

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

(3) イヌを用いた飼料混入投与による1年間反復経口投与毒性試験

(資料 毒性-19)

試験実施機関：

報告書作成年： [GLP 対応]

検体純度：

供試動物： ビーグル犬、約6か月齢

開始時体重範囲 雄 7.7～12.3kg 雌 7.2～10.8kg

1群雌雄各4匹

投与期間： 52週間( )

投与方法： 検体を0、10、20、40及び300ppmの濃度で混合した飼料400gを52週間にわたり1日1回与えた。なお、回復群として13週間300ppm飼料投与後、39週間基礎飼料のみを与える群を設けた。

用量設定根拠：

以上の結果に基づき、本試験における検体投与量を10、20、40及び300ppmに設定した。

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た。

試験期間を通じて検体投与に起因する一般状態の変化及び死亡例はみられなかった。

体重変化；全ての生存動物について、毎週1回体重を測定した。

検体投与群の体重及び体重増加量の増減において、対照群と比較し散発的に有意差がみられたが、一貫した傾向がみられず検体投与による影響とは考えられなかった。

飼料摂取量及び飼料効率；試験期間中個体ごとに毎日飼料摂取量を測定し、週ごとの平均飼料摂取量を算出した。また飼料効率も算出した。

検体投与による影響はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

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。

投与量 (ppm)		10	20	40	300	300(回復群)
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	0.3	0.6	1.2	8.8	10.1
	雌	0.3	0.6	1.2	9.3	9.9

詳細な状態の観察；投与 1 週前及び投与 51 週に全ての動物を対象に以下の項目の測定を行った。

一般状態観察

- ・ 精神状態、頭位、頭部協調性

姿勢及び歩行の観察

姿勢及び体位の反応

固有受容性

四肢の観察

- ・ 片足ホッピング・片足立位・片足歩行、手押し車状歩行、ホッピング（跳び直り）

脊髄体節性反射

- ・ 三頭筋、二頭筋、胸部屈筋、膝蓋、頸頭部、腰部屈筋、会陰部、交叉伸展反射

頭部神経観察

- ・ 威嚇反応、瞳孔反射、瞳孔協調性、瞳孔径、眼位、眼前庭反射、病的眼振、眼瞼反射、角膜反射、眼収縮筋反射、下筋の一時的緊張と大きさ、嗅覚観察、嘔吐反射、舌観察

バビンスキー反射

痛覚鈍化

いずれの検査項目にも検体投与に起因する変化はみられなかった。

血液学的検査；投与前 1 週、投与開始後 12、25 及び 51 週に、各群のすべての動物の頸静脈から検体処理前（給餌前）に採血して以下の項目について検査した。

赤血球数、白血球数、血小板数、血小板活性（投与前 1 週、投与開始後 12 週及び 25 週に実施）、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、白血球百分比（投与前 1 週、投与開始後 12 及び 25 週は対照群、300ppm 群及び 300ppm 回復群を対象に検査を行い、52 週にはすべての群の動物を対象に検査実施）、赤血球形態検査（投与前 1 週、投与開始後 12 週及び 25 週に実施）、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、網状赤血球数（対照群、300ppm 及び 300ppm 回復群を対象に実施）

統計学的に有意差のみられた検査項目を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

検査項目	週	雄					雌				
		投 与 量 (ppm)									
		10	20	40	300	300 (回復群)	10	20	40	300	300 (回復群)
Hb	12										
	25								120↑		121↑
	51										115↑
Ht	12										
	25								127↑		
	51										115↑
血小板数	12					138↑				131↑	136↑
	25									131↑	
	51										

Dunnett 検定 ↓↓: p<0.05、 ↑↑: p<0.01

表中の数値は対照群に対する変動率(%)

300ppm 群及び 300ppm 回復群雌雄で血小板数の有意な増加がみられたが、その程度は軽度であり、背景対照データ範囲 (雄  $3.42 \pm 0.96 \times 10^5 / \mu\text{l}$ 、雌  $3.6 \pm 0.91 \times 10^5 / \mu\text{l}$ ) 内であることから、毒性学的に重要な変化とは考えられなかった。雌の投与群でみられた Hb 及び Ht の有意な増加はいずれも背景対照データ範囲 (Hb: 雄  $15.7 \pm 1.35 \text{g/dl}$ 、雌  $16.0 \pm 1.76 \text{g/dl}$ 、Ht: 雄  $48.0 \pm 4.6\%$ 、雌  $49.6 \pm 5.4\%$ ) に有ること、用量との関連性がみられないことから検体投与の影響とは考えられなかった。

血液生化学的検査；血液学的検査と同じ試料を用い、投与前 1 週、投与開始後 12、25 及び 51 週に、各群のすべての動物の頸静脈から検体処理前（給餌前）に採血して以下の項目について検査した。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、グルコース、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、グロブリン、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、総コレステロール、総タンパク、無機リン、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ ( $\gamma$ -GTP)

統計学的に有意差のみられた検査項目を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

検査項目	週	雄					雌				
		投 与 量 (ppm)									
		10	20	40	300	300 (回復群)	10	20	40	300	300 (回復群)
AST	12									141↑	159↑
	25		134↑				154↑		146↑	183↑	192↑
	51							192↑		175↑	
ALT	12									171↑	
	25									145↑	
	51										
ALP	12						138↑	137↑			
	25										
	51										
無機リン	12										
	25										
	51					127↑				84↓	84↓
7N7ミン	12				109↑						
	25										
	51										
カルシウム	12										
	25					107↑					
	51										
カリウム	12										
	25										
	51				110↑						
塩素	12										
	25					97↓					
	51										

Dunnett 検定    ↑↓: p<0.05、    ↑↓↓: p<0.01

表中の数値は対照群に対する変動率(%)

いくつかの検査項目で対照と比べ統計学的に有意差のある変化がみられたが、以下の理由により毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。

20ppm 群雄の 25 週で AST の増加は、その程度が軽度 (4.3U/L) であり、高濃度投与群では有意な増加がみられなかった。また、12 及び 51 週では有意な増加がみられないことから検体投与の影響とは考えられなかった。雌の AST は、12 週では 300ppm 群(41U/L)及び 300ppm 回復群(46U/L)で対照群と比べ有意に高値であったが、その程度は軽度であった。25 週では 10ppm(37U/L)、40ppm(35U/L)、300ppm(44U/L)及び 300ppm 回復群(46U/L)で対照群と比べ有意に高値であったが、いずれもその程度は軽度であり、用量と関連性のある増加ではなかった。51 週では、20ppm(46U/L)及び 300ppm 群(42U/L)で対照群と比べ有意に高値であったが、その程度は軽度であり、用量と関連性のある増加ではなかった。したがって、雌でみられた AST の変化は、検体投与による影響とは考えられなかった。

300ppm 群雌の 25 週 (53U/L) 及び 51 週(45U/L)では ALT が対照群と比べ有意に高値であったが、その程度は軽度であり、各動物の測定値は試験機関の背景対照データの範囲内 (7.0~57.0 U/L) であり、雄ではみられないことから検体投与の影響とは考えられなかった。10 及び 20ppm 群雌の 12 週で ALP が対照群と比べ、有意に高値であったが、いずれの動物の値も試験機関の背景対照データ範囲内 (102±38.3 U/L) であり、高濃度投与群では有意差がみられないこと、12

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

週以外の検査時期では異常がみられないこと及び雄では異常がみられないことから検体投与の影響ではないと考えられた。300ppm 回復群雄の 51 週で無機リンが対照群と比べ有意に高値であった。雌では 300ppm 及び 300ppm 回復群において 51 週で有意に低値であった。しかしながら、いずれも試験機関の背景データ範囲内（雄  $6.5 \pm 1.03$ 、雌  $6.4 \pm 0.88$ 、単位 mg/dl）であり、雄では高値、雌では低値と同じ変化ではないこと、51 週以外の検査時期ではみられないことから検体投与の影響ではないと考えられた。その他、300ppm 群雄では 12 週にアルブミンが、51 週にカリウムが対照群と比べ有意に高値であった。300ppm 回復群雄では 25 週にカルシウムが対照群と比べ有意に高値であり、25 週で塩素が有意に低値であった。これらの変化はいずれも、試験機関の背景対照データ範囲内（アルブミン  $3.4 \pm 0.26$ g/dl、カリウム  $4.87 \pm 0.40$ mEq/l、カルシウム  $10.9 \pm 0.37$ mEq/l、塩素  $109 \pm 2.2$ mEq/l）であり、1 回の検査でしか有意差がみられないことから検体投与の影響ではないと考えられた。

尿検査；投与前 1 週、投与開始後 12、25 及び 51 週に、各群の全ての動物を個々に一晩代謝ケージに収容して採取した尿について以下の項目を検査した。

尿量、色調、外観、比重、pH、タンパク、グルコース、ウロビリノーゲン、ケトン体、ビリルビン、潜血、白血球、尿沈渣

いずれの検査項目にも検体投与に起因する変化はみられなかった。

眼科学的検査；投与開始前及び投与 2 週（1 ヶ月）、8 週（2 ヶ月）、12 週（3 ヶ月）、16 週（4 ヶ月）、20 週（5 ヶ月）、25 週（6 ヶ月）、40 週（9 ヶ月）及び 50 週（12 ヶ月）に、対照群及び投与群の全ての動物について間接眼検査鏡を用いて検査した。また、投与 12 週に眼圧を測定した。

次表に各投与群にみられた病変を検査時期別に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

性別		雄						雌					
投与量(ppm)		0	10	20	40	300	300 (回復群)	0	10	20	40	300	300 (回復群)
検査動物数		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
病変	検査時												
後囊下白内障	全検査					2	4↑					2	4↑
	1ヶ月												
	2ヶ月												
	3ヶ月					2	3					1	4
	4ヶ月					2	4					1	4
	5ヶ月					2	4					1	4
	6ヶ月					2	4					1	4
	9ヶ月					2	4					1	4
	12ヵ月					2	4					2	4
前Y字状縫合線白濁	全検査	1		1	3	3	2	2	2	2	2	2	1
	投与前			1		1	1	1		1	1	1	1
	1ヶ月			1	1	2	2	1	2	1	1	1	1
	2ヶ月	1		1	3	3	2	2	2	1	1	2	1
	3ヶ月	1		1	3	3	2	2	2	1	1	2	1
	4ヶ月	1		1	3	3	2	2	2	1	1	2	1
	5ヶ月	1		1	3	3	2	2	2	1	1	2	1
	6ヶ月	1		1	3	3	2	2	2	2	2	2	1
	9ヶ月	1		1	3	3	2	2	2	2	2	2	1
12ヵ月	1		1	3	3	2	2	2	2	2	2	1	
水晶体赤道面白内障	全検査					2						2	
	1ヶ月												
	2ヶ月												
	3ヶ月												
	4ヶ月												
	5ヶ月												
	6ヶ月					1							
	9ヶ月					2						1	
	12ヵ月					2						2	

Fisherの直接確率検定(全検査時期の動物数について申請者が実施) ↑↓: p<0.05

表中の数値は出現動物数(空欄は病変がみられなかったことを示す)

網掛けは回復群における回復期間(基礎飼料を与えた期間)を表す。

300ppm 群及び 300ppm 回復群でみられた後囊下白内障は、その大部分が投与開始後 2~3 ヶ月にかけてみられた。以後の病変の進行はまちまちであったが、水晶体全域が混濁する例はなく、失明する例もなかった。また、水晶体赤道面白内障は 300ppm 群で投与開始後 6~12 ヶ月にかけてみられたが、300ppm 回復群ではいずれの検査時期にもみられなかった。水晶体赤道面白内障は後囊下白内障に遅れて発生したが、水晶体後囊下白内障の進展と関連性はみられなかった。前Y字状縫合線白濁は対照群を含む各用量群で観察されたことから検体投与の影響とは考えられなかった。300ppm 回復群でみられた後囊下白内障は 9 か月の

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

回復期間中完全には回復しなかったが、2例の片眼においておいて小さな混濁部分が回復した。また、300ppm 回復群では回復期間中に新たな病変の発生はなく、投与期間中に発生した変化の悪化もみられなかった。投与後 12 週目に測定した眼圧には検体投与の影響はみられなかった。

臓器重量；投与終了時に、全ての生存動物を対象にして以下の臓器重量を測定した。また、体重に対する相対重量も算出した。

副腎、脳、精巣上体、腎臓、肝臓、卵巣、精巣、上皮小体を含む甲状腺

統計学的に有意であった検査項目を次表に示す。

性 別		雄					雌				
		投 与 量 (ppm)									
臓 器		10	20	40	300	300 (回復群)	10	20	40	300	300 (回復群)
副 腎	絶対重量			68 ↓	67 ↓						
	対体重比		82 ↓	82 ↓	73 ↓						

Dunnett 検定 ↑↓:  $p < 0.05$ , ↑↓↓:  $p < 0.01$

表中の数値は対照群に対する変動率(%)

20 (相対重量のみ)、40 及び 300ppm 群雄で副腎の絶対及び相対重量が有意に減少した。しかし、減少に明瞭な用量との関連性がみられないこと、病理組織学的に変化がみられないこと及び雌に変化がみられないことから毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。

肉眼的病理検査；投与終了時の全ての生存動物を対象に肉眼的病理検査を実施した。

検体投与に起因する変化はみられなかった。

病理組織学的検査；投与終了時の全ての生存動物について、以下の臓器について病理標本作製して検査した。

副腎、大動脈、皮膚、骨及び骨髄（胸骨及び大腿骨）、骨髄塗沫標本、脳（前脳、中脳、後脳）、眼球（視神経を含む）、胆嚢、消化管（食道、胃（噴門部、胃底部、幽門部）、十二指腸、回腸、空腸、盲腸、結腸及び直腸）、心臓、腎臓、肝臓、肺（右葉、左葉、気管支を含む）、リンパ節（腸間膜及び咽頭上）、卵巣及び卵管、膵臓、末梢神経（坐骨神経、脛骨神経）、下垂体、前立腺、唾液腺、骨格筋、乳腺を伴う皮膚、脊髄（胸部、頸部、腰部）、脾臓、精巣（精巣上体を含む）、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）、気管、膀胱、子宮（膈を含む）、その他肉眼的に異常のみられた病変部

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

主な病変について次表に示す。

性別		雄						雌					
投与量 (ppm)		0	10	20	40	300	300 (回復群)	0	10	20	40	300	300 (回復群)
臓器	検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	病変												
眼球	水晶体変性-片側						2						
	水晶体変性-両側					3						2	4
	水晶体変性-合計					3	2					2	4
精巣	精細管上皮変性 /萎縮-両側				1		2						

表中の数値は出現動物数（空欄は病変がみられなかったことを示す）

300ppm 群及び 300ppm 回復群の雌雄でみられた水晶体の変化は検体投与の影響と考えられた。水晶体にみられた変化はモルガニー球形成を伴う線維腫張及び水晶体皮質の裂隙であった。病変は後皮質被膜に最も頻発し、種々の程度で皮質深部に達していた。赤道面における線維異常は時に前皮質の病変に進展するが後皮質病変に比し低頻度であり、300ppm 群でのみみられた。精細管上皮変性が 40ppm 群雄で 1/4 例及び 300ppm 回復群雄で 2/4 例みられたが、300ppm 群ではみられないこと、ビーグル犬では自然発生病変として生じると報告（原文報告書 54 頁、参考文献 7(James, R.W. and Heywood, R.(1979) Age-related variations in the testes and prostate of beagle dogs. Toxicology, Vol.12, pp.273-279)及び参考文献 8(Greaves, P.(1990) Male genital tract. In: Histopathology of Preclinical Toxicity Studies, Elsevier, Amsterdam, pp. 584-624) されていることから検体投与に起因する変化ではないと考えられた。

以上の結果より、雌雄ともに 300ppm 群以上で水晶体に検体投与による異常がみられたことより、無毒性量は雌雄いずれも 40ppm (1.2mg/kg/日)と考えられた。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。




本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。




本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

## 8. 繁殖毒性及び催奇形性

### (1) ラットを用いた繁殖毒性試験

(資料 毒性-21)

試験機関：

報告書作成年： [GLP 対応]

検体純度：

供試動物： CrI:CD®BR 系ラット、1 群雌雄各 30 匹

開始時体重範囲 雄 263.0～357.9g、雌 177.5～246.7g

投与期間： P1 世代；雄 開始（9 週齢）から交配前 10 週間、交配期間及び解剖日まで

雌 投与開始（9 週齢）から交配前 10 週間、交配、妊娠、哺育期間及び解剖日まで

F1 世代；雄 離乳後 15 週間、交配期間及び解剖日まで

雌 離乳後 15 週間、交配、妊娠、哺育期間及び解剖日まで

試験期間：

投与方法： 検体を 0、20、200 及び 800ppm の濃度になるように基礎飼料に混入し、自由摂取させた。検体混入飼料は、週 1 回調製した。

投与量設定根拠；

交配・調整・選抜及び観察・検査項目：試験の概要を表 1 に示す。

一般状態及び死亡率；全ての動物について、一般状態及び生死を 1 日 1 回観察した。また、週に 1 回詳細な身体検査を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

体重変化；交配前育成期間は P1 及び F1 世代の全ての動物について週 1 回体重を測定した。  
妊娠及び哺育期間は P1 及び F1 雌について 0、7、14 及び 21 日に測定した。

飼料摂取量及び飼料効率；P1 動物では投与第 70 日、F1 動物では投与 105 日の交配前育成期間終了まで週 1 回飼料摂取量を測定した。妊娠期間は P1 及び F1 世代の雌の飼料摂取量を妊娠 0、7 及び 14 日に測定した。これらの測定値と体重から飼料効率を算出した。

交配及び交尾・妊娠の確認；交配は雌雄 1 対 1 で、膈内または床敷に膈栓が確認されるまで同居させた。2 週間以内に交尾がみられない場合は雄を既に交尾が確認された雄と取り替え、さらに 1 週間同居させた。交尾を確認した日を妊娠 0 日とした。

繁殖性に関する指標；分娩後、各雌親動物について生存出産児数、死亡産児数、児の性別について調査した。

交配、妊娠、出産及び哺育期間の観察に基づき、次の指標を求めた。

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{交尾確認雌動物数}}{\text{交配雌動物数}} \times 100$$

$$\text{妊娠率 (\%)} = \frac{\text{妊娠雌動物数}}{\text{交尾確認雌動物数}} \times 100$$

$$\text{出産率 (\%)} = \frac{\text{1匹以上の生存出産児の認められた腹数}}{\text{妊娠雌動物数}} \times 100$$

$$\text{着床率 (\%)} = \frac{\text{総出産児数}}{\text{着床数}} \times 100$$

$$\text{出産児生存率 (\%)} = \frac{\text{生存出産児数}}{\text{総出産児数}} \times 100$$

$$\text{哺育児生存率 (\%)} = \frac{\text{生後4日選抜前における生存哺育児数}}{\text{生存出産児数}} \times 100$$

$$\text{哺育率 (\%)} = \frac{\text{離乳児 (生後21日) 生存哺育児数}}{\text{生後4日選抜後の生存哺育児数}} \times 100$$

$$\text{離乳率 (\%)} = \frac{\text{離乳した腹数}}{\text{生存出産腹数}} \times 100$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

児動物の体重測定及び観察；F1及びF2世代の児動物体重を出産後0、4（調整前、後）、7、14及び21日に各腹ごとに雌雄別にまとめて測定した。各観察期間中、個々の児動物について異常な症状や所見、死亡、消失あるいは奇形の有無について観察した。

肉眼的病理検査；全ての屠殺及び死亡した親動物について肉眼的病理検査を行った。肝臓及び精巣については重量を測定した。子宮については交配に用いた全ての雌について着床痕の有無と数を調べた。

病理組織学的検査；全ての親世代動物から以下の組織について保存し、病理組織学的検査は対照群と最高投与群のみを行った。低用量群及び中間用量群については肉眼的異常部位と標的臓器について病理組織学的検査を行った。

下垂体、肝臓、精巣、精巣上体、精嚢腺、前立腺、凝固腺、卵巣、子宮、膈、子宮頸管及び肉眼的異常部位

血液生化学的検査；P1及びF1世代の親動物について交配前期間の終了直前に各群雌雄10匹の動物を16時間絶食させた後、眼窩静脈叢から採血して以下の項目を測定した。

アルカリホスファターゼ(ALP)、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)、ソルビトール酸化酵素(SDH)、ビリルビン、コレステロール、トリグリセリド、総タンパク、アルブミン、グルコース、尿素窒素、クレアチニン、カルシウム、リン酸塩、ナトリウム、カリウム、塩素

肝臓のペルオキシゾームの $\beta$ -酸化活性の測定；P1及びF1世代の雌雄の親動物について哺育終了時に、各群雌雄各5匹から肝臓を摘出し、重量測定後、Tris緩衝液を加えホモジナイズした。ホモジネートは600×gで15分遠心後、上清を取り出し、さらにその上清を15000×gで15分遠心して上清を捨てペルオキシゾーム画分を調製した。このペルオキシゾーム画分の $\beta$ -酸化活性を測定した。

結果：試験結果を表2に示す。

《親動物》

体重変化；

800ppm群ではP1及びF1のいずれも雌雄とも生育期間を通じて平均体重及び平均体重増加量が有意に減少した。また、妊娠期間及び哺育期間でも平均体重の有意な減少がみられたが、平均体重増加量に差がみられないことから生育期間における平均体重減少が原因と考えられる。200ppm群のP1雄の平均体重増加量は生育期間の投与0-7、21-28、42-49日では有意な減少がみられたが、F1の雌雄及びP1の雌では減少がみられないことから検体投与の影響とは考えられなかった。

飼料摂取量及び飼料効率；

飼料摂取量は P1 及び F1 とも 800ppm 群雌雄の生育期間及び妊娠期間で有意に減少した。200ppm 群では投与期間中散発的に有意な減少がみられたが検体投与の影響とは考えられなかった。飼料効率は P1 の 800ppm 群雌雄で生育期間に有意な減少がみられた。F1 では 200ppm 群の雌の妊娠期間で有意な減少がみられたが生物学的に意味のある変化とは考えられなかった。

一般状態；

P1 の 800ppm 群雄での下痢の発生頻度が、P1 及び F1 の 800ppm 群雌での脱毛の発生頻度が有意に増加した。また、F1 の 800ppm 群雌では、Teeth Crooked の発生頻度が有意に増加したが生物学的に意味のない反応と考えられた。

血液生化学的検査；

P1 及び F1 の 800ppm 群雌雄で ALP、ALT、AST 及び SDH の有意な増加がみられた。これらの変化は、検体投与による肝細胞障害と胆汁鬱滞を示すものと考えられる。また、800ppm 群ではトリグリセリドが有意に減少し、F1 雄を除き総コレステロールが有意に増加した。これらの変化は 800ppm 群では肝臓のペルオキシゾームによる  $\beta$ -酸化活性が有意に増加していることより脂質代謝異常による二次的な変化と考えられる。その他の有意差のみられた変化は、その程度が軽度であること（アルブミン、グロブリン、カルシウム、ナトリウム、塩素、BUN）、高濃度投与群では変化がみられないこと（カルシウム、リン酸塩、グルコース）から検体投与に起因する変化とは考えられなかった。さらに、BUN の有意な増加はクレアチニンに変化がみられないことから検体投与による変化とは考えられなかった。

臓器重量；

P1 及び F1 のいずれも 800ppm 群では肝臓の絶対重量が雄では有意に減少し、雌では有意に増加した。肝臓の相対重量は P1 の雄では有意に減少し、雌では P1 及び F1 とも有意に増加した。雌における肝臓重量の増加は肝臓のペルオキシゾームの  $\beta$ -酸化活性の増加と関連していると考えられるが、雄の肝臓重量の減少については病理組織学的検査において変化がみられないことから生物学的意義は不明である。P1 の 800ppm 群雄で精巣の相対重量が有意に増加した。しかしながら絶対重量では有意差がみられず病理組織学的検査でも変化がみられないことから体重減少に起因するものと考えられた。

肝臓ペルオキシゾームの  $\beta$ -酸化活性；

P1 及び F1 のいずれも 800ppm 群雌雄で肝臓ペルオキシゾームの  $\beta$ -酸化活性の有意な増加がみられた。

肉眼的病理検査；

P1 及び F1 のいずれにおいても検体投与に起因する変化はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

病理組織学的検査;

P1及びF1のいずれにおいても検体投与に起因する変化はみられなかった。

繁殖指標;

交尾率、妊娠率、出産率、着床率、妊娠期間などの指標に検体投与の影響はみられなかった。

《児動物》

同腹児数及び哺育生存率;

800ppm 群の F1 同腹児の哺育児生存率が有意に低下したが、その値 98.8%は試験実施機関の背景データ（平均 98.5% 範囲 95~100%）の範囲内であることから検体投与の影響とは考えられなかった。その他の指標に有意な変化はみられなかった。

体重変化;

800ppm 群の F1 及び F2 同腹児で哺育期間を通して平均体重が有意に減少した。

一般状態;

P1 及び F1 のいずれにおいても検体投与に起因する変化はみられなかった。

肉眼的病理検査;

P1 及び F1 のいずれにおいても検体投与に起因する変化はみられなかった。

以上の結果より、800ppm 群では親動物に体重及び体重増加量並びに飼料摂取量及び飼料効率の有意な減少、血液生化学的検査項目の有意な変化、肝臓重量の有意な変化、肝臓ペルオキシゾームの  $\beta$ -酸化活性の有意な増加がみられ、児動物体重も有意に低値であったことから無毒性量は親動物及び児動物いずれも 200ppm（雄 11.3mg/kg/日、雌 13.0mg/kg/日）と判断される。繁殖に対する影響は最高投与群でもみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

試験の概要を以下に示す。

表 1

世代	期間(日)	作業手順	項目
P1	生育(70)		一般状態、生死を毎日観察、体重、飼料摂取量を週1回測定
	交配(21)	雌雄1対1で交配。交尾は陰栓の有無で確認(妊娠0日)	育成期間終了時に各群雌雄親動物各10匹について血液生化学的検査を実施交配状況の観察
	妊娠(21)		妊娠0,7,14,21日に体重測定、妊娠0,7,14日に飼料摂取量を測定
	F1 出産---	-----	出産状況の観察、出産児数、生存児数、外表異常及び同腹生存児体重測定
	哺育(21日)		分娩0,4,7,14及び21日目に体重測定
---	離乳----	継代用の各群雌雄30匹を各腹から可能な限り各腹から雌雄1匹ずつ選抜	親用動物[F1]に選抜されなかった一部の児動物を剖検、雌雄親動物の剖検、対照群及び最高投与群について病理組織学検査
F1	生育(105)		1群雌雄親動物各5匹の肝臓を用いてペルオキシザム $\beta$ の $\beta$ -酸化活性を測定
	交配(21)	(P1世代に準じる)	(P1世代に準じる)
	妊娠(21)		
	F2 出産---	-----	-(P1世代に準じる)
	哺育(21日)		
-	離乳----	-----	-(P1世代に準じる)
F2			F2動物は離乳後一部の児動物について剖検



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

結果：以下に示す

表 2

世 代		親：P1				児：F1				親：F1		児：F2	
投 与 量 (ppm)		0	20	200	800	0	20	200	800	0	20	200	800
供試動物数 (匹)		雄	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
		雌	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
検体 採取 量	生育期間 (mg/kg)	雄	—	1.14	11.3	44.7	—	1.48	14.8	62.1	—	1.48	14.8
	雌	—	1.45	14.2	53.3	—	1.80	17.5	71.8	—	1.80	17.5	71.8
一般状態	妊娠期間 (mg/kg)	雌	—	1.39	13.5	53.7	—	1.36	13.0	54.7	—	1.36	13.0
	雄	—	影響なし	影響なし	下痢	—	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし
死亡率(%)	雌	—	影響なし	影響なし	脱毛	—	影響なし	影響なし	脱毛	—	影響なし	影響なし	
	雄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
体重	生育期間 P1:0-70日	雄	(100)	(101)	(97)	(93)↓	(100)	(96)	(99)	(89)↓	(100)	(100)	(100)
	雌	(100)	(106)↑	(100)	(90)↓	(100)	(100)	(100)	(100)	(91)↓	(100)	(100)	(100)
体重 増加量	妊娠期間 0-21日	雌	(100)	(105)↑	(100)	(92)↓	(100)	(98)	(97)	(93)↓	(100)	(98)	(97)
	雌	(100)	(103)	(100)	(97) <sup>注1</sup>	(100)	(97)	(98)	(98) <sup>注2</sup>	(100)	(97)	(98)	(98) <sup>注2</sup>
飼料 採取量	生育期間 P1:0-70日	雄	(100)	(100)	(92) <sup>注3</sup>	(85)↓	(100)	(95)	(99)	(89)↓	(100)	(95)	(99)
	雌	(100)	(117)↑	(98)	(63)↓	(100)	(100)	(100)	(100)	(91)	(100)	(100)	(100)
飼料 効率	妊娠期間 0-14日	雌	(100)	(103)	(103)	(98) <sup>注4</sup>	(100)	(98)	(87) <sup>注5</sup>	(101)	(100)	(98)	(97)
	雌	-3.5	-14.1	7.7	19.6↑	-4.5	-17.2	0.3	20.7↑	(100)	(97)	(98)	(98) <sup>注2</sup>
飼料 効率	生育期間 P1:0-70日	雄	(100)	(101)	(97)	(92)↓	(100)	(97)	(99)	(90)↓	(100)	(97)	(99)
	雌	(100)	(103) <sup>注7</sup>	(96) <sup>注8</sup>	(84)↓	(100)	(101)	(98)	(92)↓	(100)	(101)	(98)	(92)↓
飼料 効率	妊娠期間 0-14日	雌	(100)	(104)	(93) <sup>注9</sup>	(85)↓	(100)	(96)	(93)	(89)↓	(100)	(96)	(93)
	雄	(100)	(99)	(95) <sup>注10</sup>	(92)↓	(100)	(99)	(101)	(99) <sup>注11</sup>	(100)	(99)	(101)	(99) <sup>注11</sup>
飼料 効率	生育期間 P1:0-70日	雌	(100)	(112)↑	(102)	(74)↓	(100)	(100)	(102)	(98)	(100)	(100)	(102)
	妊娠期間 0-14日	雌	(100)	(92)	(93)	(106) <sup>注12</sup>	(100)	(94)	(83)↓	(99)	(100)	(94)	(83)↓

注 1; 哺育 0、7、14 日は有意な減少がみられた。

注 2; 哺育 0、7、14 日は有意な減少がみられた。

注 3; 投与 0-7、21-28、42-49 日では有意な減少がみられた。

注 4; 妊娠 0-7 日では有意な減少がみられた。

注 5; 妊娠 0-7 日では有意な減少がみられた。

注 6; 妊娠 0-7 日では有意な減少がみられた。

注 7; 投与 7-14、35-42、42-49 日では有意な増加がみられた。

注 8; 投与 49-56 日では有意な減少がみられた。

注 9; 妊娠 7-14 日では有意な減少がみられた。

注 10; 投与 21-28、42-49 日では有意な減少がみられた。

注 11; 投与 7-14 日では有意な減少がみられた。

注 12; 妊娠 7-14 日では有意な増加がみられた。

( )内は対照群に対する変動率(%)

統計学的検定法は表の終わりに記載

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

表2 (続き)

世 代		親 : P1				児 : F2			
投 与 量 (ppm)		0	20	200	800	0	20	200	800
供試動物数 (匹)	雄	30	30	30	30	30	30	30	30
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30
交 尾 率 (%)		96.7	100	96.7	100	93.3	93.3	89.7	100
		29/30	30/30	29/30	30/30	28/30	28/30	26/29	29/29
妊 娠 率 (%)		93.1	80.0	65.5	93.3	71.4	67.9	76.9	89.7
		27/29	24/30	19/29	28/30	20/28	19/28	20/26	26/29
出 産 率 (%)		100	100	100	100	100	100	95	100
		27/27	24/24	19/19	28/28	20/20	19/19	20/20	26/26
着 床 率 (%)		90.7	92.4	93.7	92.5	87.3	87.6	87.1	94.2
妊 娠 期 間 (day)		22.9	22.7	22.7	22.8	22.2	21.8	22.2	22.0
肉眼的病理検査		雌雄ともに検体投与に起因すると思われる変化は認められなかった							
組織病理学的検査		雌雄ともに検体投与に起因すると思われる変化は認められなかった							
親 動 物  血 液 生 化 学 的 検 査	ALP	雄			(166)↑				(169)↑
		雌							(144)↑
	ALT	雄				(237)↑			(211)↑
		雌		(65)↓	(60)↓	(58)↓			
	AST	雄				(163)↑			(187)↑
		雌		(81)↓	(77)↓			(87)↓	
	SDH	雄				(266)↑			(174)↑
		雌		(67)↓	(52)↓			(75)↓	
	ビリルビン	雄				(133)↑			(131)↑
		雌							
	総コレステロール	雄			(141)↑	(129)↑			(126)↑
		雌				(143)↑			(133)↑ (154)↑
	トリグリセリド	雄				(38)↓			(16)↓
		雌				(67)↓			(68)↓
	総タンパク	雄			(99)↓				
		雌							
	アルブミン	雄			(107)↑				
		雌							(113)↑
	グロブリン	雄							(81)↓
		雌				(88)↓			(83)↓
グルコース	雄								
	雌		(115)↑				(120)↑		
BUN	雄				(114)↑			(133)↑	
	雌							(113)↑	
リン酸塩	雄						(90)↓		
	雌								
カルシウム	雄							(95)↓	
	雌		(97)↓						
ナトリウム	雄				(99)↓				
	雌								
塩素	雄		(103)↑	(103)↑	(105)↑		(103)↑	(103)↑	
	雌				(104)↑			(103)↑	

( )内の数字は対照群に対する変動値(%)

統計学的検定法は表の終わりに記載

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

表 2 (続き)

世 代		親 : P1		児 : F1		親 : F1		児 : F2			
投 与 量 (ppm)		0	20	200	800	0	20	200	800		
供試動物数 (匹)	雄	30	30	30	30	30	30	30	30		
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30		
親動物	ペルオキシゲームのβ-酸化活性		雄			(155)↑			(150)↑		
			雌			(164)↑			(175)↑		
	生化学検査動物の肝臓重量		絶対雄								
			絶対雌						(127)↑		
			相対雄								
			相対雌			(115)↑	(125)↑			(129)↑	
	臓器重量	肝臓	絶対雄			(88)↓			(84)↓		
			絶対雌				(119)↑		(122)↑		
			相対雄				(93)↓				
			相対雌				(123)↑		(124)↑		
		精巣	絶対								
			相対				(108)↑				
	平均出産児数		12.8	13.4	14.6	13.1	13.3	12.7	13.3	13.7	
	出産児生存率(%)		97.8	97.6	99.6	99.5	95.3	98.1	93.6	98.7	
性比(雄の割合%)		46	55	49	49	45	54	50	47		
哺育児生存率(%)		99.5	99.7	98.7	98.8↓	99.0	99.3	94.1	98.4		
哺育率(%)		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.2	100.0	100.0		
離乳率(%)		100.0	95.8	100.0	100.0	100.0	100.0	94.7	100.0		
児動物	哺育児体重 (g)	出産 0 日	合計	7.1	7.0	6.6	6.6↓	6.5	6.6	6.3	6.3
			雄	7.2	7.2	6.9	6.8	6.7	6.8	6.5	6.6
			雌	6.9	6.7	6.4	6.4	6.4	6.4	6.2	6.2
	分娩後 4 日調整前	合計	11.6	11.7	10.9	10.6↓	11.0	11.1	10.3	10.1↓	
		雄	11.8	11.9	11.0	10.9	11.4	11.2	10.5	10.3	
		雌	11.4	11.1	10.7	10.3	10.8	10.9	10.1	9.8	
	分娩後 4 日調整後	合計	11.7	11.7	10.9	10.6↓	11.1	11.0	10.3	10.1↓	
		雄	11.9	12.0	11.1	10.9	11.4	11.2	10.4	10.3	
		雌	11.4	11.2	10.7	10.2	10.8	10.9	10.2	9.9	
	分娩後 7 日	合計	18.2	18.7	17.7	16.8↓	17.5	17.8	17.0	16.4↓	
		雄	18.8	19.1	18.1	17.3	18.1	18.0	17.2	16.8	
		雌	17.8	18.0	17.4	16.3	17.0	17.7	16.7	16.0	
	分娩後 14 日	合計	36.4	38.0	36.3	33.2↓	35.4	35.7	34.8	33.0↓	
		雄	37.8	38.8	36.9	33.9	36.1	35.7	35.3	33.8	
		雌	35.7	36.8	35.7	32.5	34.7	35.8	34.2	32.3	
	分娩後 21 日	合計	59.7	61.8	60.0	54.2↓	57.6	59.7	57.1	54.0↓	
		雄	62.6	63.5	61.3	55.5	58.9	60.6	58.2	55.5	
		雌	58.1	59.4	58.6	53.0	56.2	58.0	55.9	52.5	
	一般状態		検体投与に起因すると思われる変化は認められなかった								
	肉眼的病理検査		検体投与に起因すると思われる症状は認められなかった								

( )内の数字は対照群に対する変動値(%), ↓↑; p<0.05

Dunnett 検定; 体重、体重増加量、飼料摂取量、妊娠期間、生化学的測定値、臓器重量、Cochran-Armitage 検定; 一般状態、交尾率、妊娠率、出産率、病理組織学的検査結果 Jonckheere 検定; 着床数、着床率、平均産児数、性比、出産児生存率、哺育児生存率、哺育率 Linear contrast of least square means; 平均哺育児体重 (雌雄合算値のみ統計実施) Fisher の直接確立計算法; 病理組織学的検査結果

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

[申請者注] ラットの2世代繁殖試験においてP<sub>1</sub>の200ppm、F<sub>1</sub>の対照群及び20ppm群の妊娠率の低下の理由及び試験の有効性を以下のように考察する。

当該試験の妊娠率を次表に示す。

世代		親：P <sub>1</sub>		児：F <sub>1</sub>		親：F <sub>1</sub>		児：F <sub>2</sub>	
投与量(ppm)		0	20	200	800	0	20	200	800
供試動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30
妊娠動物数		27	24	19	28	20	19	20	26
妊娠率(%)		93.1	80.0	65.5	93.3	71.4	67.9	76.9	89.7
		27/29	24/30	19/29	28/30	20/28	19/28	20/26	26/29

- ・ 妊娠率低下の理由；試験責任者は P<sub>1</sub> の 200ppm(65.5%)、F<sub>1</sub> の対照群(71.4%)及び 20ppm 群(67.9%)の妊娠率が低かったことに関し、その理由は不明としている。しかしながら、妊娠率の低下に用量との関連がみられないこと、最高投与の 800ppm 群における妊娠率が P<sub>1</sub> 世代 93.3%、F<sub>1</sub> 世代 89.7%と高く、その値が背景対照データ(P<sub>1</sub> 世代：72.2～100.0%、F<sub>1</sub> 世代：46.7～86.9%)の最高値近辺にあることから、上記投与群の妊娠率の低下は検体の影響ではないと結論している。
- ・ 背景対照データとの比較；P<sub>1</sub> 世代の 200ppm 群の妊娠率 65.5%が P<sub>1</sub> 世代の背景対照データ範囲 72.2～100.0%から逸脱していた。F<sub>1</sub> 世代の対照群及び 20ppm 群それぞれの妊娠率 71.4%及び 67.9%は背景対照データ 46.7～86.9%の範囲内であった。
- ・ 標本数；妊娠率の低かった P<sub>1</sub> 世代の 200ppm 群、F<sub>1</sub> 世代の対照群及び 20ppm 群それぞれの妊娠動物数は 19、20 及び 19 でありガイドラインで規定された 20 匹を確保できなかった群もあるが、最低 19 匹の妊娠動物が得られていることから、試験責任者は繁殖機能の評価には十分としている。

以上より、ラットの2世代繁殖試験において P<sub>1</sub> の 200ppm 群、F<sub>1</sub> の対照群及び 20ppm 群の妊娠率が低かった理由は、明らかではない。しかしながら、妊娠率低下に用量との関連がみられず、最高投与群における妊娠率が最も高く、検体投与は妊娠に悪影響を及ぼすとは考えられなかった。従って、申請者は P<sub>1</sub> の 200ppm 群、F<sub>1</sub> の対照群及び 20ppm 群の妊娠率の低下は偶発的な変化と考える。また、繁殖に関するデータの統計学的及び科学的な比較的に十分な標本数が得られていることから、試験は有効と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

(2) ラットにおける催奇形性試験

(資料 毒性-22)

試験機関：

報告書作成年： [GLP 対応]

検体純度：

供試動物： Crj:CD@BR 系ラット、

開始時週齢；雌 11 週齢、雄 13 週齢、各群交尾確認雌 25 匹、

開始時体重範囲；雌 216.1～310.3g、雄(入手時体重)290.5～381.1g

試験期間： 妊娠 7-16 日間投与

(投与開始 、帝王切開終了 )

試験方法： 検体を 0.5% tween80 溶液に懸濁して 0、125、250、500 及び 1000mg/kg/日の用量で交尾確認雌動物に妊娠 7～16 日の 10 日間、1 日 1 回強制経口投与した。

交配は雌動物を膈内または床敷上に膈栓を確認するまで雄動物と 1 対 1 で同居させた。膈栓を確認した日を妊娠 1 日とした。

投与量設定根拠；

検査項目及び方法：

親動物； 生死については毎日観察した。一般状態は毎朝観察し、さらに検体投与期間は午後にも観察した。体重は、妊娠 1、7、9、11、13、15、17 及び 22 日に測定した。飼料摂取量を妊娠 1 日から 22 日まで 2 日ごとに測定した。妊娠 22 日に親動物を CO<sub>2</sub> 処理によって安楽死させ、肉眼的病理検査を行い、子宮を摘出して重量を測定後、着床数、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚について観察した。また、卵巣を摘出して妊娠黄体数について調べた。

胎児； 生存胎児の性別を観察し、個体別体重を測定した後、外表異常の有無を検査した。矮小胎児（同腹胎児中の最小体重胎児がその他の胎児の平均体重の 2/3 以下の場合矮小胎児とした。同腹胎児中に矮小胎児がみられた場合、次に 2 番目に体重の軽い胎児についても同様の操作を行い、以下矮小胎児が認められなくなるまで同様の操作を繰り返した）を識別した。外表異常の検査後、各腹で 1 番目の生存胎児とそれから 1 つおきの生存胎児について、断頭して内臓異常について検査し、性別を確認した。また、腎臓の発生遅延についても分類した。断頭した頭部は中性緩衝ホルマリンで固定して検査した。全ての胎児を 70%エタ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

ノールで固定後、骨格標本を作製し、骨格検査した。

結果： 下表に示す。

投与量 (mg/kg/日)		0	125	250	500	1000	
1群当たりの動物数		25	26 <sup>a)</sup>	25	25	25	
1群当たりの妊娠動物数		25	24	25	24	25	
早産動物数		0	0	0	0	1	
死亡動物数		1	1	0	0	0	
全胎児吸収動物数		0	0	0	0	1	
全胎児死亡動物数		0	0	0	0	1	
生存胎児を有した動物数		24	24	25	24	23 <sup>b)</sup>	
親動物	検査動物数	24	24	25	24	24	
	一般状態	検体投与に起因する異常はみられなかった。					
	体重増加量 <sup>1)</sup> (g) [%]	7-9	4.6	1.9	1.3	-1.0↓	-1.0↓
			[100]	[41]	[28]	[-22]	[22]
		7-22	40.9	42.5	43.9	42.9	43.4
			[100]	[104]	[107]	[105]	[106]
	摂餌量 <sup>2)</sup> (g) [%]	7-9	21.6	20.9	20.9	19.2↓	18.5↓
			[100]	[97]	[97]	[89]	[86]
		7-17	22.3	22.9	23.4	22.4	21.9
			[100]	[103]	[105]	[100]	[98]
剖検所見	検体投与に起因する変化はみられなかった。						
着床所見 ／ 腹平均	妊娠黄体数	18.3	17.8	17.1	18.3	17.2	
	着床数	16.4	16.3	15.0	16.4	15.6	
	生存胎児数	16.0	15.9	14.4	15.5	14.6	
着床後死亡	早期死亡胚数	0.4	0.4	0.6	1.0	0.8	
	後期死亡胚数	0	0	0	0	0.1	
	死亡胚合計	0.4	0.4	0.6	1.0	0.9	

Cochran-Armitage 検定、Jonckheere 検定、 ↓↑ : p<0.05

a) 検体投与前の妊娠 5 日に 1 例が死亡したため 1 匹を追加した。

b) 死亡胎児のみしかみられなかった 1 例については計算から除外した。

1) 早産動物、妊娠しなかった動物、計画屠殺前に死亡した動物については計算から除外した。

妊娠 7-9 日の体重増加量は補正していないが、妊娠 7-22 日の体重増加量については胎児を含む子宮重量を引いた値である。

2) 早産動物、妊娠しなかった動物、計画屠殺前に死亡した動物については計算から除外した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

投与量 (mg/kg/日)		0	125	250	500	1000	
1群当たりの動物数		24	24	25	24	24	
平均生存胎児体重 (g)		5.19	5.13	5.11	5.21	5.26	
生存胎児の性比(雄/全胎児)		0.46	0.51	0.43	0.45	0.52	
奇形胎児数(腹)		2(2)	3(3)	2(2)	0	3(3)	
奇形胎児/腹の出現率(%)		0.6	0.8	0.5	0	0.8	
変異胎児数(腹)		105(23)	98(22)	98(24)	132(24)	84(21)	
変異胎児/腹の出現率(%)		27.5	25.3	29.6	35.9	24.2	
外表異常	検査胎児数	384	381	361	371	354	
	外表奇形胎児数 (腹)	0	2(2)	0	0	1(1)	
	奇形胎児/腹の出現率 (%)	0	0.6	0	0	0.3	
	奇形	尾欠損	0	1	0	0	0
	糸状尾	0	0	0	0	1	
胎児 内臓異常	検査胎児数	199	198	187	191	183	
	内臓奇形胎児数(腹)	1(1)	0	0	0	1(1)	
	内臓奇形/腹の出現率 (%)	0.5	0	0	0	0.5	
	奇形	胃壁破裂	0	1	0	0	0
		副腎欠損	1	0	0	0	0
		副腎位置異常	0	0	0	0	1
		小腸位置異常	0	0	0	0	1
		腎臓欠損	1	0	0	0	0
		腎臓位置異常	0	0	0	0	1
		肝臓位置異常	0	0	0	0	1
		膵臓位置異常	0	0	0	0	1
		脾臓位置異常	0	0	0	0	1
		胃位置異常	0	0	0	0	1
		胸郭位置異常	0	0	0	0	1
	尿管欠損	1	0	0	0	0	
	発育遅延による内臓変異胎児数(腹)	14(9)	6(5)	5(5)	10(9)	15(8)	
	内臓変異/腹の出現率 (%)	7.3	3.3	4.2	5.5	8.9	
変異	大動脈開存(腹)	1(1)	0	3(3)	0	3(2)	
	小腎乳頭 (腹)	Size1	3(2)	2(2)	0	3(2)	5(3)
		Size2	10(7)	4(3)	2(2)	7(7)	6(4)

Cochran-Armitage 検定、Jonckheere 検定、

↓ : p<0.05

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

投与量 (mg/kg/日)		0	125	250	500	1000		
1群当たりの動物数		24	24	25	24	24		
胎児	頭部異常	検査胎児数	197	197	187	191	183	
		頭部奇形胎児数(腹)	0	2(2)	0	0	1(1)	
		頭部奇形/腹の出現率(%)	0	0.9	0	0	0.5	
		奇形	右脳が左脳の 大きさの半分(腹)	0	0	0	0	1(1)
		小眼球症(腹)	0	2(2)	0	0	0	
	骨格異常	検査胎児数	384	381	361	371	354	
		骨格奇形胎児数(腹)	1(1)	2(2)	2(2)	0	0	
		奇形胎児/腹の出現率(%)	0.3	0.6	0.5	0	0	
		奇形	肋骨欠損(腹)	0	1(1)	0	0	0
			肋骨癒合(腹)	0	1(1)	2(2)	0	0
			胸骨癒合(腹)*	1(1)	0	0	0	0
			椎骨欠損(腹)	0	1(1)	0	0	0
			骨格変異胎児数(腹)	6(4)	3(3)	9(4)	11(10)	5(2)
			骨格変異/腹の出現率(%)	1.6	0.8	2.8	3.0	1.5
		変異	痕跡状過剰肋骨(腹)	5(3)	2(2)	8(4)	6(5)	4(1)
			胸骨の不整列(腹)	1(1)	1(1)	1(1)	5(5)	1(1)
			発育遅延による骨格変異胎児数(腹)	86(22)	91(22)	90(24)	118(22)	69(20)
			骨格変異/腹出現率(%)	22.4	23.5	27.3	32.2	19.1
		変異	肋骨の化骨遅延(腹)	0	0	1(1)	1(1)	2(2)
			波状肋骨(腹)	0	2(1)	1(1)	1(1)	2(2)
		頭蓋骨化骨遅延(腹)	18(10)	18(14)	23(14)	19(10)	11(9)	
	胸骨化骨遅延(腹)	30(13)	38(15)	31(16)	28(13)	19(9)		
	椎骨化骨遅延(腹)	44(16)	42(16)	40(14)	84(18)	47(18)		

Cochran-Armitage 検定、Jonckheere 検定、 ↓↑ : p<0.05

\* : 詳細な記録は残っていないが、早期の胸骨癒合が正常像から逸脱していたか、あるいは何らかの異常がみられたことから「骨格奇形」と分類された。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

親動物； 対照群及び 125mg/kg/日群で各 1 例が死亡した。対照群の 1 例は妊娠 15 日に切迫屠殺したが、剖検の結果誤投与が死因であった。125mg/kg/日群の 1 例は検体投与前の妊娠 5 日に死亡し、剖検で膀胱結石による水腎症がみられた。体重増加量及び飼料摂取量は妊娠 7-9 日に 500 及び 1000mg/kg/日群で有意な減少がみられた。一般状態に検体投与による影響はみられなかった。また、剖検でも、検体に起因する所見は認められなかった。妊娠率、胎児数、妊娠黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数、性比などの繁殖に関する指標に検体投与の影響はみられなかった。

胎児； 1000mg/kg/日群の親動物 1 腹では死亡胎児 2 例のみがみられた。この動物の剖検では子宮の捻転及び子宮内の赤色液貯留がみられたが、検体投与の影響とは考えられなかった。奇形や異常の発生頻度ならびに化骨進行に検体投与の影響はみられなかった。

以上の結果から、親動物に対しては 500mg/kg/日以上で体重増加量及び飼料摂取量が減少したことより、無毒性量は 250mg/kg/日と判断された。

胎児に対してはいずれの投与量でも異常がみられないことより無毒性量は最高投与量の 1000mg/kg/日と判断された。また、最高投与量である 1000mg/kg/日でも催奇形性はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

(3) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 毒性-23)

試験実施機関：

報告書作成年： [GLP 対応]

検体純度：

供試動物： ニュージーランドホワイト種ウサギ、開始時月齢 約6か月齢、  
開始時体重範囲 2.846~3.972kg、各群交配雌 20匹

試験期間： 妊娠 7-19 日間投与  
(投与開始 、帝王切開終了 )

試験方法： 検体を 0.5% tween80 溶液に懸濁して 0、100、350 及び 1000mg/kg/日の用量で、  
交配した雌に妊娠 7~19 日の 13 日間、1 日 1 回強制経口投与した。試験には購  
入先で交配した雌動物を妊娠 1~3 日に受領して使用した。購入先で交配した日  
を妊娠 0 日とした。

投与量設定根拠；

検査項目及び方法：

親動物； 生死については毎日観察した。一般状態は毎朝観察し、さらに検体投与期間は  
午後にも観察した。体重は、妊娠 4、7、10、13、16、20 及び 29 日に測定した。  
飼料摂取量を妊娠 4 日から 29 日まで 3 日ごとに測定した。妊娠 29 日に親動物  
を安楽死させ、肉眼的病理検査を行い、子宮を摘出して重量を測定後、着床数、  
生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚について観察した。また、卵巣を摘出して妊  
娠黄体数について調べた。

胎児； 生存胎児は、個体別体重を測定し、性別を確認し、外表異常の有無を検査した。  
矮小胎児（同腹胎児中の最小体重胎児がその他の胎児の平均体重の 2/3 以下の場  
合矮小胎児とした。同腹胎児中に矮小胎児がみられた場合、次に 2 番目に体重の  
軽い胎児についても同様の操作を行い、以下矮小胎児が認められなくなるまで同  
様の操作を繰り返した）を識別した。外表異常の検査後、全ての胎児について内  
臓異常と性別を検査した。腎臓の発生遅延についても分類した。次に、全ての胎  
児を 70%エタノールで固定後、骨格標本を作製し、骨格検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

結果： 下表に示す。

投与量 (mg/kg)		0	100	350	1000	
1群当たりの動物数		20	20	20	20	
1群当たりの妊娠動物数		17	20	18	17	
流産動物数		0	2	0	4↑	
死亡動物数		0	1 <sup>a)</sup>	0	0	
全胎児吸収動物数		0	0	0	0	
生存胎児を有した動物数		17	17	18	13	
親動物	一般状態	検体投与に起因する異常はみられなかった。			糞の小型化、褐色便、糞量減少、排便停止	
	体重増加量 <sup>1)</sup> (g)	127.7	139.1	144.9	98.9	
	[%]	[100]	[109]	[113]	[77]	
	飼料摂取量 <sup>2)</sup> (g)	149.2	147.0	144.8	146.6	
	[%]	[100]	[99]	[97]	[98]	
	妊娠率 <sup>3)</sup> (%)	85	100	90	85	
	剖検所見	検体投与起因する変化はみられなかった。				
	着床所見／腹平均	妊娠黄体数	8.9	9.6	8.8	10.8
		着床数	8.1	9.1	8.4	9.5
		生存胎児数	7.8	8.8	8.2	8.7
着床後死亡		早期死亡胚数	0.2	0.2	0.2	0.6
		後期死亡胚数	0.1	0.1	0	0.2
	死亡胚合計	0.3	0.3	0.2	0.8	

Cochran-Armitage 検定 ↓↑: p<0.05

a)妊娠 17 日に事故死した。

1)妊娠 7-20 日の平均体重増加量

2)妊娠 7-20 日の平均飼料摂取量

3)申請者が算出

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

投 与 量 (mg/kg)		0	100	350	1000		
1 群当たりの動物数		17	17	18	13		
胎 児	平均生存胎児体重 (g)	41.56	40.76	40.22	40.38		
	生存胎児の性比(雄/全胎児)	0.50	0.46	0.45	0.48		
	奇形胎児数	1(1)	1(1)	2(2)	1(1)		
	奇形胎児/腹の出現率(%)	0.7	1.0	2.5	0.7		
	変異胎児数	45(13)	24(11)	52(16)	57(10)		
	変異胎児/腹の出現率(%)	34.5	15.3	35.4	42.6		
	外 表	検査胎児数	133	149	147	113	
		外表異常胎児数	0	0	0	0	
	内 臓	検査胎児数	133	149	147	113	
		内臓奇形胎児数(腹)	0	0	1(1)	0	
		内臓奇形/腹の出現率(%)	0	0	1.4	0	
		奇形 横隔膜欠損	0	0	1	0	
	頭 部 異 常	検査胎児数	133	149	147	113	
		頭部奇形胎児数(腹)	0	0	0	1(1)	
		頭部奇形/腹の出現率(%)	0	0	0	0.7	
		奇形 水頭症	0	0	0	1(1)	
	骨 格 異 常	検査胎児数	133	149	147	113	
		骨格奇形胎児数(腹)	1(1)	1(1)	1(1)	0	
		奇形胎児/腹の出現率(%)	0.7	1.0	1.1	0	
		奇形	半胸骨分節(腹)	1(1)	0	0	0
			非癒合胸骨(腹)	0	1(1)	0	0
			半椎(腹)	0	0	1(1)	0
		骨格変異胎児数(腹)	0	1(1)	1(1)	1(1)	
骨格変異/腹の出現率(%)		0	0.7	0.7	0.8		
変異		痕跡状頸部肋骨(腹)	0	0	1(1)	0	
		胸骨の癒合(腹)*	0	1(1)	0	1(1)	
発育遅延による骨格変異胎児数(腹)		45(13)	23(10)	51(16)	56(10)		
骨格変異/腹出現率(%)		34.5	14.6	34.7	41.0		
変異		骨盤の化骨遅延(腹)	0	1(1)	1(1)	0	
		頭蓋骨の湾曲(腹)	2(2)	1(1)	5(5)	3(2)	
		頭蓋骨化骨遅延(腹)	0	1(1)	2(1)	0	
	胸骨化骨遅延(腹)	41(12)	17(9)	46(16)	46(10)		
	椎骨化骨遅延(腹)	8(3)	4(2)	0	11(2)		

Jonckheere 検定

\* : 早期の胸骨癒合の正常像からの逸脱がなく、かつその他に異常がみられなかったことから「骨格変異」と分類された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

親動物； 100mg/kg/日群で1例が死亡した。死因は投与時の傷であった。体重増加量及び飼料摂取量に検体投与による影響はみられなかった。一般状態の変化として、1000mg/kg/日群で妊娠7-19日に糞の小型化や褐色便が有意に増加した。この変化は投与期間終了後も一部の動物にみられた。また、1000mg/kg/日群では妊娠7-19日に糞量の減少もしくは排糞の停止がみられた。これらの変化は投与液が濃厚で比較的大量であることに起因すると考えられた。剖検では、検体投与に起因する所見はみられなかった。1000mg/kg/日群で流産の頻度が有意に増加した。妊娠率、胎児数、妊娠黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数、性比などの生殖に関する指標に検体投与の影響はみられなかった。

胎児； 死亡、体重、奇形及び変異の発生頻度に検体投与の影響はみられなかった。

以上の結果から、親動物に対しては1000mg/kg/日群で検体投与による一般状態の変化及び流産の頻度が増加したことより無毒性量は350mg/kg/日と判断された。胎児に対してはいずれの投与量でも異常がみられないことより、無毒性量は最高投与量の1000mg/kg/日と判断された。また、最高投与量である1000mg/kg/日でも催奇形性はみられなかった。

#### [申請者注]

ウサギの催奇形性試験における100mg/kg投与群の流産の2例について本薬の投与の影響でないことを以下のように考察した。

ウサギの催奇形性試験は0、100、350および1000mg/kg/日の投与量で実施し、各群でそれぞれ0、2、0及び4例の流産がみられた。1000mg/kg/日群では統計学的に有意な増加であった。

100mg/kg/日でみられた2例の流産については、以下の理由により検体投与の影響ではないと判断した。

- ・ 100mg/kg/日の上位濃度である350mg/kg/日群で流産がみられないこと。
- ・ 統計学的に有意差がみられないこと。
- ・ 2例（動物番号；28896、28915）に流産がみられたが、妊娠18日に流産した1例（動物番号；28915）は流産前の一般状態などに検体投与の影響はみられないことから偶発的な変化と考えられた。
- ・ 残りの1例（動物番号；28896）は妊娠21日に流産した。この動物は妊娠7日目以降、飼料摂取量が極端に減少した。この変化に関連して、体重も減少し、また糞量も減少した。剖検において、胃内に毛球と考えられる線維状内容物がみられた（原試験報告書85頁）。これらの変化は、同群の他の動物では観察されず、また、350mg/kg/日群ではみられないことから検体投与による影響とは考えられない。飼料摂取量の減少と胃内の毛球との関連は明らかではないが、関連している可能性がある。
- ・ 背景データにおける流産頻度は0～1例であった。当該試験における

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

100mg/kg/日群の流産2例は背景データの範囲を越えていたが、上記のように1例は偶発的な変化であり、残りの1例は飼料摂取量減少などに起因する二次的な作用によると考えられるので、検体の影響とは考えられない。

- ・当該試験の予備試験として、20匹の妊娠ウサギを用いた試験を実施した。試験は検体を1000mg/kg/日の濃度で妊娠7～19日にかけて毎日1回投与し、妊娠22日に剖検した。その結果、妊娠率、胎児吸収率、胎児死亡率などの繁殖指標に検体投与の影響はみられず、さらに、流産もみられなかった。

以上より、当該試験の100mg/kg/日投与群における2例の流産は、検体投与の影響ではなく、偶発的な変化もしくは二次的な作用によると考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

## 9. 変異原性

### (1) 遺伝子突然変異

#### ① 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 毒性-24)

試験実施機関：

報告書作成年： [GLP 対応]

検体純度：

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535、TA97、TA98 株) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA(pKM101)株を用い、代謝活性化系 (S9) の存在及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。試験は3連制 (1群3枚のプレートを用いる) とし、2回行った。

なお、サルモネラ菌の使用菌株に関して、ガイドラインでは TA1537 株の使用が要求されているが、TA97 株は代替菌株として使用が推奨されており、フレームシフト型変異に対する感受性の高いことが認められている。

用量設定根拠：

結果： 結果を表1及び2に示した。

2回の試験において、検体は代謝活性化系 (S9) の有無にかかわらず、いずれの用量においても、また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-アミノアントラセン、2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、ICR-191 アクリジン及びメチルメタンスルホネートでは、全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、代謝活性化系を含む本試験条件下で検体は復帰変異誘発性を有さないものと判断される。

表 1

<試験 1>

薬物及び 濃度(μg/plate)		S9	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*	TA97	TA98	
対照(DMSO)	0	-	127	13	170	115	23	
検体	10	-	126	12	169	107	22	
	50	-	80	13	185	105	19	
	100	-	77	10	185	115	19	
	500	-	99	7	178	115	16	
	1000	-	86	10	168	113	18	
	2500	-	100	11	161	113	17	
	5000	-	95	10	158	123	22	
対照(DMSO)	0	+	134	13	190	101	26	
検体	10	+	178	13	182	127	28	
	50	+	134	11	179	132	29	
	100	+	127	11	170	133	24	
	500	+	120	12	193	138	25	
	1000	+	112	12	195	150	27	
	2500	+	115	13	182	127	25	
	5000	+	121	10	177	150	21	
陽性 対照	2AA	**	+	1587	384	2017	1327	1727
	2NF	25	-					1381
	NAAZ	2	-	554	1249			
	ICR-191	2	-				2193	
	MMS	1000	-			2211		

表中の値は 3 枚の平均値

2AA : 2-アミノアントラセン

2NF : 2-ニトロフルオレン

NAAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : ICR-191 アクリジン

MMS : メチルメタンスルホネート

\* : WP2uvrA(pKM101)

\*\* : 用量は TA100 及び TA97: 1μg/plate、TA1535 及び TA98: 2μg/plate、

WPuvrA(pK101):25μg/plate



表 2

<試験 2>

薬物及び 濃度(μg/plate)		S9	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*	TA97	TA98	
対照(DMSO)	0	-	133	14	169	150	21	
検体	10	-	132	9	168	139	18	
	50	-	95	13	180	158	13	
	100	-	95	7	169	173	16	
	500	-	97	10	197	163	15	
	1000	-	119	7	187	167	20	
	2500	-	65	7	182	143	21	
	5000	-	58	8	159	103	18	
対照(DMSO)	0	+	139	15	158	148	25	
検体	10	+	149	13	190	155	31	
	50	+	110	9	188	157	25	
	100	+	120	10	178	157	21	
	500	+	99	11	175	155	23	
	1000	+	105	8	173	148	31	
	2500	+	95	9	162	150	22	
	5000	+	109	6	152	134	18	
陽性 対照	2AA	**	+	827	414	1562	710	1678
	2NF	25	-					1663
	NAAZ	2	-	504	607			
	ICR-191	2	-				2602	
	MMS	1000	-			2019		

表中の値は 3 枚の平均値

2AA : 2-アミノアントラセン

2NF : 2-ニトロフルオレン

NAAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : ICR-191 アクリジン

MMS : メチルメタンスルホネート

\* : WP2uvrA(pKM101)

\*\* : 用量は TA100 及び TA97: 1μg/plate、TA1535 及び TA98: 2μg/plate、

WPuvrA(pK101):25μg/plate

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

② 哺乳類細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験 (CHO/HGPRT試験)

(資料 毒性 - 32)

試験機関 :

報告書作成年 : [GLP 対応]

検体純度 :

試験方法 : チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-K1-BH4 細胞を用い、代謝活性化系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、HGPRT 座位における遺伝子突然変異を検定した。被験物質は DMSO に溶解させた。検体を 4 時間処理し、変異発現期間を経過した細胞  $2 \times 10^5$  個を 6-チオグアニン  $24 \mu\text{M}$  を含む培養液に再播種し突然変異試験用とした。同時に、100 細胞を再播種しコロニー形成率測定用とした。7~10 日間培養し細胞を固定後、ギムザ染色を施しコロニー数を計数した。なお、コロニー形成率測定には各群 6 枚、変異頻度測定には各群 24 枚のシャーレを用いた。

陽性対照物質として、非活性化では 5-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU)、代謝活性化では 20-メチルコラントレン (MCA) を用いた。

用量設定根拠 :

結果の判定 : 突然変異頻度が陰性対照と比較して条件付き二項検定 (Kastenbaum and Bowman の推計学的方法 : 有意水準  $p \leq 0.05$ ) で有意な増加を示し、濃度依存性がみられ、かつ、その頻度が  $15 \times 10^{-6}$  以上である場合に陽性と判定した。一方、生存率 10%以上のいずれの処理群においても、統計学的に有意な増加が認められない場合に陰性と判定した。

結果 : 試験結果を表 1~4 に示した。

非代謝活性化法、代謝活性化法とも高濃度において、相対生存率で無毒性~弱い細胞毒性作用が、相対増殖率で中等度~強い細胞毒性作用が観察された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

また、非代謝活性化法（確認試験）の 400 µg/mL、代謝活性化法（初回試験）の 300 µg/mL、同確認試験の 450 µg/mL ではいずれも 1 系列において突然変異頻度に統計学的に有意な増加がみられたが、 $15 \times 10^{-6}$  の頻度を超えることはなかった。他の処理群の突然変異頻度には統計学的に有意な増加はみられなかった。陽性対照の BrdU 及び MCA では突然変異頻度に明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本被験物質は当該試験条件下において、突然変異誘発性は陰性であると判断した。

表 1. 試験結果 (非代謝活性化系-初回試験)

発現期間: 7日間

被験物質	濃度 (µg/mL)	相対生存率 (%)	相対増殖率 (%)	総突然変異コロニー数[ディッシュ数]	絶対コロニー形成率 (%)	突然変異頻度 / 10 <sup>6</sup> 細胞 <sup>a</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	100.0	99.7	17 [22]	114.9	3.5
検体	75.0 <sup>#</sup>	100.1	95.7	0 [12]	105.5	0.0
	100 <sup>#</sup>	103.9	99.4	1 [11]	107.0	0.4
	150	96.6	78.8	5 [23]	130.2	0.9
	175	69.3	43.5	5 [22]	114.3	1.0
	200	57.5	24.3	9 [20]	101.0	2.4
	250	74.0	40.1	2 [17]	121.2	0.5
陽性対照 (BrdU <sup>b</sup> )	50	77.2	64.4	334 [20]	115.0	73.0**

a: 突然変異頻度 = 総突然変異コロニー数 / (ディッシュ数 × 2 × 10<sup>5</sup> × 絶対コロニー形成率)

b: BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine)

#: 雑菌汚染の為、1系列で評価した。

\*: p ≤ 0.05, Kastenbaum and Bowman 法、かつ、突然変異頻度 < 15 × 10<sup>6</sup>

\*\* : p ≤ 0.01, Kastenbaum and Bowman 法、かつ、突然変異頻度 ≥ 15 × 10<sup>6</sup>

コロニー形成率測定 (200細胞/プレート)、突然変異測定 (2 × 10<sup>5</sup>細胞/プレート)

表 2. 試験結果 (非代謝活性化系-確認試験)

発現期間: 7日間

被験物質	濃度 (µg/mL)	相対生存率 (%)	相対増殖率 (%)	総突然変異コロニー数[ディッシュ数]	絶対コロニー形成率 (%)	突然変異頻度 / 10 <sup>6</sup> 細胞 <sup>a</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	100.0	97.1	11 [24]	109.3	2.2
検体	200	103.5	32.0	8 [23]	94.1	1.7
	250	107.3	45.6	13 [24]	101.3	2.7
	300	104.5	37.2	6 [23]	80.0	1.9
	350	125.4	45.4	8 [24]	87.8	2.0
	400	117.7	38.9	18 [24]	101.0	3.6*
	450	113.6	28.9	18 [24]	102.2	3.6
陽性対照 (BrdU <sup>b</sup> )	50	99.7	52.8	280 [22]	111.3	57.1**

a: 突然変異頻度 = 総突然変異コロニー数 / (ディッシュ数 × 2 × 10<sup>5</sup> × 絶対コロニー形成率)

b: BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine)

\*: p ≤ 0.05, Kastenbaum and Bowman 法、かつ、突然変異頻度 < 15 × 10<sup>6</sup> (1系列のみ)

\*\* : p ≤ 0.01, Kastenbaum and Bowman 法、かつ、突然変異頻度 ≥ 15 × 10<sup>6</sup>

コロニー形成率測定 (200細胞/プレート)、突然変異測定 (2 × 10<sup>5</sup>細胞/プレート)

表 3. 試験結果 (代謝活性化系-初回試験)

発現期間 : 7日間

被験物質	濃度 (µg/mL)	相対生存率 (%)	相対増殖率 (%)	総突然変異コロニー数[ディッシュ数]	絶対コロニー形成率 (%)	突然変異頻度 / 10 <sup>6</sup> 細胞 <sup>a</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	100.0	99.1	16 [24]	87.4	3.8
検体	100	88.9	49.3	9 [24]	103.0	1.9
	150	62.7	39.5	14 [24]	100.7	3.0
	200	89.6	24.5	25 [24]	101.1	5.2
	250	88.7	14.1	24 [24]	107.6	4.7
	300	102.3	8.2	23 [24]	88.8	5.1*
	400	34.9	7.5	11 [24]	84.6	2.7
陽性対照 (MCA <sup>b</sup> )	5	81.4	85.8	326 [23]	89.4	79.7**

a: 突然変異頻度 = 総突然変異コロニー数 / (ディッシュ数 × 2 × 10<sup>5</sup> × 絶対コロニー形成率)

b: Methylcholanthrene

\* : p ≤ 0.05, Kastenbaum and Bowman 法、かつ、突然変異頻度 < 15 × 10<sup>6</sup> (1系列のみ)

\*\* : p ≤ 0.01, Kastenbaum and Bowman 法、かつ、突然変異頻度 ≥ 15 × 10<sup>6</sup>

コロニー形成率測定 (200細胞/プレート)、突然変異測定 (2 × 10<sup>5</sup>細胞/プレート)

表 4. 試験結果 (代謝活性化系-確認試験)

発現期間 : 7日間

被験物質	濃度 (µg/mL)	相対生存率 (%)	相対増殖率 (%)	総突然変異コロニー数[ディッシュ数]	絶対コロニー形成率 (%)	突然変異頻度 / 10 <sup>6</sup> 細胞 <sup>a</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	100.0	98.5	9 [24]	91.4	2.1
検体	300	99.3	22.7	9 [24]	93.0	2.0
	400	91.0	24.8	5 [24]	87.7	1.2
	450	76.4	17.2	24 [23]	92.8	5.8*
	500	69.0	20.0	12 [24]	92.0	2.7
	600	78.4	9.0	5 [23]	92.2	1.2
陽性対照 (MCA <sup>b</sup> )	5	111.7	73.9	475 [24]	91.8	107.8**

a: 突然変異頻度 = 総突然変異コロニー数 / (ディッシュ数 × 2 × 10<sup>5</sup> × 絶対コロニー形成率)

b: Methylcholanthrene

\* : p ≤ 0.05, Kastenbaum and Bowman 法、かつ、突然変異頻度 < 15 × 10<sup>6</sup> (1系列のみ)

\*\* : p ≤ 0.01, Kastenbaum and Bowman 法、かつ、突然変異頻度 ≥ 15 × 10<sup>6</sup>

コロニー形成率測定 (200細胞/プレート)、突然変異測定 (2 × 10<sup>5</sup>細胞/プレート)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

(2) 染色体異常誘発性

① ヒト培養リンパ球を用いた染色体異常試験

(資料 毒性-25)

試験機関：

報告書作成年： [GLP 対応]

検体純度：

試験方法： ヒト末梢血リンパ細胞(HPBL)に検体を代謝活性化系 (S9) の存在及び非存在下で処理し、有糸分裂中期像を観察することにより *in vitro* における染色体異常誘発性を検定した。

①細胞毒性試験；培養開始 48 時間後に検体を含む培地に細胞を移し、代謝活性化系の存在及び非存在下で細胞を検体に暴露した。培養は 37°C の条件下で 3 時間行った。その後、BrdU を含む培地でさらに約 23 時間培養し、培養終了 2 時間前にコルセミドを加えて、細胞を分裂中期に同調させた。細胞周期の遅延を評価し、その結果に基づき染色体異常試験の濃度及び細胞回収時間を設定した。

②染色体異常試験；細胞毒性試験と同様の方法で 2 回行った。ただし、BrdU を培地に添加せず、細胞回収時間を適宜調整した。陽性対照として代謝活性化系非存在下ではマイトマイシン C (MMC) を、代謝活性化系存在下ではシクロホスファミド (CP) を用いた。細胞 100 個 (50 個 2 反復) の分裂中期像について、構造的染色体異常を評価した。また細胞 1000 個当たりの有糸分裂指数(MI)も測定した。

用量設定根拠；

細胞回収時間設定根拠；

細胞毒性試験において、代謝活性化系非存在下では濃度に関連した平均世代時間(AGT)の増加が認められた (表 1)。陰性対照で 15 時間であったのに対し、30µg/mL では 23 時間であった。代謝活性化系存在下では、濃度に関連した AGT の増加は認められなかった。1 回目の染色体異常試験における細胞回収時間は、本検体を用いて 1993 年に行った試験の結果に基づいて設定した。0 及び陽性対照については回収時間を処理後 18 時間とし、その他の濃度については処理後 21 時間とした。2 回目の試験での回収時間は 1 回目の染色体異常試験と並行して行われた細胞毒性試験の結果に基づき、0 及び 10µg/mL の回収時間を処理後 19 時間、15µg/mL 以上では処理後 23 時間とした。代謝活性化系存在下の 2 回目の試験では、いずれの濃度も処理後

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

19時間のみとした。

試験結果： 結果を表2-1、2及び表3-1、2に示す。

代謝活性化系非存在下では、2回の試験で異常を有する細胞の割合に統計学的有意な増加が認められた。1回目の試験では20及び25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、また2回目の試験では15、20及び25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で統計学的有意な増加が認められた。さらに、代謝活性化系非存在下では、2回の試験とも異常を有する細胞の割合に濃度に関連した有意な増加が認められた。代謝活性化系の存在下では、2回の試験ともいずれの濃度においても異常を有する細胞の割合に統計学的有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、検体はS9代謝活性化系の非存在下でヒトリンパ球細胞において構造的染色体異常を示した。従って、本試験条件下で検体は陽性であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

表 1 細胞毒性試験

薬剤及び濃度(μg/mL)		S9	AGT (時間)	有糸分裂指数
対照		-	15.4	7.8
検体	10	-	—	—
	15	-	18.4	3.6
	20	-	20.1	3.3
	25	-	22.1	2.4
	30	-	22.8	1.1
MMC	0.35	-	—	—
対照		+	16.0	8.4
検体	15	+	—	—
	20	+	—	—
	25	+	15.5	6.6
	30	+	15.7	8.9
CP	10	+	—	—

\* : Fisher の直接確率法(p<0.05)

対照 : DMSO

MMC : マイトマイシン C (陽性対照)

CP : シクロホスファミド (陽性対照)

有糸分裂指数 : 1000 細胞当りの有糸分裂数



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

表 2-1 染色体異常試験 (試験 1)

薬剤及び濃度(μg/mL)	S9	回収時間	細胞当たり平均異常数	異常細胞 (%)	>1 の異常を有する細胞 (%)	有糸分裂指数 <sup>4</sup>	
対照 <sup>1</sup>	-	18	0.05	5.0	6.2	6.2	
検体	10	-	21	0.07	4.0	5.8	
	15	-	21	0.07	6.0	3.3	
	20	-	21	0.16	14.0*	1.4	
	25	-	21	0.25	18.0*	1.4	
MMC <sup>2</sup>	0.35	-	18	0.61	43.0*	4.0	
12.0*							
対照 <sup>1</sup>	+	18	0.03	3.0	0.0	6.2	
検体	15	+	21	0.01	1.0	0.0	5.0
	20	+	21	0.04	4.0	0.0	5.2
	25	+	21	0.01	1.0	0.0	4.2
	30	+	21	0.02	2.0	0.0	5.2
CP <sup>3</sup>	10	+	18	0.50	37.0*	9.0*	1.2

\* : Fisher の直接確率法(p<0.05)

対照<sup>1</sup> : DMSO

MMC<sup>2</sup> : マイトマイシン C (陽性対照)

CP<sup>3</sup> : シクロホスファミド (陽性対照)

有糸分裂指数<sup>4</sup> : 1000 細胞当りの有糸分裂数

表 2-2 染色体異常試験 (試験 1)

薬剤 (g/mL)	S9	キヤップ		染色体分体						染色体						計	MI (%)			
				断裂			交換			断裂			交換					その他		
				tb	ib	f	tr	qr	int	af	dm	r	t	d	10			pu	pc	
対照 <sup>1</sup>	-	2	1	2	1							2							5	6.2
検体	10	-	6	1	6		1												4	5.9
	15	-	3	0	3	1	1		1			1							6	3.3
	20	-	5		12			1	1			1	1						14	1.4
	25	-	25	4	19	1	1	2	4			2							18	1.5
MMC <sup>0.35</sup>	-	25	9	42	2		12	4			0	1							43	4.0
対照 <sup>1</sup>	+	1		3															3	6.3
検体	15	+	5		1														1	5.0
	20	+	2		2	1					1								4	5.3
	25	+	4	1	1														1	4.3
	30	+	1			1											1		2	5.2
CP <sup>10</sup>	+	31	8	37	4		3	4	1	1									37	1.2

対照<sup>1</sup> : DMSO

tg:染色体キヤップ

ig:同位染色体キヤップ

tb:染色体断裂

ib:同位染色体断裂

f:フラグメント

tr:3 放射

qr:4 放射

int:内部変化

af:無動原体フラグメント

dm:二重微小染色体

r:環化

t:転座

d:二動原体

10:10 以上の異常

pu:微細染色体

pc:微細細胞

MI:有糸分裂指数

計 : 1 以上の異常を有した細胞数

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

表 3-1 染色体異常試験 (試験 2)

薬剤及び濃度(μg/mL)		S9	回収時間	細胞当たり平均異常数	異常細胞 (%)	>1の異常を有する細胞 (%)	有糸分裂指数 <sup>4</sup>
対照 <sup>1</sup>		-	19	0.04	3.0	1.0	9.1
検体	10	-	19	0.09	9.0	0.0	7.0
	15	-	23	0.20	15.0*	4.0	5.6
	20	-	23	0.17	14.0*	2.0	4.4
	25	-	23	0.13	12.0*	1.0	2.6
MMC <sup>2</sup>	0.35	-	19	0.52	42.0*	9.0*	6.9
対照 <sup>1</sup>		+	19	0.05	3.0	1.0	10.4
検体	15	+	19	0.02	2.0	0.0	9.3
	20	+	19	0.00	0.0	0.0	9.1
	25	+	19	0.04	4.0	0.0	7.4
	30	+	19	0.04	4.0	0.0	6.7
CP <sup>3</sup>	10	+	19	0.64	39.0*	12.0*	5.8

\* : Fisher の直接確率法(p<0.05)

対照<sup>1</sup> : DMSO

MMC<sup>2</sup> : マイトマイシン C (陽性対照)

CP<sup>3</sup> : シクロホスファミド (陽性対照)

有糸分裂指数<sup>4</sup> : 1000 細胞当りの有糸分裂数

表 3-2 染色体異常試験 (試験 2)

薬剤 (g/mL)	S9	ギャップ		染色体分体						染色体						計	MI (%)			
				断裂			交換			断裂			交換					その他		
				tg	ig	tb	ib	f	tr	qr	int	af	dm	r	t			d	10	pu
対照 <sup>1</sup>	-	5	0	1														3	9.1	
検体	10	-	7	1	5					1									9	7.1
	15	-	12		13		1			4				1				1	15	6.6
	20	-	22	6	12	2	1	1									1		14	4.4
	25	-	12	3	8		1			2						2			12	2.6
MMC <sup>2</sup> 0.35	-	25	9	25	3	3	7	6		7			1						42	6.9
対照 <sup>1</sup>	+			3			1	1											3	10.4
検体	15	+	1		2														2	9.3
	20	+	1																	9.1
	25	+			2					1	1								4	7.4
	30	+	4	1	3					1									4	6.7
CP <sup>3</sup> 10	+	17	6	28	2	1	8	6	2	6				1	1				39	6.6

対照<sup>1</sup> : DMSO

tg:染色体分体ギャップ

ig:同位染色体分体ギャップ

tb:染色体分体断裂

ib:同位染色体断裂

f:フラグメント

tr:3 放射

qr:4 放射

int:内部変化

af:無動原体フラグメント

dm:二重微小染色体

r:環化

t:転座

d:二動原体

10:10以上の異常

pu:微細染色体

pc:微細細胞

MI:有糸分裂指数

計 : 1以上の異常を有した細胞数

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

② マウス骨髄を用いた小核試験

(資料 毒性-26)

試験実施機関：

報告書作成年： [GLP 対応]

検体純度：

供試動物： Crl:CD-1系マウス（48日齢）、高用量群は1群雌雄各6匹、その他の群は1群雌雄各5匹

試験方法： 検体をコーンオイルに懸濁させ、マウスに0, 1250, 2500及び5000mg/kgを単回強制経口投与した。陽性対照にはシクロホスファミドを用い、40mg/kgの割合で腹腔内投与した。また、対照群は溶媒であるコーンオイルを経口投与した。投与後24、48及び72時間後に屠殺し（中用量群及び低用量群は24時間後のみ）、大腿骨を摘出し骨髄塗沫標本を作成した。骨髄塗沫標本はアクリジンオレンジ染色を施し、蛍光顕微鏡を用いて検鏡した。1動物当たり2000個の多染性赤血球について、小核の有無を検査した。また、全赤血球中の多染性赤血球の割合についても調べた。

用量設定根拠：

結果： 結果は次頁に示す。

いずれの検体投与群でも、小核を有する多染性赤血球の有意な増加はみられなかった。また、検体投与群で多染性赤血球の減少はみられなかった。一方、陽性対照として用いたシクロホスファミドを投与した群では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度の有意な増加がみられた。

以上の結果より、本試験条件下で検体は変異誘発性を有さないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

投与後 屠殺までの時間 (時間)	群 (mg/kg)	性別	動物数	平均 MNPCE <sup>2</sup> 出現率(%)	平均 PCE/NCE <sup>4</sup> 比
24	0	雄	5	0.14	0.95
		雌	5	0.13	0.98
	1250	雄	5	0.11	1.02
		雌	5	0.11	1.62
	2500	雄	5	0.10	0.95
		雌	5	0.10	1.21
5000	雄	6	0.07	1.04	
	雌	6	0.21	1.09	
48	0	雄	5	0.09	0.92
		雌	5	0.11	1.18
	5000	雄	6	0.07	0.98
		雌	6	0.14	1.08
72	0	雄	5	0.10	1.02
		雌	5	0.10	1.70
	5000	雄	6	0.11	1.54
		雌	6	0.08	1.23
24	陽性対照 <sup>1</sup> (40mg/kg)	雄	5	1.07*	1.06
		雌	5	1.33*	1.16

\* : p<0.05 ; 分散分析

陽性対照<sup>1</sup> : シクロホスファミド

PCE<sup>3</sup> : 多染性赤血球

MNPCE<sup>2</sup> : 小核を有する多染性赤血球

NCE<sup>4</sup> : 正染性赤血球

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

(3) DNA損傷誘発性

① 初代培養ラット肝細胞を用いた*in vitro* 不定期DNA合成試験

(資料 毒性-27)

試験実施機関：

報告書作成年： [GLP 対応]

検体純度：

供試動物： Crl:CD@BR 系雄ラット (7~8 週齢)、体重範囲 260~279.4g

試験方法： 初代培養ラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験を行い、検体の DNA 損傷誘発性を調べた。

若齢成熟雄ラット肝臓より調製した初代培養肝細胞をチャンバースライド上で培養した。細胞の生存率はトリパンブルー染色により測定した。チャンバースライドは各処理濃度当り 6 枚準備し、4 枚を UDS 評価に、残りの 2 枚を細胞毒性を調べるための乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性測定に用いた。試験は独立した 2 回の試験を行った。検体の処理は、検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、3H-チミジンを加えた培地中に所定の濃度になるように添加し、19 時間培養することにより行った。検体の処理濃度は 1 回目の試験では、0、0.05、0.1、0.5、1.5 及び 10µg/mL とし、2 回目の試験では 1 回目の試験濃度に 7.5µg/mL を追加した濃度とした。陰性対照として使用溶媒の DMSO を、また陽性対照として 2-アセチルアミノフルオレン

(2-AAF) を用いた。培養後、UDS の評価用スライドは、エタノール：氷酢酸(3:1)で固定し、オートラジオグラフィ用乳液に浸漬・乾燥した後で、-20℃で 4~5 日間感光させ、現像した。UDS の評価は、2 枚のスライドについて、スライド当り 25 個の細胞を顕微鏡下で観察し、核上及び細胞質上の銀粒子数を計数した。核上の銀粒子数から細胞質上の銀粒子数を差し引き、正味核上銀粒子数(NNG)を算出して、UDS 誘導の判定に用いた。細胞毒性は薬剤処理後の培地中の LDH 活性を測定し、活性が増加した場合細胞毒性が生じたと判断した。

処理量設定根拠；

結果： 次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

薬 剤	用量群 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	試験 1		試験 2	
		平均 NNG <sup>1</sup>	LDH <sup>2</sup> 活性	平均 NNG <sup>1</sup>	LDH <sup>2</sup> 活性
DMSO	0	-2.8	252	-3.8	2000
検体	0.05	-5.0	251	-3.0	1400
	0.1	-5.7	210	-4.6	1380
	0.5	-4.2	203	-3.4	1540
	1	-2.5	274	-3.9	1330
	5	-1.1	285	-2.5	1450
	7.5	NT <sup>4</sup>	NT	-2.9	1170
	10	- <sup>5</sup>	621	- <sup>5</sup>	1670
陽性対照 2-AAF <sup>3</sup>	0.02	10.2	256	7.4	1610
	0.2	18.4	271	21.1	1860

NNG<sup>1</sup> : 正味細胞核上粒子数 (=細胞核上の銀粒子数 - 細胞質内の銀粒子数)

LDH<sup>2</sup> : 乳酸脱水素酵素活性

2-AAF<sup>3</sup> : 2-アセチルアミノフルオレン

NT<sup>4</sup> : 実施せず

-<sup>5</sup> : 細胞毒性のため評価せず

調製した肝細胞の生存率は、1回目 97.6%、2回目 95.8%であった。

1及び2回目のいずれの試験でも、検体処理細胞にUDSの誘導は認められなかった。一方、陽性対照である2-AAFを処理した細胞では明らかなUDS誘導が認められた。

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  処理群では、1回目の試験でLDH活性の増加がみられ、また1及び2回目の試験のいずれでも細胞質内及び核上に銀粒子が認められない細胞が観察された細胞毒性が生じたため、UDSの評価ができなかった。

以上の結果より、本試験条件下で検体はDNA損傷誘発性を有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

② 初代培養ラット肝細胞を用いた*in vitro* 不定期DNA合成試験

(資料 毒-36)

試験実施機関：

報告書作成年： [GLP 対応]

検体純度：

供試動物： Crl:CD®(SB)BR 系雄ラット (成獣)、体重範囲 160.1~286.0 g

試験方法： 初代培養ラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験を行い、検体の DNA 損傷誘発性を検定した。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、0.025~1000 µg/mL の範囲で 4 回の試験を行った。UDS 評価には、各試験とも同時に行った細胞毒性試験の結果に基づいて 6 濃度を選択した。  
標準手法により単離したラット肝細胞を、<sup>3</sup>H-チミジン及び検体を添加した培地で約 19 時間培養した。培養には各群 5 枚の培養皿を用い、3 枚を UDS 評価用、2 枚を細胞毒性評価用とした。検体処理後、UDS 評価用の培養について、非標識チミジンを添加した培地に交換してさらに 30 分間培養した。培養後、細胞をエタノール酢酸溶液で固定し、オートラジオグラフィ用スライドを作製した。スライド当たり 50 細胞を顕微鏡下で観察し、核上銀粒子数及びその核に隣接する 3 領域 (核と同面積) の細胞質上銀粒子数を計数した。核上銀粒子数から 3 領域の平均細胞質上銀粒子数を差し引き、正味核上銀粒子数 (NNG) を算出した。細胞毒性評価用の培養については、検体処理後新たな培地に交換してさらに約 2~4 時間 (申請者計算) 培養した。培養後、トリパンブルー染色法により細胞の生存数を測定し、溶媒対照に対する生存率を求めた。  
結果の判定は、溶媒対照群と比較し群平均 NNG が 5 個以上増加した場合及び/又は 5 個以上の NNG を有する細胞の平均出現率が 10%以上上昇した場合を陽性とした。溶媒対照には DMSO、陽性対照には 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) を用いた。

処理量設定根拠；

結果： 1 回目試験では、1000 及び 500 µg/mL で析出が認められ、5 µg/mL 以上の濃度で中等度以上の細胞毒性が認められた。背景 (細胞質上) の銀粒子が過剰であり UDS 評価ができなかったが、細胞毒性の結果を 2 回目試験の処理量設定に用いた。  
2 回目試験では、2.5 µg/mL 以上で細胞毒性が認められた。従って、UDS 評価は 0.1~5 µg/mL の濃度範囲 (生存率 49.6~15.5%) について行った。  
3 回目試験 (申請者注：処理量、毒性等は不明) では、陽性対照の反応が弱く試験の許容基準を満たさなかった。  
4 回目試験では、5 µg/mL 以上で細胞毒性が認められた。従って、UDS 評価は 0.1~5 µg/mL の濃度範囲 (生存率 80.0~111.6%) について行った。

2 回目試験及び 4 回目試験の結果を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

(数値は平均値)

薬剤	用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	2回目試験			4回目試験		
		平均 NNG <sup>a</sup>	$\geq 5\text{NNG}$ を 有する細胞 出現率(%) <sup>b</sup>	細胞 生存率 <sup>c</sup>	平均 NNG <sup>a</sup>	$\geq 5\text{NNG}$ を 有する細胞 出現率(%) <sup>b</sup>	細胞 生存率 <sup>c</sup>
溶媒 (DMSO)	1.00	-1.89	8.67	100.0	-2.85	3.33	100.0
検体	0.100	-0.61	8.00	115.5	-2.91	2.00	100.0
	0.250	-1.47	8.67	108.2	-2.39	0.00	106.7
	0.500	-1.44	9.33	94.8	-1.99	1.33	105.7
	1.00	-1.31	10.67	94.1	-2.67	0.67	111.6
	2.50	-1.00	13.33	70.0	-2.73	2.00	103.3
	5.00	-0.50	9.33	49.6	-2.73	0.00	80.0
2-AAF	0.100	13.83	92.67	105.2	15.89	95.33	118.7

陽性対照：2-AAF：2-アセチルアミノフルオレン

NNG：正味核上銀粒子数=核上銀粒子数-3領域の細胞質上平均銀粒子数

<sup>a</sup>：3スライドについての平均 NNG

<sup>b</sup>：3スライドについて、5個以上の NNG を有する細胞の平均出現率

<sup>c</sup>：2スライドについて、検体処理後の溶媒対照に対する平均細胞生存率

UDS 評価を行った 2 試験では、いずれの濃度においても対照群と比し平均 NNG または 5 個以上の NNG を有する細胞の出現率に上昇は認められなかった。一方陽性対照として用いた 2-AAF では、平均 NNG または 5 個以上の NNG を有する細胞の出現率のいずれにも明らかな上昇が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において検体は不定期 DNA 合成を誘発せず、DNA 損傷誘発性を有しないと判断される。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

③ 培養ラット肝細胞を用いた *in vivo/in vitro* 不定期DNA合成試験

(資料 毒-37)

試験実施機関：

報告書作成年： [GLP対応]

検体純度：

供試動物： Crl:CD®BR系雄ラット、6~7週齢、1群雄5匹

試験開始時体重 177~247g

試験方法： 検体を強制経口投与したラットの培養肝細胞を用い、*in vivo-in vitro* 不定期DNA合成 (UDS) 試験により検体の遺伝子DNA損傷誘発性を検定した。

検体をコーンオイルに懸濁して 800 及び 2000 mg/kg の用量で、雄ラットに単回強制経口投与した。投与の 2~4 時間及び 14~16 時間後に肝臓を露出させ、生体内でコラゲナーゼ灌流した後、標準手法により肝細胞を単離した。細胞の生存率は、単離後の肝細胞の一部を用いてトリパンブルー染色により測定した。肝細胞の単離は、各群 3 匹の動物からとし、動物当たり 6 枚のカバーガラス上で細胞を培養した。細胞をカバーガラスに付着させた後、<sup>3</sup>H-チミジンを添加した培地に交換して 4 時間培養した。その後、新たに非標識チミジンを添加した培地に交換してさらに一夜培養した。培養後、細胞をエタノール-氷酢酸溶液で固定し、動物当たり 3 枚のオートラジオグラフィー標本作製した。UDS の評価は、各動物 2 枚のスライドを用いて顕微鏡下でスライド当たり 50 細胞を観察し (計 100 細胞)、核上銀粒子数及び核に隣接する 3 領域の細胞質上銀粒子数を計数した。核上銀粒子数から 3 領域の平均細胞質上銀粒子数を差し引いて正味核上銀粒子数 (NNG) を算出した。

結果の判定は背景対照データに基づき、群平均 NNG が 0 を越え、かつ修復中 (5 個以上の NNG を有する) の細胞の平均出現率が 20% 以上の場合を陽性とした。

溶媒対照には溶媒のみ、2~4 時間及び 14~16 時間処理の陽性対照にはそれぞれジメチルニトロソアミン (DMN) 及び 2-アセトアミドフルオレン (2-AAF) を用いた。

用量設定根拠；

結果： 試験結果を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

(数値は群平均)

処理時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	動物数	観察細胞数 /動物	平均NNG <sup>a</sup>	修復中細胞 (NNG $\geq$ 5) の平均出現率(%) <sup>b</sup>
2~4	溶媒対照	0	3	100	-1.3	0.7
	検 体	800	3	100	-1.9	-
		2000	3	100	-1.7	-
	DMN	10	3	100	8.6	77.3
14~16	溶媒対照	0	3	100	-2.0	-
	検 体	800	3	100	-1.9	-
		2000	3	100	-2.7	0.3
	2AAF	75	3	100	11.7	91.0

-: 修復中細胞の正味銀粒子数が0であるため算出せず<sup>a</sup>

溶媒対照: コーンオイル

陽性対照: DMN: ジメチルニトロソアミン

2AAF: 2-アセトアミドフルオレン

<sup>a</sup>: NNG: 正味核上銀粒子数=核上銀粒子数-3領域の平均細胞質上銀粒子数

<sup>b</sup>: 5個以上の正味核上銀粒子数を有する細胞の平均出現率

検体処理群では、いずれの用量及び処理時間においても群平均 NNG 及び修復中細胞の平均出現率に上昇は認められなかった。

一方、陽性対照に用いた DMN 及び 2AAF では、いずれも群平均 NNG 及び修復中細胞の平均出現率に明らかな上昇が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において検体は不定期 DNA 合成を誘発せず、DNA 損傷誘発性を有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

## 10. 生体機能影響

ファモキサドンにおける薬理試験

(資料 毒性-28)

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

### 1. 投与量設定試験

### 2. 中枢神経系に対する作用

#### ① 一般状態観察

供試動物； Crj:CD-1(ICR)系マウス 5 週齢、体重範囲； 30.4～33.9 g、1 群雄 3 匹

試験方法； 検体を上記と同様に懸濁させ、溶媒対照(0)、500、1500 及び 5000 mg/kg を経口投与した。一般状態を経口投与 1、2、4、6 及び 8 時間後に、Irwin の多次元観察法に準じて観察した。

試験結果； 500 mg/kg 投与の 2～6 時間後に軽度な軟便が 3 例中 2 例に認められた。1500 mg/kg では投与 4 及び 6 時間後に軽度な軟便が 1 または 2 例に認められたが、5000 mg/kg では認められなかった。軟便以外の一般状態の変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

② 睡眠時間に対する作用

供試動物; Crj:CD-1(ICR)系マウス、5週齢、体重範囲:29.0~33.8 g、1群雄8匹

試験方法; 検体を上記と同様に懸濁させ、溶媒対照(0)、500、1500及び5000 mg/kgを経口投与した。経口投与2時間後に、ヘキソバルビタール80mg/kgを腹腔内投与した。ヘキソバルビタール投与後、正向反射が消失した動物を約37℃の温水マット上におき、正向反射の消失している時間を測定した。

試験結果; いずれの用量でもヘキソバルビタール睡眠に対し、有意な影響を及ぼさなかった。

③ 痙攣誘発作用 (電撃痙攣に対する作用)

供試動物; Crj:CD-1(ICR)系マウス、5週齢、体重範囲:28.2~34.2 g、1群雄10匹

試験方法; 検体を上記と同様に懸濁させ、溶媒対照(0)、500、1500及び5000 mg/kgを経口投与した。経口投与2時間後に電撃痙攣装置を用いて、角膜に正常動物の痙攣誘発閾値よりやや低い電気刺激を与え、強直性屈曲、強直性伸展及び間代性の各痙攣及び昏睡の発現の有無を観察した。陽性対照群には電気刺激を与える15分前にペンチレンテトラゾール40 mg/kgを皮下投与した。

試験結果; 5000 mg/kgで10例中1例に強直性屈曲痙攣のみが認められた以外の作用は認められなかった。一方、ペンチレンテトラゾール40mg/kgでは10例中8または9例において各痙攣ならびに昏睡が観察され、いずれの作用にも有意差が認められた。

④ 正常体温に対する作用

供試動物; Crj:Wistar系ラット、5週齢、体重範囲:167.3~197.8 g、1群雄6匹

試験方法; 検体を上記と同様に懸濁させ、溶媒対照(0)、500、1500及び5000 mg/kgを経口投与した。投与前及び経口投与1、2及び4時間後に、デジタル電子体温計のセンサーを直腸内へ挿入して直腸温を測定した。

試験結果; いずれの用量においても正常体温に対し有意な影響を及ぼさなかった。

3. 循環器系に対する作用 (無麻酔ラットの血圧及び心拍数に対する作用)

供試動物; Crj:Wistar系ラット、7週齢、体重範囲:256.6~281.3g、1群雄6匹

試験方法; 検体を上記と同様に懸濁させ、溶媒対照(0)、500、1500及び5000 mg/kgを経口投与した。投与前及び経口投与1、2及び4時間後にラット尾動脈圧測定装置を用いて収縮期血圧及び心拍数をそれぞれ測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

試験結果; いずれの用量でも収縮期血圧及び心拍数に影響を及ぼさなかった。

#### 4. 自律神経系に対する作用 (瞳孔径に対する作用)

供試動物; Crj:Wistar系ラット、5週齢、体重範囲:171.4~201.3 g、1群雄6匹

試験方法; 検体を上記と同様に懸濁させ、溶媒対照(0)、500、1500及び5000 mg/kgを経口投与した。投与前及び経口投与1、2及び4時間後に実体顕微鏡を用いて瞳孔径を測定した。

試験結果; いずれの用量においても瞳孔径に影響を及ぼさなかった。

#### 5. 消化器系に対する作用 (マウス腸管輸送能に対する作用)

供試動物; Crj:CD-1(ICR)系マウス、5週齢、体重範囲:25.5~28.6 g、1群雄8匹

試験方法; 検体を上記と同様に懸濁させ、溶媒対照(0)、500、1500及び5000 mg/kgを一晩絶食したマウスに経口投与した。投与2時間後にアラビアゴムの5%溶液に懸濁させた5%炭末液を0.2mL/匹経口投与し、その30分後に胃腸管を摘出し、十二指腸起始部から炭末到達先端までの長さを測定して、小腸全長に対する炭末最先進部の移行率(%)をもって腸管輸送能とした。

試験結果; いずれの用量でも腸管輸送能に有意な影響を及ぼさなかった。

#### 6. 骨格筋に対する作用 (懸垂動作試験)

供試動物; Crj:CD-1(ICR)系マウス、5週齢、体重範囲:27.2~33.9 g、1群雄8匹

試験方法; 検体を上記と同様に懸濁させ、溶媒対照(0)、500、1500及び5000mg/kgを経口投与した。水平に張り渡した針金にマウスの前肢をかけさせ、5秒以内に後肢を針金にかけられるものを選び試験に供した。懸垂動作は経口投与1、2及び4時間後に測定した。10秒以内に後肢を針金にかけられない場合を陽性とした。

試験結果; いずれの用量でも懸垂動作に影響を及ぼさなかった。

#### 7. 血液に対する作用 (血液凝固に対する作用)

供試動物; Crj:Wistar系ラット、5週齢、体重範囲:140.4~160.0 g、1群雄6匹

試験方法; 検体を上記と同様に懸濁させ、溶媒対照(0)、500、1500及び5000 mg/kgを経口投与した。経口投与2時間後に採血し、遠心して血漿を得た。この血漿にトロンボプラスチンCを添加してプロトロンビン時間を、またパトロンチン及び塩化カルシウムを添加して活性化部分トロンボプラスチン時間を血液凝固自動測定装置を用いて測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

試験結果; いずれの用量でも血液凝固系に影響を及ぼさなかった。

以上の結果より、ファモキサドンは 5000 mg/kg の高用量においても生体機能に対する明らかな作用を有さず、薬理活性の極めて弱い物質である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

「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*1 (試験動物)	投与経路 (溶媒)*2	投与量 (mg/kg)	数/群	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要
1.中枢神経系 ①一般状態 [Irwin法] (マウス)	経口投与 (コーン油 +アセトン)	500, 1500, 5000	3	5000	>5000	軽度な軟便が 500 及び 1500 mg/kg 群 で 1~2 例認められ たが被験物質の作 用とは考えられな かった。
②睡眠時間 (マウス)	経口投与 (コーン油 +アセトン)	500, 1500, 5000	8	5000	>5000	影響なし
③痙攣誘発 [電撃刺激] (マウス)	経口投与 (コーン油 +アセトン)	500, 1500, 5000	10	5000	>5000	影響なし
④正常体温 (ラット)	経口投与 (コーン油 +アセトン)	500, 1500, 5000	6	5000	>5000	影響なし
2.循環器系 [血圧,心拍数] (ラット)	経口投与 (コーン油 +アセトン)	500, 1500, 5000	6	5000	>5000	影響なし
3.自律神経系 [瞳孔径] (ラット)	経口投与 (コーン油 +アセトン)	500, 1500, 5000	6	5000	>5000	影響なし
4.消化器系 [炭末輸送] (マウス)	経口投与 (コーン油 +アセトン)	500, 1500, 5000	8	5000	>5000	影響なし
5.骨格筋系 [懸垂動作] (マウス)	経口投与 (コーン油 +アセトン)	500, 1500, 5000	8	5000	>5000	影響なし
6.血液 [血液凝固] (ラット)	経口投与 (コーン油 +アセトン)	500, 1500, 5000	6	5000	>5000	影響なし

\*1: 試験はすべて無麻酔下で実施

\*2: 溶媒: コーン油とアセトン (85:15) の混合物

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

## 11. その他

(1) ラットを用いた飼料混入投与による 28 日間反復経口免疫毒性試験

(資料 毒性-33)



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。




本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。


本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

(2) マウスを用いた飼料混入投与による 28 日間反復経口免疫毒性試験

(資料 毒性-34)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。




本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。

(3) 雌ラットを用いた赤血球量に及ぼす影響の回復性試験

(資料 毒性-35)



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。


本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。




本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社にある。