、血漿コリンエステラーゼ活性及び赤血球コリンエステラーゼ活性の阻害が認められた。脳コリンエステラーゼ活性は対照群に対し68%であった。

<申請者注：

>

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

肉眼的病理検査；試験終了時、対照群及び検体投与群のすべての動物を対象として剖検、肉眼的病理検査を行った。

対照群を含む全ての群において異常所見は認められず、検体投与に関連づけられる変化は認められなかった。

病理組織学的検査；試験終了時、対照群及び検体投与群のすべての動物を対象として、以下の臓器について病理組織学的検査を行った。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、子宮、大腸及び小腸、膀胱、骨髄

いずれの投与群においても検体投与に関連づけられる変化はなかった。

以上、ダイアジノン25%水和剤のイヌを用いた27週間または46週間経口投与による慢性毒性試験における影響としては、23.1及び9.3 mg/kg群において検体投与群に起因する中毒症状（食欲不振、体重減少、沈鬱あるいは軟便）が観察され、すべての検体投与群において血漿、赤血球及び脳のコリンエステラーゼ活性の阻害が観察された。以上のことから無毒性量は4.6 mg/kg/day未満と判断された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

3) サルを用いた経口投与による慢性毒性試験

(資料No. 24)

試験機関：

報告書作成年

<申請者注：

>

検体の純度：50%水和剤 (製剤組成不明、有効成分含量 )

<申請者注：

>

供試動物：サル (*Macaca mulatta*)、1群雌雄各3匹

投与期間：106週間

投与方法：検体(50%水和剤)のダイアジノン純度を換算し所定量を経口的に投与した。投与は1週間に6回行った。

投与量	性/動物数
対照群	雄；3 雌；3
5.0 mg/kg/day (34日以前 <sup>1)</sup> 10.0 mg/kg/day)	雄；3 雌；3
0.5 mg/kg/day (34日以前 1.0 mg/kg/day)	雄；3 雌；3
0.05 mg/kg/day (34日以前 0.1 mg/kg/day)	雄；3 雌；3

注：投与19から34日までは検体投与せず。

<申請者注：35日の用量変更の理由は報告書に記載なし。以下の群の投与量記載は投与35日以降のものを記載する。>

観察・検査項目及び結果：

一般症状及び死亡率；一般症状及び生死を毎日観察した。

一般症状としては、5.0 及び0.5 mg/kg/day群における周期的な軟便、5.0 mg/kg/day群の1匹及び0.05 mg/kg/day群の1匹に知覚過敏症等が観察された。その他、検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。

<申請者注：0.05 mg/kg/day群の1匹にみられた知覚過敏症については、後述するコリンエステラーゼ活性には0.05 mg/kg/day群には、異常がみられなかったことから、検体投与との関連性はない変化と判断された。>

死亡動物数を次表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

項目	性別及び用量群 (mg/kg/day)							
	雄				雌			
	0	0.05	0.5	5	0	0.05	0.5	5
供試動物数	3	3	3	3	3	3	3	3
死亡動物	数							
	死亡週							

各投与群において死亡動物が認められたがいずれも検体投与との関連性は認められなかった。

体重変化；投与期間中毎週1回、全動物の体重を測定した。

投与開始、終了時の体重及び体重増加量を下表に示す。

項目	性別及び用量群 (mg/kg/day)							
	雄				雌			
	0	0.05	0.5	5.0	0	0.05	0.5	5.0
投与開始時 (kg)								
投与終了時 (kg)								
体重増加量 (kg)								

Dunnett の多重比較検定：↑ ↓ :  $p \leq 0.05$  ↑↓ :  $p \leq 0.01$  (申請者実施)

各検体投与群の体重増加量は対照群に比べ、わずかに低値傾向を示し、特に雌で顕著であった。

<申請者注：

>

眼科学的検査；投与終了時、対照群及び検体投与群のすべての生存動物を対象として、以下の項目について眼科学的検査を行った。

眼圧(触診による推定)、瞳孔反応、結膜、眼瞼、角膜、眼房水、虹彩、レンズ、硝子体、眼底、強膜

検体投与に関連づけられる変化は認められなかった。

神経学的検査；試験終了時、対照群及び検体投与群のすべての生存動物を対象として神経学的検査を行った。

<申請者注：

>

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

その結果、検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。

ツベルクリン検査；投与7、9、16、20及び21カ月目に生存動物を対象としてツベルクリン検査を行った。

<申請者注： >

血液学的検査；投与66、78、91及び104週目に生存動物を対象として、以下の項目について検査した。

ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、沈降反応、白血球数、白血球百分比 (Stab：杆状核好中球、Seg：分葉核好中球、Eosi：好酸球比率、Lymp：リンパ球、Mono：単球)

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査時期	性別及び投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		0.05	0.5	5.0	0.05	0.5	5.0

Dunnett の多重比較検定：↑↓： $p \leq 0.05$  ↑↓： $p \leq 0.01$  (申請者実施)  
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの

検体投与に関連づけられる変化は認められなかった。

<申請者注： >

>

血液生化学的検査；投与66、78、91及び104週目に生存動物を対象として、以下の項目について検査した。

尿素窒素 (BUN)、血清アルカリホスファターゼ (ALP)、絶食時血糖、血清グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査 時期	性別及び投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		0.05	0.5	5.0	0.05	0.5	5.0

Dunnett の多重比較検定：↑↓： $p \leq 0.05$  ↑↓： $p \leq 0.01$  (申請者実施)  
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの

検体投与に関連づけられる変化は認められなかった。

<申請者注：

>

コリンエステラーゼ活性検査；投与66、78、91及び104週目に生存動物を対象として、以下の項目について検査した。

赤血球コリンエステラーゼ (ChE) 活性、血漿ChE活性、脳ChE活性

赤血球、血漿及び脳ChE活性の対照群に対する割合を下表に示す。

項目	検査週	性別及び投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		0.05	0.5	5	0.05	0.5	5

Dunnett の多重比較検定：↑↓： $p \leq 0.05$  ↑↓： $p \leq 0.01$  (申請者実施)  
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

5.0 mg/kg/day群では、赤血球ChE活性は全ての検査時で著しい阻害が認められた。血漿ChE活性は投与66、78及び91週目の検査において著しい阻害が認められた。脳のChE活性は雌において44%の阻害がみられた。

0.5 mg/kg/day群では、赤血球ChE活性は、66及び78週目に明らかな阻害が認められた。血漿球ChE活性は著しい阻害が認められた。脳のChE活性は雌において21%の阻害がみられた。

0.05 mg/kg/day群の赤血球ChE活性及び血漿ChE活性は対照群との間に明らかな差を認めなかった。

<申請者注：

>

尿検査；投与65、78、93及び104週目に生存動物を対象として、以下の項目について検査した。

色調、比重、pH、蛋白質、糖、沈査

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査時期	性別及び投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		0.05	0.5	5.0	0.05	0.5	5.0

Dunnettの多重比較検定：↑↓： $p \leq 0.05$     ↑↓： $p \leq 0.01$ （申請者実施）

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの

検体投与に関連づけられる変化は認められなかった。

<

>

肉眼的病理検査；投与終了時（投与106週目）のすべての生存動物は、ペントバルビタールナトリウム静脈注射によって屠殺し、また、途中死亡動物及び瀕死状態で切迫屠殺した動物を対象として剖検、肉眼的病理検査を行った。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

対照群を含む全ての群において検体投与に関連したと思われる変化あるいは統計学的に有意な変化は認められなかった。

臓器重量；投与終了時、対照群及び検体投与群のすべての動物を対象として、以下の臓器の重量を測定し、同時に対体重比を算出した。

肝臓、心臓、甲状腺、脳、腎臓、肺、下垂体、副腎、精巣、卵巣、前立腺、精のう、子宮

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

検査項目	検査時期	性別及び投与量 (mg/kg/day)					
		雄			雌		
		0.05	0.5	5.0	0.05	0.5	5.0

Dunnett の多重比較検定：↑ ↓ :  $p \leq 0.05$     ↑↓ :  $p \leq 0.01$  (申請者実施)  
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの

検体投与に関連づけられる変化は認められなかった。

<

>

病理組織学的検査；投与終了時、対照群及び5.0 mg/kg/day群のすべての動物を対象として、以下の臓器について病理組織学的検査を行った。なお、0.5及び0.05 mg/kg/day群では\*印の臓器について検査を行った。

肝臓\*)、心臓\*)、甲状腺\*)、脳\*)、腎臓\*)、肺\*)、下垂体\*)、副腎\*)、骨髄\*)、座骨神経\*)、胃\*)、眼球\*)、脊髄、性腺、前立腺、精囊腺、子宮、気管、胸腺、脾臓、骨格筋、胆のう、食道、リンパ腺、大腸、乳腺、動脈、唾液腺、膀胱、皮膚、小腸

病理組織学的検査において検体投与に関連づけられる変化あるいは統計学的に有意な変化は認められなかった。

以上、ダイアジノン50%水和剤のサルを用いた106週間経口投与による慢性毒性試験における影響としては、5.0 mg/kg/day群雌の体重増加抑制、5.0及び0.5 mg/kg/day群における血漿及び赤血球コリンエステラーゼ活性の明らかな阻害、5.0及び0.5 mg/kg/day群における周期的な軟便、5.0 mg/kg/day群の1例の知覚過敏症であった。従って、当試験にお

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ける無毒性量を雌雄とも0.05 mg/kg/dayと判定した。

<

>

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

4) マウスを用いた経口投与による発痛性試験 (資料No. 26)

試験機関：  
報告書作成年

検体の純度： (原体)

供試動物： マウス 検体投与群は各群雌雄各50匹、対照群は雌雄各25匹  
投与開始週令 6週令、投与開始時体重 雄21g、雌17g

投与期間：103週間

投与方法：実験用飼料に100及び200 ppmの検体を添加し調製した。飼料中に検体を均一に分散させる目的で少量のアセトンを助剤として用いた。飼料の最終重量の2%に相当するコーン油を粉立ち防止を目的に添加した。  
飼料は自由摂取とし、週に2回新鮮な飼料を与えた。

用量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

一般症状及び死亡率；一般症状及び生死を毎日2回観察した。

一般症状としては、検体投与群において過剰活動が認められた。

雌雄とも十分な数の動物が試験終了時まで生存した。

<申請者注：

投与量(ppm)	0	100	200
雄			
雌			

体重変化；2週間に1回すべての生存動物の体重を測定した。

検体投与群雌で、体重が投与80週以後、対照群に比較して低下したが、それ以前の期間及び検体投与群雄では有意な差を認めなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検体摂取量；WHO換算式を適用して算定した検体摂取量を下表に示す。

投与用量 (ppm)	100	200
検体摂取量*	15	30

\* 申請者が算出した。

病理組織学的検査；投与期間終了時のすべての生存動物、途中死亡動物及び瀕死状態で切迫屠殺した動物を対象として以下の臓器について病理組織学的検査を行った。

皮膚、肺及び気管支、気管、骨及び骨髄、脾臓、リンパ腺、心臓、唾液腺、肝臓、膵臓、胃、小腸、大腸、腎臓、膀胱、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、乳腺、前立腺または子宮、精巣または卵巣、脳、その他病変部

その結果、100 ppm群雄において肝臓の腫瘍(肝細胞腺種または肝癌)発生頻度の増加が認められたが、200 ppm群雄では対照群雄における肝臓の腫瘍発生頻度と同等であり、検体投与に起因した発生頻度の増加とは考えられなかった。その他の腫瘍性病変及び非腫瘍性病変が検体投与群及び対照群ともに同等の頻度で認められ、検体投与に関連した腫瘍性病変の発生頻度の上昇及び早期化は認められなかった。

投与量 (ppm)	0		100		200	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
検査動物数	21	23	46	47	48	49
-----						

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

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

#### 腫瘍性病変の発生頻度

性	雄			雌		
投与量(ppm)	0	100	200	0	100	200
検査動物数	25	50	50	25	50	50

次頁以降に認められた主要な非腫瘍性病変及び全ての腫瘍性病変を示す。

以上、ダイアジノン原体のマウスを用いた103週間飼料混入投与による発癌性試験における影響としては、検体投与群の過剰活動及び投与80週以後の検体投与群雌の体重低下であった。

腫瘍性病変及び非腫瘍性病変が、検体投与群及び対照群ともに同等の頻度で認められ、検体投与に関連した腫瘍性病変の発生頻度の上昇及び早期化は認められず、発癌性はないものと判断した。















本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

5) マウスを用いた経口投与による発癌性試験

(資料No. 27)

試験機関：

報告書作成年

検体の純度：原体（純度不明）

供試動物： 系マウス、開始時38日齢、開始時体重；雄12.8～31.5 g、雌7.5～20.9 g  
投与52週後に各群雌雄各10匹を中間屠殺した。

投与量	供試動物数	
	雄	雌
対照群	60	60
100 ppm	60	60
200 ppm	59 <sup>a)</sup>	61 <sup>a)</sup>
300 ppm	59 <sup>b)</sup>	—
400 ppm	—	60

<sup>a)</sup>：投与44週後に雌1例に性別の取り違えが判明ため、雄の200ppm群から雌の200ppm群に移動した。

<sup>b)</sup>：投与44週後に雄の中に雌1例が含まれていたため、この1例を除外した。

投与期間：2年間(投与開始： 年7月25日～屠殺解剖： 年7月29～8月5日)

投与方法：検体とコーンオイルを混合し、検体保存溶液を調製した。この検体保存溶液で最初のプレミックスを調製し、次に粉末基礎飼料で希釈して、所定濃度の投与飼料を調製した。飼料調製は毎週1回行った。

用量設定根拠：報告書に記載なし。

観察・検査項目及び結果：

一般症状及び死亡率；一般症状及び生死の観察は、投与開始2週間は毎日2回、その後は投与95週まで毎日1回、投与95週以後は毎日2回行った。また、腫瘍組織の検査を含む詳細な臨床観察を毎週行った。

一般症状には検体投与に関連した変化は認められなかった。

試験中、触診検査によって1つ以上の腫瘍を観察した動物数は次表のとおりであり、検体投与群と対照群の間に差を認めなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

触診腫瘤観察

項目	性別及び用量群 (ppm)							
	雄				雌			
	0	100	200	300	0	100	200	400

投与期間中の死亡動物数は下に示す。

項目	性別及び用量群 (ppm)							
	雄				雌			
	0	100	200	300	0	100	200	400
動物数	60	60	59	59	60	60	61	60

検体投与群と対照群の間に死亡率の差は認められなかった。

体重変化；投与開始から13週後まで毎週1回、その後は2週間に1回、すべての生存動物の体重を測定した。

300 ppm群雄及び400 ppm群雌の体重は対照群に比較し、有意な差のある断続的な体重増加抑制が認められた。その他の検体投与群では検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた検査時期を下表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

体重変化

検査 時期 (週)	性別及び用量群(ppm)					
	雄			雌		
	100	200	300	100	200	400
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
15						
17						
19						
21						
23						
25						
27						
29						
31						
33						
35						
37						
39						
41						
43						
45						
47						
49						
51						
53						
55						
57						
59						
61						
63						
65						
67						
69						
71						
73						
75						
77						
79						
81						
83						
85						
87						
89						
91						
93						
95						
97						
99						
101						
103						

統計学的有意差：↑↓： $p \leq 0.05$  (Dunnettの多重比較検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

摂餌量；摂餌量は体重測定と同時に、投与開始から13週後まで毎週1回、その後は2週間に1回、すべての生存動物の摂餌量を測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた検査時期を下表に示す。

検査 時期 (週)	性別及び用量群 (ppm)					
	雄			雌		
	100	200	300	100	200	400
1						
2						
3						
4						
5						
8						
10						
13						
17						
19						
25						
29						
31						
35						
39						
41						
47						
49						
51						
57						
59						
61						
63						
65						
69						
71						
73						
77						
79						
81						
83						
85						
87						
89						
91						
95						
99						
101						

統計学的有意差：↑ ↓ :  $p \leq 0.05$  (Dunnnett の多重比較検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものと

検体投与群において、対照群に比較し有意な差を示す測定時が認められたが、一貫した傾向が認められず、検体投与に関連した変化とは考えられなかった。

<申請者注：

>

飲水量；飲水量は各群雌雄の生存している動物の最初の5匹について、投与1週、12週、25週、51週、77週及び101週に測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた検査時期を下表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

検査 時期 (週)	性別及び用量群 (ppm)					
	雄			雌		
	100	200	300	100	200	400
1						
12						
25						
51						
101						

統計学的有意差：↑↓： $p \leq 0.05$  (Wilcoxon Rank sum test)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの

検体投与群において、対照群に比較し有意な差を示す測定時が認められたが、一貫した傾向が認められず、検体投与に関連した変化とは考えられなかった。

検体摂取量；摂餌量より算出した検体摂取量は次表のとおりである。

投与量 (ppm)		100	200	300	400
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	9~27	19~51	27~81	—
	雌	10~37	23~72	—	54~141
平均摂取量*	雄	16	31	46	—
	雌	22	43	—	86

\* 申請者が算出した平均値

血液学的検査；投与12カ月後及び24カ月後に各群雌雄各10匹を対象として、眼窩洞穿刺により採血し以下の項目について検査した。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、網状赤血球数、赤血球数、白血球数及び白血球百分比、血小板数

対照群と比べ統計学的有意差の認められた検査項目を下表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

項目	検査 時期 (月)	性別及び用量群 (ppm)					
		雄			雌		
		100	200	300	100	200	400

統計学的有意差：↑↓：p<0.05 (Dunnett の多重比較検定)

表中の数値は変動の日安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの

投与12カ月後の検査では、400 ppm群雌において血小板数の有意な増加と、網状赤血球数の有意な減少が認められた。しかし、これら有意な変化は投与期間との関連性はないことから、検体投与に関連した変化とは考えられなかった。投与24カ月後の検査では、400 ppm群雌における分葉好中球の有意な減少、300 ppm群雄及び200 ppm群雄における網状赤血球数の有意な増加が認められた。しかし、これらの投与群の赤血球数、ヘマトクリット値またはヘモグロビン量のいずれにおいても有意な増加は認められなかった。

臓器重量；投与12カ月後に血液学的検査を行った動物、及び投与24カ月後の全生存動物を対象として、以下の臓器について重量を測定し、同時に対体重比を算出した。

心臓、肝臓、脳(髄を含む)、副腎、脾臓、腎臓、精巣/卵巣、肺

対照群と比べ統計学的有意差の認められた臓器を下表に示す。

項目	検査 時期 (月)	性別及び用量群 (ppm)					
		雄			雌		
		100	200	300	100	200	400

統計学的有意差：↑↓：p<0.05 (Dunnett の多重比較検定)

表中の数値は変動の日安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

心臓の重量または対体重比において有意な増加が、投与12カ月後では、400 ppm群雌における重量、200 ppm群雌及び100 ppm群雌における対体重比、投与24カ月後では、300 ppm群雌及び100 ppm群雌における重量、400 ppm群雌における対体重比で認められた。肝臓では投与24カ月後において400 ppm群雌における重量と200 ppm群雌における対体重比で減少が認められた。また、400 ppm群雌では投与24カ月後において肝臓及び腎臓重量の減少と脳の対体重比の増加が認められた。その他の臓器においては対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

<

>

肉眼的病理検査；投与12カ月後の途中解剖動物、投与期間終了時のすべての生存動物、途中死亡動物及び瀕死状態で切迫屠殺した動物を対象として剖検、肉眼的病理検査を行った。

検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。

病理組織学的検査；上記の肉眼的病理検査を行った動物を対象として、以下の臓器について病理組織学的検査を行った。

肉眼的病変部、脳(前脳、中脳及び後脳)、眼球、ハーダー腺、下垂体、唾液腺、心臓、胸腺、甲状腺と上皮小体、気管、肺(含主気管支)、食道、胃(前胃部及び腺胃部)、小腸(十二指腸、空腸及び回腸)、大腸(結腸及び直腸)、副腎(皮質及び髄質)、膵臓、肝臓(2葉)、胆嚢、腎臓、膀胱、精巣または卵巣、前立腺または子宮(子宮体部及び子宮頸管)、脾臓、リンパ節(腸間膜及び下顎部)、皮膚(乳腺領域)、座骨神経、乳腺、胸腺、骨髓、

さらに、各群雌雄各10匹については以下の臓器についても病理組織学的検査を行った。

脊髄(胸部及び頸部)、鼻腔、副鼻腔、舌、口腔、鼻咽腔及び中耳

#### [非腫瘍性病変]

認められた主要な非腫瘍性病変を表1に示す。

投与12カ月後の途中解剖動物、投与期間終了時のすべての生存動物、途中死亡動物及び瀕死状態で切迫屠殺した動物において認められた病変には検体投与に起因したと思われる病変はなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

<申請者注：

>

[腫瘍性病変]

認められたすべての腫瘍性病変を表2に示す。

投与12カ月後の途中解剖動物、投与期間終了時のすべての生存動物、途中死亡動物及び瀕死状態で切迫屠殺した動物において認められた病変は、本系統マウスにおいて通常観察される病変であり、検体投与に起因したと思われる病変はなかった。

<申請者注：

>

以上、ダイアジノン原体のマウスを用いた24カ月間飼料混入投与による発癌性試験における影響としては、300 ppm群雄及び400 ppm群雌の断続的な体重増加抑制であった。従って、マウスにおける無毒性量は雌雄とも200ppm（雄31 mg/kg/day、雌43mg/kg/day）であると判断された。<申請者注：

>

腫瘍性病変及び非腫瘍性病変が、検体投与群及び対照群ともに同等の頻度で認められ、検体投与に関連した腫瘍性病変の発生頻度の上昇及び早期化は認められず、発癌性はないものと判断した。



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2. 腫瘍性病変

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (ppm)	0	100	200	400	0	100	200	400
途中死亡・切迫殺										

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

Fisherの直接確率計算法 : ↑↓、 $p \leq 0.05$     ↑↓、 $p \leq 0.01$  (申請者実施)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2. 腫瘍性病変（続き）

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (ppm)	0	100	200	400	0	100	200	400
途中死亡・切迫殺										

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

Fisherの直接確率計算法 :  $\uparrow\downarrow$ 、 $p \leq 0.05$   $\uparrow\downarrow$ 、 $p \leq 0.01$  (申請者実施)

表2. 腫瘍性病変（続き）

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (ppm)	0	100	200	400	0	100	200	400
52週途中計画殺										

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

Fisherの直接確率計算法 :  $\uparrow\downarrow$ 、 $p \leq 0.05$   $\uparrow\downarrow$ 、 $p \leq 0.01$  (申請者実施)



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2. 腫瘍性病変（続き）

転帰	臓器	性別	雄				雌				
		投与量 (ppm)	0	100	200	400	0	100	200	400	
最終計画殺											

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 Fisherの直接確率計算法 : ↑↓、 $p \leq 0.05$     ↑↓、 $p \leq 0.01$  (申請者実施)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2. 腫瘍性病変 (続き)

転帰	臓器	性別		雄				雌				
		投与量 (ppm)		0	100	200	400	0	100	200	400	
最終 計画 殺												

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍  
 Fisherの直接確率計算法 : ↑↓、 $p \leq 0.05$     ↑↓、 $p \leq 0.01$  (申請者実施)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2. 腫瘍性病変 (続き)

転帰	臓器	性別	雄				雌			
		投与量 (ppm)	0	100	200	400	0	100	200	400
全動物										

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

Fisherの直接確率計算法 : ↑↓、 $p \leq 0.05$  ↑↓、 $p \leq 0.01$  (申請者実施)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2. 腫瘍性病変 (続き)

転帰	臓器	性別		雄				雌			
		投与量 (ppm)		0	100	200	400	0	100	200	400
全動物											
	合計										

(B) : 良性腫瘍 (M) : 悪性腫瘍

Fisherの直接確率計算法 : ↑↓、 $p \leq 0.05$     ⇕、 $p \leq 0.01$  (申請者実施)

\* 良性/悪性の判断のつかない腫瘍が3例あったため、腫瘍総数に加算した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(12) 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

1) ラットを用いた繁殖試験

(資料No. 28)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度： (原体)

供試動物： 系ラット、開始時体重 雄 145～196 g 雌 109～143 g、  
1群雄13匹、雌26匹

投与期間：P世代；投与開始から、雄では交配終了までの17週間、雌ではF<sub>1</sub>離乳時までの  
21～23週間

F<sub>1</sub>世代；離乳時からF<sub>2</sub>離乳までの21～23週間

F<sub>2</sub>世代；離乳時に剖検

(実施期間： 年7月14日～ 年6月12日)

投与方法：検体摂取量が0、0.1、1及び10 mg/kg/dayになるように被験物質混合飼料を  
調製し、自由摂取させた。飼料は毎週調製した。

投与量設定根拠；

試験方法及び検査項目：概要を表1にまとめた。

P世代の親動物は15週間育成し、その後交配を開始した。得られたF<sub>1</sub>動物から各群雄15匹、雌30匹を無作為に選択してF<sub>1</sub>世代の親動物とした。P世代の雄は交配期間終了後に、雌はF<sub>1</sub>哺育児を離乳した後に試験から除外した。F<sub>1</sub>哺育児の各群雌雄各5匹について剖検し、病理組織学的検査を行った。

F<sub>1</sub>世代の親動物もP世代と同様に育成と繁殖を行ってF<sub>2</sub>を得た。F<sub>2</sub>哺育児は離乳時に各群雌雄各5匹について剖検し、病理組織学的検査を行った。F<sub>2</sub>哺育児の離乳後、F<sub>1</sub>世代の親動物の各群雄10匹、雌25匹について剖検し、病理組織学的検査を行い、試験を終了した。

一般症状及び死亡率；全動物の全検査期間に一般症状及び生死を毎日観察した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

体重変化；P世代及びF<sub>1</sub>世代の親動物について、投与開始から15週間の生育期間中、毎週1回体重を測定した。繁殖期間中は、妊娠0及び20日、哺育1、4、7、14及び21日に母動物の体重を測定した。

摂餌量；生育期間中、上記体重測定と同時に毎週1回測定した。

交配及び交尾の確認；交配は雄1匹に対して雌2匹を同居させ、毎日膣栓及び膣垢を検査した。膣栓または精子の確認日を妊娠0日とした。

繁殖に関する指標；交配、妊娠、出産の状況及び哺育期の観察結果に基づき、以下の計算式を用いて各指数を算出し、繁殖に関する指標とした。

$$\text{妊娠率 (\%)} = \frac{\text{妊娠または分娩を認めた雌数}}{\text{雄と同居させた雌数}} \times 100$$

$$\text{雄の妊孕率 (\%)} = \frac{\text{1匹以上の雌を妊娠させた雄数}}{\text{雌と同居させた雄数}} \times 100$$

$$\text{出産率 (\%)} = \frac{\text{生存児を分娩した雌数}}{\text{妊娠雌数}} \times 100$$

$$\text{哺育率 (\%)} = \frac{\text{離乳まで生存児を有した雌数}}{\text{生存児を分娩した雌数}} \times 100$$

$$\text{哺育1日生存率 (\%)} = \frac{\text{哺育1日の生存児数}}{\text{総産児数}} \times 100$$

$$\text{哺育4日生存率 (\%)} = \frac{\text{哺育4日の生存児数}}{\text{総産児数}} \times 100$$

$$\text{哺育7日生存率 (\%)} = \frac{\text{哺育7日の生存児数}}{\text{哺育4日の生存児数}} \times 100$$

$$\text{哺育14日生存率 (\%)} = \frac{\text{哺育14日の生存児数}}{\text{哺育7日の調整後の生存児数}} \times 100$$

$$\text{哺育21日生存率 (\%)} = \frac{\text{哺育21日の生存児数}}{\text{哺育14日の生存児数}} \times 100$$

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

$$\text{性比} = \frac{\text{雄哺育児数}}{\text{全哺育児数}} \times 100 \quad (\text{哺育1日及び21日に算出した})$$

肉眼的病理検査；F<sub>1</sub>及びF<sub>2</sub>離乳児の各群雌雄各5匹と、F<sub>1</sub>世代の親動物の各群雄10匹、雌25匹を対象として解剖し、肉眼的病理検査を行った。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の臓器について病理組織学的検査を行った。

脳、下垂体、脊髄（胸部）、眼球、唾液腺、食道、甲状腺、肺、心臓、大動脈、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、胃、腸間膜リンパ節、膀胱、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（結腸）、精巣及び精巣上体、精のう、前立腺、卵巣、子宮、神経及び筋肉、皮膚、肋骨結合部、骨髄、肉眼的病変部

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表1 試験方法及び検査項目概要

世代	期間	作業手順	主要な検査項目
P	生育(15週間)		体重、摂餌量を週1回測定
	交配(2週間)	雄1匹に対して雌2匹で交配(交尾確認日を妊娠0日として妊娠日数を起算した)。交配期間終了後に雄動物は試験から除外した。	膣栓確認、膣垢検査
F <sub>1</sub>	妊娠(3週間)		妊娠0及び20日に体重測定 妊娠期間、妊娠率
	----- 出産 -----	(F <sub>1</sub> )	出産状況の観察 生存産児数、死産児数、性別、出産率
	哺育(21日間)	哺育7日に各腹の哺育児数を10匹までに調整した。	母動物の体重、哺育児の体重及び生存率を哺育1、4、7、14及び21日に測定
	----- 離乳 -----	F <sub>1</sub> 世代の親動物として各群雄15匹、雌30匹を無作為に選抜した。P親動物及び残りのF <sub>1</sub> 離乳児は哺育21日に試験から除外した。	F <sub>1</sub> 離乳児の各群雌雄各5匹について、剖検及び病理組織学的検査
	生育(15週間)		P世代に準ずる。
F <sub>2</sub>	交配(2週間) 妊娠(3週間)		上記F <sub>1</sub> を得るための手順、検査項目に準ずる。
	----- 出産 -----	(F <sub>2</sub> )	
	哺育(21日間)		
	----- 離乳 -----		F <sub>1</sub> 親動物の各群雄10匹、雌25匹について、剖検及び病理組織学的検査 F <sub>2</sub> 離乳児の各群雌雄各5匹について、剖検及び病理組織学的検査
F <sub>2</sub>		残りのF <sub>1</sub> 親動物及びF <sub>2</sub> 離乳児は試験から除外した。	



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

結果：概要を表2に示した。

〔親動物〕

一般症状及び死亡率；各世代の対照群及び検体投与群の雌雄において、唾液腺涙腺炎（SDA）ウイルス感染症が認められた。このSDAウイルス感染症の症状としては片眼または両眼への障害（赤くなる、涙腺、分泌物、眼周辺の血液のまじった痂皮）、脱毛、被毛不良、被毛汚れや尿による汚染着色等であり、発生頻度はすべての群で雌に高率であった。このSDAウイルス感染症は検体投与に関連したものではなかった。いずれの投与群においても検体投与に関連すると思われる症状は全く認められず、死亡例または瀕死状態での屠殺例もなかった。

体重変化；生育期間、妊娠期間及び哺育期間中の体重には、対照群と検体投与群との間で有意差は認められなかった。

摂餌量；生育期間中の雌雄において、一時的な摂餌量の有意な増加または低下が散見されたが、用量相関性はみられず、検体投与に関連した変化は認められなかった。

肉眼的病理検査及び病理組織学的検査；検体投与に関連したと思われる変化は認められなかった。

繁殖に関する指標；妊娠率、出産率、雄の妊孕率、妊娠期間、哺育率のいずれにも検体投与に関連すると思われる影響は認められなかった。

〔児動物〕

生存産児数；いずれの投与群においても、検体投与に関連すると思われる差異は認められなかった。

哺育児の生存率及び体重；いずれの投与群においても、検体投与に関連すると思われる差異は認められなかった。

性比；1 mg/kg/day投与群のF<sub>1</sub>哺育児において、哺育1日の雄の割合が低下した（有意差なし）が、用量相関性はみられず、世代間に共通した変化ではなかったため偶発的なものであると判断した。

肉眼的病理検査及び病理組織学的検査；いずれの世代においても検体投与に関連すると思われる変化は認められなかった。

以上の結果より、2世代にわたってラットにダイアジノン原体を混餌投与した場合、いずれの世代の親動物及び児動物にも悪影響は認められず、繁殖能力についても何ら影響は認められなかった。したがって、本試験における無毒性量は親動物及び児動物とも10 mg/kg/dayであり、繁殖毒性は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

<申請者注>

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2 結果の概要

世代		親:P				児:F <sub>1</sub>				
投与群(mg/kg/day)		0	0.1	1	10	0	0.1	1	10	
動物数		雄								
		雌								
親動物	一般症状	雌雄								
	死亡率(%)	雌雄								
	体重変化	生育期間	雌雄							
		妊娠期間	雌							
		哺育期間	雌							
	摂餌量	生育期間	雄							
			雌							
	妊娠率(%)									
	雄の妊孕率(%)									
	出産率(%)									
	妊娠期間(日) <sup>a</sup>									
	哺育率(%)									
生存産児数 <sup>a</sup>										
生存率(%)	哺育1日									
	哺育4日									
	哺育7日									
	哺育14日									
	哺育21日									
体重(g) <sup>a</sup>	哺育1日	雄								
		雌								
	哺育4日	雄								
		雌								
	哺育7日	雄								
		雌								
	哺育14日	雄								
		雌								
	哺育21日	雄								
		雌								
性比	哺育1日									
	哺育21日									

<sup>a</sup>: 群平均値、↑↓: p<0.05 (Bartlett検定、ANOVA法、多重対比較法)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2) ラットにおける催奇形性試験

(資料No. 30)

試験機関：  
報告書作成年

検体の純度： (原体)

供試動物： 系ラット、10週齢、  
1群妊娠雌動物30匹 (胎児観察用として1群20匹、生後観察用として1群10匹)

投与期間：器官形成期投与11日間(試験期間： 年5月～ 年11月)

投与方法：検体を0.2%Tween80水溶液に懸濁し、妊娠7日から17日までの11日間、0、0.53、1.45及び4 mg/kg/dayの用量で毎日1回経口投与した。投与容量は妊娠7日の体重に基づいた。陽性対照群にはエチレンチオウレア (ETU) 50 mg/kg/dayを同様に投与した。

投与量設定根拠；

試験方法：交配は膣垢像で発情前期を示す日の夕刻に雄と同居させ、翌朝膣栓あるいは膣内精子の確認をもって交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。投与の終了した各群30匹の妊娠動物のうち、20匹を妊娠21日に帝王切開して、胎児の奇形学的検査を行った。残り10匹は自然分娩させ、出生児の生後発育に及ぼす影響を観察した。

自然分娩させた哺育児は生後3日に原則として1腹当り雌雄各4匹に調整し、生後21日に離乳した。離乳時には各腹雌雄各1匹ずつを剖検した。残りのF<sub>1</sub>離乳児は10週齢まで育成し、各腹雌雄各1匹ずつを、①育成期間中の性成熟状態の観察、②10週齢時の行動・学習機能検査、③10週齢時の剖検の各検査に供した。10週齢まで育成したF<sub>1</sub>動物については、各群雌雄各10匹を群内で交配して自然分娩させ、F<sub>2</sub>哺育児の生後3日まで観察した。

なお、陽性対照群については哺育試験を行わず、全腹を妊娠21日に帝王切開し、胎児の外表検査を行った。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

観察・検査項目：概要を表1に示した。

#### 奇形学的検査

母動物；一般症状及び生死を毎日観察し、妊娠0、7、14及び21日に体重を測定した。

摂餌量及び飲水量を体重測定日に各群7～8匹について測定した。妊娠21日の午前中に帝王切開し、着床痕数、黄体数、生存胎児数、胚・胎児死亡数（着床痕及び残存胎盤：初期死亡、浸軟児及び死亡児：後期死亡）を検査した。

生存胎児；体重、性別、胎盤重量、外表奇形の有無及び胎児頭臀長の検査または測定を行った。各腹の胎児のうち半数については骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査（Dawson変法：アリザニンレッドS染色による骨格異常、変異及び化骨状態を観察）し、残りの半数については内臓異常の有無を検査した。また、対照群と高用量群の各5腹については、内臓検査に用いた胎児の肝臓、腎臓及び心臓の病理組織学的検査を行った。

<申請者注>

#### 生後観察

自然分娩母動物及び出生児；妊娠期間、産児数（生存産児数及び死産児数）、生存児の性別、外表奇形の有無、生後0（分娩日）、3、7、14及び21日の哺育児及び母動物の体重、生後3及び21日の生存児数、着床数（剖検時の子宮内の着床痕数）の検査または測定を行った。哺育児の形態的分化状態として、生後3日に耳介開展、生後10日に切歯萌出及び毛生状態、生後16日に眼瞼開裂を観察し、離乳時に機能検査（正向反射、聴覚反射、痛覚反射、角膜反射、握り反射、姿勢・歩様状態）を行った。離乳後の育成期間中の児動物については、3週齢（離乳時）から10週齢まで毎週体重を測定し、性成熟状態として生後36日に膣開口、生後50日にペニス型及び交配前2周期分の膣垢周期を観察した。10週齢時には、対照群及び高用量群の動物について、行動・学習機能検査（スキナー箱による明暗弁別学習、回転カゴによる自発運動及びオープンフィールドによる情動性）を行った。その後各群のF<sub>1</sub>動物を交配して生殖機能検査を行い、F<sub>2</sub>哺育児の生後3日まで観察した。

生殖機能に関する指標；

$$\text{分娩率 (\%)} = \frac{\text{生存産児数}}{\text{着床数}} \times 100$$

$$\text{生後3日生存率 (\%)} = \frac{\text{生後3日の生存児数}}{\text{生存産児数}} \times 100$$

$$\text{生後21日生存率 (\%)} = \frac{\text{生後21日の生存児数}}{\text{生後3日の調整後の児数}} \times 100$$

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表1 観察・検査項目の概要

世代	期間、週齢	作業手順	観察・検査項目
P	10週齢	交配	
	妊娠7日 ～ 妊娠17日 (11日間)	検体投与(1群30匹)	一般症状、生死を毎日観察 体重、摂餌量、飲水量測定 (妊娠0、7、14及び21日)
	妊娠21日	帝王切開(1群20匹)	母動物(P)：剖検、主要臓器重量 着床数、黄体数、生存胎児数、 胚・胎児死亡数 生存胎児：体重、頭臀長、性別、胎盤重量、外 表、骨格、内臓の奇形学的検査 病理組織学的検査(対照群及び高用量群 各5腹：肝臓、腎臓及び心臓)
	分娩 (生後0日)	(1群10匹)	母動物(P)：体重測定(哺育0、3、7、14及び21日)、 妊娠期間 児動物(F <sub>1</sub> )：産児数(生存産児数及び死産児数)、生 存児体重、性比、外表検査
	生後3日	原則的に雌4匹、雄4 匹に調整、残りの哺 育児は試験から除外	哺育児(F <sub>1</sub> )：体重測定(生後3、7、14及び21日) 耳介展開、生後3日生存率
	生後10日 生後16日		切歯萌出、毛生状態 眼瞼開裂
F <sub>1</sub>	離乳 (生後21日)	離乳時解剖	生後21日生存率 母動物(P)：剖検、着床数、分娩率 離乳児(F <sub>1</sub> )：剖検、主要臓器重量(各腹雌雄各1匹) 機能検査(各腹雌雄各1匹)
		F <sub>1</sub> 児動物育成	児動物(F <sub>1</sub> )：体重測定(生後3週～10週)
	生後10週	10週齢時解剖	(F <sub>1</sub> )：剖検、主要臓器重量(各腹雌雄各1匹) 行動・学習機能検査(対照群及び高用量群 各腹雌雄各1匹)
F <sub>2</sub>	交配	兄妹交配を避けて 群内交配(1群雌雄各 10匹)	発情周期(交配前2周期分の膻垢像観察) 交尾率(雌雄)、妊娠率
	妊娠		母動物(F <sub>1</sub> )：体重測定(妊娠0、7、14及び21日)、妊 娠期間
	分娩 (生後0日)		児動物(F <sub>1</sub> )：産児数(生存産児数及び死産児数)、生 存児体重、性比
	生後3日		母動物(F <sub>1</sub> )：着床数、分娩率 哺育児(F <sub>2</sub> )：生存児数、生存児体重、生後3日生存率



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

結果：概要を表2-1（奇形学的検査）、表2-2（生後観察）及び表2-3（臓器重量）に示した。

### 奇形学的検査

#### 〔母動物〕

一般症状及び死亡率；試験期間中、各群の母動物には検体投与に関連すると思われる異常は認められなかった。また、いずれの群にも死亡は認められなかった。

体重変化；投与期間中及び妊娠期間中において、いずれの投与群の母動物の体重にも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

陽性対照群では、妊娠17日の体重が有意に低下した。

摂餌量、飲水量；0.53 mg/kg/day投与群で、妊娠0～7日における摂餌量が有意に減少したが、投与前期間であり、検体投与とは関連のない変化であった。

4 mg/kg/day投与群では、妊娠7～14日の摂餌量に有意な低下がみられ、妊娠期間中の総摂餌量は対照群に比して8%減少し、これらは検体投与の影響と判断された。

飲水量にはいずれの投与群においても検体投与に関連すると思われる変化は認められなかった。

陽性対照群では、投与期間中の摂餌量が有意に減少した。

着床所見；黄体数、着床数、生存胎児数及び胚・胎児死亡率には、いずれの投与群においても検体投与に関連すると思われる変化は認められなかった。

陽性対照群においても、変化は認められなかった。

#### 〔生存胎児〕

胎児体重；0.53及び4 mg/kg/day投与群の雌胎児の体重が対照群に比較して有意に増加した。しかし、この変化には用量相関性が認められないことから偶発的なものと考えられた。

陽性対照群では雌雄とも有意に減少した。

頭臀長、性比、胎盤重量；いずれの指標にも検体投与に関連すると思われる変化は認められなかった。

陽性対照群では頭臀長が雌雄の頭臀長とも有意に減少した。

奇形学的検査；外表、骨格及び内臓検査では、いずれの投与群においても検体投与に関連すると思われる奇形及び変異は認められなかった。

骨化進行度の検査において、4 mg/kg/day投与群で胸骨分節骨化遅延が有意に増加した。

陽性対照群では髄膜瘤、短尾、内反足等の外表奇形が全腹の大部分の胎児に認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

## 生後観察

### 〔母動物〕

体重変化；1.45 mg/kg/day投与群において、分娩日の体重が有意に増加した。同群では産児数が対照群に比して腹平均で約1匹少なかったため、これが影響しているものと思われ、その後の哺育は良好であったので、偶発的な現象と考えられた。

分娩・出生児所見；妊娠期間、産児数（生存児数及び死産児数）、着床数、生存児体重、性比、外表異常、着床数、分娩率について測定または評価したが、検体投与に関連すると思われる変化は認められなかった。

### 〔児動物〕

生後発育所見；哺育児の体重、生後3日及び21日生存率には、検体投与に関連すると思われる変化は認められなかった。

形態分化状態の検査では、0.53及び4 mg/kg/day投与群で耳介展開率の有意な低下及び増加が、1.45 mg/kg/day投与群で眼瞼開裂率の有意な低下が認められたが、用量相関性はみられず、これらは偶発的なものと考えられた。切歯萌出率はすべての投与群で有意に低下したが、哺育児の体重に投与群と対照群との間で全く差がないこと、離乳後の育成期における体重にも影響はみられないこと、生殖機能検査、行動・学習機能検査及び病理学的検査でも異常が認められないことから、検体のF<sub>1</sub>世代への影響とは考えられなかった。形態分化は本来数日にわたって完成される現象であるが、本試験では観察日を1日と限ったために差が生じたものと考えられる。

離乳時機能検査；全離乳児に対して行った各種反射機能及び行動観察において、対照群及び投与群ともに異常は認められなかった。

育成期（離乳～10週齢）の体重変化；0.53 mg/kg/day投与群の雄の9週齢で有意な高値が、1.45 mg/kg/day投与群の雌の10週齢で有意な低値が認められたが、より高用量群では体重に対する影響は認められなかったため、これらの変化は検体投与とは関連のないものと考えられた。

性成熟検査；雄では生後50日でペニス先端部のU型の確認を、雌では生後36日に膣開口の確認を行ったが、対照群と投与群の間で差は認められなかった。また、交配前2周期分の膣垢像の観察により、発情周期（4日周期）の確認を行ったところ、全例で正常な周期を示していた。

行動・学習機能検査；明暗弁別学習能、自発運動量及び情動性のいずれにおいても、対照群と4 mg/kg/day投与群との間で差は認められなかった。

生殖機能検査；F<sub>1</sub>動物の交尾率、妊娠率、妊娠期間及びF<sub>2</sub>哺育児の体重には、いずれの投与群においても検体投与の影響は認められなかった。1.45 mg/kg/day投与

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

群で妊娠14及び21日のF<sub>1</sub>母動物の体重が有意に低下し、0.53 mg/kg/day投与群でF<sub>2</sub>哺育児の生後3日生存率が有意に低下した。しかし、これらの変化はより高用量群では認められず、検体投与の影響ではないと考えられた。

4 mg/kg/day投与群で着床数の有意な減少による産児数の減少が認められた。分娩率（生存産児数/着床数）には対照群との間で有意差はみられなかった。

#### 病理学的検査

剖検所見；帝王切開時の母動物、3週齢（離乳時）及び10週齢時のF<sub>1</sub>動物の剖検では、検体投与に起因すると思われる病変は認められなかった。

臓器重量；脾臓、腎臓、心臓または肝臓で有意差が散見されたが、これらの変化に一貫性はみられず、用量相関性も認められなかったため、検体投与に関連したものではないと考えられた。

以上の結果から、ダイアジノン原体を妊娠ラットに経口投与した場合、母動物に影響はみられなかったが、胎児では4 mg/kg/day投与群で胸骨分節骨化遅延の増加が認められた。出生後の児動物に異常はみられなかったが、生殖機能検査において、4 mg/kg/day投与群で着床数の減少が認められ、検体投与による悪影響である可能性が示唆された。したがって、本試験における無毒性量は母動物で4 mg/kg/day、胎児及び出生後のF<sub>1</sub>動物で1.45 mg/kg/dayであると判定した。催奇形性は陰性であった。

<申請者注：

>

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2-1 結果の概要 (奇形学的検査)

投与群(mg/kg/day)		0	0.53	1.45	4	陽性対照 (ETU)50
1群当り動物数		30	30	30	30	20
母動物						
生存胎児						

\*: 群平均値、\*: 頭部、尾部及び四肢奇形(髄膜瘤、短尾、内反足等)、-: 有意差なし  
 ↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01、↑↓: p<0.001  
 [t検定(体重、摂餌量、頭臀長)、順位和検定(奇形又は変異胎児数)]

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2-2 結果の概要(生後観察)

投与群(mg/kg/day)		0	0.53	1.45	4	
検査腹数		10	10	10	10	
母動物体重変化						
妊娠期間(日) <sup>a</sup>						
産児数 <sup>a</sup>						
生存産児数 <sup>a</sup>						
着床数 <sup>a</sup>						
分娩率(%)						
出生児・ 生後発育 所見	検査児動物数					
	性比(雄/雌)					
	外表異常					
	哺育児 体重(g) <sup>a</sup>	生後0日	雄 雌			
		生後3日	雄 雌			
		生後7日	雄 雌			
		生後14日	雄 雌			
		生後21日	雄 雌			
	生後3日生存率(%)					
	生後21日生存率(%)					
	形態分化率(%)	耳介展開				
		切歯萌出				
		腹部発毛				
		眼瞼開裂				
育成期(離乳~10週齢)体重変化						
生殖機能 検査所見	検査動物数					
	交尾率(%)					
	妊娠率(%)					
	体重変化					
	妊娠期間(日) <sup>a</sup>					
	産児数 <sup>a</sup>					
	生存産児数 <sup>a</sup>					
	着床数 <sup>a</sup>					
	分娩率(%)					
	性比(雄/雌)					
	哺育児 体重(g) <sup>a</sup>	生後0日	雄 雌			
生後3日		雄 雌				
生後3日生存率(%)						

<sup>a</sup>: 群平均値、-: 有意差なし

↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01、↑↓: p<0.001

[t検定(体重、摂餌量、頭臀長、産児数、着床数)、カイ2乗検定(形態分化率、生存率)]

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2-3 結果の概要(臓器重量)

投与群(mg/kg/day)		0	0.53	1.45	4	陽性対照 (ETU)50
母動物	検査動物数	10	10	10	10	10
	脾臓	重量 <sup>a</sup>				
		対体重比 <sup>b</sup>				
F <sub>1</sub> 3週齢	検査動物数(雄/雌)					/
	脾臓(雄)	重量 <sup>a</sup>				
		対体重比 <sup>b</sup>				
F <sub>1</sub> 10週齢	検査動物数(雄/雌)					
	腎臓(雄)	対体重比 <sup>b</sup>				
	心臓(雄)	重量 <sup>a</sup>				
		対体重比 <sup>b</sup>				
	肝臓(雌)	重量 <sup>a</sup>				

<sup>a</sup>: 群平均値(mg)、肝臓のみ(g)、<sup>b</sup>: 群平均値(%) × 1000

↑↓: p<0.05、↑↓↓: p<0.01 (t検定)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

3) ウサギにおける催奇形性試験

(資料No. 31)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度： (原体)

供試動物： 妊娠ウサギ、13～16週齢、1群16～17匹

試験期間： 年7月15日～ 年11月11日

投与方法： 検体をアラビアゴム水溶液に懸濁し、0、2.5、10及び40 mg/kg/dayの投与用量で妊娠6日から妊娠18日までの13日間、毎日1回強制経口投与した。

投与量設定根拠：

試験方法及び検査項目：

母動物；一般症状及び生死を毎日観察し、妊娠1、6、8、10、14、19、23及び29日に体重を測定した。また、摂餌量を体重測定日に測定した。

雌雄を同居させ、交尾観察後も少なくとも1時間同居させ、さらに交尾後の雌には黄体形成ホルモンを静脈注射し、確実に排卵が行われるようにした。交配日を0日とした。妊娠29日に剖検した後、帝王切開し、黄体数、着床数、生存胎児数及び死亡・吸収胚数を検査した。

生存胎児；外表検査、体重測定の後、内臓異常の有無を調べて性別を判定した。エタノール固定後に頭部を前頭頂骨縫合に沿って薄切し、脳の異常の有無を調べた。奇形の認められなかった胎児について骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。

結果：結果の概要を表1に示した。

[親動物]

一般症状；40 mg/kg/day投与群において、投与後に検体投与に関連したと思われるふらつき、振戦、異常行動及び異常姿勢が認められた。その他の投与群では一般症状の異常は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

死亡率；投与開始前及び開始後において、健康状態不良のために死亡または切迫屠殺した動物が、0、2.5、10及び40 mg/kg/day群投与群でそれぞれ2、4、4及び6例あった。これらの動物では、糞排泄減少、低体温、立毛、子宮感染症等が各群に共通して認められた。その他に、対照群では胃管挿入ミスによる死亡が2例あった。

また、試験終了時まで生存した動物のうち、0、2.5、10及び40 mg/kg/day投与群のそれぞれ1、1、4及び3例について、健康状態不良と判断されたため評価から除外した。これらの動物においても糞排泄減少、低体温等の症状が共通して認められた。

健康状態不良の動物にみられた症状については、対照群を含む全群で、投与開始前及び開始後に共通して同様の所見が得られていることから、検体投与の影響とは考えられなかった。

評価除外親動物；対照群1例(No.119)、2.5mg/kg/日群1例(No.209)、10mg/kg/日群4例(No.301,303,315,324)、40mg/kg/日群3例(No.402,408,415)の動物は健康状態不良と判断され、評価から除外された。これら9例が示した症状は上記の死亡例と同様に検体投与の影響によるものではないと考えられた。

体重変化；40 mg/kg/day投与群において、投与開始後3日間（妊娠6～8日）の平均体重増加量の明らかな減少（-9 g）が認められた。その後回復に向かったが、妊娠6日から29日までの体重増加量は対照群の値の82%であった。その他の投与群では対照群と比較して差は認められなかった。

摂餌量；40 mg/kg/day投与群において、投与期間中の摂餌量の減少（対照群の値の83～93%）が認められた。その他の投与群では対照群と比較して差は認められなかった。

剖検所見；検体投与によると考えられる肉眼的変化は認められなかった。

着床所見；投与群と対照群の間に差は認められなかった。

#### 〔胎児〕

体重；40 mg/kg/day投与群の胎児体重は対照群と比較して有意に低下した。この変化は検体投与の母動物に対する影響に起因した変化であると考えられた。

10 mg/kg/day投与群においても対照群と比較して有意な胎児体重の低下が認められたが、これは検体投与に関連した変化と考えるよりも、むしろ生存胎児数の増加に起因した変化と考える方が妥当と考えられた。

性比；投与群と対照群の間で差は認められなかった。



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

外表、内臓及び骨格奇形；検体投与に関連すると思われる変化は認められなかった。  
各群の奇形胎児の発生頻度及び奇形児を有する腹の頻度にも差はみられなかった。

外表及び内臓異常；検体投与に関連すると思われる変異は認められなかった。

骨格異常；40及び2.5 mg/kg群において骨格異常の発生頻度が対照群に比較し、有意に減少した。＜申請者注：この変化は、減少性変化であることから毒性学的に意義のある変化ではないと判断された。＞

以上の結果から、ダイアジノン原体を妊娠ウサギに投与した場合、40 mg/kg/day投与群において母動物に中毒症状（ふらつき、振戦、異常行動、異常姿勢）及び体重増加抑制が、胎児に低体重が認められた。したがって、本試験の条件下における無毒性量は母動物及び胎児とも10 mg/kg/dayであり、催奇形性は陰性であると判定した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 1 結果の概要

投与群 (mg/kg/day)		0	2.5	10	40	
1群当たり動物数		25	22	25	30	
評価 から 除外 した 動物	投与開始前 (健康状態不良)	死亡数				
		切迫屠殺数				
	投与開始後 (健康状態不良)	死亡数				
		切迫屠殺数				
試験終了時まで生存したが、健康状態不良のため除外した動物数						
胃管挿入ミスによる死亡動物数						
非妊娠動物数						
流産動物数						
全胚吸収動物数						
評価に用いた動物数						
母動物	一般状態					
	体重変化					
	摂餌量					
	肉眼的病理検査					
	着床所見	検査親動物数				
		黄体数 <sup>a</sup>				
		着床数 <sup>a</sup>				
		生存胎児数 <sup>a</sup>				
		前期死亡胚数 <sup>a</sup>				
		後期死亡胚数 <sup>a</sup>				
総死亡胚数 <sup>a</sup>						
胎児	検査胎児数(腹数)					
	胎児体重(g) <sup>a</sup>					
	性比(%) <sup>b</sup>					
	奇形	検査胎児数(腹数)				
		奇形胎児数(%) <sup>c</sup>				
		奇形胎児所有腹数(%)				
		水頭症 [腹毎の胎児出現率(%)]				
		左前肢屈曲 [腹毎の胎児出現率(%)]				
		頭蓋屈曲 [腹毎の胎児出現率(%)]				
		頭蓋扁平/後頭部突起 [腹毎の胎児出現率(%)]				
腰椎二分 [腹毎の胎児出現率(%)]						
両眼白内障/網膜形成異常 [腹毎の胎児出現率(%)]						

<sup>a</sup>: 群平均値、<sup>b</sup>: 腹毎の雄胎児の割合(%)の群平均値、<sup>c</sup>: %は腹毎の発生頻度の群平均値

↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01 (Kruskal-Wallis検定)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表1 結果の概要(続き)

投与群 (mg/kg/day)		0	2.5	10	40
胎児					

\*: 群平均値、\*: 腹毎の雄胎児の割合 (%) の群平均値、% は腹毎の発生頻度の群平均値  
 ↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01 (Kruskal-Wallis検定)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表1 結果の概要(続き)

		投与群 (mg/kg/day)	0	2.5	10	40
胎児						

<sup>a</sup>: 群平均値、<sup>b</sup>: 腹毎の雄胎児の割合(%)の群平均値、<sup>c</sup>: %は腹毎の発生頻度の群平均値  
 ↑↓: p<0.05、↑↑↓: p<0.01 (Kruskal-Wallis検定)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(13) 変異原性

1) 遺伝子突然変異原性

① 細菌を用いた復帰変異試験

(資料No. 32)

試験機関：

報告書作成年

検体の純度： (原体)

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA1538、TA98及びTA100株)、トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *hcr*<sup>-</sup>株)を用い、ラットの肝から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。検体の溶解にはジメチルスルホキシド(DMSO)を用い、5000または1000 µg/プレートを最高濃度とした。

結果：次頁表に示した。

試験は2連制で1回行った。検体ダイアジノン(代謝活性化法を含め、最高濃度5000または1000 µg/プレートにおいても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた2-アミノアントラセン(2AA)、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(AF-2)、β-プロピオラクトン(β-PL)、9-アミノアクリジン(9AA)、2-ニトロフルオレン(2-NF)では、すべての検体及び菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果から、ダイアジノン原体は、代謝活性化を含む本試験条件下においては、復帰変異誘発性を有さないものと判定した。

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											
				塩基置換型				フレームシフト型							
				WP2 <i>hcr</i> <sup>-</sup>		TA1535		TA100		TA1537		TA1538		TA98	
試験 I	対照 (DMSO)	—	—	11 26	(19)	9 14	(12)	120 143	(132)	7 9	(8)	9 15	(12)	12 22	(17)
	ダイアジノン	200	—	24 24	(24)	7 13	(10)	91 109	(100)	4 9	(7)	9 16	(13)	16 26	(21)
		1000	—	24 29	(27)	8 15	(12)	119 132	(126)	4 13	(9)	3 8	(6)	26 29	(28)
		5000	—	18 27	(23)	4 9	(7)	115 115	(115)	4 4	(4)	7 8	(8)	18 21	(20)
試験 II	ダイアジノン	10	—	16 18	(17)	15 24	(20)	167 190	(179)	9 10	(10)	16 20	(18)	20 35	(28)
		100	—	22 27	(25)	13 15	(14)	178 179	(179)	4 9	(7)	13 17	(15)	23 31	(27)
		1000	—	20 27	(24)	12 14	(13)	204 126	(165)	2 8	(5)	14 15	(15)	28 38	(33)
	対照 (DMSO)	—	+	18 18	(18)	6 10	(8)	155 157	(156)	8 9	(9)	13 15	(14)	14 24	(19)
	ダイアジノン	10	+	15 16	(16)	7 10	(9)	166 173	(170)	5 9	(7)	13 16	(15)	15 26	(21)
		100	+	10 18	(14)	14 16	(15)	133 131	(132)	7 7	(7)	11 21	(16)	22 23	(23)
		1000	+	18 19	(19)	10 13	(12)	140 138	(139)	10 10	(10)	16 17	(17)	19 34	(27)
	陽性 対照	(脚注) (試験 I)	—	—	2112 <sup>a)</sup> 1848	(1980)	1068 <sup>b)</sup> 1181	(1125)	884 <sup>c)</sup> 1020	(952)	>10000 <sup>d)</sup> >10000	(>10000)	3432 <sup>e)</sup> 4764	(4098)	289 <sup>f)</sup> 370
2AA (試験 II)		20	—			13 16	(15)	315 309	(312)	20 21	(21)	25 40	(33)	51 55	(53)
2AA (試験 II)		20	+			242 311	(277)	3456 3456	(3456)	258 291	(275)	4000 4956	(4478)	4404 4848	(4626)
AF-2 (試験 II)		(脚注)	—	1332 <sup>g)</sup> 1824	(1578)			1532 <sup>h)</sup> 1391	(1463)					307 <sup>i)</sup> 327	(317)

a) 0.25  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  AF-2    b) 50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$   $\beta$ -PL    c) 0.05  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  AF-2    d) 200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  9AA    e) 50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  2NF

f) 0.1  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  AF-2    g) 0.25  $\mu\text{g}/\text{プレート}$     h) 0.05  $\mu\text{g}/\text{プレート}$     i) 0.1  $\mu\text{g}/\text{プレート}$     ( ) 平均値

2AA: 2-アミノアントラセン、AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、 $\beta$ -PL:  $\beta$ -プロピオラクトン、

9AA: 9-アミノアクリジン、2-NF: 2-ニトロフルオレン

②細菌を用いた復帰変異試験(宿主経由試験)

(資料No. 32)

試験機関：

報告書作成年 年

検体の純度： (原体)

方 法： 雄マウス(7週齢、体重 $31.3 \pm 1.3$  g)を1群5～6匹の4群とし、検体を1% Tween80水溶液に懸濁し、0、30及び70 mg/kgの用量で、24時間間隔で2回経口投与した。陽性対照群はジメチルニトロサミン(DMN)50 mg/kgを1回経口投与した。2回目の検体投与直後、対数期のヒスチジン要求性ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (G46株)： $3.2 \times 10^8$  個/mL：2 mLをマウス腹腔内に注入した。処置3時間後に腹腔内菌液を回収し、最小寒天培地で2日間培養後、復帰変異コロニー数及び生存菌数を計算した。

結 果：次頁表に示した。

検体ダイアジノンは、G46株を用いた *in vivo*での復帰変異試験においても復帰変異菌数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたDMN投与群では明らかな増加が認められた。

以上の結果から、ダイアジノン原体は宿主経由試験条件で復帰変異誘発性はないものと判定した。

群	投与量 mg/kg	復帰変異 菌数 / mL	生存菌数 $\times 10^{-8}$ / mL	復帰変異 菌数 / $\times 10^8$ 生存菌数	平均値 $\pm$ S. D.
対 照 1% Tween 80	—	15.00	34.1	0.44	0.30 $\pm$ 0.12
		15.00	46.3	0.32	
		10.83	39.7	0.27	
		6.67	44.5	0.15	
		5.00	28.7	0.17	
		17.50	41.4	0.42	
ダイアジノン	30 $\times$ 2	9.17	29.7	0.31	0.39 $\pm$ 0.14
	30 $\times$ 2	15.00	23.7	0.63	
	30 $\times$ 2	10.00	29.6	0.34	
	30 $\times$ 2	10.83	35.7	0.30	
	30 $\times$ 2	10.00	28.5	0.35	
ダイアジノン	70 $\times$ 2	8.33	22.7	0.37	0.35 $\pm$ 0.11
	70 $\times$ 2	5.83	16.7	0.35	
	70 $\times$ 2	10.83	24.3	0.45	
	70 $\times$ 2	11.67	24.2	0.48	
	70 $\times$ 2	7.50	34.8	0.22	
	70 $\times$ 2	6.67	31.3	0.21	
陽性対照 DMN	50	3193.33	34.4	92.83	166 $\pm$ 60.63**
	50	4136.67	31.0	133.44	
	50	3950.00	32.6	121.17	
	50	6380.00	26.4	241.67	
	50	6283.33	27.5	228.48	
	50	6043.33	32.8	184.25	

\*\* : 対照群 (1% Tween80) と比較して、 $P < 0.01$  水準で有意差あり

DMN : ジメチルニトロサミン



③細菌を用いたDNA修復試験

(資料No. 32)

試験機関：

報告書作成年

検体の純度： (原体)

方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換え修復機構保持株(H-17)と欠損株(M-45)を用い、Rec assayによってDNAの損傷の誘発性を検定した。  
 検体の溶解にはジメチルスルホキシド(DMSO)を用い、100%液 0.02 mL/ディスクを最高濃度とした。

結果：

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	阻止帯長 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
対照 (DMSO)	—	0	0	0
ダイアジノン	223 *	0	0	0
	1115	0	0	0
	2231	0	0	0
	5577	0	0	0
	11153	0	0	0
	22306	0	0	0
陰性対照 (カナマイシン)	10	6	4	2
陽性対照 (マイトマイシンC)	0.1	11	2	9

\*：申請者にて処理量を算出した (密度  $1.1153 \text{ g/cm}^3$ )  $\times 0.02 \text{ mL} \times$  処理濃度)。

検体ダイアジノン処理群では最高濃度である100%液 0.02 mL/ディスクにおいて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、両株の間に明らかな生育阻止の差が生じた。

以上の結果から、ダイアジノン原体はDNA損傷の誘発性はないものと判定した。

2) 染色体異常誘発性

培養ヒト・リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常誘発性試験

(資料No. 33)

試験機関：

(英国) [GLP対応]

報告書作成年

検体の純度： (原体)

試験期間： 年 5 月 27 日～ 6 月 16 日

方法：フィトヘモアグルチニンを加えて細胞分裂を誘発したヒトのリンパ球を用いた。検体を24時間処理した後に染色体標本を作製した。S-9 Mixの添加及び無添加で実験を行い、S-9 Mix添加の場合は、検体処理期間中の最初の2時間だけS9 Mixを処理した。いずれの場合も1濃度当り3反復処理を行い1処理当り100個の分裂中期像を観察して染色体異常を有する細胞の出現数を計数した。染色体異常はギャップ、切断、断片、交換、多重異常、核内倍化、細粉化及び倍数体(別に記録し、観察総数から除く)に分類した。また、細胞毒性の指標として、1000個の細胞を観察して細胞分裂指数を算定した。なお、検体の処理濃度は、細胞分裂指数を指標とした予備試験の結果から、5、10及び20 µg/mLとした。

結果：次頁の表に示した。

最高濃度区(20 µg/ml)では細胞毒性が認められ、細胞分裂指数が溶媒対照区と比較してS-9 Mix無添加の場合は46%、S-9 Mix添加の場合には21%低下した。染色体異常の出現率はダイアジノンのいずれの濃度区でも溶媒対照区と比較して有意な差異は認められなかった。一方、陽性対照として用いたクロラムブシル及びシクロフォスファミドでは染色体異常の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下においてダイアジノン原体の染色体異常誘発性は陰性と結論した。

化 合 物	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S-9 Mix 有無	細胞分裂 指数 <sup>1)</sup> (%)	観 察 細胞数	染色体異常を有する細胞数					
					ギャップを含む			ギャップを除く		
					合 計	範囲(%)	平均(%) <sup>2)</sup>	合 計	範囲(%)	平均(%) <sup>2)</sup>
溶媒対照 (DMSO)		—	3.4	300	4	1-2	1.3	1	0-1	0.3
		+	2.9	300	2	0-2	0.7	2	0-2	0.7
ダイアジノン	5	—	3.7	300	6	1-3	2.0	2	0-1	0.7
		+	2.6	300	2	0-2	0.7	1	0-1	0.3
	10	—	3.7	300	8	1-5	2.7	5	1-3	1.7
		+	2.8	300	6	2-2	2.0	3	0-2	1.0
	20	—	2.0	300	5	1-3	1.7	3	0-3	1.0
		+	2.3	300	4	0-3	1.3	1	0-1	0.3
シクロfosファミド	6	—	3.4	300	5	0-3	1.7	1	0-1	0.3
		+	2.3	300	35	9-16	11.7	21	5-11	7.0
クロラムブシル	2.5	—	0.9	300	89	27-35	29.7	70	20-29	23.3

<sup>1)</sup> 細胞分裂指数 = (分裂中期細胞数 / リンパ球) × 100

<sup>2)</sup> 平均 = (染色体異常を有する分裂中期細胞数 / 観察細胞総数) × 100

### 3) DNA損傷性

大腸菌を用いたDNA損傷試験

(資料No. 34)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度： (原体)

試験期間：1986年6月3日～6月12日

供試菌株：*Escherichia coli*(大腸菌)のWP-2株、WP-67株及びCM-871株を用いた。DNA修復に関与する遺伝子に関して、WP-2株は野生株である。WP-67株及びCM-871株はWP-2由来の変異株で、WP-67株はuvrAとpolAの欠損株であり、CM-871はuvrA、recA及びlexAの欠損株である。野生株と欠損株の致死感受性の差を調べることにより検体のDNA損傷作用の有無を判定することができる。

方法：各菌株を一夜培養し、0.1 M 磷酸緩衝液で希釈して菌数を約  $2 \times 10^8$  g/mL に調製した。試験管に菌液 2 mL を入れ、検体溶液 0.1 mL と緩衝液もしくは S-9 Mix 0.2 mL を加えて 37°C で振とう培養した。2 時間後及び 18 時間後に 0.1 mL を採取し、 $10^{-2}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  及び  $10^{-6}$  倍に希釈した。各希釈液をそれぞれ 3 枚の栄養寒天培地に 20  $\mu$ L ずつ広げ、37°C で 1 日培養した後にコロニー数を計数した。WP-2 株を用いた予備試験でダイアジノン は 10～10000  $\mu$ g/mL の濃度で抗菌性を示さなかったことから、最高濃度を 10000  $\mu$ g/mL とし、以下 3160、1000、316 及び 100  $\mu$ g/mL で実験を行った。無処理区では菌液 2 mL に緩衝液 0.3 mL を加えた。溶媒対照区では検体溶液に代えてジメチルスルホキシド (DMSO) 0.1 mL を加えた。陽性対照化合物としてマイトマイシン C (MMC) と 2-アミノアントラセン (2AA) を用い、遺伝子機構に関与せずに致死性を示すアンピシリン (AMP) を陰性対照化合物として用いた。なお、実験はすべて 2 連制で行った。

上記で得られたコロニー数の計数結果から、まず菌株毎に無処理区に対する各処理区での生存率を算定し、次いで、処理区毎に野生株 (WP-2 株) に対する欠損株 (WP-67、CM-871 株) の生存率比率 ( $C_s$ ) を算定した。

$C_s$  値が 0.3 以下の場合には DNA 損傷作用の可能性を示唆し、0.1 以下の場合には陽性と判定される。

$$C_s = \frac{\text{欠損株での平均生存率(\%)}}{\text{野生株の平均生存率(\%)}}$$

結果：各菌株の平均生存率と欠損率のCs値を次頁の表に示した。陽性対照化合物2AAではS-9 Mixを加えた場合にCM-871株のCs値が、MMCでは両欠損株のCs値が著しく低下し、明らかなDNA損傷性が認められた。

ダイアジノン処理区では、CM-871株のCs値がS-9 Mixを加えない場合の18時間処理区で低下した。10000 µg/mL及び3160 µg/mL処理でのCs値はそれぞれ0.07及び0.12であった。ダイアジノンで誘発されるDNAの変化はuvrA遺伝子機構で修復される単純なクロスリンクもしくは大きな附加体ではなく、recAもしくはlexA遺伝子機構によって認識、修復されるタイプの変化であると考察された。ダイアジノンのDNA損傷性は、2時間処理では認められず、また3.16 mg/mLより低い濃度では認められないことから、本試験の知見はダイアジノンが極めて弱いDNA損傷性を示したと解釈すべきであると結論された。

以上の結果から、ダイアジノン原体はDNA損傷性を示したが、その作用は極めて弱いと結論された。

化合物	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S-9 Mixの 有無	2時間処理			18時間処理		
			WP-2	WP-67	CM-871	WP-2	WP-67	CM-871
ダイアジノン	10000	+	72%	23% (0.31)	67% (0.92)	97%	101% (1.05)	42% (0.43)
	3160	+	81	36 (0.44)	58 (0.72)	94	91 (0.97)	42 (0.44)
	1000	+	71	29 (0.41)	58 (0.82)	100	97 (0.97)	42 (0.42)
	316	+	76	33 (0.44)	65 (0.85)	100	95 (0.95)	46 (0.46)
	100	+	74	36 (0.48)	67 (0.91)	99	104 (1.05)	57 (0.58)
DMSO	(0.1 mL)	+	83	51 (0.61)	79 (0.95)	106	115 (1.09)	101 (0.96)
ダイアジノン	10000	-	63	36 (0.57)	54 (0.87)	88	32 (0.36)	7 (0.07)
	3160	-	65	38 (0.58)	67 (1.02)	92	32 (0.34)	11 (0.12)
	1000	-	67	36 (0.53)	67 (1.00)	83	41 (0.49)	28 (0.34)
	316	-	75	40 (0.53)	68 (0.91)	76	41 (0.54)	54 (0.72)
	100	-	69	47 (0.67)	65 (0.93)	80	43 (0.54)	39 (0.48)
DMSO	(0.1 mL)	-	96	78 (0.81)	81 (0.84)	102	108 (1.05)	103 (1.00)
2AA	5	-	71	80 (1.13)	72 (1.02)	80	97 (1.21)	100 (1.25)
	5	+	75	51 (0.68)	0.53 ( $7.1 \times 10^{-2}$ )	88	101 (1.15)	0.56 ( $6.3 \times 10^{-3}$ )
MMC	0.05	-	72	6 ( $7.7 \times 10^{-2}$ )	$5.4 \times 10^{-2}$ ( $7.5 \times 10^{-4}$ )	29	0.11 ( $3.8 \times 10^{-3}$ )	0.01 ( $3.8 \times 10^{-4}$ )
AMP	25	-	3	33 (11.99)	13 (4.79)	$2.6 \times 10^{-4}$	$4.8 \times 10^{-4}$ (1.85)	$8.3 \times 10^{-4}$ (3.19)

( )内数値はC s 値

MMC : マイトマイシンC、2AA : 2-アミノアントラセン、AMP : アンピシリン

4) 小核誘発性

マウスを用いた小核試験

(資料No. 35)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年

検体の純度： (原体)

供試動物： 系マウス、7週齢、体重 雄 30.2~36.5 g、1群6匹

試験方法：検体を1 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液(1%CMC)に懸濁し、15.6、31.3、62.5及び125 mg/kgの投与用量で、24時間間隔で強制的に2回経口投与した。なお、溶媒対照群には1%CMCを同様に投与した。

最終投与18~24時間後に動物を屠殺し、各動物の両側大腿骨の骨髄細胞を採取してスライドガラスに塗抹し、メタノールで固定後、0.005%アクリジンオレンジ溶液で染色し、骨髄標本作製した。

陽性対照群にはマイトマイシンCの1 mg/kgを腹腔内に1回投与し、投与18~24時間後に動物を屠殺した。

本試験では、検体投与群の高用量群から3試験群について、動物番号順に各群5匹の動物を評価対象とし、骨髄標本作製した。なお、2回目の投与で1例が死亡した125 mg/kg群では、生存した5例全例を評価対象とした。

評価対象としなかった動物と15.6 mg/kg群動物については、標本作製を行わず、安楽死させた。

各動物標本について、2000個の幼若赤血球を観察し、小核を有する幼若赤血球の全幼若赤血球数に対する出現頻度(小核出現頻度)を求めた。さらに、各動物標本500個の赤血球を計数し、全赤血球中の幼若赤血球の占める割合(幼若赤血球の比率)を求めた。

用量設定根拠：

結果：骨髄標本の観察結果を次頁の表に示す。

一般状態では、溶媒対照群、15.6及び31.3 mg/kg群に異常はみられなかった。62.5 mg/kg群では流涎及び流涙等が認められ、125 mg/kg群では自発運動の減少、流涎、流涙、呼吸緩徐、体温低下、腹臥及び横臥等に加え、1例が2回目の投与後に死亡した。

小核出現頻度及び幼若赤血球の比率には、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照群であるマイトマイシンC投与群では、小核出現頻度において溶媒対照群と比較して、統計学的に有意な増加が認められた。

#### 骨髓標本の観察結果

採取時間	薬物	投与用量 (mg/kg)	性	観 察 動物数	MNPCE % (平均値±SD)	PCE/(PCE+NCE) % (平均値±SD)
最終投与後 18～24時間	溶媒対照 (1%CMC)	—	雄	5	0.15±0.08	53.8± 5.6
	ダイアジノン	31.3	雄	5	0.19±0.13	59.4± 4.3
		62.5	雄	5	0.14±0.10	50.8± 4.8
		125	雄	5	0.25±0.10	44.5±14.3
	陽性対照 (マイトマイシンC)	1 mg/kg	雄	5	2.81±0.43 <sup>a</sup>	52.0±14.4

MNPCE：多染性赤血球2000個のうち、小核を有する多染性赤血球数

PCE：多染性赤血球数                      NCE：正染性赤血球数

<sup>a</sup>：溶媒対照群に対して  $p \leq 0.01$  で有意 (the Conditional Binomial test)。

以上の結果から、本試験条件下において、ダイアジノン原体は骨髓細胞に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(14) 生体の機能に及ぼす影響

ダイアジノンにおける薬理試験

(資料No. 36)

試験機関：

報告書作成年

検体の純度： (原体)

① ウサギの呼吸、循環器系に対する作用

供試動物：ウサギ、雄、体重 2.5～3.5 kg、供試動物数報告書に記載なし

方 法：検体を0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)水溶液に懸濁し、ウレタン麻酔下にあるウサギに5及び20 mg/kgの検体を大腿静脈より投与し、呼吸運動(内圧)、右頸動脈圧、心電図(第Ⅱ誘導)及び生体位心臓運動に対する影響を観察した。

結 果：ダイアジノンの5及び20 mg/kg静脈内投与では、呼吸、頸動脈圧、心電図及び生体位心臓運動に対して何ら作用を示さなかった。

② 消化器系に対する作用

1) モルモットの摘出腸管に対する作用

供試動物：モルモット、雄、体重 300～400 g

方 法：モルモットを放血死させ、回腸及び結腸を摘出し、マグヌス槽を用いて、 $10^{-4}$  g/mL、 $10^{-5}$  g/mL、 $10^{-6}$  g/mL、 $10^{-7}$  g/mL及び $10^{-8}$  g/mLの濃度のダイアジノンの直接作用及びアセチルコリン $10^{-6}$  g/mL、ヒスタミン $10^{-6}$  g/mL、塩化バリウム $3 \times 10^{-4}$  g/mLによる摘出回腸の収縮並びにアドレナリン $10^{-7}$  g/mLによる摘出結腸の弛緩に対する作用性を調べた。

結 果：ダイアジノンは $10^{-4}$  M以下の濃度ではモルモットの摘出回腸に対して何ら作用を示さなかった。摘出結腸に対しては $10^{-5}$  g/mL及び $10^{-4}$  g/mLで弛緩作用を示した。

アセチルコリン $10^{-6}$  g/mL、ヒスタミン $10^{-6}$  g/mL及び塩化バリウム $10^{-4}$  g/mLによる摘出回腸の収縮に対するダイアジノンの影響は、ダイアジノン $10^{-8}$ 及び $10^{-7}$  g/mLでは何ら作用を示さなかったが、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 及び $10^{-4}$  g/mLの濃度で、それぞれ10～30%、50～60%、70～90%と、濃度依存的に抑制が認められた。また、この抑制作用は、洗浄により消失した。なお、ダイアジノン $10^{-8}$  g/mLではアセチルコリン $10^{-6}$  g/mLによる回腸の収縮を増強する場合も認められた。

アドレナリン $10^{-7}$  g/mLによる結腸の弛緩に対しては、ダイアジノン $10^{-5}$ 及び $10^{-4}$  g/mLで抑制が認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2) マウス腸管内炭末輸送に対する作用

供試動物： マウス、雄、体重 20 g 前後、1 群 7 匹

方 法：24時間絶食後、検体を0.5%CMC水溶液に懸濁し、0、5及び20 mg/kgを経口投与した。投与30分後に炭末懸濁液を0.2 mL/10 g 経口投与した。その20分後に屠殺開腹し、腸管を摘出して幽門部から炭末の到達先端までの小腸の長さを測定し、小腸全長に対する比率を算出した。

結 果：ダイアジノン5 mg/kg投与では作用を示さなかったが、20 mg/kg投与では軽度な促進作用を認めた。

③ ラットの体温に対する作用

1) 正常体温に対する作用

供試動物： ラット、雄、体重 200 g 前後、1 群 7 匹

方 法：直腸温を30分毎に4回測定し、体温変動の少ない動物を用いた。検体を0.5%CMC水溶液に懸濁し、0、5及び20 mg/kgを経口投与した。投与後30分毎に7回直腸温を測定し、検体投与前の正常体温に対する変動値を調べた。

結 果：ダイアジノンの5及び20 mg/kg投与では、正常体温に対して作用を示さなかった。

2) 解熱作用

供試動物： ラット、雄、体重 200 g 前後、1 群 7 匹

方 法：*Escherichia Coli*(*E. Coli*) 10  $\gamma$ /kgを静脈投与し、1～1.5時間に体温が0.7～1°C上昇した動物を用いた。検体を0.5%CMC水溶液に懸濁し、0、5及び20 mg/kgを経口投与した。投与後30分毎に7回直腸温を測定し、*E. Coli* 投与前の正常体温に対する変動値を調べた。

結 果：ダイアジノンの5及び20 mg/kg投与では、発熱ラットの体温に対して何ら作用を示さなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

④ ヒスタミンによる毛細血管透過性に対する作用

供試動物： ラット、雄、体重 200 g 前後、供試動物数報告書に記載なし

方 法：ラットの腹部を除毛し、検体を0.5%CMC水溶液に懸濁して、0、5及び20 mg/kgを経口投与した。投与1時間後に腹部皮下に0.1%ヒスタミン0.05 mLを注射し、その直後に1%エバンスブルー(0.25 mL/200 g)を尾静脈に投与した。その15分後に動物を屠殺し、腹部皮下を剥離し、皮膚内面の青染部分の面積を測定した。

結 果：ダイアジノンの5 mg/kgではほとんど作用を示さなかったが、20 mg/kgでは約15.7%増強した。

⑤ モルモットの角膜及び結膜に対する作用

供試動物：モルモット、雄、体重 300~350 g、供試動物数報告書に記載なし

方 法：検体を0.5%CMC水溶液に懸濁し、角膜面に1、5及び10%液を片眼に0.2 mL滴下した。他眼には1%コカイン液を滴下し、マンドリン線刺激に対する瞬膜反射の有無で麻酔作用の有無を調べた。

結 果：ダイアジノン1、5及び10%液の0.2 mL点眼におけるモルモットの角膜及び結膜反射に対する麻酔作用は何ら認めなかった。

⑥ ウサギの脳波に対する作用(慢性電極の植え込み)

供試動物：ウサギ、雄、体重 2.5~3.5 kg、供試動物数報告書に記載なし

方 法：ペントバルビタールNaで麻酔したウサギの脳内各部位に電極を植え込んだ。電極植え込み部位は、前頭葉、後頭葉(角質)、扁頭核、海馬(深部)とした。慢性電極を植え込んだウサギを用いてダイアジノン5及び20 mg/kgの耳静脈投与を行い、自発脳波に対するダイアジノンの作用を調べた。

結 果：ダイアジノン投与によって、ウサギの行動及び脳波のいずれにおいても顕著な変化を認めなかった。

以上、ダイアジノンは、呼吸、循環器系に対しては何ら作用を示さなかったが、消化器系に対する作用として、摘出腸管のアセチルコリン、ヒスタミン及び塩化バリウムにおける腸管収縮作用に対し抑制的に作用し、腸管内炭末輸送を軽度促進した。体温に対する作用、角膜及び結膜に対する作用及び脳波に対する作用では検体投与に関連した変化を認めなかった。ヒスタミンによる毛細血管透過性に対しては増強的に作用した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

「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)	動物数 / 1群	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	試験の概要
① 呼吸、循環器系に対する作用(ウサギ)	大腿静脈投与 (0.5%CMC水溶液)	5, 20		20	—	5、20mg/kg静脈内投与では、呼吸、頸動脈圧、心電図、生体位心臓運動に対し、何ら作用を示さなかった。
② 消化器系に対する作用 1) 摘出腸管 (モルモット)	回腸：マグヌス槽 (0.5%CMC水溶液)	(g/mL) 10 <sup>-8</sup> , 10 <sup>-7</sup> 10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-1</sup> g/mL	—	10 <sup>-4</sup> M以下の濃度では摘出回腸に対し、何ら作用を示さなかった。
	結腸：マグヌス槽 (0.5%CMC水溶液)	(g/mL) 10 <sup>-8</sup> , 10 <sup>-7</sup> 10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-6</sup> g/mL	10 <sup>-5</sup> g/mL	摘出結腸に対し、10 <sup>-5</sup> M、10 <sup>-4</sup> Mで弛緩作用を示した。
	回腸：マグヌス槽 (0.5%CMC水溶液) アセチルコリン:10 <sup>-6</sup> g/mL ヒスタミン:10 <sup>-6</sup> g/mL BaCl <sub>2</sub> :3×10 <sup>-4</sup> g/mL	(g/mL) 10 <sup>-8</sup> , 10 <sup>-7</sup> 10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-7</sup> g/mL	抑制: 10 <sup>-6</sup> g/mL	アセチルコリン(10 <sup>-6</sup> g/mL)、ヒスタミン(10 <sup>-6</sup> g/mL)、BaCl <sub>2</sub> (3×10 <sup>-4</sup> g/mL)による摘出回腸の収縮に対し、10 <sup>-8</sup> 、10 <sup>-7</sup> g/mLでは作用を示さなかった。10 <sup>-6</sup> 、10 <sup>-5</sup> 、10 <sup>-4</sup> g/mLの濃度で、それぞれ10~30%、50~60%、70~90%の濃度依存性な抑制を示した。グイジン/ルの作用は洗浄により消失した。グイジン/ル10 <sup>-8</sup> g/mLでアセチルコリン(10 <sup>-6</sup> g/mL)による回腸の収縮を増強する場合も認められた。
	結腸：マグヌス槽 (0.5%CMC水溶液) アトレチン:10 <sup>-7</sup> g/mL	(g/mL) 10 <sup>-8</sup> , 10 <sup>-7</sup> 10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-6</sup> g/mL	10 <sup>-5</sup> g/mL	10 <sup>-5</sup> 、10 <sup>-4</sup> g/mLの濃度はアトレチン(10 <sup>-7</sup> g/mL)による結腸の弛緩を抑制した。
2) 腸管内炭末輸送 (マウス)	経口投与 (0.5%CMC水溶液)	5, 20	7	5	20	20mg/kg投与で軽度促進した。
③ 体温に対する作用 1) 正常体温に対する作用(ラット)	経口投与 (0.5%CMC水溶液)	5, 20	7	20	—	5、20mg/kg投与では正常体温に対し作用を示さなかった。
	2) 解熱作用(ラット)	E. Coli 10 <sup>7</sup> /kg を静脈注射し発熱 経口投与 (0.5%CMC水溶液)	5, 20	7	20	—
④ ヒスタミンによる毛細血管透過性に対する作用(ラット)	経口投与 (0.5%CMC水溶液) 0.1%ヒスタミンを皮下注射、1%エバンズブルーを尾静脈注射	5, 20		5	20	5mg/kg投与では作用を示さなかったが、20mg/kg投与では約15.7%増強した。
⑤ 角膜および結膜に対する作用 (モルモット)	点眼 (0.5%CMC水溶液)	(%) 1, 5, 10		10	—	1、5、10%液の点眼では角膜および結膜反射に対し何ら作用を示さなかった。
⑥ 脳波に対する作用 (ウサギ)	耳静脈投与	5, 20		20	—	5、20mg/kg投与では行動および脳波のいずれにおいても顕著な変化は認められなかった。

報告書に動物数の記載がない場合、動物数は空欄とした。

—：無作用量又は作用量が求められない場合

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(15) 解毒及び治療

1) ラット及びウサギにおける中毒治療

(資料No. 37)

試験機関 : Edgewood Arsenal, Medical Research Laboratory

(文献 Toxicol. Appl. Pharmacol. 15, 216-224)

報告書作成年 1969年

検体の純度 : (原体)

供試動物 : アルビノ雌ラット 1群6匹 体重 ; 110~140 g

ウサギ 1群4匹 体重 ; 2.2~2.6 kg

① ダイアジノン中毒のラットの脳及び横隔膜ChEの変化 :

ダイアジノンの235 mg/kg (LD<sub>50</sub>値の0.8倍)をラットに経口投与した後、経時的に脳及び横隔膜のChE活性を測定した。

両組織ともChE活性は徐々に回復したが、横隔膜は24時間を経過した後に初めて回復が始まった。脳のAChE活性も同様に回復したが、横隔膜に比較して回復程度は低かった。

	ChE活性(対対照群%)	
	脳	横隔膜
24時間後	22.6	15.5
140時間後	44.8	62.6

② ダイアジノン中毒の拮抗 :

ラットにダイアジノンを経口投与し、各種の治療処理を行った場合のダイアジノンの毒性値を測定した。

治療処理				LD <sub>50</sub> (mg/kg)	対対照群 LD <sub>50</sub> 比
1回(10分後)		2回(4時間後)			
アトピン 16 mg/kg 筋注	アトピン 2-PAM Cl 30 mg/kg	アトピン 16 mg/kg 筋注	アトピン 2-PAM Cl 30 mg/kg		
-	-	-	-	293.8 (252.0~342.5)	1.00
+	-	-	-	396.2 (301.8~520.5)	1.35
-	経口	-	-	513.4 (422.8~623.4)	1.75
-	静注	-	-	355.0 (265.0~476.0)	1.21
+	静注	-	-	498.8 (424.0~587.0)	1.70
+	経口	-	-	925.8 (716.1~1197.0)	3.16
+	経口	+	-	1082.0 (836.5~1398.0)	3.69
+	静注	+	-	317.0 (241.0~419.5)	1.08
+	経口	-	経口	832.0 (587.0~1170.0)	2.84
+	静注	-	経口	1000.0 (670.0~1489.0)	3.41
+	経口	+	経口	794.1 (533.0~1180.0)	2.71
+	静注	+	経口	875.0 (718.0~1084.0)	2.98
+	静注	+	静注	552.6 (315.5~612.0)	1.88
+	経口	+	静注	1000.0 (779.0~1278.0)	3.41

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ダイアジノン投与10分後にアトロピン筋注あるいは2-PAM Clを単用投与した場合はほとんど効果が認められなかった。しかし、アトロピン筋注と2-PAM Clとの併用投与は治療効果が認められた。特に2-PAM Clの経口投与は効果が高い。

③ 2-PAM Clによる *in vivo* でのChEの再活性 :

LD<sub>50</sub>値の0.8倍のダイアジノン(235 mg/kg)をラットに経口投与し後、16 mg/kgのアトロピンを筋注し、24時間後に3群に分けた。

I群 ; 30 mg/kg 2-PAM Clを静脈注射

II群 ; 30 mg/kg 2-PAM Clを経口投与

III群 ; 無処理、中毒対照群

2-PAM Cl処理1時間後にラットを屠殺し、横隔膜を摘出した。各群の横隔膜のChE活性を測定した。

2-PAM Cl処理は阻害された横隔膜のChEを再び活性化した。

④ アトロピン及び2-PAM Cl処理をしたウサギの血中ChE活性と延命 :

ウサギを用い対照用血液を採血後、ダイアジノン1600 mg/kgを腹腔内投与した。最初の中毒症状が発現した時点でアトロピン16 mg/kgを筋注し、中毒後及びオキシム投与後経時的に採血し、全血のChE活性を測定した。

2-PAM Cl 30 mg/kgの単独静注あるいはアトロピンと2-PAM Clの経口併用投与により血中ChE活性は急速に再活性化及び中毒症状の回復が認められた。

以上の結果から、ダイアジノン中毒動物に対して硫酸アトロピンと2-PAM Clによる治療が有効であることが認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2) ヒトにおける中毒治療

(資料No. 38)

試験機関：香川県立中央病院麻酔科

(文献 香川県中病医誌 Vol.6 137~139)

文献発表年 1987年

農 薬：ダイアジノン約30 mLを誤飲。剤形不明。

患 者：女性(90歳)

体 重；36 kg

既往歴；25年前、肺結核。昭和60年8月、右上腕骨骨折。昭和60年12月頃より老人性痴呆。

現病歴；昭和61年2月13日午前10時30分から午後12時50分までの間にダイアジノン約30 mLを誤飲した。同日午後12時55分頃、意識不明で倒れているのを家人に発見され来院。家人による発見時、左下腿に痙攣様運動がみられたという。

来院時所見；舌根が沈下し、呼吸は微弱で、聴診では有響性ラ音が聞かれた。血圧80/40 mmHg、徐脈で、意識レベルはJapan Coma Scale (3-3-9度方式)の300点であった。瞳孔は縮小し、光反応は消失していた。便失禁(血便)もみられた。

治療経過：気管内挿管で呼吸補助を行うと同時に、胃管を挿入し、生理食塩水10 Lにて胃洗浄を行った。また、ショックに対して輸液、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム300 mg、重炭酸ナトリウム300 mLの点滴静注を行い、硫酸アトロピン0.5 mgを筋注した後、午後3時7分、ICUへ収容。

ICU入室後、硫酸アトロピン(1 A=0.5 mg)を初回5 A、ついで4時間毎に1 Aずつ、また、PAM(1 A=500 mg)を6時間毎に1 Aずつ静注した。その他、D-マンニトール300 mLの点滴静注を行った。意識レベルは次第に向上し、ICU入室2時間後にはJapan Coma Scale の2点まで回復がみられた。

第2病日、自発呼吸も十分に回復していたため抜管した。血圧は比較的安定しており、脈拍数は硫酸アトロピンの投与により100~130/分に維持されていた。下血に対してはシメチジン200 mgの静注を行い、解毒及び肝庇護のためグルタチオン1200 mg、強力ミノファーゲン・シー® 40 mgを投与した。

第6病日、意識レベルの改善、呼吸筋の回復など、全身状態が良好になり一般病棟へ転床した。

臨床症状の軽快により、PAMの投与は第13病日まで、硫酸アトロピンは第20病日までで打ち切った。血漿コリンエステラーゼも次第に回復した。第25病日には症状軽快により退院した。

以上の結果から、ダイアジノン中毒に対して硫酸アトロピンとPAMによる治療が有効であることが認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2. 原体中混在物及び代謝物を用いた試験成績

1) 原体中混在物を用いた試験成績

ダイアジノン原体中の混在物の略号、化学名及び構造式を以下に示した。

略名	化学名	構造式

略名中の囲い文字は原体成分組成表における番号

\* : 原体中の含量が0.1%以下であるため、原体規格からは除外されている。



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

① マウスにおける急性経口毒性

(資料No. 39)

試験機関：

報告書作成年

検体の純度：原体中に含まれる主要混在物、D-I、D-II、D-III、D-IV及びD-Vの5検体について実施した。各検体の純度は以下の通り

検 体					
純 度					

供試動物： 系マウス、5週齢、1群雄10匹

観察期間：14日間

投与方法：各検体をオリーブ油にて所定濃度に希釈して体重10g当り0.1mLを経口投与した。1000 mg/kgを最高薬量として、以下300、100、30及び10 mg/kgの薬量の内、大半の動物が死亡する薬量から死亡しない薬量までの3薬量で実験を行った。

絶食期間：報告書に記載なし。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、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実施した。

結 果：

検体	推定LD <sub>50</sub> 値	投与量 (mg/kg)	死亡率 死亡数/供試数	主要症状の 発現と消失	肉眼的 病理所見
	> 1000	100 300 1000	0/10 0/10 0/10	(発現)投与30~60分後 (消失)4日後	N. P.
	> 1000	100 300 1000	0/10 0/10 0/10	(発現)投与60分後 (消失)1日後	N. P.
	30~100	10 30 100	1/10 1/10 10/10	(発現)投与30~60分後 (消失)3日後	肺の赤色化
	300~1000	100 300 1000	0/10 0/10 10/10	(発現)投与10分後 (消失)1日後	肺の赤色化
	100~300	100 300 1000	2/10 7/10 9/10	(発現)投与60分後 (消失)3日後	肺の赤色化

N. P. : 検体投与に起因する異常を認めず

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

及び 1000 mg/kg投与でも死亡は認められなかった。

100 mg/kg投与群で10匹の死亡動物を認めた。1000 mg/kg投与群にのみ死亡動物を認めた。300 mg/kg投与群で7匹、1000 mg/kg投与群で10匹の死亡動物を認めた。

中毒症状としては、流涙、流涎、振せん及び不規則性呼吸等の有機燐系化合物の特徴的な症状が見られた。

なお、検体投与による死亡動物の肉眼的病理検査では、肺の一部または全体の赤色化が認められた。生存動物では何ら特記すべき変化は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

② 原体混在物 の変異原性 (資料No. 40)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度：

試験期間： 9月21日～9月24日

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌(TA100及びTA98株)を用いて、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S9 Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。試験は2連制で1回行った。

試験結果：結果を次表に示した。

検体は、S9 Mixの有無にかかわらず、最高用量(5000  $\mu$ g/プレート)においても、いずれの菌株で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-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2)、2-Nitrofluorene (2NF) 及び 3,4-Benzo[a]pyrene (B[a]P) では、すべての検定菌株で、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

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

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(表内の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/プレート)	S9Mixの 有無	復帰変異コロニー数/プレート	
			塩基置換型	フレームシフト型
			TA100	TA98
対照 (DMSO)	—	—	107	20
	10	—	101	10
	50	—	103	17
	100	—	96	13
	500	—	82	14
	1000	—	39	6
	5000	—	21	7
対照 (DMSO)	—	+	101	29
	10	+	104	25
	50	+	93	30
	100	+	94	31
	500	+	71	8
	1000	+	53	3
	5000	+	53	6
陽 性 対 照	AF-2	0.01	—	344
	2NF	1.0	—	165
	B[a]P	5.0	+	1116

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

2NF: 2-Nitrofluorene

B[a]P: 3,4-Benzo[a]pyrene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

③ 原体混在物 の変異原性

(資料No. 41)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度：

試験期間： 年9月21日～9月24日

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌(TA100及びTA98株)を用いて、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S9 Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。試験は2連制で1回行った。

試験結果：結果を次表に示した。

検体は、S9 Mixの有無にかかわらず、最高用量(5000  $\mu$ g/プレート)においても、いずれの菌株で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-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2)、2-Nitrofluorene (2NF)及び3,4-Benzo[a]pyrene (B[a]P)では、すべての検定菌株で、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

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

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(表内の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/プレート)	S9Mixの 有無	復帰変異コロニー数/プレート	
			塩基置換型	フレームシフト型
			TA100	TA98
対照 (DMSO)	—	—	75	32
	10	—	82	20
	50	—	84	22
	100	—	81	26
	500	—	74	17
	1000	—	80	23
	5000	—	88	28
対照 (DMSO)	—	+	81	34
	10	+	77	25
	50	+	81	26
	100	+	77	25
	500	+	88	27
	1000	+	87	21
	5000	+	94	14
陽 性 対 照	AF-2	0.01	—	254
	2NF	1.0	—	178
	B[a]P	5.0	+	688

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

2NF: 2-Nitrofluorene

B[a]P: 3,4-Benzo[a]pyrene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

④ 原体混在物 の変異原性

(資料No. 42)

試験機関：

報告書作成年

検体の純度：

試験期間： 年 9 月 21 日～ 9 月 24 日

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌(TA100及びTA98株)を用いて、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S9 Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。試験は2連制で1回行った。

試験結果：結果を次表に示した。

検体は、S9 Mixの有無にかかわらず、最高用量(5000  $\mu$ g/プレート)においても、いずれの菌株で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-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2)、2-Nitrofluorene (2NF) 及び3, 4-Benzo[a]pyrene (B[a]P) では、すべての検定菌株で、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

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

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(表内の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/プレート)	S9Mixの 有無	復帰変異コロニー数/プレート		
			塩基置換型	フレームシフト型	
			TA100	TA98	
対照 (DMSO)	—	—	75	32	
	10	—	95	24	
	50	—	82	27	
	100	—	82	30	
	500	—	92	28	
	1000	—	84	21	
	5000	—	79	18	
対照 (DMSO)	—	+	81	34	
	10	+	83	23	
	50	+	85	28	
	100	+	72	31	
	500	+	76	27	
	1000	+	85	23	
	5000	+	75	19	
陽 性 対 照	AF-2	0.01	—	254	—
	2NF	1.0	—	—	178
	B[a]P	5.0	+	688	393

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

2NF: 2-Nitrofluorene

B[a]P: 3,4-Benzo[a]pyrene



本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

⑤ 原体混在物 の変異原性

(資料No. 43)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度：

試験期間： 年9月21日～9月24日

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌(TA100及びTA98株)を用いて、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S9 Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。試験は2連制で1回行った。

試験結果：結果を次表に示した。

検体は、S9 Mixの有無にかかわらず、最高用量(5000  $\mu$ g/プレート)においても、いずれの菌株で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-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2)、2-Nitrofluorene (2NF)及び3, 4-Benzo[a]pyrene (B[a]P)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、検体はの有無にかかわらず含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(表内の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9Mixの 有無	復帰変異コロニー数/プレート		
			塩基置換型	フレームシフト型	
			TA100	TA98	
対照 (DMSO)	—	—	124	27	
	10	—	122	21	
	50	—	136	22	
	100	—	107	19	
	500	—	105	28	
	1000	—	116	16	
	5000	—	78	13	
対照 (DMSO)	—	+	120	29	
	10	+	125	26	
	50	+	123	28	
	100	+	138	27	
	500	+	139	26	
	1000	+	128	34	
	5000	+	124	19	
陽 性 対 照	AF-2	0.01	—	374	—
	2NF	1.0	—	—	142
	B[a]P	5.0	+	1384	558

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

2NF: 2-Nitrofluorene

B[a]P: 3,4-Benzo[a]pyrene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

⑥ 原体混在物 の変異原性

(資料No. 44)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度：

試験期間： 年 9月21日～9月24日

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌(TA100及びTA98株)を用いて、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S9 Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。試験は2連制で1回行った。

試験結果：結果を次表に示した。

検体は、S9 Mixの有無にかかわらず、最高用量(5000  $\mu$ g/プレート)においても、いずれの菌株で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-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2)、2-Nitrofluorene (2NF)及び3,4-Benzo[a]pyrene (B[a]P)では、すべての検定菌株で、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

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

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(表内の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/プレート)	S9Mixの 有無	復帰変異コロニー数/プレート		
			塩基置換型	フレームシフト型	
			TA100	TA98	
対照 (DMSO)	—	—	75	32	
	10	—	90	30	
	50	—	88	24	
	100	—	88	26	
	500	—	76	28	
	1000	—	83	26	
	5000	—	71	23	
対照 (DMSO)	—	+	81	34	
	10	+	94	33	
	50	+	90	34	
	100	+	88	26	
	500	+	78	29	
	1000	+	80	26	
	5000	+	79	27	
陽 性 対 照	AF-2	0.01	—	254	—
	2NF	1.0	—	—	178
	B[a]P	5.0	+	688	393

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

2NF: 2-Nitrofluorene

B[a]P: 3,4-Benzo[a]pyrene