

10. 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

(1) ME P 原体のラットを用いた繁殖毒性試験

(資料 10-1)

試験機関: Hazleton Laboratories America Inc.

報告書作成年: 1980 年

検 体: ME P 原体

検体純度:

供試動物: Sprague-Dawley 系雌雄ラット、投与開始時体重; 雄 204~258 g、雌 148~192 g

動物数; P1 世代の F1A 児離乳までは 1 群雄 15 匹、雌 30 匹 (対照群のみ雄 20

匹、雌 40 匹)、P1 世代の 2 回目交配以降は 1 群雄 10 匹、雌 20 匹

試験期間: 1972 年 1 月 4 日 第 1 世代 (P1) 投与開始

1973 年 8 月 13 日 第 3 世代の第 2 回目の同腹児 (F3B) の離乳

投与期間: 第 1 (P1) 世代; 交配の 9 週間前から F1B 児離乳時まで

第 2 (P2) 世代; 離乳時から F2B 児離乳時まで

第 3 (P3) 世代; 離乳時から F3B 児離乳時まで

投与方法: 検体を、最初の親世代 (P1) の F1A 児離乳終了までは 0、10、30 及び 150 ppm

の濃度で、以降は 0、10、30 及び 100 ppm の濃度で基礎飼料に混入し、自由に摂

取させた。飼料は毎週新たに調製した。

交配・調整・選抜及び観察・検査項目: 概要を表 1 にまとめた。

体重・飼料摂取量・一般状態及び行動観察; すべての親動物について、試験開始時、4 週目及び 9 週目に測定・記録した。

交配、分娩及び哺育; 各世代とも 9 週間投与した後、同じ群の雄動物 1 匹と雌動物 2 匹ずつを同居させた。3 週間の交配期間中、雄動物は 1 週間毎に雌動物の間をローテーションさせた。交尾成立後、すべての動物を個別別ケージに戻した。出生 24 時間後に間引きを行い、母動物 1 匹当たり最高 8 匹の児動物が哺育されるようにした。児動物すべてについて肉眼的に異常徴候の有無を観察した。離乳後、親動物は再度繁殖させ、第 2 回目の同腹児群を産ませた。諸記録はすべて第 1 回目と同じように行った。離乳時に F1B および F2B 児動物から各群について雄 10 匹と雌 20 匹を無作為に選抜し、次世代の親動物 (P2 および P3) とした。第 2 回目の同腹児群の離乳後に親動物を屠殺廃棄した。

繁殖性に関する指標; 次の指標について観察または算出した。

交尾動物数、産児数、生存児数、死産児数、死亡児数、離乳児数

受胎率 = (妊娠雌動物数 / 交尾成立雌動物数) × 100

出産率 = (生存児動物を出産した雌動物数 / 妊娠雌動物数) × 100

出生児生存率 = (出産時生存児数 / 産児数) × 100

哺育率 = (離乳児数 / 生後 24 時間の間引き後の生存児数) × 100

出生 24 時間後と離乳時の児動物体重

病理学的検査； F1B および F2B 児動物、F2A および F3A 児動物の 1/3、ならびに F3B 児動物の 1/2 については、離乳後に剖検を行った。また、試験終了時に、各群の F3B 児動物雌雄各 10 匹について放血致死後剖検し、脳、下垂体、眼、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胃、膵臓、小腸、大腸、膀胱、生殖腺、骨、骨髄および異常病変部位を 10% 中性緩衝ホルマリン中に保存した。このうち対照群及び高用量群の雌雄各 5 匹の甲状腺、肝臓、腎臓、胃及び小腸について病理組織学的検査を行った。

表 1 試験の概要

世代	期間 (週間)	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P1	生育(9週)		症状観察(投与0、3、9週目) 体重、摂餌量測定(投与0、3、9週目)
	1回目交配(3週) 妊娠(3週)	雌2対雄1で交配。	交尾成立動物数を記録、受胎率を算出
	出産		産児数(生存及び死亡)を記録、出産率算出
	哺育	生後24時間に各同腹児を最高8匹に調整	児動物;死亡及び異常を観察 体重測定(生後24時間、離乳時) 出生児生存率、哺育率を算出
	離乳	慢性毒性試験に供する動物を選抜 (1回目交配に準ずる)	F1A児の屠殺・廃棄
	2回目交配(3週) 妊娠(3週)		(1回目交配に準ずる)
P2	出産		(1回目交配に準ずる)
	哺育	(F1A児哺育期に準ずる)	(F1A児哺育期に準ずる)
	離乳		
	F1B 離乳児から継代用の各群雄10匹、雌20匹を選抜 P1世代親動物の屠殺	F1B 離乳児の1/3を剖検	
	生育(9週) 1回目交配(3週) 妊娠(3週)	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	出産		(P1世代に準ずる)
P3	哺育	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	離乳	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	F2A 離乳児の1/3を剖検		
	2回目交配(3週) 妊娠(3週)	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	出産		(P1世代に準ずる)
	哺育	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
P3	離乳	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	生育(9週) 1回目交配(3週) 妊娠(3週)	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	出産		(P1世代に準ずる)
	哺育	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
P3	離乳		F3A 離乳児の1/3を剖検
	2回目交配(3週) 妊娠(3週)	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
P3	出産		(P1世代に準ずる)
	哺育	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
P3	離乳	P3世代親動物の屠殺	F3B 離乳児の1/2を剖検し、対照群と高用量群の雌雄各5匹について病理組織学的検査

結 果：概要を次頁の表 2 に示した。

親動物；P1 世代親動物の 150 ppm 群および P2 世代親動物の 100 ppm 群では、交配前生育期間の体重が対照群に比べて低下した。

各世代ともに途中死亡あるいは投与に関連した症状所見、摂餌量への影響は認められなかった。また、いずれの世代においても、交配能力及び繁殖能力について投与に関連した影響は認められなかった。

児動物；F1A 世代の 150 ppm 群では、生後 24 時間体重が対照群に比べて有意に低下した。

また 100 ppm 群では、全ての世代で哺育率が有意に低下し、F1A 雌雄児動物、F1B 雄児動物および F2A 雌雄児動物の離乳時体重が対照群に比べて有意に低下した。

その他には、検体投与に関連した繁殖性に関する指標の変化、肉眼的病理所見及び病理組織学的所見は認められなかった。

以上の結果から、3 世代にわたってラットに本剤を混餌投与した場合、100 ppm 投与群で、親動物に体重増加抑制が、また児動物で哺育率および離乳時体重の低値が認められた。繁殖能に対しては何ら影響がみられなかった。

したがって、無毒性量は親動物及び児動物に対して 30 ppm (P1：雄 1.786 mg/kg/day、雌 2.241 mg/kg/day、P2：雄 2.017 mg/kg/day、雌 2.279 mg/kg/day、P3：雄 2.202 mg/kg/day、雌 2.524 mg/kg/day) と判断される。繁殖性については最高投与量の 100 ppm でも影響がなかった。

表2 結果概要

世代		親 : P1				児 : F1A				親 : P1				児 : F1B				
投与量 (ppm)		0		10		30		150		0		10		30		100		
動物数	雄	20	15	15	15	10	10	10	10									
	雌	40	30	30	30	20	20	20	20									
親動物	一般状態	検体投与に起因する異常なし																
	死亡	雄	0	0	0	0												
		雌	0	0	0	0												
	交配前 体重増加量	雄	—	対照群と差なし				増加抑制										
		雌	—	対照群と差なし				増加抑制										
	交配前 摂餌量	雄	—	対照群と差なし														
		雌	—	対照群と差なし														
	検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	0.0	0.622	1.786	9.625												
		雌	0.0	0.740	2.241	13.513												
	受胎率 (%)	95.0		96.7	83.3	80.0	85.0	95.0	85.0	80.0								
出産率 (%)	100.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0									
産児数	443		342	265	265	214	242	219	152									
児動物	一般状態	検体投与に起因する異常なし								検体投与に起因する異常なし								
	出生児生存率 (%)	98.2		98.5	97.4	98.9	100	98.8	99.5	99.3								
	哺育率 (%)	96.0		89.8	96.0	47.1 ↓	97.8	82.0	90.4	69.9 ↓								
	生後 24 時間 体重 (g)	雄	6.5	6.5	6.7	5.6 ↓	6.6	6.7	7.0	6.7								
		雌	6.3	6.1	6.5	5.6 ↓	6.3	6.3	6.5	6.5								
	離乳時体重 (g)	雄	51.7	50.2	51.9	35.6 ↓	51.8	48.5	49.6	43.9 ↓								
		雌	49.6	47.2 ↓	49.4	35.8 ↓	49.2	49.0	48.9	43.7								
	肉眼的病理検査	検体投与に起因する異常なし																

太枠は検体の投与による影響であることを示す。斜線：検査せず。—：対照群

対照群との有意差の検定 (↓ ↑ : p < 0.05)

t 検定：児動物体重

Dixon & Massey (1957) の検定：受胎率、出生児生存率、哺育率

Wilfred J. Dixon and Frank J. Massey, Jr., Introduction to Statistical Analysis, pp. 123-123, p.232 - Section 13-6, McGraw-Hill, 1957

(つづく)

表 2 (つづき)

世代		親 : P2				児 : F2A				親 : P2				児 : F2B				
投与量 (ppm)		0	10	30	100	0	10	30	100	0	10	30	100	0	10	30	100	
動物数	雄	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	雌	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
親動物	一般状態	検体投与に起因する異常なし																
	死亡	雄	0	0	0	0												
		雌	0	0	0	0												
	交配前 体重増加量	雄	—	対照群と差なし			増加抑制											
		雌	—	対照群と差なし			増加抑制											
	交配前 摂餌量	雄	—	対照群と差なし														
		雌	—	対照群と差なし														
	検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	0.0	0.665	2.017	6.847												
		雌	0.0	0.760	2.279	8.505												
	受胎率 (%)		100.0	80.0↓	90.0	100.0	100.0	100.0	90.0	95.0	100.0	100.0	90.0	95.0				
出産率 (%)		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0					
産児数		212	183	216	202	281	277	234	235									
児動物	一般状態	検体投与に起因する異常なし								検体投与に起因する異常なし								
	出生児生存率 (%)		100	100	98.6	95.0	99.6	99.3	98.7	96.6								
	哺育率 (%)		96.0	96.8	97.9	73.9↓	80.4	90.0↑	96.5↑	68.6↓								
	生後 24 時間 体重 (g)	雄	6.7	6.6	6.1	5.8	7.0	6.5	6.8	7.1								
		雌	6.5	6.3	5.9↓	5.6↓	6.6	6.3	6.6	6.7								
	離乳時体重 (g)	雄	50.1	49.6	49.1	42.4↓	47.4	46.5	46.7	44.3								
		雌	47.7	47.5	48.1	39.7↓	45.2	43.0	44.3	44.0								
肉眼的病理検査		検体投与に起因する異常なし								検体投与に起因する異常なし								

太枠は検体の投与による影響であることを示す。斜線：検査せず。—：対照群
対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05)

t 検定：児動物体重

Dixon & Massey (1957) の検定：受胎率、出生児生存率、哺育率

Wilfred J. Dixon and Frank J. Massey, Jr., Introduction to Statistical Analysis, pp. 123-123, p. 232 - Section 13-6, McGraw-Hill, 1957

(つづく)

表 2 (つづき)

世代		親 : P3				児 : F3A				親 : P3				児 : F3B				
投与量 (ppm)		0		10		30		100		0		10		30		100		
動物数	雄	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	雌	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
親動物	一般状態	検体投与に起因する異常なし																
	死亡	雄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		雌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	交配前 体重増加量	雄	-															
		雌	-															
	交配前 摂餌量	雄	-															
		雌	-															
	検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	0.0	0.774	2.202	7.738	0.0	0.774	2.202	7.738	0.0	0.774	2.202	7.738	0.0	0.774	2.202	7.738
		雌	0.0	0.879	2.524	9.047	0.0	0.879	2.524	9.047	0.0	0.879	2.524	9.047	0.0	0.879	2.524	9.047
	受胎率 (%)	100.0		100.0		85.0		95.0		95.0		95.0		100.0		95.0		
出産率 (%)	100.0		100.0		100.0		100.0		100.0		100.0		100.0		100.0			
産児数	229		218		203		219		232		227		205		232			
一般状態	検体投与に起因する異常なし								検体投与に起因する異常なし									
出生児生存率 (%)	97.8		98.6		97.5		99.5		99.1		99.6		99.0		99.1			
哺育率 (%)	93.4		82.4 ↓		81.6 ↓		68.3 ↓		94.4		93.9		88.9		70.4 ↓			
生後 24 時間 体重 (g)	雄	6.4	6.7	6.6	6.8	6.4	6.8	6.8	6.1	6.4	6.8	6.8	6.1	6.4	6.8	6.8	6.1	
	雌	5.9	6.4	6.2	6.5 ↑	6.0	6.3	6.7 ↑	5.8	6.0	6.3	6.7 ↑	5.8	6.0	6.3	6.7 ↑	5.8	
離乳時体重 (g)	雄	48.0	49.7	44.8	46.3	45.1	45.1	48.5	39.0	45.1	45.1	48.5	39.0	45.1	45.1	48.5	39.0	
	雌	44.8	49.0 ↑	45.9	45.6	44.1	43.1	46.7	38.8	44.1	43.1	46.7	38.8	44.1	43.1	46.7	38.8	
肉眼的病理検査	検体投与に起因する異常なし								検体投与に起因する異常なし									
病理組織学的検査	検体投与に起因する異常なし								検体投与に起因する異常なし									

太枠は検体の投与による影響であることを示す。斜線：検査せず。-：対照群

a：対照群と 100 ppm 群の F3B 児動物雌雄各 5 例の甲状腺、肝臓、腎臓、胃および小腸について検査した。

対照群との有意差の検定 (↓↑ : $p < 0.05$)

↑ 検定：児動物体重

Dixon & Massey (1957) の検定：受胎率、出生児生存率、哺育率

Wilfred J. Dixon and Frank J. Massey, Jr., Introduction to Statistical Analysis, pp. 123-123, p.232 - Section 13-6, McGraw-Hill, 1957

(2) MEP原体のラットを用いた繁殖毒性試験

(資料10-2)

試験機関: Argus Research Laboratories, Inc.

報告書作成年: 1990年 [GLP対応]

検体: MEP原体

検体純度:

供試動物: CrI:CD®(SD)BR系雌雄ラット、1群雌雄各30匹

投与開始時約6週齢、体重; 雄199~257g、雌151~197g

試験期間: 1989年4月20日 第1世代投与開始日

1990年2月23日 第2世代の最終安楽殺日

投与期間: 第1(P1)世代; 交配の12週間前からF1b児離乳後の安楽殺まで

第2(P2)世代; 離乳時からF2児離乳後の安楽殺まで

投与方法: 検体をコーンオイルに溶解し、0、10、40及び120ppmの濃度で基礎飼料に混入して自由に摂取させた。飼料は約週1回の頻度で調製した。

[投与量設定根拠]

方法及び試験項目: 概要を表1にまとめた。

P及びF1a親動物

一般状態及び死亡; すべての親動物について、投与期間中は、症状観察を1日1回、さらに死亡の有無を1日2回確認した。

体重及び摂餌量; 雄ラットの体重および摂餌量を、試験期間を通して週1回の頻度で測定した。雌ラットの体重を、交配前期間は週1回以上の頻度で、妊娠中は妊娠0、6、12、15および20日(必要であれば25日)に、哺育期間は哺育1、4、7、10、14、16、18、21、28日に測定した。雌ラットの摂餌量を、交配前期間は週1回の頻度で、妊娠中は妊娠0、6、12、15および20日(必要であれば25日)に、哺育期間は哺育1、4、7、10、14、16、18および21-28日に測定した。

交配及び妊娠の確認; 雌を同群の雄と1対1で最長21日間同居させて交配を行った。膣垢中に精子が確認されるか膣栓が認められた場合に交尾成立と判断し、妊娠0日とした。同居開始後14日以内に交尾がみられなかった雌ラットについては、

同じ群のすでに交尾が確認された雄ラットと同居させた。P1 世代雌雄ラットについては、自然分娩させた後 2 週間以上の間隔をおいて 2 回目の交配を行った。繁殖性に関する指標；生育，交配，妊娠及び哺育の各期間と剖検時に以下の指標について調べた。

性周期；各交配期間の 1 週間前から妊娠 0 日まで，各雌から膣垢を採取し，性周期を調べた。

交尾成立までの期間；雌雄を同居後，膣栓または膣垢中の精子が確認されるまでの日数とした。

交尾率 (%) = (交尾成立雄 (雌) 数 / 同居させた雄 (雌) 数) × 100

雄の受胎率 (%) = (交尾した雌が妊娠した雄数 / 交尾成立雄数) × 100

雌の受胎率 (%) = (妊娠雌数 / 交尾成立雌数) × 100

出産率 (%) = (児動物を出産した雌数 / 妊娠雌数) × 100

妊娠中に死亡した雌を出産雌数に含めない。

妊娠期間；交尾成立日 (妊娠 0 日) から分娩完了日 (哺育 1 日) までの期間を日数で表した。

着床痕数；F1a 親動物の剖検時に子宮内の着床痕を数えた。

病理学的検査；P1 世代雄ラットは 2 回目交配期間終了後、P1 世代雌ラットは F1b 児動物の哺育期間終了後、F1a 世代雌雄ラットは F2 児動物の哺育期間終了後に安楽殺した。すべての P1 および F1a 世代親ラットについて、詳細な剖検を行った。雌ラットでは着床痕の観察も行った。すべての肉眼的病変部位ならびに雌ラットの膣、子宮／子宮頸部、卵巣、乳腺、下垂体および肝臓、雄ラットの精巣、精巣上体、精囊、前立腺、凝固腺、下垂体および肝臓を 10% 中性緩衝ホルマリン液中に保存した。すべての病変部位ならびに肝臓について病理組織学的検査を行った。

児動物：

一般状態及び死亡；哺育期間中は、死亡の有無を 1 日 2 回以上観察した。各同腹児の児動物数を 1 日 1 回計測し、児動物の全身状態を 1 日 1 回記録した。以下の指標を算出した。

哺育 4 日生存率 (%) = (哺育 4 日の哺育児数調整前の生存児数 / 出產生児数) × 100

離乳率 (%) = (離乳時生存児数 / 哺育 4 日の哺育児数調整後の生存児数) × 100

体重；哺育 1 (出生時)、4、7、14、21 および 28 日の児動物体重を測定した。

性比 = (生存雄児動物数 / 生存児動物数)

病理学的検査；次世代親動物として選抜されなかったすべての F1a 世代児動物は哺育 28 日に剖検し、肉眼的病変の有無を観察した。F1b および F2 世代児動物については、それぞれ哺育 21 日および 28 日に剖検し、肉眼的病変の有無を観察した。死産または死亡児動物は剖検に供した。哺育 4 日の哺育児数調整時に選抜されなかった F1a、F1b および F2 世代児動物は、その日に剖検を行った。

表1 試験の概要

世代	期間 (週間)	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P1	生育(82日)		症状観察を1日1回、死亡を1日2回確認 体重、摂餌量を週1回測定 交配前1週間から性周期を検査 交配状況の観察 交尾成立までの日数を記録 交尾率を算出
	1回目交配(3週間)	雌雄1対1で交配。膣栓及び膣垢中の精子で交尾確認(妊娠0日)	妊娠0、6、12、15および20日(必要であれば25日)に体重、摂餌量測定
	妊娠(3週間)		
	出産	分娩が完了した日を哺育1日とした	出産状況の観察 妊娠期間、産児数(生存及び死亡)を記録、出産率を算出
	哺育(4週間)	哺育4日に各同腹児数を雄4匹雌4匹に調整(可能ならば)	母動物; 哺育1、4、7、10、14、16、18、21および28日に体重、哺育1、4、7、10、14、16、18、21-28日に摂餌量を測定。 児動物; 死亡の有無を1日2回観察 全身状態および児動物数を1日1回観察 哺育1、4、7、14、21および28日に体重を測定 途中死亡及び哺育4日児数調整で選抜されなかった児動物の剖検
P2	離乳	F1a 離乳児から継代用の各群雄30匹雌30匹(可能ならば各腹雌雄各1匹)を無作為に選抜 P1世代親動物は1回目交配に準じて2回目交配を行う(哺育期間は21日間)	次世代親動物に選抜されなかったF1a 離乳児の剖検 P1世代雄は2回目交配期間終了後に剖検 P1世代雌はF1b 児動物の哺育期間終了後に剖検 P1親動物の肉眼的異常部位及び肝臓の病理組織学的検査 F1b 児動物を哺育21日に剖検
	生育(88日)		(P1世代に準ずる)
	1回目交配(3週間)	(P1世代に準ずる)	
	妊娠(3週間)		
	出産	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	哺育(4週)	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	離乳	F1a 世代親動物の安楽殺 F2 離乳児の安楽殺	哺育28日の F2 離乳児全例を剖検した。 F1a 親動物を剖検、肉眼的異常部位及び肝臓の病理組織学的検査 F1a 雌動物の着床痕の観察

結 果：概要を表 2 に示した。

親動物；

死亡；検体投与の影響による死亡は認められなかった。

P1 世代雌ラット 5 例の死亡（10 ppm 群の 3 例と 120 ppm 群の 2 例）は、1 群当たりの死亡数に用量相関性がなく、検体摂取量が最高となる時期以降の死亡ではないことから、検体投与に関連しないと考えられた。120 ppm 群の F1a 世代雌ラット 1 例の死亡は分娩時の合併症に関連し、1 例のみでの事象であることと発現頻度が有意でないことから、検体投与に関連しないと考えられた。

一般状態；120 ppm 群の F1a 世代雌ラットでは、妊娠中に軟便または液状便および着色鼻汁の発現動物数が増加する傾向がみられ、哺育期間には軟便または液状便が認められる動物数の増加傾向および振戦が認められる動物数の統計学的に有意な増加がみられた。P1 世代雌雄ラットおよび F1a 世代雄ラットでは、一般状態の異常は認められなかった。

体重及び体重増加量；P1 世代雄ラットでは、120 ppm 群で交配前期間 1～8 日、43～50 日および 57～64 日の期間において体重増加量の統計学的に有意な低値が認められ、平均体重は交配前期間 8、50、64、71 および 78 日に有意に低値であった。

P1 世代雌ラットでは、120 ppm 群で体重増加量の低値傾向または有意な低値が、交配前期間（投与 1～8 日、8～15 日、22～29 日、57～64 日、78～82 日、1～82 日で有意）、1 回目の妊娠中（妊娠 15～20 日の間で有意）および哺育期間、2 回目の妊娠中および哺育期間に認められた。また、同群では平均体重の低値傾向または有意な低値も、交配前期間（投与 15、29 および 64 日で有意）、1 回目妊娠中（妊娠 12 および 20 日で有意）、1 回目哺育期間（哺育 7～21 日で有意）、2 回目妊娠中および 2 回目哺育期間（哺育 14 および 18 日で有意）に認められた。40 ppm 群では、1 回目哺育期間の哺育 16 および 21 日には、平均体重の有意な低値が認められた。

F1a 世代雄ラットでは、40 および 120 ppm 群で交配期間後 1～50 日および 1 日～安楽殺日間の体重増加量の有意な低値が認められた。また、120 ppm 群では、離乳後 1～8 日、8～15 日、50～57 日、71～78 日、78～85 日、1～99 日および 1 日から同居前までの期間において体重増加量の有意な低値が認められ、交配期間後 8～15 日および 36～43 日の期間においても体重増加量の有意な低値が認められた。平均体重についても、120 ppm 群では、離乳後 1～99 日までの期間の各週、同居開始日、および交配期間後 1 日から安楽殺日までの各週で有意に低値であった。40 ppm 群では、安楽殺日に体重の有意な低値が認められた。

F1a 世代雌ラットでは、120 ppm 群の交配前及び妊娠中の体重増加量の低値傾向または有意な低値が認められ、交配前期間 1～8 日および 1～99 日の期間に体重増加量の有意な低値が認められた。また、同群の平均体重について

は、交配前期間、妊娠中および哺育期間の全ての測定時点において低値傾向または有意な低値が認められた。

120 ppm 群では、哺育 21~28 日および 1~28 日における体重減少の程度が対照群と比較して有意に低かったが、これは児動物の死亡と関連している可能性があり、検体投与に関連していないと考えられた。

絶対及び相対摂餌量；P1 世代雄ラットでは絶対および相対摂餌量への影響は認められなかった。

P1 世代雌ラットでは、120 ppm 群の絶対および相対摂餌量の低値傾向または有意な低値が、1 回目の妊娠中および哺育期間に認められ、絶対摂餌量の有意な低値、相対摂餌量の低値傾向が 2 回目哺育期間に認められた。

F1a 世代雄ラットでは、120 ppm 群において交配前期間から交配後期間を通して絶対および相対摂餌量の有意な低値が認められた。

F1a 世代雌ラットでは、120 ppm 群で交配前期間の 1~8 日、64~71 日および 92~99 日、妊娠 0~6 日、哺育 4~7 日、7~10 日、10~14 日および 1~14 日の期間に絶対摂餌量の有意な低値が認められた。また、相対摂餌量についても、120 ppm 群で哺育 7~10 日に有意な低下が認められた。40 ppm 群では、哺育 7~10 日、10~14 日および 1~14 日の期間に絶対摂餌量の低値傾向または有意な低値が認められた。

相対摂餌量の高値傾向または有意な高値が 120 ppm 群の F1a 世代雌雄ラットに認められたが、これらの相対摂餌量の高値は、高用量群での体重の低値と関連していた。

P1 世代雌ラットの全投与群で投与 1~8 日に認められた摂餌量の低下は、おそらく検体の味に対するラットの嫌忌を反映していると考えられた。その他の絶対摂餌量の変化は、相対摂餌量の変化を伴っていないことから、検体投与の影響とは考えられなかった。

繁殖性；P1 世代の 1 回目交配期間において、10 および 40 ppm 群の雄ラットでは受胎率（妊娠に至った交尾動物数）の有意な低下が認められた。120 ppm 群の雄ラットでは、2 回目交配期間に交尾成績の有意な低下が認められた。これらの交尾成績の低下は、1) 用量依存性がない、2) 1 回目と 2 回目の交配期間の間で再現性のある影響がない、3) F1a 世代に被験物質投与に関連した影響がない、4) 全ての交配期間の間で再現性のある影響がない、などのことから検体投与に関連した変化ではないと考えられた。F1a 世代では、交尾または受胎率に影響は認められなかった。

その他の母動物の生存率、妊娠期間および着床痕数などの繁殖性指標に影響は認められなかった。

病理組織学的検査；検査したいずれの組織においても、投与に関連した病理組織学的変化は認められなかった。認められた病理組織学的変化は、同齢同系統の成

熟雌雄ラットに自然発生的によく見られるタイプの病変であった。検体投与はこれらの偶発的所見の種類および発現頻度に影響しなかった。

児動物；全世代の120 ppm群において児動物体重の低値傾向または有意な低値が認められた。F1aおよびF2世代の120 ppm群では、死亡児動物数の有意な増加が認められ、瀕死状態／死亡に関連する症状を有する児動物数が増加した。また、全世代の120 ppm群では、生存率および離乳率の低下傾向または有意な低下が認められた。

その他の統計学的に有意な変化は、より高用量群に同様のより大きな変化が認められないことから、検体投与の影響とは考えられなかった。

本試験の結果、体重増加量、体重ならびに絶対および相対摂餌量に対する用量依存性のある統計学的に有意な影響が120 ppm群の雌雄ラットに認められた。体重および体重増加量については、40 ppm群でもP1世代雌ラットの哺育期間およびF1a世代雄ラットの交配後期間において有意な影響が認められ、絶対摂餌量については、40 ppm群のF1a世代雌ラットにおいて有意な影響が認められた。P1世代およびF1a世代のいずれでも、繁殖成績に対して検体投与に関連する影響は認められなかった。児動物については、120 ppm群の全ての世代で、児動物体重の低値傾向または有意な低値がみられ、児動物の死亡数増加と関連する指標の変化が認められた。

したがって、無毒性量は親動物に対して10 ppm(P1:雄0.7 mg/kg/day、雌0.7 mg/kg/day、F1a:雄0.7 mg/kg/day、雌0.8 mg/kg/day)、児動物に対して40 ppm(P1:雄2.7 mg/kg/day、雌3.1 mg/kg/day、F1a:雄2.8 mg/kg/day、雌3.3 mg/kg/day)と判断される。繁殖性については最高投与量の120 ppmでも影響がなかった。

表2 結果概要

世代		親 : P1				児 : F1a, F1b				
投与量 (ppm)		0	10	40	120	0	10	40	120	
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30	
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	
親動物	一般状態									
	雄 :									
	切歯の不正咬合 / 破折 / 欠損		2	9↑	6	3	8	1↓	1↓	4
	着色鼻汁		7	10	14	8	7	16↑	7	6
	雌 (妊娠中) ^a :									
	軟便 / 液状便		0/2	1/1	1/1	0/1	0	1	1	4
	着色鼻汁		0/0	1/1	0/1	0/0	1	2	2	4
	雌 (哺育期間) ^a :									
	振戦		0/0	0/0	0/0	1/2	0	0	0	6↑
	軟便 / 液状便		1/5	0/5	2/1	1/3	4	8	6	10
死亡										
雄		0	0	0	0	0	0	0	0	
雌		0	3 ^b	0	2 ^c	1 ^d	0	0	1 ^e	
平均体重	雄	交配前	-	↓50, 71日	有意差なし	↓50, 71, 78日 ↓8, 64日	-	有意差なし	有意差なし	↓全測定時点
		交配後	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	-	有意差なし	↓安楽殺日	↓全測定時点
	雌	交配前	-	有意差なし	有意差なし	↓15, 29, 64日	-	有意差なし	有意差なし	↓全測定時点
		1回目妊娠	-	有意差なし	有意差なし	↓12, 20日	-	有意差なし	有意差なし	↓妊娠6~20日
		1回目哺育	-	有意差なし	↓16, 21日	↓7~21日	-	↓21, 28日, 安楽殺日	↓10, 14, 21日	↓全測定時点
		2回目妊娠	-	有意差なし	有意差なし	低値傾向				
2回目哺育	-	有意差なし	有意差なし	↓14, 18日						

太枠は検体の投与による影響であることを示す。斜線：検査せず。-：対照群

a：1回目妊娠または哺育期間中の発現頻度 / 2回目妊娠または哺育期間中の発現頻度を示す

b：1回目妊娠9および19日、2回目哺育18日にそれぞれ1例が死亡した。

c：試験205日目と2回目妊娠23日にそれぞれ1例が死亡した。

d：ケージから逃げ出したため、離乳後53日に安楽殺した。

e：分娩完了前に死亡した。

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05, ↓↓ : p < 0.01)

Dunnett の検定 ; 親動物の体重

二項分布の均一性についての分散分析 ; 一般状態

表2 つづき

世代		親 : P1		児 : F1a, F1b		親 : F1a		児 : F2			
投与量 (ppm)		0	10	40	120	0	10	40	120		
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30		
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30		
親動物	体重増加量	雄	交配前	-	↓1-8日	↓57-64日 ↑8-15日 ↑64-71日	↓1-8, 43-50, 57-64日	-	有意差なし	有意差なし	↓1-8, 71-78, 78-85, 1-99日, 1-交配直前 ↓8-15, 50-57日
			交配後	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	-	有意差なし	↓1-50日, 1-安楽殺日	↓8-15, 36-43, 1-50日, 1-安楽殺日
		雌	交配前	-	有意差なし	↑64-71日	↓1-8, ↓8-15, 22-29, 57-64, 78-82日 ↓1-82日	-	↓1-99日	有意差なし	↓1-8, 1-99日
			1回目妊娠	-	有意差なし	有意差なし	↓15-20日	-	有意差なし	有意差なし	低値傾向
			1回目哺育	-	有意差なし	有意差なし	低値傾向	-	有意差なし	有意差なし	↑21-28, 1-28日
			2回目妊娠	-	有意差なし	有意差なし	低値傾向	/			
	2回目哺育	-	有意差なし	有意差なし	低値傾向						
	絶対摂餌量	雄	交配前	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	-	有意差なし	有意差なし	↓1~15, 29~99日, 1-99日 ↓15-22, 22-29日
			交配後	-	↓投与138-145日	有意差なし	↓投与138-145日	-	↓50-53日	有意差なし	↓全期間

太枠は検体の投与による影響であることを示す。斜線：検査せず。-：対照群
対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05, ↓↑ : p < 0.01)

Dunnett の検定；親動物の体重増加量、絶対摂餌量

表2 つづき

世代		親: P1		児: F1a, F1b		親: F1a		児: F2		
投与量 (ppm)		0	10	40	120	0	10	40	120	
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30	
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	
絶対 摂餌量	雌	交配前	-	↓1-8日	↓1-8日	↓1-8日 ↓78-82日	-	↓15-22, 50-57 日 ↓64-71 日	↓50-57, 64-71 日 ↓71-78 日	↓1-8, 64-71, 92-99 日
		1回目妊娠	-	↓0-6日	有意差なし	↓0-6日	-	有意差なし	有意差なし	↓0-6日
		1回目哺育	-	有意差なし	有意差なし	↓7-10日	-	有意差なし	↓1-14日 ↓7-14 日	↓4-14, 1-14日
		2回目妊娠	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	斜線			
		2回目哺育	-	有意差なし	有意差なし	↓4-7, 7-10, 1-14日				
	雄	交配前	-	有意差なし	有意差なし	↑投与 57-64日	-	有意差なし	有意差なし	↑1-43, 1-99日 ↑43-50 日
		交配後	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	-	有意差なし	↑15-22 日	↑22-29 日 ↑15-22 日
		交配前	-	↓1-8日	↓1-8日	↓1-8日 ↑15-22日	-	有意差なし	↓71-78 日	↑1-50 日 ↑50-57, 1-99日
		1回目妊娠	-	有意差なし	有意差なし	低値傾向	-	有意差なし	有意差なし	↑6-12日
		1回目哺育	-	有意差なし	有意差なし	↓7-10日	-	有意差なし	有意差なし	↓7-10日
雌	2回目妊娠	-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	斜線				
	2回目哺育	-	有意差なし	有意差なし	低値傾向					
	交配前	雄	-	0.7	2.7	8.0	-	0.7	2.8	8.8
	交配前	雌	-	0.7	3.1	9.6	-	0.8	3.3	11.1

太枠は検体の投与による影響であることを示す。斜線：検査せず。-：対照群
対照群との有意差の検定 (↓↑: p < 0.05, ↓↑: p < 0.01)

Dunnett の検定；親動物の絶対および相対摂餌量

a: P 世代の交配前検体摂取量は、申請者が各週の摂取量を平均し算出した。

表2 つづき

世代		親 : P1				親 : F1a					
		児 : F1a, F1b		児 : F2							
投与量 (ppm)		0	10	40	120	0	10	40	120		
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30		
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30		
1 回 目 交 配	親 動物 繁 殖 能 力	発情回数/7日	1.6	1.6	1.5	1.6	1.6	1.7	1.6	1.7	
		交尾成立までの 日数	雄	3.2	2.1	2.0	2.3	2.4	2.9	2.7	2.8
			雌	3.7	3.0	3.0	4.2	3.7	4.7	5.0	6.3
		交尾率 (%)	雄	90.0	90.0	86.7	83.3	82.8	80.0	73.3	70.0
			雌	93.3	96.7	96.7	96.7	93.1	90.0	86.7	93.3
		受胎率 (%)	雄	92.6	66.7↓	65.4↓	72.0	75.0	83.3	95.4	81.0
			雌	92.8	69.0	65.5	72.4	70.4	85.2	92.3	75.0
		出産率 (%)	100	95.0	100	100	94.7	100	100	95.2	
	妊娠期間	23.2	23.3	23.4	23.4	23.3	23.3	23.2	23.3		
	着床痕数					15.6	14.5	14.0	13.6		
	兒 動 物	死 亡 兒 数	平均産児数	14.8	14.6	13.0	12.7	13.8	13.9	13.2	12.7
			平均生存産児数	14.6	14.6	12.8	12.2	13.6	13.7	13.0	12.4
			平均死産児数	0.2	0.0	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2
		哺 育 日 数	哺育1日	4	0	1	4	0	1	0	2
哺育2-4日			8	2	3	32↑	1	2	1	34↑	
哺育5-7日			1	0	0	9↑	0	0	0	6↑	
哺育8-14日			1	0	0	2	0	0	0	8↑	
哺育15-21日			0	0	0	0	0	0	0	0	
哺育22-28日			0	0	0	1	0	0	0	0	
哺育4日生存率		96.8	99.3	98.4	86.0↓	99.6	99.0	99.7	85.5↓		
離乳率	99.0	100	100	91.5↓	100	100	99.4	89.8↓			

太枠は検体の投与による影響であることを示す。斜線：検査せず。-：対照群

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05, ↓↑ : p < 0.01)

Dunn の多重比較検定；交尾成立までの期間、妊娠期間、発情回数、産児数、着床痕数

二項分布の均一性についての分散分析；交尾率、受胎率、出産率、哺育4日生存率および離乳率

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

表2 つづき

世代		親：P1 児：F1a、F1b				親：F1a 児：F2					
投与量 (ppm)		0	10	40	120	0	10	40	120		
1 回目 交配	体 重	哺育1日	6.5	6.5	6.8	6.2	6.8	6.7	6.6	6.5	
		哺育4日 ^a	9.8	9.5	10.0	8.8	10.4	9.9	9.6	8.4↓	
		哺育4日 ^b	9.8	9.5	10.2	8.9	10.4	10.0	9.6	8.4↓	
		哺育7日	16.5	15.8	16.8	13.8	17.0	16.5	15.8	12.1↓	
		哺育14日	35.2	34.9	35.4	28.7↓	36.4	35.0	34.0	26.8↓	
		哺育21日	55.0	54.3	54.1	45.9↓	58.2	56.2	54.4	44.0↓	
	児動物	性比 (哺育1日)	45.5	51.0	49.2	53.9	46.5	49.2	50.0	56.4	
	一般状態：	小さく、衰弱	2	0	0	5	0	0	0	0	
	削瘦	0	0	0	1	0	0	0	0		
	衰弱	0	0	0	2	0	0	0	3		
	体温下降	0	1	2	4	0	0	2	4		
	哺乳してない	1	0	0	3	0	0	0	3		
	振戦	0	0	0	1	0	0	1	0		
腹部の尿汚れ	0	0	0	1	0	0	0	0			
蒼白化	0	0	1	0	0	0	0	3			
剖検所見		検体投与に起因する異常なし				検体投与に起因する異常なし					
動物数		雄	30	30	30	30	斜線：検査せず。—：対照群				
		雌	30	30	30	30					
2 回目 交配	親動物繁殖能力	発情回数/7日	1.6	1.8	1.8	1.8					
		交尾成立までの日数	雄	3.1	2.5	2.4					2.1
			雌	3.7	3.6	3.7					3.6
		交尾率 (%)	雄	83.3	82.1	76.7					56.7↓
			雌	90.0	89.3	83.3					66.7
		受胎率 (%)	雄	88.0	73.9	69.6					82.4
			雌	88.9	76.0	72.0					80.0
		出産率 (%)	100	100	94.4	87.5					
妊娠期間	23.1	23.2	23.4	23.2							

太枠は検体の投与による影響であることを示す。斜線：検査せず。—：対照群

a：哺育児動物数調整前

b：哺育児動物数調整後

対照群との有意差の検定 (↓↑：p < 0.05、↓↑：p < 0.01)

Dunnett の検定；児動物体重、各腹の平均性比

Dunn の多重比較検定；交尾成立までの期間、妊娠期間、発情回数

二項分布の均一性についての分散分析；交尾率、受胎率、出産率

表2 つづき

世代		親 : P1		児 : F1b		
投与量 (ppm)		0	10	40	120	
2 回 目 交 配	動物	平均産児数	14.6	15.5	13.0	12.4
		平均生存産児数	14.4	15.1	12.7	12.3
		平均死産児数	0.1	0.4	0.3	0.0
	死 亡 児 数	哺育1日	2	1	1	0
		哺育2-4日	9	3	3	4
		哺育5-7日	0	0	0	2
		哺育8-14日	0	0	0	2
		哺育15-21日	0	8 ↓ ^a	0	0
		哺育4日生存率	96.8	98.6	98.0	97.7
	体 重	離乳率	100	94.7 ↓	100	96.3 ↓
		哺育1日	6.7	6.5	6.8	6.5
		哺育4日 ^b	10.2	9.6	10.8	9.7
		哺育4日 ^c	10.3	9.6	10.9	9.8
		哺育7日	17.0	16.0	17.9	14.6
		哺育14日	36.6	34.8	37.9	29.6 ↓
	動物	哺育21日	56.2	55.3	57.9	47.6 ↓
		性比 (哺育1日)	51.1	48.1	47.3	47.1
		一般状態	検体投与に起因する異常なし			
動物	剖検所見	検体投与に起因する異常なし				

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

a : 母動物1例が死亡したため、全同腹児を哺育18日に安楽殺した。

b : 哺育児動物数調整前

c : 哺育児動物数調整後

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05、↓↑ : p < 0.01)

Dunnett の検定 ; 児動物体重、各腹の平均性比

Dunn の多重比較検定 ; 交尾成立までの期間、妊娠期間、産児数

二項分布の均一性についての分散分析 ; 交尾率、受胎率、出産率、哺育

4日生存率および離乳率

(3) MEP原体のラットにおける催奇形性試験

(資料10-3)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1974年

検 体：MEP原体

純 度：

試験動物：SD系妊娠ラット（交配時12週齢）

投与量 (mg/kg/日)		溶媒対照群	2	7	20
供試母体数	末期開腹群	18	18	18	18
	自然分娩群	6	5	8	5

投与方法：MEP原体をコーンオイルに溶解し、2、7および20* mg/kg/日の投与量で妊娠9日目から14日目**までの6日間毎日1回経口投与した。

なお、対照群にはコーンオイルを同様に投与した。

*：予備試験で得られた母体に対する最大耐量。

**：臍栓形成を確認した日を妊娠0日目とした。

投与量設定根拠；

試験項目：

母 体；一般症状を毎日観察し、妊娠0日目および投与開始日から妊娠末期まで毎日体重測定を行った。妊娠20日目に開腹し、着床数、生存胎児数、死亡胎児数を記録した。一方、新生児を得るために自然分娩させた母体では哺乳および一般状態を毎日観察し、3週間の哺乳後屠殺して子宮の着床痕数を調べ、分娩児数と比較した。

生存胎児；性別判定および体重測定後、外表異常の有無を観察した。生存胎児の半分について腹部諸臓器を観察後、骨格標本作製して骨化の進行状態および骨格異常の有無を観察した。残りの半分については、標本作製し、内臓異常を検査した。

新 生 児；各群5～8母体を自然分娩させ、産児数、生存児数を調べた。生存児について性別判定、外表異常観察を行い、離乳するまでの3週間、一般状態および耳介開展、切歯萌芽、被毛の発生、眼瞼開裂などの分化状態を観察し、また、6週間にわたって毎週1回体重を測定した。

離乳期には、一般行動、音に対する反応性、正向反射能、運動性などを観察した。その後、雌雄を分離して育成し、精巣下降、臍開口などの性分化の時期を調べた。6週間後

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

に屠殺し、生殖系の発育状態および胸腹部諸臓器の異常の有無を肉眼的に観察、また、主要臓器(脳、肝、腎、脾、精巣/卵巣)の重量を測定した。

結 果:

投 与 量(mg/kg/日)		溶媒対照	2	7	20		
親動物 (末期開腹群)	母 体 数	18	18	18	18		
	一 般 状 態				立毛、運動失調、尿失禁、振戦、眼球突出、興奮		
	体 重 変 化				軽度の増加抑制		
	繁殖に対する影響	着床数(平均±SE)	12.33±0.610	12.33±0.471	12.94±0.431	12.56±0.525	
		生存胎児数(平均±SE)	雄	5.7±0.54	5.2±0.57	6.8±0.56	5.8±0.53
			雌	4.9±0.59	6.2±0.45	5.6±0.56	5.5±0.48
死亡胎児数(%)	31(14.0)	17(7.7)	10(4.3)	22(9.7)			
胎 児	体 重 (g、平均±SE)	雄	3.77±0.027	3.78±0.041	3.70±0.027	3.43±0.047	
		雌	3.56±0.030	3.54±0.037	3.49±0.029	3.23±0.051	
	性 比(雄:雌)	102:89	93:112	123:100	105:99		
	外 表 異 常 (%)	0(0)	0(0)	1(0.45)	1(0.49)		
	骨 格 異 常 (%)	0(0)	0(0)	1(0.93)	0(0)		
	骨 格 変 異						
	骨 化 進 行 度						
内 臓 異 常 (%)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)			
親動物 (自然分娩群)	母 体 数	6	5	8	5		
	一 般 状 態				末期開腹群と同様の中毒症状		
	体 重 変 化				増加抑制		
	繁殖に対する影響	着床数(平均±SE)	12.5±0.9	12.8±0.8	11.9±0.9	11.6±0.5	
		産児数(平均±SE)	10.5±1.2	11.6±1.0	9.6±0.9	11.0±0.8	
		出 産 率 (%)	82.9	90.6	80.5	94.3	
分 娩 時 期							
死 産 児 数		2/63	0/55	4/77	3/55		

新 生 児	投 与 量(mg/kg/日)	溶媒対照	2	7	20
	外 表 異 常(出生時)				
	性 比(雄:雌)	35:26	26:29	36:37	24:28
	一 般 症 状				
	体 重 変 化		生後5週間の 雌体重が有意 に小さい。		出生時の雌雄体 重が有意に小さ い。
	離乳期(生後3週間)の 生存率(%)	93.3	94.5	87.9	89.8
	生後6週間の生存率(%)	93.3	91.4	86.6	88.3
	聴覚および正向反射能 (離 乳 期)				
	発 育 分 化				
	剖検所見(生後6週間)				
	臓器重量(生後6週間)			卵巢重量の有 意な減少。	

(1) 空欄は対照群と比較して差のないことを示す。

(2) 太枠は検体の投与による影響であることを示す。

20mg/kg 群の母体に中毒症状および体重増加抑制がみられたが、妊娠維持、分娩、哺育に対しては全く影響がなかった。胎児の外表異常として7 mg/kg 群に脳ヘルニア1例および20 mg/kg 群に口蓋裂1例を、骨格異常として7 mg/kg 群に胸椎体分離1例を認めしたが、これらは頻度も低く、偶発的なものとする。20mg/kg 群の新生児の出生時体重が雌雄ともやや小さかったが、その後の体重増加では対照群と差がなかった。胎児および新生児に関するその他の所見には、検体の投与に起因すると思われる影響は認められなかった。

以上の結果から、MEP原体をラットの妊娠9日目から14日目に毎日経口投与したところ、最高投与量の20 mg/kg/日でも胎児に対する催奇形性作用は認められず、新生児にも影響を与えなかった。また、母体の妊娠維持に対する最大無作用量は20 mg/kg/日を若干下回る量と判断される。

(4)MEP原体のラットにおける催奇形性試験

(資料10-4)

試験機関：Hazleton Laboratories America, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年：1987年

検 体：MEP原体

検体純度：

供試動物：Sprague-Dawley系 (CrI:CD(SD)[®]BR) 妊娠ラット (試験開始時約12~14週齢)
1群24匹

試験期間：1986年4月8日 交配開始
1986年5月2日 帝王切開終了

投与方法：検体をコーンオイルと混和し、3、8および25 mg/kg/dayの投与量で妊娠6日*
から15日までの10日間、妊娠6日に測定した体重に基づきそれぞれ5 mL/kg
の投与液量で1日1回強制経口投与した。対照群にはコーンオイルを同様に投与
した。

*) 膣栓または膣内の精子が確認された日を妊娠0日として起算した。

投与量設定根拠；

観察・検査項目：

親動物；全雌動物について、死亡、健康状態または毒性作用の明確な症状の有無を1日2
回観察した。実験開始時(妊娠0日)、妊娠6~19日および屠殺時(妊娠20日)
に体重測定ならびに詳細な検査を実施し、体重測定日間の摂餌量を測定した(妊
娠0日を除く)。妊娠20日に、すべての雌動物を屠殺し、胸腔、腹腔および骨
盤腔内の臓器の異常について肉眼的に観察した。各妊娠動物から子宮を摘出して
重量を測定し、着床数とその位置、生存および死亡胎児数、早期および後期吸収
胚数ならびに異常の有無を観察した。卵巣については黄体数を計測した。

生存胎児；全生存胎児について体重測定、性別判定、外表検査を行った。各同腹児から生
存胎児の約半数を選抜して内臓検査を行い、残りの生存胎児について骨格検査を
行った。

結 果：概要を次頁の表に示した。

親動物；すべての雌動物が計画屠殺時まで生存した。投与期間中ならびに投与期間終了
後に、25 mg/kg 群では毒性症状として振戦、粗毛、削瘦、鼻汁および尿汚れが
認められた。3 mg/kg 群および8 mg/kg 群の動物には投与に関連した症状は認め

られなかった。

25 mg/kg 群の最終体重（妊娠 20 日）は対照群に比べて統計学的に有意ではないものの軽度に低値であり、修正最終体重は、対照群に比べて有意に低値であった。また、25 mg/kg 群では、投与期間中の体重増加量が対照群に比べて有意に低値であった。

25 mg/kg 群では、妊娠 16～20 日間の体重増加量が対照群に比べて有意に高値となったが、投与期間終了後の代償性の体重増加によるもので、検体投与の影響ではないと考えられた。3 mg/kg 群および 8 mg/kg 群では、投与期間終了後の体重増加量が対照群値よりも有意に高値であったが、体重は対照群と差がなかったことから、検体投与の影響ではないと考えられた。また、3 mg/kg 群および 8 mg/kg 群では、妊娠子宮重量が対照群値に比べて有意に増加したが、対照群と 25 mg/kg 群の間で妊娠子宮重量に差はみられなかったことから、これらは用量相関性のある子宮内への影響を示すものではなかった。

胎児；妊娠率、着床率、胎児生存率、胎児の性比および胎児体重に群間で差はみられなかった。いずれの群においても、胎児の奇形の発現率あるいは分布は催奇形性を示すものではなかった。

25 mg/kg 群では、片側が完全でもう片側が痕跡状の 13 肋骨を有する胎児の割合およびこのような胎児が含まれる腹の割合の有意な増加が認められたが、両側とも痕跡状の 13 肋骨を有する胎児数には増加はみられなかったことから、検体投与に関連する影響ではないと考えられた^{申請者注 1}。

以上のように、本剤を器官形成期に 25 mg/kg/day の用量で投与したところ、母動物では体重増加抑制および振戦といった明らかな毒性が認められたことから、母動物に対する無毒性量 (NOAEL) は 8 mg/kg/day であった。一方、胎児動物には、投与に関連した毒性は認められなかったことから、胎児に対する無毒性量 (NOAEL) は 25 mg/kg/day であると考えられた。また、最高投与量の 25 mg/kg/day でも胎児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

申請者注 1：「13 肋骨片側完全、片側痕跡状」の発現頻度増加について

「13 肋骨片側完全、片側痕跡状」の発現頻度が対照群と 25 mg/kg 群の比較において、統計学的な差を生じたが、0、3、8 および 25 mg/kg 群の発現頻度は 0.0 (0/156 例)、2.5 (4/160 例)、2.0 (3/149 例) および 3.1 (4/130 例) % と明確な用量相関性はなく、投与の影響とは考えられなかった。また、上記所見の両側性変化である「13 肋骨痕跡状」も対照群を含む各群でみられたが、統計学的な差は認められなかった。これらのことから、本試験でみられた片側性変化である「13 肋骨片側完全、片側痕跡状」の 25 mg/kg 群における統計学的な差は、密接な関係があると考えられる両側性の「13 肋骨痕跡状」の発現状況と考え合わせ、検体投与に関連しない偶発的なものと判断した。

付表

投与群 (mg/kg/day)	対照	3	8	25
1群あたり動物数	24	24	24	24
妊娠動物数	24	22	20	20
死亡	0	0	0	0
一般状態観察動物数	24	24	24	24
投与期間所見：				
振戦	0	0	0	9
粗毛	0	0	0	7
削瘦	1	3	1	7
鼻汁	0	1	0	6
尿汚れ	0	1	0	10
投与後期間所見：				
振戦	0	0	0	5
粗毛	0	0	0	5
削瘦	0	1	0	3
鼻汁	0	0	0	5
尿汚れ	0	0	0	2
平均体重	—	有意差なし	有意差なし	↓(妊娠 11~19日)
体重増加量	—	↑(妊娠 6-16、6-19、6-20、16-20、0-20日)	↑(妊娠 6-20、16-20日)	↓(妊娠 6-10~18日) ↑(妊娠 16-20日)
摂餌量	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし
妊娠子宮重量 (g)	71.8	81.4 ↑	82.2 ↑	73.4
修正最終体重 (g)	289.9	296.1	288.1	273.3 ↓
剖検所見	検体投与に起因する異常は認められなかった			
着床所見				
検査母動物数	24	22	20	20
平均黄体数	16.0	16.8	18.0	16.0
平均着床数	14.0	15.3	15.8	14.1
着床率 (%)	88	92	89	87
早期吸収胚率 (%)	6	3	6	7
後期吸収胚率 (%)	0	0	0	0
平均生存胎児数	13.1	14.7	14.8	13.3
胎児生存率 (%)	94	97	94	93
平均死亡胎児数	0	0	0	0

太枠内は検体の影響であることを示す。—：対照群

着床率 (%) = (着床数 / 黄体数) × 100

吸収胚率 (%) = (吸収胚数 / 着床数) × 100

胎児生存率 (%) = (生存胎児数 / 着床数) × 100

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05)

Dunnnett 検定：体重、体重増加量、摂餌量、妊娠子宮重量、修正最終体重

他の群間で差がないと考えられた項目については、統計解析は行わなかった。

(つづく)

附表 (つづき)

投与群 (mg/kg/day)		対照	3	8	25	
平均胎児体重 (g)	雄	3.5	3.5	3.6	3.5	
	雌	3.3	3.4	3.3	3.3	
性比 (生存雄胎児%)		49	51	48	50	
外表検査	検査胎児 (腹) 数	314 (24)	324 (22)	295 (20)	265 (20)	
	奇形	正中閉鎖不全	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		無顎	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		ドーム状頭部	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		合計	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
内臓検査	検査胎児 (腹) 数	158 (24)	164 (22)	146 (20)	135 (20)	
	奇形	口蓋裂	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		小眼球	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		両側性無眼球	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		心臓/大血管の異常	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		肺葉の小型化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		異所性腎臓	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		正中閉鎖不全	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		合計	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	変異	脳半球の小型化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		大血管の変異	0 (0)	2 (2)	2 (2)	0 (0)
		腎乳頭小型化	12 (9)	11 (6)	8 (7)	5 (3)
		腎乳頭欠損	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		腎乳頭片側小型化、他側欠損	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		結腸軽度膨張	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		中等度尿管拡張	24 (14)	28 (14)	26 (13)	18 (7)
		重度尿管拡張	2 (2)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		片側中等度、他側重度尿管拡張	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
		精巣下降不全	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
		合計	35 (18)	38 (16)	33 (15)	22 (9)

太枠内は検体の影響であることを示す。- : 対照群

対照群との有意差の検定 ($\downarrow \uparrow : p < 0.05$)

Dunnnett 検定 : 胎児体重

Fisher-Irwin 確率検定 : 奇形を有する胎児数および腹数

他の群間で差がないと考えられた項目については、統計解析は行わなかった。

(つづく)

付表 (つづき)

		投与群 (mg/kg/day)	対照	3	8	25	
胎児	奇形	検査胎児 (腹) 数	156 (24)	160 (22)	149 (20)	130 (20)	
		無顎	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
		合計	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	骨格検査 変異		頭蓋骨不完全骨化	5 (5)	9 (5)	2 (1)	8 (6)
			舌骨未骨化	18 (8)	18 (9)	13 (3)	17 (7)
			仙椎前椎骨数 26 未満	1 (1)	3 (3)	0 (0)	0 (0)
			椎体分離	4 (4)	6 (6)	4 (3)	0 (0)
			尾椎骨化数 4 未満	36 (15)	48 (13)	40 (16)	22 (12)
			仙椎骨化数 4 未満	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			第 5 胸骨分節未骨化	53 (20)	67 (15)	42 (19)	54 (16)
			第 6 胸骨分節未骨化	2 (2)	5 (5)	0 (0)	2 (2)
			他の胸骨分節未骨化	2 (2)	2 (2)	0 (0)	2 (2)
			第 5/6 胸骨分節分離	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
			胸骨分節配列異常	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
			完全肋骨数 11	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			13 肋骨片側完全、片側痕跡状	0 (0)	4 (3)	3 (2)	4↑ (4↑)
			13 肋骨痕跡状	1 (1)	2 (2)	0 (0)	2 (2)
			14 肋骨痕跡状	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3)
			第 7 頸肋骨	1 (1)	3 (3)	2 (2)	4 (4)
			波状肋骨/肋骨屈曲	1 (1)	1 (1)	3 (1)	0 (0)
			過剰浮遊肋骨	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
			肋骨不連続骨化	0 (0)	3 (2)	0 (0)	0 (0)
			中足骨骨化数 4 未満	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		坐骨不完全骨化	1 (1)	2 (2)	0 (0)	3 (2)	
		坐骨未骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		合計	71 (21)	95 (20)	78 (20)	72 (19)	

太枠内は検体の影響であることを示す。—：対照群

対照群との有意差の検定 (↓↑: p < 0.05)

Fisher-Irwin 確率検定：一部の骨格変異の出現頻度、奇形を有する胎児数および腹数
他の群間で差がないと考えられた項目については、統計解析は行わなかった。

(5) ME P原体のマウスにおける催奇形性試験

(資料10-3)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1974年

検 体：ME P原体

純 度：

試験動物：ICR-JCL系妊娠マウス（交配時12週齢）

投与量 (mg/kg/日)		溶媒対照群	20	70	200
供試母体数	末期開腹群	19	20	19	20
	自然分娩群	6	7	6	7

投与方法：ME P原体をコーンオイルに溶解し、20、70 および 200* mg/kg/日の投与量で妊娠7日目から12日目**までの6日間毎日1回経口投与した。

なお、対照群にはコーンオイルを同様に投与した。

*：予備試験で得られた母体に対する最大耐量。

**：陰栓形成を確認した日を妊娠0日目とした。

投与量設定根拠：

試験項目：

母 体；一般症状を毎日観察し、妊娠0日目および投与開始日から妊娠末期まで毎日体重測定を行った。妊娠18日目に開腹し、着床数、生存胎児数、死亡胎児数を記録した。一方、新生児を得るために自然分娩させた母体では、哺乳および一般状態を毎日観察し、3週間の哺乳後屠殺して子宮の着床痕数を調べ、分娩児数と比較した。

生存胎児；性別判定および体重測定後、外表異常の有無を観察した。生存胎児の全例について腹部諸臓器を観察後、骨格標本作製して骨化の進行状態および骨格異常の有無を観察した。

新 生 児；各群6～7母体を自然分娩させ、産児数、生存児数を調べた。生存児について性別判定、外表異常観察を行い、離乳するまでの3週間、一般状態および耳介開展、切歯萌芽、被毛の発生、眼瞼開裂などの分化状態を観察し、また、6週間にわたって毎週1回体重を測定した。

離乳期には、一般行動、音に対する反応性、正向反射能、運動性などを観察した。その後、雌雄を分離して育成し、精巣下降、陰開口などの性分化の時期を調べた。6週間後に屠殺し、生殖系の発育状態および胸腹部諸臓器の異常の有無を肉眼的に観察、また、

主要臓器(脳、肝、腎、脾、精巣/卵巣)の重量を測定した。

結 果:

投 与 量(mg/kg/日)		溶媒対照	20	70	200	
親動物 (末期開腹群)	母 体 数	19	20	19	20	
	一 般 状 態					
	体 重 変 化					
	繁殖に対する影響	着床数(平均±SE)	12.42±0.385	11.75±0.532	12.84±0.646	11.85±0.734
		生存胎児数(平均±SE)	雄	6.3±0.38	5.6±0.48	6.8±0.51
雌			5.4±0.35	5.1±0.42	4.7±0.50	5.3±0.52
死亡胎児数(%)		15 (6.4)	20 (8.5)	25 (10.2)	12 (5.1)	
胎 児	体 重 (g、平均±SE)	雄	1.35±0.010	1.31±0.012	1.31±0.012	1.33±0.012
		雌	1.30±0.009	1.27±0.007	1.26±0.002	1.30±0.012
	性 比 (雄:雌)		119 : 102	112 : 103	130 : 89	121 : 105
	外 表 異 常 (%)		0 (0)	3 (1.4)	3 (1.4)	4 (1.8)
	骨 格 異 常 (%)		1 (0.47)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	骨 格 変 異					
骨 化 進 行 度						
親動物 (自然分娩群)	母 体 数	6	7	6	7	
	一 般 状 態					
	体 重 変 化					
	繁殖に対する影響	着床数(平均±SE)	12.0±0.5	13.0±1.1	13.2±0.7	12.0±0.38
		産児数(平均±SE)	11.2±1.0	11.9±1.0	12.5±0.8	10.4±0.4
		出 産 率 (%)	92.1	92.0	95.0	87.0
		分 娩 時 期				
死 産 児 数		1/67	0/83	0/75	0/73	

投 与 量(mg/kg/日)		溶媒対照	20	70	200
新 生 児	外 表 異 常(出生時)				
	性 比(雄:雌)	29:37	41:42	44:31	48:25
	一 般 症 状				
	体 重 変 化			出生時の雌体重が有意に小さい。	生後1週間の雌体重が有意に大きい。
	離乳期(生後3週間)の生存率(%)	92.1	87.2	85.8	86.2
	生後6週間の生存率(%)	92.1	87.2	85.8	84.8
	聴覚および正向反射能(離乳期)				
	発 育 分 化				
	臓器重量(生後6週間)			雄の腎重量と同体重比および雌の肝重量の有意な減少。	雌の肝重量体重比の有意な減少。

(1)空欄は対照群と比較して差のないことを示す。

(2)太枠は検体の投与による影響であることを示す。

口蓋裂および眼瞼開存の外形異常が投与群の胎児にのみ認められたが、これらは同系統マウスにおいて自然発生的にみられるものであり、投与量との相関もないことから、検体の投与に起因するものとは考えられない。また、新生児の体重変化および臓器重量において散見された投与群と対照群の差は、用量依存性がなく、検体の投与に関連した変化とは考えられない。その他、検体の投与によるものと思われる影響は、母体、胎児、新生児のいずれにも認められなかった。

以上の結果から、MEP原体をマウスの妊娠7日目から12日目に毎日経口投与したところ、最高投与量の200 mg/kg/日でも胎児に対する催奇形性作用は認められず、新生児にも影響を与えなかった。また、母体に対する最大無作用量は200 mg/kg/日と判断された。

(6) ME P原体のウサギにおける催奇形性試験

(資料10-6)

試験機関：Hazleton Laboratories America, Inc.

報告書作成年：1986年 [GLP 対応]

検 体：ME P原体

純 度：

試験動物：New Zealand White [HRA:(NZW)SPF] 雌ウサギ

人工授精時5ヶ月齢、体重2.86~3.87 kg、1群16匹

試験期間：1985年12月23日投与開始、1986年1月17日帝王切開終了

投与方法：検体をコーンオイルと混和し、3、10 および 30 mg/kg/day の投与量で妊娠7日*
から19日までの13日間、最新体重に基づきそれぞれ1.0 mL/kgの投与液量で1日
1回強制経口投与した。対照群にはコーンオイルを同様に投与した。

*)：人工授精日を妊娠0日として起算した。

[投与量設定根拠]

試験項目：

母動物；症状、流産、早産および死亡の有無を毎日観察した。妊娠0、7、8、9、13、16、19、
20、23、26 および 29 日に体重を測定し、この間の摂餌量も測定した。妊娠29日に
安楽死させ、帝王切開した。剖検後、子宮を摘出して着床数、早期および後期吸収
胚数ならびに生存および死亡胎児数を観察し、卵巣の黄体数を計数した。

胎 児；全胎児の体重測定、性別判定、外形観察、内臓観察および骨格観察を行った。

結 果；概要を次頁の表に示した。

母動物；投与期間中に30 mg/kg 群の6例の死亡が認められ、3例で流産または早産（妊娠22
~29日）がみられた。妊娠18日に10 mg/kg 群の1例の死亡が認められ、妊娠8日
に対照群の1例の死亡が認められた。これら2例では死亡前に摂食不良がみられた。

3 mg/kg 群の 2 例の死亡は投与操作ミスによるものであった。投与期間中および投与期間終了後はすべての群で摂食不良がしばしば認められた。投与に関連した症状所見として、30 mg/kg 群で自発運動の減少、運動失調、流涎、呼吸困難および振戦が認められた。他の群では、投与期間中に死亡した 1 例 (10 mg/kg 群) で自発運動の減少がみられたのみであった。

摂餌量は 10 mg/kg 群で妊娠 9~13 日に有意な低値が、30 mg/kg 群で妊娠 26~29 日に有意な高値がみられ、さらに妊娠 7~8 日に有意な低下傾向が認められた。体重は 30 mg/kg 群で妊娠 7~13 日間の増加量に有意な低値がみられ、妊娠 0~29 日間の体重増加量も対照群に比してやや低値であったが、その差は統計学的に有意ではなかった。30 mg/kg 群では対照群に比して着床率の軽度な低下が認められたが、妊娠率および黄体数に投与に関連した変化は認められなかった。

胎児；生存率、性比あるいは平均体重に投与に関連した影響は認められなかった。異常がみられた胎児の割合は、対照群、3、10 および 30 mg/kg 群でそれぞれ 2%、8%、6% および 0%、異常胎児が含まれる腹の割合はそれぞれ 8%、23%、31% および 0% であった。全体あるいは型別 (外形、内臓または骨格) の異常発現率に用量と関連した増加は認められなかった。

以上のように、本剤を妊娠ウサギの器官形成期に 30 mg/kg/day の用量で投与したところ、振戦、流産および死亡といった明らかな母動物毒性が認められた。よって、母動物に対する無毒性量 (NOAEL) は 10 mg/kg/day と考えられた*。一方、投与に関連した発生毒性は認められなかったことから、胚・胎児に対する無毒性量 (NOAEL) は 30 mg/kg/day であると考えられた*。

*：報告書原本に NOAEL の記載はないため、申請者見解を記載した。

附表

投与群 (mg/kg/day)		対照	3	10	30	
母動物	動物数	16	16	16	16	
	死亡	1	2 ^{a)}	1	6	
	妊娠動物数	14	15	16	16	
	流早産	0	0	0	3	
	一般状態	観察動物数	16	16	16	16
		自発運動減少	0	0	1	14
		運動失調	0	0	0	14
		流涎	0	0	0	14
		呼吸困難	0	0	0	14
	振戦	0	0	0	14	
	体重変化	妊娠 7-13 日				↓
		妊娠 0-29 日				軽度増加抑制
	摂餌量	妊娠 7-8 日				低下傾向*
妊娠 9-13 日			↓			
妊娠 26-29 日					↑	
剖検所見						
子宮内所見	観察母動物数	13	13	15	7	
	平均黄体数	11.7	11.4	11.0	10.1	
	平均着床数	8.3	7.6	8.3	5.7	
	着床率(%)	72.5	67.9	76.8	61.5	
	早期吸収胚率	16.2	14.2	21.0	21.1	
	後期吸収胚率	2.2	0.9	1.3	0.0	
胎児	平均生存胎児数		6.6	6.4	6.9	4.6
	平均胎児体重 (g)	雄	44.6	43.6	41.1	48.0
		雌	42.9	42.6	40.5	45.0
	平均死亡胎児数		0.0	0.1	0.0	0.0
性比 (生存雄胎児%)		60.0	40.0	48.4	66.9	

対照群との有意差の検定は Dunnett の t 検定 (↓↑ : p<0.05) または Terpstra-Jonckheere の傾向検定 (* : p<0.05) を用いて行った。

空欄は特記すべき変化がないことを示す。

a) : 剖検の結果、2例とも投与時の操作ミスに起因することが明らかであった。

(つづく)

附表 (つづき)

		投与群(mg/kg/day)	対照	3	10	30	
胎児	胎児観察	観察胎児数/観察腹数	86/13	83/13	104/13	32/7	
		異常発現胎児数 (%)	2 (2.3)	7 (8.4)	6 (5.8)	0 (0.0)	
		異常発現腹数 (%)	1 (7.7)	3 (23)	4 (31)	0 (0.0)	
	外形	変異	胎児数 (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)	0 (0.0)
			腹数 (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (7.7)	0 (0.0)
		異常	胎児数 (%)	1 (1.2)	0 (0.0)	3 (2.9)	0 (0.0)
			腹数 (%)	1 (7.7)	0 (0.0)	2 (15)	0 (0.0)
	内臓	変異	胎児数 (%)	4 (4.7)	1 (1.2)	5 (4.8)	1 (3.1)
			腹数 (%)	3 (23)	1 (7.7)	4 (31)	1 (14)
		異常	胎児数 (%)	0 (0.0)	2 (2.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
			腹数 (%)	0 (0.0)	2 (15)	0 (0.0)	0 (0.0)
	骨格	変異	胎児数 (%)	67 (78)	64 (77)	79 (76)	25 (78)
			腹数 (%)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	7 (100)
		異常	胎児数 (%)	2 (2.3)	6 (7.2)	4 (3.8)	0 (0.0)
			腹数 (%)	1 (7.7)	2 (15)	3 (23)	0 (0.0)

対照群との有意差の検定は Fisher-Irwin exact 検定を用いて行った。

(7) MEP原体のラットを用いた一世代繁殖毒性試験

(資料 No. 10-7)

試験機関：(株)大雄会医科学研究所

報告書作成年：2004年

試験目的：in vitro 試験^{*}および in vivo 試験^{**}において抗アンドロゲン作用が報告されていることから、ラットのP世代交配前からF₁世代成熟まで検体を混餌投与し、発情周期、交尾、受胎、分娩、哺育等の生殖能、および内分泌攪乱作用に感受性の高い指標を含む出生児の成育に及ぼす影響について詳細に検索する目的で実施した。

検体：MEP原体

検体純度：

供試動物：Sprague-Dawley系ラット、1群雌雄各12匹(P世代)または20匹(F₁世代)

投与開始時約6週齢、体重雄162~195g、雌123~150g(P世代)

投与期間：P世代；雄は交配前10週間および交配期間を経て剖検日まで、雌は交配前10週間ならびに交配および妊娠期間を経て離乳まで、F₁世代；離乳時から10週齢までの7週間(2001年11月5日~2002年4月17日)

投与方法：検体をコーンオイルに溶解し、0、10、20および60ppmの濃度で混入した飼料を自由に摂食させた¹⁾。なお、飼料は4週間に1回の頻度で調製した。

*: in vitro 試験

Tamura, H. et al., Androgen receptor antagonism by the organophosphate insecticide fenitrothion, *Toxicol. Sci.*, 60, 56-62 (2001)

Tamura, H. et al., Interaction of organophosphate pesticides and related compounds with the androgen receptor, *Environmental Health Perspectives*, 111, 545-552 (2003)

Sohoni, P. et al., Possible androgenic/anti-androgenic activity of the insecticide fenitrothion, *J. Appl. Toxicol.*, 21, 173-178 (2001)

** : in vivo 試験

Turner, K. J. et al., Effects of in utero exposure to the organophosphate insecticide fenitrothion on androgen-dependent reproductive development in the Cr1:CD (SD) BR rat, *Toxicol. Sci.*, 68, 174-183 (2002)

Tamura, H. et al., Androgen receptor antagonism by the organophosphate insecticide fenitrothion, *Toxicol. Sci.*, 60, 56-62 (2001)

¹⁾ 申請者注：投与量設定根拠

交配・調整・選抜および観察・検査項目：概要を次頁の表にまとめた。

一般状態および死亡率；全動物について、生死および一般状態を毎日観察した。

さらに、F₁世代動物については以下の項目についても観察した。

出産児数、死産児数、性別、外形異常；生後0日

肛門-生殖突起間距離 (AGD)；生後0、21、35日

乳頭および乳房観察；生後12、49日

精巣下降；生後28、35、42日

陰茎亀頭の包皮分離；生後35日から完了まで毎日

膣開口；生後21日から完了まで毎日

体重；P世代は投与開始日およびその後剖検日まで週1回、さらに剖検時に個別に測定した。交配あるいは分娩が確認された雌は、妊娠0、7、14、18および21日、哺育0、4、7、14および21日に測定した。

F₁世代については、生後0、4、7、14および21日、離乳後は週1回、また、剖検時に個別に体重を測定した。さらに、陰茎亀頭の包皮分離および膣開口の完了日に体重を測定した。

摂餌量；P世代はケージ当たりの摂餌量を交配前10週間は週1回、交配あるいは分娩が確認された雌は、妊娠2~4、5~7、12~14、16~18および19~21日、哺育2~4、5~7、12~14および19~21日に測定した。

F₁世代については、離乳後に週1回の頻度でケージ当たりの摂餌量を測定した。

交配および妊娠の確認；P世代動物は育成期間終了後、同じ群の雄1匹と雌1匹を最長2週間同居させ、膣垢塗抹を毎日観察し、精子の有無によって交尾を確認した(妊娠0日)。

試験の概要

世代	期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	育成期間 (10 週)		一般状態および生死観察；毎日 体重および摂餌量測定；週 1 回 性周期観察
	交配 (最長 2 週)	雌 1 対雄 1 で交配。交尾は膈垢中の精子で確認 (妊娠 0 日)	交配状況の確認 交配成立日数を記録
	妊娠 (3 週)		体重；妊娠 0、7、14、18、21 日 摂餌量；妊娠 2~4、5~7、12~14、16~18 および 19~21 日 妊娠期間を記録
	分娩		分娩状況の観察 産児数 (生存および死亡)、性別、外形異常を記録
	哺育 (21 日)	生後 4 日に各同腹児数を 8 匹に調整 (原則として雄 4 匹雌 4 匹)	母動物体重；哺育 0、4、7、14、21 日 摂餌量；哺育 2~4、5~7、12~14、19~21 日 児動物体重；生後 0、4、7、14、21 日 肛門-生殖突起間距離；生後 0、21 日 乳頭、乳房観察；生後 12 日
	離乳	生後 21 日に離乳後観察用の動物として各群 10 腹から雌雄各 2 匹を無作為に選抜 選抜されなかった児動物の安楽殺 親動物の安楽殺	児動物；肉眼的病理検査、器官重量測定 親動物；肉眼的病理検査、脳コリンエステラーゼ測定、器官重量測定、精子検査、病理組織学的検査
F ₁	育成期間 (7 週)	生後 10 週齢で全動物を安楽殺	一般状態および生死観察；毎日 体重および摂餌量測定；週 1 回 肛門-生殖突起間距離；生後 35 日 乳頭、乳房観察；生後 49 日 膈開口観察；生後 21 日~完了 精巣下降観察；生後 28、35、42 日 包皮分離観察；生後 35 日~完了 性周期観察 肉眼的病理検査、器官重量測定、精子検査、病理組織学的検査

繁殖性に関する指標；次の指標とした。

性周期 (P 世代；交配 2 週間前から交尾成立までの規則性、F₁ 世代；8 週齢から 2 週間の規則性)

交配成立日数 (交配開始から膣垢中に精子が確認された日までの日数)

妊娠期間 (膣垢中に精子が確認された日から分娩日までの日数)

交尾率 (%) = (交尾成立動物数 / 同居動物数) × 100

受胎率 (%) = (妊娠動物数 / 交尾成立動物数) × 100

出生率 (%) = (分娩時生存児数 / 着床痕数) × 100

生存率 (%) = (生後 4 日調整前生存児数 / 分娩時生存児数) × 100

離乳率 (%) = (生後 21 日生存児数 / 生後 4 日調整後生存児数) × 100

生化学的検査：P 世代動物について、剖検時に脳を摘出し、脳中のコリンエステラーゼ活性を測定した。

精子検査：P 世代および 10 週齢の F₁ 世代雄について、剖検時に精巣上体の精子数、精子運動性、精子形態および精巣の精子数を検査した。

病理学的検査：P 世代動物については F₁ 世代離乳時に、離乳後観察に選抜された F₁ 世代動物については 10 週齢で安楽殺し、それぞれ肉眼的病理検査を行い、以下の器官重量を測定した。

子宮 (頸部および卵管を含む)、卵巣、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、前立腺背側葉、精囊 (凝固腺を含む)、肛門挙筋 + 球海綿体筋 (LABC 筋)、尿道球腺、陰茎亀頭、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、脳、下垂体、甲状腺

また、以下の組織について病理標本を作成し、対照群と 60 ppm 群について鏡検した。

子宮、卵巣、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、前立腺背側葉、精囊 (凝固腺を含む)、下垂体、甲状腺

F₁ 世代の児数調整時に間引きされた児動物については、胸腹部の肉眼的病理検査を行い、性別を確認した。離乳後観察に選抜されなかった F₁ 世代児動物については生後 21 日に肉眼的病理検査を行い、以下の器官重量を測定した。

脳、脾臓、胸腺、子宮

結 果：概要を表に示した。

P 世代；雌雄ともに投与期間を通じて、臨床症状の変化および死亡を認めなかった。また、体重、体重増加量に検体投与による影響を認めなかった。

摂餌量は 60 ppm 群の雄で交配前期間の前半に低値傾向で推移し、第 5 週で有意な低値が観察され、軽度かつ一時的ながら検体の影響が認められた。

性周期、生殖能力検査および分娩状況では検体投与の影響を認めなかった。

器官重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査、卵胞検査および精子検査では、検体投与による影響を認めなかった。

脳組織中のコリンエステラーゼ活性は、60 ppm 群の雄、20 ppm 以上の群の雌で統計学的な低値を示した。

F₁ 世代；外形異常の発現はなく、哺育期間中および離乳後を通じて、臨床症状の変化も認めなかった。

哺育期間中の生存率は 60 ppm 群でやや低値を認めたが、生後 21 日の生存児数が 1 例のみという腹が 1 例あり、全体の平均値を引き下げたものと考えられた。この腹を除いた生後 4 日生存率は対照群 99% に対して 97% であり、統計学的にも有意でないことから、検体投与による影響とは考えられなかった。

また、生後 23 日に 60 ppm 群の雄 1 例の死亡を認めた。この動物は、離乳時の体重が他の動物と比較して低値であったこと、また、剖検所見では、腹部膨満および胃消化管のガスによる膨満を認め、胃消化管内に内容物を認めなかったことから、離乳後、自力で摂餌することが困難であり、摂餌不良による衰弱死と推察された。他の動物については症状発現ならびに死亡は認められなかったことから、1 例のみの偶発的な発現であり、検体投与による影響ではないと考えられた。

離乳後の体重および体重増加量では、10 および 20 ppm 群の雄、10 ppm 群の雌でそれぞれ有意な高値を散見したが、用量に関連のない変化であり、偶発的な変化と考えられた。また、摂餌量では、60 ppm 群の雄で有意な高値を散見したが、一過性の変化であり、毒性学的に意義のない変化と考えられた。

肛門-生殖突起間距離、乳頭および乳房観察、膺開口、精巣下降および陰茎亀頭と包皮の分離など、形態分化観察においても検体投与による影響を認めなかった。また、性周期および精子検査においても検体投与による影響を認めなかった。生後 4 日、21 日および 70 日における肉眼的病理学検査においても、肉眼的異常所見を観察しなかった。器官重量では検体投与による影響を認めなかった²⁾。病理組織学的検査および卵胞検査においても、検体投与による影響を認めなかった。

²⁾ 申請者注：生後 70 日の器官重量について

絶対あるいは相対重量の変化が各器官あるいは各投与群で散見されたが、投与量と相関のない変化であるか、絶対あるいは相対重量いずれか片方のみの変化であることから、検体投与と関連しない偶発的な変化と考えられた。

以上の結果より、MEPはP世代に対しては、60 ppm群の雄で投与初期に軽度かつ一時的ながら摂餌抑制が認められ、脳組織中のコリンエステラーゼ活性は、60 ppm群の雄、20 ppm以上の群の雌で、統計学的に有意な低下をきたしたが、60 ppm群においても生殖能力、分娩、哺育といった繁殖機能に影響は認められなかった。F₁世代に対しては、臨床症状、体重、摂餌量ならびに病理学的検査といった一般毒性学的指標には影響は認められず、抗雄性ホルモン作用も含め、内分泌攪乱作用に感受性の高い指標に対しても何ら影響がないことが明らかになった。

したがって、MEP原体の無毒性量は親動物の一般毒性に対して雄で20 ppm、雌で10 ppm (P世代; 雄 1.28 mg/kg/日、雌 0.71 mg/kg/日、F₁世代; 雄 1.75 mg/kg/日、雌 0.87 mg/kg/日)、繁殖性ならびに次世代に対しては60 ppm (P世代; 雄 3.81 mg/kg/日、雌 4.26 mg/kg/日、F₁世代; 雄 5.57 mg/kg/日、雌 5.58 mg/kg/日) と判断された³⁾。

³⁾ 申請者注：検体摂取量は育成期の体重と摂餌量から算出した値を記載した。

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

結果の概要

世代		親:P 児:F ₁					
投与群 (ppm)		0	10	20	60		
動物数	雄	11 ^{a)}	11 ^{a)}	12	12		
	雌	12	12	12	12		
一般状態		検体投与に起因した異常なし					
死亡数	雄	0	0	0	0		
	雌	0	0	0	0		
体重変化	雄	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし		
	雌育成期	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし		
	妊娠中	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし		
	哺育期間	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし		
摂餌量	雄	—	有意差なし	有意差なし	↓: 投与5週 低値傾向: 交配 前期間前半		
	雌育成期	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし		
	妊娠中	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし		
	哺育期間	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし		
育成期 検 体摂取量 (mg/kg/日)	雄	—	0.64	1.28	3.81		
	雌	—	0.71	1.38	4.26		
脳コリンエ ステラーゼ 活性 (IU/g)	雄 (%) ^{b)}	10.95 (—)	10.67 (97)	10.87 (99)	↓ 10.00 (91)		
	雌 (%) ^{b)}	11.01 (—)	10.67 (97)	↓ 8.88 (81)	↓ 2.98 (27)		
精子 検査	精巣精子数		2.02	2.18	1.90	1.78	
	精巣上体精子数		3.60	3.69	3.58	3.23	
	精子運動率 (%)		81.61	81.55	75.08	79.21	
	異常精子率 (%)		1.45	1.64	1.67	3.00	
肉眼的病理検査		検体投与に起因した異常なし					
器官 重量	雄	脳	重量 (g)	2.0954	2.1188	2.1440	2.1458
			対体重比	0.3675	0.3790	↑ 0.4028	0.3881
	雌	卵 巣	重量 (g)	0.0858	0.0916	↑ 0.0960	0.0903
			対体重比	0.0283	0.0305	↑ 0.0313	0.0302

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

—: 対照群

a) 投与 39 日目にケージから逃亡した 1 例を試験から除外した。

b) () 内の数値は各対照群の値を 100% として算出した相対活性率を示す。

対照群との有意差の検定 (↑ ↓: p < 0.05, ↑ ↓: p < 0.01)

Dunnett 多重比較検定または Steel 多重比較検定: 体重、体重増加量、摂餌量、器官重量、精子数、精子運動率、精子形態異常発現率、脳中コリンエステラーゼ活性 (つづく)

結果の概要

世代		親 : P 児 : F ₁					
投与群 (ppm)		0	10	20	60		
親動物	病理組織学的検査		検体投与に起因した異常なし				
	卵胞検査	小卵胞数	98.7	/	/	94.7	
		発育卵胞数	15.1	/	/	17.2	
		胞状卵胞数	8.2	/	/	9.8	
		黄体数	111.2	/	/	98.6	
	性周期異常動物数		0	1	0	0	
	交配成立日数		3.5 ^{b)}	2.6	4.3	2.4 ^{b)}	
	交尾率 (%)		100	100	100	100	
	受胎率 (%)		100	83	100	100	
	妊娠期間 (日)		22.4 ^{b)}	22.4	22.4	22.6 ^{b)}	
	着床痕数		13.3	13.2	13.6	13.6	
	出生率 (%)		92.8	93.4	91.6	90.8	
	児動物	平均生存産児数		12.3	12.2	12.4	12.3
		平均死産児数		0.0	0.1	0.1	0.4
生存率 (%)		99	99	99	88		
離乳率 (%)		100	100	100	97		
性比		45.9	55.6	55.0	43.3		
一般状態		検体投与に起因した異常なし					
体重 (g)		哺育 0日	雄	7.29	6.84	7.04	7.08
			雌	6.82	6.55	6.53	6.53
		哺育 4日	雄	11.95	11.15	11.08	10.60
			雌	11.07	10.86	10.44	10.28
		哺育 7日	雄	19.56	18.21	19.47	17.17
			雌	18.14	18.19	18.25	17.00
		哺育 14日	雄	37.77	36.55	37.82	33.11
			雌	35.74	36.13	36.14	33.62

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

/ : 検査せず

b) 妊娠0日が特定できなかった1例を除く。

対照群との有意差の検定 (↑ ↓ : p < 0.05, ↑ ↓ : p < 0.01)

Dunnett 多重比較検定または Steel 多重比較検定 : 体重、生存産児数、死産児数、着床痕数

Steel 多重比較検定 : 妊娠期間、性比、出生率、生存率、離乳率

χ² 検定 : 交尾成立動物数、妊娠成立動物数、性周期異常動物数、病理組織学的検査

Student の t 検定または Aspin-Welch の検定 : 卵胞検査

(つづく)

結果の概要

世代			親：P 児：F ₁				
投与群 (ppm)			0	10	20	60	
児動物	体重 (g)	哺育 21日	雄	61.31	60.63	61.54	54.21
			雌	58.19	59.35	58.13	55.06
	AGD (mm)	哺育 0日	雄	3.533	3.382	3.449	3.420
			雌	1.496	1.491	1.499	1.448
		哺育 21日	雄	18.839	19.006	18.908	17.999
			雌	10.760	10.999	10.563	10.412
	12日齢時乳頭数	雄	0.0	0.0	0.0	0.0	
		雌	12.0	12.1	12.0	12.0	
	12日齢時乳房数	雄	0.0	0.0	0.0	0.0	
		雌	11.6	11.9	11.8	10.4	
	肉眼的病理検査	4日齢	検体投与に起因した異常なし				
		21日齢	検体投与に起因した異常なし				
器官重量	21日齢	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし		
動物数	雄	20	20	20	20		
	雌	20	20	20	20		
一般状態	検体投与に起因した異常なし						
死亡数	雄	0	0	0	1		
	雌	0	0	0	0		
平均体重	雄	—	↑:49、56、70日齢	↑:28、35日齢 ↑:42~70日齢	有意差なし		
	雌	—	↑:21、35、42日齢 ↑:28日齢	有意差なし	有意差なし		
体重増加量	雄	—	↑:21~56、21~70日齢	↑:21~35、21~63、21~70日齢 ↑:21~42、21~49、21~56日齢	有意差なし		
	雌	—	↑:21~28日齢	有意差なし	有意差なし		

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

—：対照群

対照群との有意差の検定 (↑ ↓: p < 0.05, ↑ ↓: p < 0.01)

Dunnnett 多重比較検定または Steel 多重比較検定：体重、体重増加量、器官重量、AGD、乳頭数、乳房数

(つづく)

結果の概要

世代		親 : P 児 : F ₁				
投与群 (ppm)		0	10	20	60	
離乳後育成動物	摂餌量	雄	—	有意差なし	有意差なし	↑:26~28、33~35、61~63日齢
		雌	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし
	検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	—	0.87	1.75	5.57
		雌	—	0.87	1.82	5.58
	35日齢時 AGD (mm)	雄	29.148	↑ 29.860	↑ 29.820	29.359
		雌	14.991	15.453	15.393	14.686
	49日齢時 乳頭数	雄	0.0	0.0	0.0	0.0
		雌	12.0	12.0	12.0	12.0
	49日齢時 乳房数	雄	0.0	0.0	0.0	0.0
		雌	12.0	12.0	12.0	12.0
	膺開口	開始日齢	33.7	32.5	33.8	32.5
		完了日齢	35.3	35.3	34.3	34.6
		完了時体重 (g)	124.5	130.4	121.0	121.5
	精巣下降動物数 ^{c)}	28日齢	20/20	20/20	20/20	19/19
		35日齢	20/20	20/20	20/20	19/19
	包皮分離	開始日齢	40.6	40.8	40.3	40.8
		完了日齢	45.0	44.4	44.7	44.7
		完了時体重 (g)	227.4	235.0	↑ 243.5	236.1
	性周期異常動物数		7	6	6	10
	精子検査	精巣精子数	2.05	2.03	2.22	2.07
精巣上体精子数		2.19	2.19	2.31	2.25	
精子運動率 (%)		88.37	85.09	82.13	83.96	
異常精子率 (%)		2.10	1.40	1.78	1.21	
肉眼的病理検査		検体投与に起因した異常なし				

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

— : 対照群

c) 表中の数値は精巣下降が確認された動物数/検査動物数

対照群との有意差の検定 (↑ ↓ : p < 0.05、↑ ↓ : p < 0.01)

Dunnett 多重比較検定または Steel 多重比較検定 : 摂餌量、AGD、乳頭数、乳房数、包皮分離日および完了日体重、膺開口日および完了日体重、精子数、精子運動率、精子形態異常発現率

Steel 多重比較検定 : 妊娠期間、性比、出生率、生存率、離乳率

χ²検定 : 精巣下降完了例数、性周期異常動物数

(つづく)

結果の概要

世代		親 : P 児 : F ₁						
投与群 (ppm)		0	10	20	60			
離乳後育成熟動物	器官重量	雄	最終体重 (g)	391.2	↑ 418.3	↑ 423.1	413.1	
			脳	重量 (g)	1.9899	2.0273	↑ 2.0804	↑ 2.0782
				対体重比	0.5104	↓ 0.4890	0.4931	0.5057
			肝臓	重量 (g)	15.3839	↑ 17.0759	↑ 17.2564	↑ 17.0143
				対体重比	3.9388	4.0853	4.0719	4.1173
			腎臓	重量 (g)	2.8828	2.9834	↑ 3.1078	3.0852
		対体重比		0.7377	0.7128	0.7354	0.7481	
		雌	最終体重 (g)	243.6	257.0	244.7	257.6	
			脳	重量 (g)	1.8491	↑ 1.9048	1.8778	↑ 1.9138
				対体重比	0.7624	0.7485	0.7750	0.7491
			脾臓	重量 (g)	0.5590	0.5523	0.5276	0.5177
				対体重比	0.2281	0.2153	0.2168	↓ 0.2011
	腎臓		重量 (g)	1.7814	1.8796	1.8441	↑ 1.9588	
		対体重比	0.7335	0.7319	0.7557	0.7641		
	卵巣	重量 (g)	0.0776	↑ 0.0879	↑ 0.0900	0.0863		
		対体重比	0.0318	0.0346	↑ 0.0372	0.0337		
	病理組織学的検査		検体投与に起因した異常なし					
	卵胞検査	小卵胞数	133.6	/	/	135.8		
		発育卵胞数	46.2	/	/	45.2		
		胞状卵胞数	21.3	/	/	19.4		
黄体数		137.3	/	/	144.1			

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

/ : 検査せず

対照群との有意差の検定 (↑ ↓ : p < 0.05, ↑ ↓ : p < 0.01)

Dunnett 多重比較検定または Steel 多重比較検定 : 体重、器官重量

χ² 検定 : 病理組織学的検査

Student の t 検定または Aspin-Welch の検定 : 卵胞検査

11. 変異原性

遺伝子突然変異性試験

(1) M E P 原体の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料11-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1975年

検 体：M E P 原体

純 度：

試験方法：大腸菌 Escherichia coli のトリプトファン要求性株 (W3623、W3102)、枯草菌 Bacillus subtilis のトリプトファン要求性株 (W168) およびネズミチフス菌 Salmonella typhimurium のヒスチジン要求性株 (TA1535、TA1536、TA1537、TA1538) を用い、以下の2つの方法により、栄養要求性から非要求性への復帰変異性を検索した。

方法Ⅰ：各菌株を含む最少培地プレートを中心に、検体の DMSO 溶液 10 μ L を含浸させた直径 8mm の paper disk を置き、3日後に disk 周辺の復帰変異株コロニーを観察した。

方法Ⅱ：Tris-HCl buffer (0.1M、pH7.0) 中で DMSO に溶解した検体と菌体を一定時間接触させた後、最少培地および最少培地に要求アミノ酸を加えた各プレートを用いて突然変異菌数および全菌数を測定、突然変異率を求めた。

尚、いずれの方法においても、陽性対照としてニトロソグアニジンを用いた。

試験結果：

[方法 I]

突 然 変 異 性								
薬物	含浸量 (1disk 当り)	使用菌株						
		大腸菌		枯草菌	ネズミチフス菌			
		W3623	W3102	W168	TA1535	TA1536	TA1537	TA1538
DMSO(溶媒対照)	50 μ g	-	-	-	-	-	-	-
MEP原体	10 μ g	-	-	-	-	-	-	-
	100 μ g	-	-	-	-	-	-	-
	1 mg	-	-	-	-	-	-	-
	10mg	-	-	-	-	-	-	-
ニコチンアミン (陽性対照)	10 μ g	+	-	/	+	-	-	+
	100 μ g	+	+	/	+	-	-	+

+：突然変異誘発を認めたもの、 -：突然変異誘発を認めなかったもの

斜線箇所：該当なし

MEP原体の 10mg/disk までの量では、いずれの検定菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、陽性対照では、大腸菌 W3623、W3102、ネズミチフス菌 TA1535、TA1538 株に復帰変異コロニー数の増加が認められた。

[方法 II]

突 然 変 異 率							
薬物	処理量	処理 時間	使用菌株				
			大腸菌		枯草菌	ネズミチフス菌	
			W3623	W3102	W168	TA1535	TA1538
DMSO(溶媒対照)	10 mg/mL	17 時間	7.9×10^{-8}	2.3×10^{-8}	6.4×10^{-7}	5.2×10^{-7}	2.9×10^{-6}
MEP原体	10 μ g/mL	17 時間	4.9×10^{-8}	5.6×10^{-8}	2.3×10^{-7}	9.6×10^{-7}	8.4×10^{-6}
	100 μ g/mL	17 時間	6.2×10^{-8}	2.1×10^{-8}	5.9×10^{-7}	1.6×10^{-6}	4.9×10^{-6}
ニコチンアミン (陽性対照)	5 μ g/mL	10 分	5.9×10^{-5}	3.6×10^{-6}	/	/	/
	10 μ g/mL	10 分	7.5×10^{-4}	7.0×10^{-5}	/	/	/

斜線箇所：該当なし

MEP原体の 10 および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ との 17 時間に亘る接触により、いずれの菌株においても突然変異率の変化はみられなかった。一方、陽性対照では、10 分間の処理により、大腸菌における突然変異率が約 10^3 倍上昇した。

以上の結果から、MEP原体は復帰変異誘発性を有しないと判断される。

(2) MEP 原体の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料11-2)

試験機関：残留農薬研究所

報告書作成年：1979年

検 体：MEP 原体

純 度：

試験方法：ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* のヒスチジン要求性株 (TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100) および大腸菌 *Escherichia coli* のトリプトファン要求性株 (WP2hcr) を用い、SD系雄ラット (8週齢、平均体重290g) の肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下でAmesらの方法によりMEP 原体の復帰変異性を検索した。尚、検体はDMSOに溶解して供試した。

試験結果：

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix	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		
			WP2hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
溶媒対照 (DMSO)		-	18	6	100	3	14	11
			15	9	129	10	14	30
MEP 原体	10	-	18	7	135	9	15	24
			20	8	121	10	18	13
	50	-	27	10	153	4	8	24
			29	6	134	7	16	24
	100	-	20	10	143	10	13	28
			15	11	156	11	16	29
	500	-	17	3	226	2	17	25
			17	11	204	1	14	31
	1000	-	26	2	129	1	20	28
			20	2	113	0	15	30
	5000	-	19	*	52	1	10	31
			20	*	77	1	23	23

* 菌株の生育阻止を認める。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
溶媒対照 (DMSO)	/	+	18	6	102	6	10	11
			17	9	96	6	15	21
MEP原体	10	+	15	15	145	8	12	21
			20	11	114	2	10	20
	50	+	22	16	142	10	17	14
			27	4	124	3	12	16
	100	+	22	3	163	9	7	17
			29	11	143	4	19	19
	500	+	26	11	322	9	16	19
			19	5	241	1	19	14
	1000	+	27	5	181	3	9	25
			25	9	241	4	13	35
	5000	+	13	4	143	1	18	22
			25	3	167	0	15	20
2-アミノアントラセン (陽性対照)	10	-	27	14	175	18	21	31
		16	14	192	16	27	44	
	10	+	113	284	>3000	325	>3000	>3000
		136	522	>3000	347	>3000	>3000	
陽性対照	/	-	>2000 ^{a)}	1312 ^{b)}	924 ^{c)}	>10000 ^{d)}	>2000 ^{e)}	217 ^{f)}
			>2000	1444	988	>10000	>2000	267

- a) $0.25 \mu\text{g}/\text{プレート}$ AF-2 b) $50 \mu\text{g}/\text{プレート}$ β -プロピオラクトン
 c) $0.05 \mu\text{g}/\text{プレート}$ AF-2 d) $200 \mu\text{g}/\text{プレート}$ 9-アミノアクリジン
 e) $50 \mu\text{g}/\text{プレート}$ 2-ニトロフルオレン f) $0.1 \mu\text{g}/\text{プレート}$ AF-2

MEP原体はS-9 Mixの非存在下においてTA100株にわずかな復帰変異コロニー数の増加を誘起した。さらに、S-9 Mix存在下では、非存在下よりも高い値が同株において認められた。TA100株以外の株には復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたAF-2、 β -プロピオラクトン、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレンではS-9 Mixの非存在下で、また、2-アミノアントラセンではS-9 Mixの存在下で著明な復帰変異性が認められた。

以上の結果から、MEP原体はTA100株に対して薬物代謝酵素系の存在の有無にかかわらず弱い復帰変異誘発性を有すると考えられた。

(3)MEP 原体の細菌を用いる復帰突然変異試験

ニトロレダクターゼ活性を欠く TA100 株に対する復帰突然変異試験

(資料11-3)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1983年

目的：資料11-2の試験(残留農業研究所、1979年報告)において、MEP 原体はTA100株の復帰変異コロニー数をわずかに増加させ、ごく弱い復帰変異誘発性を示した。

ニトロ基を持つ化合物は細菌のニトロレダクターゼにより“False positive”を与えることがあるので、ニトロレダクターゼ欠損株を用いて試験を実施した。

検体：MEP 原体およびMEP 残留分析標品

純度：

試験方法：ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* のヒスチジン要求性株 TA100 および同系統から分離したニトロレダクターゼ活性を欠く変異株 (TA100nit⁻) を用い、SD系雄ラット(7週齢)の肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下および非存在下で Ames らの方法によりMEP 原体およびMEP 残留分析標品の復帰変異性を検索した。

尚、検体はDMSOに溶解して供試した。

試験結果：

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数/プレート			
		TA100		TA100nit ⁻	
		S-9Mix	S-9Mix	S-9Mix	S-9Mix
		-	+	-	+
MEP 残留分析標品	0	147	111	135	152
	100	167	169	193	148
	500	223	488	181	148
	1000	225	628	171	143
	2000	229	606	172	132
MEP 原体	0	157	152	142	135
	10	173	146	130	142
	100	142	170	136	142
	1000	142	427	158	170
陽性対照	20 ^{a)}	556	536	451	404
	100 ^{b)}	955	937	875	896
	5 ^{c)}	176	417	154	436
	10 ^{d)}	143	684	146	671

a) メタンスルホン酸メチル

b) β -プロピオラクトン

c) ベンゾ(a)ピレン

d) アセチルアミノフルオレン

TA100株に対してはS-9Mixの存在下で復帰変異コロニー数の増加を誘起したのに対し、TA100nit⁻株においてはS-9Mixの有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、TA100株で認められたMEP原体の復帰変異誘発性は、TA100株が持つニトロレダクターゼに起因すると推定される。

染色体異常試験

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

(資料 11-4)

試験施設：住友化学工業株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：1988年

検 体：MEP 原体

純 度：

試験方法：チャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞 (CHO-K1) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で染色体異常誘発性を評価した。検体は DMSO に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 200 個の分裂中期像について行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示す。S9 mix 非存在下、存在下のいずれの用量においても、染色体異常総数ならびに構造異常を有する細胞の出現頻度の増加は認められなかった。S9 mix 非存在下の 0.01 mg/mL、8 時間処理群の 1 つの標本では、倍数体細胞の出現頻度のわずかな増加が認められた。しかし、他の標本では認められず、時間あるいは濃度依存性がなかったこと、細胞の倍化時間 (14 時間) に比べて 8 時間の処理時間は倍数体細胞を誘発するには短いことから、被験物質の作用によるものではないと考えられた。

陽性対照化合物のマイトマイシンC、ベンゾピレン及びシクロホスファミドは、S9 mix 非存在下におけるマイトマイシンCの 8 時間処理群を除いて、構造異常総数及び構造異常を有する細胞の出現頻度を有意に増加させた。

以上の結果から、検体は本試験条件下で、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-K1) に対して染色体異常誘発性を持たないと結論された。

S9 M i x 有 無	処 理 時 間 (h)	標 本 作 製 時 間 (h)	薬 物	濃 度 (mg /mL)	観 察 細 胞 数	構 造 異 常										倍 数 体 (%) ^{a)}	分 裂 指 数 (%)		
						異 常 数						異 常 総 数		異 常 細 胞 (%)					
						染 色 分 体 型			染 色 体 型			他	+G	-G	+G			-G	
						ギ ャ ツ プ	切 断	交 換	ギ ャ ツ プ	切 断	交 換								
無	8	8	溶媒対照 (DMSO)	0.025 mL	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8.0
				100	0	1	0	0	1	1	0	3	3	3	3	1.5	9.6		
			検体	0.003	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.5	6.7
					100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	3	7.0	
				0.01	100	1	1	1	0	0	0	0	3	2	3	2	3	7.0	
					100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	6'	8.2	
			0.03	100	1	1	0	0	0	1	0	3	2	2	2	2.5	2.4		
				100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1.5	2.6		
			陽性対照 (MMC)	0.05 μg/mL	100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0.5	3.5	
					100	1	1	2	0	0	2	0	6	5	5	5	3	4.2	
無	16	16	溶媒対照 (DMSO)	0.025 mL	100	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	7.5	
				100	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	6.5	
			検体	0.003	100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	6.6	
					100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	7.0	
				0.01	100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	6.9	
					100	0	0	1	0	0	1	0	2	2	2	2	0	6.1	
			0.03	100	2	1	0	0	0	0	0	3	1	3	1	1.5	4.2		
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4.0		
			陽性対照 (MMC)	0.05 μg/mL	100	2	11	12	0	0	0	1	26**	24**	21**	19**	0.5	2.8	
					100	4	8	11	0	0	0	0	23**	19**	18**	16**	1	3.8	
無	24	24	溶媒対照 (DMSO)	0.025 mL	100	1	1	0	0	0	0	2	1	2	1	1.5	6.2		
				100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0.5	5.0		
			検体	0.003	100	0	0	0	0	0	2	0	2	2	2	2	1	6.1	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5	5.5	
				0.01	100	0	7	0	0	0	1	0	8	8	2	2	3.5	6.0	
					100	1	0	0	0	1	1	0	3	2	3	2	1	5.8	
			0.03	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.0		
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	2.4		
			陽性対照 (MMC)	0.05 μg/mL	100	6	15	29	0	0	3	0	53**	47**	41**	37**	1	3.4	
					100	5	13	23	0	1	1	0	43**	38**	37**	34**	1	2.9	

S9 Mix 有無	処理時間 (h)	標本作製時間 (h)	薬物	濃度 (mg/mL)	観察細胞数	構造異常										倍数体 (%) ^{a)}	分裂指数 (%)	
						異常数						異常総数		異常細胞 (%)				
						染色分体型			染色体型			他	+G	-G	+G			-G
						ギャップ	切断	交換	ギャップ	切断	交換							
有	2	16	溶媒対照 (DMSO)	0.025 mL	100	1	1	0	0	0	0	0	2	1	2	1	1.5	3.3
				100	3	0	0	0	0	1	0	4	1	4	1	2	2.6	
			検体	0.075	100	2	1	0	0	0	0	0	3	1	3	1	1.5	3.8
					100	2	1	2	0	1	1	0	7	5	5	4	2.5	4.4
				0.15	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	3.0
					100	0	1	1	0	0	0	0	2	2	2	2	1	2.7
				0.3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1.7
					100	0	1	2	0	0	0	0	3	3	2	2	1.5	2.2
			陽性対照 (B(a)P)	20 µg/mL	100	1	5	32	0	0	0	0	38**	37**	33**	32**	1	3.2
					100	2	5	34	0	0	1	0	42**	40**	37**	35**	1.5	2.4
有	2	24	溶媒対照 (DMSO)	0.025 mL	100	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	2	6.3	
				100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1.5	6.1	
			検体	0.075	100	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1.5	6.1	
					100	0	2	0	0	0	2	0	4	4	4	4	1	6.0
				0.15	100	0	0	1	0	0	1	1	3	3	3	3	2	2.7
					100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2.6
			0.3	100	0	0	2	0	0	0	0	2	2	2	2	1.5	2.5	
				100	0	1	2	0	0	0	0	3	3	1	1	1	1.7	
			陽性対照 (CP)	40 µg/mL	100	5	10	39	0	2	0	1	57**	52**	32**	29**	1	2.4
					100	3	10	31	0	2	1	1	48**	45**	34**	32**	1.5	1.9

a) 各標本 200 個の細胞を観察した

他：断片化、10 個以上の異常を有する細胞

+G：ギャップを含む異常

-G：ギャップを除く異常

DMSO：ジメチルスルホキシド

MMC：マイトマイシン C

B(a)P：ベンゾピレン

CP：シクロホスファミド

* p < 0.05

** p < 0.01

(5)MEP原体のラットの骨髄細胞を用いた染色体異常誘発性試験

(資料 11-5)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1982年

検体：MEP原体

純度：

試験方法：SD系雄ラット(4～5週齢、1群6匹)に対して綿実油に溶解したMEP原体を0、100、200および400 mg/kg体重の割合で1回経口投与し、6、24および48時間後に屠殺するか(実験Ⅰ)、0、20、40および80 mg/kgで5日間毎日経口投与し最終投与の6時間後に屠殺し(実験Ⅱ)、骨髄細胞の染色体標本を作製して各動物50個の分裂中期像を観察した。染色体の異常をギャップ(gap)、切断(break)、交換(exchange)、細片化(fragmentation and pulverisation)に分類し計測した。

用量設定根拠：

試験結果：

[実験Ⅰ]

薬物	投与量 (mg/kg)	投与後 の経過 時間	異常を有 する細胞 の率(%)	異常の頻度				
				ギャップ*	切断	交換	10個以上の 異常を有す る細胞	細片化
綿実油(溶媒対照)	—	6	0.7	1	1	0	0	0
MEP原体	100	6	1.0	2	1	0	0	0
	200	6	0.7	2	0	0	0	0
	400	6	1.3	4	0	0	0	0
シロホスファミド(陽性対照)	60	6	22.0**	59	23	6	0	0
綿実油(溶媒対照)	—	24	0.7	2	0	0	0	0
MEP原体	100	24	0.7	2	0	0	0	0
	200	24	0.4	1	0	0	0	0
	400	24	1.3	4	0	0	0	0
シロホスファミド(陽性対照)	60	24	44.7**	105	62	45	42	2
綿実油(溶媒対照)	—	48	0.7	2	0	0	0	0
MEP原体	100	48	0.0	0	0	0	0	0
	200	48	0.3	1	0	0	0	0
	400	48	1.0	1	2	0	0	0
シロホスファミド(陽性対照)	60	48	1.0	1	2	4	0	0

** : p<0.01

[実験Ⅱ]

薬物	投与量 (mg/kg ×5回)	最終投 与後の 経過時 間	異常を有 する細胞 の率(%)	異常の頻度				
				ギャップ	切断	交換	10個以上の 異常を有す る細胞	細片化
綿実油(溶媒対照)	—	6	0.3	1	0	0	0	0
MEP原体	20	6	1.0	2	1	0	0	0
	40	6	0.3	0	1	0	0	0
	80	6	1.0	2	1	0	0	0

MEP原体投与群ではいずれの投与量および検査時期においても染色体異常の有意な増加はみられなかった。一方、陽性対照として用いたシクロホスファミドの1回投与では、異常を有する細胞数の著明な増加が投与6および24時間後に認められた。

以上の結果から、MEP原体のラット骨髄細胞に対する染色体異常誘発性は陰性であると判断される。

(6)MEP原体のマウスの骨髄細胞を用いた染色体異常誘発性試験

(資料 11-6)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1980年

検 体：MEP原体

純 度：

試験方法：ICR系雄マウス(7~11週齢、1群4匹)に対しコーンオイルに溶解したMEP原体を0、50、200および850 mg/kg体重の割合で1回腹腔内注射し、24時間後に屠殺するか(実験Ⅰ)、あるいは、850 mg/kgで1回腹腔内注射した後、6、24および48時間目に屠殺し(実験Ⅱ)、骨髄細胞の染色体標本を作製して各動物50個の分裂中期像を観察した。染色体の異常をギャップ(gap)、切断(break)、交換(exchange)、細片化(fragmentation and pulverisation)に分類し計測した。

用量設定根拠：

試験結果：

[実験Ⅰ]

薬物	投与量 (mg/kg)	投与後 の経過 時間	異常を有 する細胞 の率(%)	異常の頻度				
				ギャップ	切断	交換	10個以上の 異常を有す る細胞	細片化
コーンオイル(溶媒対照)	—	24	4.0	9	0	0	0	0
MEP原体	50	24	3.0	6	0	0	0	0
	200	24	3.0	6	0	0	0	0
	850	24	1.5	3	0	0	0	0
陽性対照								
3,4-ベンズピレン	200	24	12.5**	25	6	0	0	0
6-メルカプトプリン	200	24	19.5**	63	5	0	0	0

** : p<0.01

[実験Ⅱ]

薬物	投与量 (mg/kg)	投与後 の経過 時間	異常を有 する細胞 の率(%)	異常の頻度				
				ギャップ	切断	交換	10個以上の 異常を有す る細胞	細片化
J-オイル(溶媒対照)	—	6	2.5	5	0	0	0	0
	—	24	2.0	4	0	0	0	0
	—	48	1.0	2	0	0	0	0
MEP原体	850	6	3.0	6	0	0	0	0
	850	24	3.0	5	1	0	0	0
	850	48	1.0	2	0	0	0	0
3,4-ベンズピレン (陽性対照)	200	6	1.5	3	0	0	0	0
	200	24	14.5**	26	2	1	0	0
	200	48	9.0**	20	3	0	0	0

** : p<0.01

MEP原体投与群では染色体異常の発現頻度の増加はみられなかった。一方、陽性対照として用いた3,4-ベンズピレンおよび6-メルカプトプリンでは、染色体異常を有する細胞数の有意な増加が認められた。

以上の結果から、MEP原体のマウス骨髄細胞に対する染色体異常誘発性は陰性であると判断される。

(7)MEP原体のマウスの骨髄細胞を用いた染色体異常誘発性試験

(資料 11-7)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1982年

検 体：MEP原体

純 度：

試験方法：ICR系雄マウス(7~8週齢、1群6匹)に対しコーンオイルに溶解したMEP原体を0、200、400および800 mg/kg体重の割合で1回腹腔内注射した後、6、24および48時間目に屠殺し、骨髄細胞の染色体標本を作製して各動物50個の分裂中期像を観察した。染色体の異常をギャップ(gap)、切断(break)、交換(exchange)、細片化(fragmentation and pulverisation)に分類し計測した。

用量設定根拠：

試験結果：

薬物	投与量 (mg/kg)	投与後 の経過 時間	異常を有 する細胞 の率(%)	異常の頻度				
				ギャップ	切断	交換	10個以上の 異常を有す る細胞	細片化
コーンオイル(溶媒対照) MEP原体	—	6	0.7	1	1	0	0	0
	200	6	1.0	2	1	0	0	0
	400	6	0.0	0	0	0	0	0
	800	6	1.0	2	1	0	0	0
マイトマイシンC(陽性対照)	4	6	30.3**	27	25	94	5	0
コーンオイル(溶媒対照) MEP原体	—	24	1.7	4	1	0	0	0
	200	24	0.0	0	0	0	0	0
	400	24	0.0	0	0	0	0	0
	800	24	0.7	2	0	0	0	0
マイトマイシンC(陽性対照)	4	24	66.3**	187	190	95	26	9
コーンオイル(溶媒対照) MEP原体	—	48	0.3	1	0	0	0	0
	200	48	0.7	2	0	0	0	0
	400	48	0.0	0	0	0	0	0
	800	48	0.7	2	0	0	0	0
マイトマイシンC(陽性対照)	4	48	16.3**	11	2	19	11	18

** : p<0.01

MEP原体投与群では染色体異常の発現頻度の増加はみられなかった。一方、陽性対照として用いたマイトマイシンCでは、染色体異常を有する細胞数の著明な増加が各検査時期において認められた。

以上の結果から、MEP原体のマウス骨髄細胞に対する染色体異常誘発性は陰性であると判断される。

(8)MEP原体のマウスの骨髄細胞を用いた小核試験

(資料 11-8)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1982年

検 体：MEP原体

純 度：

試験方法：ICR系雄マウス(7~8週齢、1群6匹)に対しコーンオイルに溶解したMEP原体を0、200、400、800および1600 mg/kg体重で1回腹腔内注射して24時間後に屠殺し、骨髄細胞の塗抹染色体標本を作製して検鏡した。

用量設定根拠：

試験結果：

薬物	投与量 (mg/kg)	多染性赤血球数/ 赤血球総数 ⁽¹⁾ (%)	小核を有する赤血 球数/赤血球総数 ⁽¹⁾ (%)	小核を有する多染 性赤血球数/多染性 赤血球数 ⁽²⁾ (%)
コーンオイル(溶媒対照)	—	30.9	0.08	0.18
MEP原体	200	36.0	0.25*	0.25
	400	36.8	0.10	0.17
	800	44.4**	0.18	0.30
マイトマイシンC(陽性対照)	4	31.0	1.45**	4.75**

(1)、(2)いずれも各動物1000個の細胞を観察。

* : p<0.05、** : p<0.01

多染性赤血球における小核の頻度をみた場合、MEP原体の投与による小核の増加は認められなかった。一方、陽性対照のマイトマイシンCでは著明な小核の増加がみられた。

DNA 損傷修復試験

(9)MEP 原体の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料11-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1975年

検 体：MEP 原体

純 度：

試験方法：以下に示す3種の細菌の野生型と紫外線感受性各株を用い、paper disk 法により放射線様傷害作用の有無を調べた。すなわち、MEP 原体のDMSO溶液 10 μ L を含浸させた直径8mmの paper disk を培地プレートの上に置き、1日後の増殖阻止円径を測定した(方法I)。

また、ラット肝から調製した薬物代謝酵素系の存在下および非存在下で、大腸菌の野生型および紫外線感受性各株をMEP 原体と buffer 中で一定時間*接触させ、その致死率を求めることにより、放射線様傷害作用の有無を検索した(方法II)。

*代謝酵素系の存在下では、30 分間、非存在下では Tris-HCl buffer (0.1M、pH 7.0) 中で17時間接触させた。

菌種	野生型 (紫外線非感受性)	DNA修復欠損株 (紫外線感受性)
大腸菌 <i>Escherichia coli</i>	W3623	W3623polA ⁻ W3623uvrA ⁻ W3623recA ⁻
枯草菌 <i>Bacillus subtilis</i>	H17	M45recA ⁻
ネズミチフス菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	TA1978	TA1538uvrB ⁻

試験結果：

(方法I)

paper disk 法による結果を次表に示す。MEP 原体は10 mg/disk までの量において、いずれの株にも生育阻止を示さなかった。一方、陽性対照のニトロソグ

アニジンでは、野生型と紫外線感受性各株との間に明らかな生育阻止の差が認められた。

生育阻止円直径 (mm)									
薬物	含浸量 (1disk 当り)	使用菌株							
		大腸菌				枯草菌		ネズミチフス菌	
		W3623*	<i>polA</i> ⁻	<i>uvrA</i> ⁻	<i>recA</i> ⁻	H17*	M45 <i>recA</i> ⁻	TA1978*	TA1538 <i>uvrB</i> ⁻
DMSO (溶媒対照)	20 μL	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0
MEP原体	100 μg	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0
	1 mg	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	/	/	/	/
	10mg	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0
ニトロソアニジン (陽性対照)	10 μg	9.5	13.2	11.5	14.6	10.3	12.9	8.7	10.3
	100 μg	17.2	25.2	18.0	30.8	19.2	34.6	12.5	15.8

* 野生型

斜線箇所：該当なし。

(方法II)

Buffer 中での致死効果試験では、薬物代謝酵素系の有無にかかわらず、30 μg/mL から溶解限界の 120 μg/mL までの範囲においてMEP原体の大腸菌各株に対する致死作用はほとんど認められなかった。一方、代謝酵素系の非存在下で、陽性対照ニトロソアニジンの10分間処理では、紫外線感受性株の致死率が野生型に比べ大きくなった。また、ジメチルニトロソアミンは、そのままではほとんど致死作用を示さないにもかかわらず、肝代謝酵素系の存在下ではW3623の *polA*⁻ および *recA*⁻ 株に対して強い致死作用を示した。

以上の結果から、MEP原体は放射線様傷害作用がないものと判断される。

(10) MEP 原体の細菌を用いたDNA修復試験

(資料11-2)

試験機関：残留農薬研究所

報告書作成年：1979年

検 体：MEP 原体

純 度：

試験方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換修復機構保持株(H17) と欠損株(M45) を用い、DNAへの損傷の誘発性を検索した。すなわち、MEP 原体のDMSO 溶液20 μ Lを含浸させた直径10mmのpaper diskを培地プレートに置き、1日後の生育阻害帯の長さを測定した。

試験結果：

薬物	濃度 (% v/v)	阻止帯の長さ (mm)		差 (mm)
		M45	H17	
溶媒対照 (DMSO)		0	0	0
MEP 原体	1	0	0	0
	5	0	0	0
	10	0	0	0
	25	0	0	0
	50	0	0	0
	100	0	0	0
カナマイシン (陰性対照)	10 μ g/disk	7	6	1
マイトマイシンC (陽性対照)	0.1 μ g/disk	6	0	6

MEP 原体はいずれの濃度においても両株に生育阻止を起こさなかった。一方、陽性対照のマイトマイシンCでは両株の間に明らかな生育阻止の差がみられた。また、陰性対照のカナマイシンでは両株に同程度の生育阻止が認められた。

以上の結果から、MEP 原体はDNAに対する損傷の誘発性はないものと判断される。

宿主経由

(11)MEP 原体の宿主経由法による DNA 修復試験

(資料11-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1975年

検 体：MEP 原体

純 度：

試験方法：ICR系雄マウス(7週齢、体重約35g)の腹腔内に大腸菌 *Escherichia coli* の野生型株 (W3623) あるいはと紫外線感受性各株 (W3623 $polA^-$ 、 $uvrA^-$ 、 $recA^-$) を挿入後、MEP 原体の急性中毒量を経口投与または筋肉注射により与え、3時間後に菌を回収して生菌数を測定した。尚、陽性対照としてストレプトゾトシンを筋肉注射により投与した。

試験結果：

薬物	投与経路	投与量	生 菌 率*			
			W3623	$polA^-$	$uvrA^-$	$recA^-$
DMSO (溶媒対照)	筋肉注射	100 mg/kg	1.0	1.0	1.0	1.0
MEP 原体	経 口	500 mg/kg	1.2	1.9	0.9	1.0
	筋肉注射	500 mg/kg	1.1	1.2	1.1	0.9
	筋肉注射	1000 mg/kg	1.2	1.2	1.0	0.9
ストレプトゾトシン (陽性対照)	筋肉注射	500 μ g/kg	0.8	0.2	0.1	0.5

*溶媒対照の生菌数を 1.0 として求めた値。

いずれの投与経路、投与量においても、MEP 原体の各菌株に対する致死作用は認められなかった。一方、陽性対照では、紫外線感受性各株の致死率が野生型株に比べ明らかに増加した。

以上の結果から、MEP 原体およびその代謝物はDNAに対して放射線様傷害作用を有しないと考えられた。

(12)MEP原体のマウスの胚培養細胞を用いた姉妹染色分体交換試験

(資料11-9)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1980年

検 体：MEP原体

純 度：

試験方法：ICR系マウス(妊娠15~16日目)の胎児より得た初代培養細胞とDMSOに溶解したMEP原体(終濃度： 10^{-5} 、 5×10^{-5} および 10^{-4} M)とを、ラット肝より調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下および非存在下で3時間処理した。その後、染色体標本を作製し、各群50個の分裂中期細胞を観察した。

用量設定根拠：

試験結果：

代謝活性化の有無	薬物	濃度(M)	姉妹染色分体交換の平均発現数/細胞
非活性化	DMSO(溶媒対照)	—	10.1
	MEP原体	10^{-5}	9.7
		5×10^{-5}	11.1
		10^{-4}	11.2
MNNG ⁽¹⁾ (陽性対照)	10^{-5}	22.5	
活性化	DMSO(溶媒対照)	—	10.0
	MEP原体	10^{-5}	10.1
		5×10^{-5}	10.9
		10^{-4}	10.7
3-MC ⁽²⁾ (陽性対照)	10^{-5}	21.2	

(1) *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

(2) 3-Methylcholanthrene

MEP原体投与群では、S-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの濃度においても姉妹染色分体交換の発現頻度の増加はみられなかった。一方、陽性対照として用いたMNNG(S-9 Mix非存在下)および3-MC(S-9 Mix存在下)では同発現頻度の著明な増加が認められた。

優性致死試験

(13)MEP原体のラットにおける優性致死試験

(資料 11-10)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1975年

検 体：MEP原体

純 度：

試験動物：SD系雄ラット(試験開始時12週齢)、1群雄11匹、雌176匹(22×8)

試験期間：5日間投与後8週間交配

試験方法：MEP原体をコーンオイルに溶解し、2、7および20mg/kg/日の投与量で雄ラットに5日間毎日経口投与した。最終投与直後から8週間にわたって、各雄を毎週新しい未経産成熟雌2匹と同居させ交配させた。陰栓を確認した雌は、その日を妊娠0日目として、雄から離れた。

尚、対照群にはコーンオイルを同様に投与し、陽性対照として用いたEMS(Ethylmethanesulfonate)200mg/kgはコーンオイルに溶解して1回腹腔内注射した。

試験項目：雄について中毒症状の発現を観察した。

雌は妊娠15日目に解剖し、黄体数、着床数、早期および後期死胚数、生存胎児数を測定し、妊娠率および優性致死率を次式により求めた。

$$\text{妊 娠 率} = \frac{\text{妊娠雌数}}{\text{交尾した雌の数}} \times 100 (\%)$$

$$\text{優性致死率} = \frac{\text{早期死胚数}}{\text{着 床 数}} \times 100 (\%)$$

試験結果：

中毒症状：MEP原体の20mg/kg/日群で3日目より、立毛、軽度の振顫が観察されたが、投与期間終了後においては行動に変化は認められなかった。

妊 娠 率：MEP原体の各群と対照群の間に試験期間中有意な差はみられなかった。EMS投与群では3週目に妊娠率の軽度の低下が認められた。

黄体数、着床数、死胚数など：MEP 原体各群に検体の投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。一方、EMS 群では、3 週目に黄体数の減少、2～3 週目に着床数の減少、2～4 週目に生存胎児数の減少と死胚数の増加が明らかな変化として認められた。

優性致死率：MEP 原体各群と対照群の間に試験期間中有意な差は認められなかった。一方、EMS 群では2～4 週目に優性致死率の著明な増加が認められた。

以上の結果から、MEP 原体はラットに対して優性致死作用がないと結論された。

項目	薬物	投与量 (mg/kg/日)	交 配 期 間 (週目)							
			1	2	3	4	5	6	7	8
妊 娠 率 (%)	コーンオイル (溶媒対照)		86.7	94.7	95.2	100	92.9	100	94.5	94.7
	MEP 原体	2	94.4	93.3	90.0	79.0	87.5	80.0	83.3	90.5
		7	100	100	100	82.4	93.8	95.2	100	95.5
		20	87.5	95.0	89.5	94.4	88.2	90.9	95.0	90.0
EMS (陽性対照)	200	90.9	86.7	63.2	90.0	100	100	100	95.0	
平 均 着 床 数	コーンオイル (溶媒対照)		12.1	12.5	12.0	12.3	12.1	12.5	13.3	13.4
	MEP 原体	2	12.4	12.9	12.3	12.9	12.5	13.6	12.1	13.1
		7	11.6	13.1	13.3*	13.8	12.9	11.9	11.6	12.9
		20	11.9	12.3	12.7	12.8	10.8	12.4	12.4	12.8
EMS (陽性対照)	200	11.9	7.2**	4.0**	11.2	13.4	13.3	13.3	13.8	
平 均 早 期 死 胚 数	コーンオイル (溶媒対照)		0.38	1.50	0.35	0.25	0.31	0.14	1.52	0.39
	MEP 原体	2	0.88	0.71	1.56	0.47	0.38	0.75*	0.53	0.42
		7	0.39	0.83	0.32	1.43	0.40	0.75*	0.32	0.48
		20	0.79	0.47	0.18	2.06	0.53	0.80*	0.84	0.33
EMS (陽性対照)	200	2.30*	5.15**	3.75**	5.00**	0.71	0.50	1.81	0.42	
優 性 致 死 率 (%)	コーンオイル (溶媒対照)		3.18	11.4	2.96	1.80	2.37	1.17	11.7	3.02
	MEP 原体	2	7.51	5.44	11.1	3.29	2.49	6.46	4.11	3.35
		7	5.42	6.17	2.44	9.57	3.31	10.2	4.86	3.96
		20	7.30	4.26	1.34	15.8	4.71	6.71	6.30	2.48
EMS (陽性対照)	200	18.5	77.9**	97.2**	54.5**	5.80	4.29	11.7	3.08	

* : p<0.05、** : p<0.01

(14)MEP原体のマウスにおける優性致死試験

(資料 11-10)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1975年

検 体：MEP原体

純 度：

試験動物：ICR-JCL系マウス(試験開始時12週齢)、1群雄12匹、雌288匹(36×8)

試験期間：5日間投与後8週間交配

試験方法：MEP原体をコーンオイルに溶解し、20および200mg/kg/日の投与量で雄マウスに5日間毎日経口投与した。最終投与直後から8週間にわたって、各雄を毎週新しい未經産成熟雌3匹と同居させ交配させた。膣栓を確認した雌は、その日を妊娠0日目として、雄から離れた。

尚、対照群にはコーンオイルを同様に投与し、陽性対照として用いたMMS(Methyl methanesulfonate)100mg/kgおよびEMS(Ethyl methanesulfonate)400mg/kgはコーンオイルに溶解して1回腹腔内注射した。

試験項目：雄について中毒症状の発現を観察した。

雌は妊娠13日目に解剖し、黄体数、着床数、早期および後期死胚数、生存胎児数を測定し、妊娠率および優性致死率を次式により求めた。

$$\text{妊 娠 率} = \frac{\text{妊娠雌数}}{\text{交尾した雌の数}} \times 100 (\%)$$

$$\text{優性致死率} = \frac{\text{早期死胚数}}{\text{着 床 数}} \times 100 (\%)$$

試験結果：

中毒症状：いずれの投与群においても中毒症状の発現は見られなかった。

妊 娠 率：MEP原体の各群と対照群の間に試験期間中有意な差はみられなかった。一方、MMSおよびEMS投与群では、いずれも2週目に著明な妊娠率の低下がみられた。

黄体数、着床数、死胚数など：MEP原体各群では特記すべき変化は認められなかった。一方、MMSおよびEMS群では、いずれも1～2週目に、黄体数、着床数、生存胎児数の

減少と死胚数の増加が著明に認められた。

優性致死率：試験期間中、MEP 原体の投与による優性致死率の増加は認められなかった。一方、MMS 群では1～2週目に、EMS 群では1～3週目に明らかな優性致死率の増加がみられた。

以上の結果から、MEP 原体はマウスに対して優性致死作用がないと結論された。

項目	薬物	投与量 (mg/kg/日)	交 配 期 間 (週目)							
			1	2	3	4	5	6	7	8
妊 娠 率 (%)	コーンオイル (溶媒対照)		97.1	97.1	97.1	91.7	97.1	94.3	86.2	96.8
	MEP 原体	20	94.2	100	100	91.7	100	88.9	86.2	90.0
		200	87.9	89.7	86.7	84.9	93.1	89.7	88.9	90.6
	陽性対照									
	MMS	100	82.4	38.2**	97.0	91.2	100	93.3	96.6	100
EMS	400	68.8	20.0**	97.1	91.4	94.1	91.4	83.9	100	
平 均 着 床 数	コーンオイル (溶媒対照)		12.7	12.2	12.6	11.7	12.4	13.2	11.8	11.3
	MEP 原体	20	12.4	11.9	12.3	11.2	12.0	12.8	12.0	12.0
		200	13.0	12.7	12.0	12.0	12.4	12.8	13.4*	12.1
	陽性対照									
	MMS	100	11.1*	8.5**	11.7	12.1	12.0	11.9	12.3	11.7
EMS	400	10.1**	6.3**	11.7	11.0	11.6	12.8	11.6	11.6	
平 均 早 期 死 胚 数	コーンオイル (溶媒対照)		0.59	0.35	0.48	0.36	0.56	0.88	0.24	0.37
	MEP 原体	20	0.30	0.44	0.41	0.42	0.39	0.11	0.44	0.37
		200	0.48	0.50	0.58	0.75	0.48	0.27**	0.50	0.45
	陽性対照									
	MMS	100	4.14**	3.00**	0.72	0.74	0.63	0.68	0.89*	0.43
EMS	400	2.77**	2.14*	1.06*	0.50	0.72	0.63	0.92*	0.71	
優 性 致 死 率 (%)	コーンオイル (溶媒対照)		5.45	5.59	3.99	2.98	4.76	6.64	2.23	2.93
	MEP 原体	20	3.24	4.29	3.92	4.45	3.41	2.93	3.40	2.91
		200	3.41	4.04	5.16	5.70	3.84	1.94**	3.42	3.77
	陽性対照									
	MMS	100	40.9**	47.3**	5.62	6.27*	5.29	5.97	7.13*	3.42
EMS	400	31.3**	39.3**	10.1**	4.80	5.73	4.79	7.15*	6.54	

* : p<0.05、** : p<0.01

(15) MEP 原体のチャイニーズハムスター細胞 (V79) を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 11-11)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検 体：MEP 原体

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター細胞 (V79) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) 存在下および非存在下で、6-チオグアニン存在下でのコロニー増殖を指標とするヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 遺伝子座の突然変異誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、S-9 Mix 存在下および非存在下ともに検体で 5 時間処理した。試験は 2 回行った。

[用量設定根拠]：

試験結果：結果を次頁の表に示す。S-9 Mix 非存在下において、1 回目試験では溶媒対照と比べ統計学的に有意な突然変異率の増加が散見されたが、用量依存性は認められず、さらに 2 回目試験では、突然変異率の増加の再現性は認められなかった。S-9 Mix 存在下では、1 回目試験の 10、300 μM において、統計学的に有意な突然変異率の増加が認められたが、用量依存性は認められず、2 回目試験の 300 μM において軽微な突然変異率の増加が認められたものの、いずれも対照群の背景値の範囲内 ($0.8-7.7 \times 10^{-6}$) の値であった。以上の結果より、S-9 Mix 存在下、非存在下ともに、突然変異率の増加に再現性や用量相関性は認められず、検体との関連性はないと考えられた。

一方、陽性対照物質である *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG、S-9 Mix 非存在下) および 9,10-ジメチル-1,2-ベンズアンスラセン (DMBA、S-9 Mix 存在下) は突然変異率の顕著な増加を誘発した。

以上の結果から、MEP 原体は代謝活性化を含む本試験条件下において、突然変異誘発性を有しないと判断された。

1 回目の試験結果

薬物	濃度 (μM)	S-9 Mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	コロニー形成率 ^{b)} (%)	突然変異率 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
溶媒対照 (DMSO)	0	—	100	105.6 \pm 9.7	1.6 \pm 2.2
MEP 原体	10	—	111	98.4 \pm 13.8	4.4 \pm 3.6*
	30	—	94	101.8 \pm 11.0	5.6 \pm 4.6**
	100	—	81	110.0 \pm 12.3	7.6 \pm 3.6**
	300#	—	66	114.0 \pm 11.6	6.4 \pm 4.9**
陽性対照 (MNNG)	3	—	86	76.5 \pm 5.5	1063.5 \pm 68.1**
溶媒対照 (DMSO)	0	+	100	112.6 \pm 12.8	3.3 \pm 2.6
MEP 原体	10	+	94	100.6 \pm 6.9	6.6 \pm 3.1*
	30	+	98	97.0 \pm 12.3	6.2 \pm 3.2
	100	+	87	82.2 \pm 9.8	6.5 \pm 5.5
	300#	+	64	101.4 \pm 7.9	7.2 \pm 4.0*
陽性対照 (DMBA)	30	+	85	106.2 \pm 10.6	178.0 \pm 23.4**

a) : 相対細胞生存率 = (コロニー数 / 溶媒対照群のコロニー数) \times 100、5 枚のプレートの平均値

b) : コロニー形成率 = (コロニー数 / 接種細胞数) \times 100、5 枚のプレートの平均値 \pm SD

c) : 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 / (接種細胞数 $3 \times 10^5 \times$ コロニー形成率)) \times 100、10 枚のプレートの平均値 \pm SD

MNNG : *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン

DMBA : 9, 10-ジメチル-1, 2-ベンズアンスラセン

: 検体の析出が認められた。

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (Kastenbaum と Bowman の方法)

2 回目の試験結果

薬物	濃度 (μM)	S-9 Mix の有無	相対細胞生存率 ^{a)} (%)	コロニー形成率 ^{b)} (%)	突然変異率 ^{c)} (×10 ⁻⁶)
溶媒対照 (DMSO)	0	-	100	75.0±8.5	4.9±3.9
				88.8±6.1	5.3±4.0
MEP 原体	10	-	89	88.6±12.1	5.3±3.6
	30	-	97	97.8±10.9	6.5±3.8
	100	-	80	89.6±10.8	5.6±4.7
	300#	-	70	80.0±7.7	8.3±6.5
陽性対照 (MNNG)	3	-	76	60.6±8.4	1234.3±69.9**
溶媒対照 (DMSO)	0	+	100	85.4±4.4	0.8±1.6
				97.0±6.0	2.7±2.2
MEP 原体	10	+	92	100.0±12.7	4.0±3.4
	30	+	89	92.6±8.2	3.2±4.0
	100	+	89	107.4±3.6	2.5±2.4
	300#	+	62	90.2±11.3	5.2±5.0*
陽性対照 (DMBA)	30	+	82	71.6±4.8	260.2±39.8**

a) : 相対細胞生存率 = (コロニー数 / 溶媒対照群のコロニー数) × 100、5 枚のプレートの平均値

b) : コロニー形成率 = (コロニー数 / 接種細胞数) × 100、5 枚のプレートの平均値 ± SD

c) : 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 / (接種細胞数 3 × 10⁵ × コロニー形成率)) × 100、10 枚のプレートの平均値 ± SD

MNNG : N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

DMBA : 9, 10-ジメチル-1, 2-ベンズアンスラセン

: 検体の析出が認められた。

* p < 0.05 ** p < 0.01 (Kastenbaum と Bowman の方法、溶媒対照群の 2 連の平均値と比較した)

(16) MEP 原体のラット初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

(資料 11-12)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：1988 年

検体：MEP 原体

検体純度：

試験方法：ラット初代培養肝細胞を用いて、*in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験を実施した。

肝細胞は 7 あるいは 8 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットから *in situ* コラゲナーゼ灌流により分離した。検体は DMSO に溶解し、0.24、1.2、6、30 および 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で ^3H -チミジン存在下、肝細胞に 20 時間処理した。細胞を低張処理後、酢酸：エタノール (1:3) で固定し、オートラジオグラフ用標本作製した。各スライド 50 個の肝細胞を観察した。核内総粒子数を計数し、核に隣接した核と同じ面積の細胞質 3 ヲ所の平均粒子数を差し引いて正味の核内粒子数を求めた。さらに正味の核内粒子数が 5 個以上の細胞 (修復細胞) の数を記録した。試験は 2 連制とし、2 回行った。

用量設定根拠：

結果：試験結果を次頁の表に示した。

最高用量の 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、顕著な細胞毒性のため生存細胞が認められなかった。30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の検体処理群では正味の核内粒子数および修復細胞の割合が溶媒対照群よりもやや増加した。しかし、0.24、1.2、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の検体処理群では正味の核内粒子数および修復細胞の割合は溶媒対照群と同レベルであった。

一方、陽性対照化合物である 2-アセチルアミノフルオレン (0.05 および 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は正味の核内粒子数および修復細胞の割合の顕著な増加を誘発した。

以上の結果から、本試験条件下において、検体はラット初代培養肝細胞に対して細胞毒性を示す用量において、不定期 DNA 合成の若干の増加を誘発すると結論した。

1 回目の試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	正味の核内粒子数 (平均値 \pm SD)	修復細胞の割合 ^{a)}
溶媒対照 (DMSO)	0	-6.93 \pm 2.77	2/100
MEP 原体	0.24	-5.87 \pm 0.46	6/100
	1.2	-7.83 \pm 1.02	3/100
	6	-7.85 \pm 1.24	2/100
	30	2.48 \pm 1.97 ^{b)}	31/100 ^{**c)}
	60 ^{d)}	- ^{e)}	- ^{e)}
陽性対照 (2-AAF)	0.05	14.24 \pm 0.22 ^{**b)}	95/100 ^{**c)}
	0.1	17.34 \pm 3.18 ^{**b)}	97/100 ^{**c)}

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (正味の核内粒子数 : 分散分析, 修復細胞の割合 : χ^2 検定)

a) 5 個以上の正味の核内粒子を有する細胞の割合

b) 申請者注 : 当該値の分散分析結果 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) は、生データに基づき申請者が記載した。

c) 申請者注 : 当該値の χ^2 検定結果 (** : $p < 0.01$) は、生データに基づき申請者が記載した。

d) 析出が認められた。

e) 細胞毒性のため十分な数の細胞が得られなかった。

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

2 回目試験の観察結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	正味の核内粒子数 (平均値 \pm SD)	修復細胞の割合 ^{a)}
溶媒対照 (DMSO)	0	-5.66 \pm 2.55	6/100
MEP 原体	0.24	-8.16 \pm 0.50	2/100
	1.2	-6.84 \pm 1.90	4/100
	6	-5.34 \pm 2.92	6/100
	30	3.58 \pm 1.56 ^{b)}	44/100 ^{**c)}
	60 ^{d)}	- ^{e)}	- ^{e)}
陽性対照 (2-AAF)	0.05	15.81 \pm 1.01 ^{**b)}	96/100 ^{**c)}
	0.1	20.15 \pm 2.38 ^{**b)}	99/100 ^{**c)}

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (正味の核内粒子数 : 分散分析, 修復細胞の割合 : χ^2 検定)

a) 5 個以上の正味の核内粒子を有する細胞の割合

b) 申請者注 : 当該値の分散分析結果 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) は、生データに基づき申請者が記載した。

c) 申請者注 : 当該値の χ^2 検定結果 (** : $p < 0.01$) は、生データに基づき申請者が記載した。

d) 析出が認められた。

e) 細胞毒性のため十分な数の細胞が得られなかった。

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

(17) MEP 原体のラット肝細胞を用いた in vivo/in vitro 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

(資料 11-13)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検体：MEP 原体

検体純度：

供試動物：Sprague-Dawley 系雄ラット (7 週齢、体重 255~322 g)、1 群 3 匹

試験方法：検体をコーンオイルに懸濁し、300 mg/kg で、強制単回経口投与した。なお、対照群にはコーンオイルのみを同様に投与した。

投与 3、12 および 24 時間後に、肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流した後に摘出して肝細胞を分離し、10%牛胎児血清を含むウィリアムズ E 培地 (WEM) 中で培養した。この肝細胞を ^3H -チミジンを含む WEM 中で 4 時間培養後、非標識チミジンを含む WEM 中で 18 時間培養した。細胞を酢酸:エタノール (1:3) で固定後、オートラジオグラフ用標本を作製した。各群 3 匹の動物について、それぞれ 50 個の肝細胞を観察した。核内総粒子数を計数し、核に隣接した核と同じ面積の細胞質 3 ヲ所の平均粒子数を差し引いて正味の核内粒子数を求めた。さらに正味の核内粒子数が 5 個以上の細胞 (修復細胞) の数を記録した。

用量設定根拠：

結果：試験結果を次表に示した。

検体投与群と溶媒対照群との間で正味の核内粒子数および修復細胞の割合に有意差は認められなかった。一方、陽性対照化合物の 2-アセチルアミノフルオレン (2AAF、50 mg/kg 強制経口投与) 投与群では正味の核内粒子数および修復細胞の割合の有意な増加が認められた。

観察結果

薬物	投与量 (mg/kg)	採取 時間 (hr)	観察 動物 数	細胞生存率 (%) (平均値±SD)	正味の核内粒 子数 (平均値±SD)	修復細胞 の割合 ^{a)}
溶媒対照 (コーンオイル)	- ^{b)}	12	3	71.4±0.4	0.30±0.74	13/150
MEP 原体	300	3	3	57.4±2.0**	-0.06±0.41	12/150
		12	3	58.8±4.4**	0.45±1.14	18/150
		24	3	67.8±19.9	-0.69±0.16	4/150
陽性対照 (2AAF)	50	12	3	67.9±8.6	19.20±0.90**	146/150**

** : $p < 0.01$ (細胞生存率: Student t 検定, 正味の核内粒子数: 分散分析, 修復細胞の割合: χ^2 検定)

a) 5 個以上の正味の核内粒子を有する細胞の割合

b) 5 mL/kg

2AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

結 論 : 以上の結果から、本試験条件下において、検体はラットの肝細胞に対して不定期 DNA 合成を誘発せず、DNA 損傷性を示さないと結論した。

12. 生体の機能に及ぼす影響

MEP原体の生体の機能に及ぼす影響に関する試験

(資料12)

試験機関：和歌山県立医科大学

報告書作成年：1972年

検 体：MEP原体、MEP-オキソン

急性毒性

供試動物：dd系マウス、体重約25g、1群雌雄各8匹

方 法：MEPはその1/4量の乳化剤Sorpoll200（以下Sorpollと略）を添加後生理食塩水で希釈し、乳化液として0.5mL/10g体重の割合で経口、皮下または腹腔内投与した。投与後72時間にわたって症状を観察した。

結 果：経口投与：自発運動の減少、呼吸促迫、呼吸困難、流涎、振戦、流涙を認め、雌雄とも936mg/kg以上の投与量で死亡を認めた。

皮下投与：自発運動の減少、流涎、挙尾、振戦、跳躍が認められた。死亡は雌雄とも2440mg/kg以上で発現した。

腹腔内投与：自発運動の減少、挙尾、跳躍、流涎、流涙、呼吸困難、チアノーゼが観察された。死亡は雌雄とも550mg/kg以上で認められた。

投与経路		経口	皮下	腹腔内
LD50 (mg/kg)	雄	1117	2832	597.7
	雌	1161	3542	583.7

角膜および結膜に対する作用

供試動物：雄ウサギ、体重2~3kg

方 法：MEPまたはMEP-オキソンにその1/4量の乳化剤Sorpollを添加後生理食塩水で希釈した。それぞれ0.1、1.0または10%のMEPまたはMEP-オキソン乳化液 0.2mLを結膜嚢に点眼し、角膜および結膜反射への影響、瞳孔径の変化などを2%コカインお

よび1%エゼリンと比較検討した。

結果：MEPでは10%液で一過性の催涙および結膜の充血を認めたのみで、角膜および結膜反射、瞳孔の形状には変化はなかった。

MEP-オキソンでは0.1%液で縮瞳を認め、1%以上の液ではさらに角膜および結膜反射は抑制され、または消失した。反射抑制作用は1%エゼリンのそれに比べて強いものであったが、2%コカインと比べると強さ、持続時間ともに軽微であった。また、10%液では催涙、結膜充血を認めた。

脳波、血圧、心電図及び脳局所循環に対する作用

供試動物：ネコ、体重2~4kg

ウサギ、体重2~3kg

方法：脳波、血圧、心電図及び脳局所循環に対する実験にはネコおよびウサギを雌雄の別なく使用し、同一個体について観察した。動物はd-tubocurarine 1.0~1.5 mg/kg (im) で不動化して人工呼吸を行い、東大脳研式脳定位固定装置に固定して実験を行った。脳波は皮質脳波（感覚野より誘導）、深部脳波（海馬回、扁桃核、脳幹網様体よりそれぞれ誘導）を測定した。

血圧は大腿動脈圧または頸動脈圧を測定し、心電図の撮影は第II誘導法によって行った。

頸動脈血流量はやや矩形波電磁血流計にて測定し、脳局所血流の測定は熱電対法に従って大脳皮質、海馬回および扁桃核の3ヶ所にて実施した。

MEP及びMEP-オキソンはその1/4量の乳化剤Sorpilを添加後生理食塩水で希釈し、乳化液として投与液量が0.1mL/kgとなるように静脈内投与した。

結果：(i)脳波に対する作用

MEP 1 mg/kg以下の投与量では変化はなく、2 mg/kgでは静脈内投与後15分頃より

30～60分持続する覚醒波が出現した。MEP-オキソンにおいては1 mg/kg以下では変化はなく、MEP同様2 mg/kgで覚醒波が出現したが、発現時間はMEPより早く、しかも皮質および海馬回において著明で60分以上持続した。MEPおよびMEP-オキソンによる覚醒波は、アトロピンの投与により直ちに消失した。

(ii) 血圧に対する作用

MEP 1～3 mg/kgの静脈内投与により、一過性の軽度の血圧下降が認められ、5 mg/kg以上の投与量では量的な相関を示す血圧下降が30～60分間持続した。10 mg/kg以上の投与においては、一過性の下降後上昇し再び下降する二相性の血圧変化を示すものがあった。MEP-オキソンでは0.3 mg/kg以下では変化はなく、0.5 mg/kg以上でMEPと同様の血圧変化を示したが、その強さはMEPの2～4倍強かった。MEPおよびMEP-オキソンによって出現した持続性の血圧下降はアトロピンおよび2-PAMによって拮抗された。

MEPおよびMEP-オキソンはノルアドレナリンの昇圧作用には影響を与えなかったが、アセチルコリンの降圧作用を増強し、明らかに作用持続時間が延長した。アセチルコリンの血圧作用に対する最大効果は、MEPよりもMEP-オキソンにおいてより短時間に発現した。

(iii) 心電図に対する作用

MEPおよびMEP-オキソンともに、脳波上明らかな作用を示す2 mg/kgの静脈内投与によっても心電図に対して影響はなかった。

(iv) 脳局所血流に対する作用

MEPは1 mg/kg以下の静脈内投与では影響を与えなかったが、2 mg/kgでは頸動脈血流

量および脳局所血流に増加がみられた。MEP-オキソン 2 mg/kgでも同様の変化が認められたが、作用発現はMEPよりも速やかであった。MEPおよびMEP-オキソンによるこれらの作用は、アトロピン、2-PAMによって拮抗された。

摘出心房および乳頭筋に対する作用

供試動物：雄モルモット、体重200～500g

方法：雄モルモットから摘出した心臓を用い、心房標本を作製した。また、乳頭筋標本の作製には同一心臓の右心室乳頭筋を用い、これに矩形波電気刺激(パルス幅 2 msec、強度 3～5 V、頻度 120/min)を加えた。実験はMagnus法に従って栄養液(95%O₂、5% CO₂ 飽和 Krebs-bicarbonate液、33°C)中で行い、心房および乳頭筋の収縮を記録した。

MEP及びMEP-オキソンはその1/4量の乳化剤Sorpolを添加後、生理食塩水で希釈したものを用い、その濃度は液槽内の最終濃度をモルで示した。

結果：(i)心房に対する作用

心房の収縮力および拍動数に対してMEP 10⁻⁶M以下の濃度では影響はなかったが、10⁻⁵M以上では20～30分後に最大に達する抑制作用を示し、その作用は洗浄操作によっても緩解しなかった。MEP-オキソンでは10⁻⁶M以下では影響はなく、10⁻⁵M以上においてMEPと同様に心房の収縮力および拍動数を抑制したが、その作用はMEPと異なり洗浄操作により消失した。MEPの心房に対する作用はアトロピン前処置により影響を受けず、2-PAM前処置により拮抗されたのに対し、MEP-オキシソンの作用はアトロピン、2-PAMいずれの前処置にも拮抗された。

ノルアドレナリンの心房作用に対し、MEPおよびMEP-オキソンは影響はなかったが、アセチルコリンの心房作用に対してはMEP-オキソンのみ増強効果を示した。

(ii) 乳頭筋に対する作用

MEP 10^{-6} M以下の濃度は乳頭筋の収縮に対して影響しなかったが、 10^{-5} M以上では乳頭筋の収縮を抑制した。その作用は緩やかに発現し、時間経過とともに増強された。

また、その抑制作用は洗浄操作によって回復しなかった。MEP-オキソンではMEPとほぼ同様の抑制作用を示したが、その作用は洗浄操作によって除去された。

アトロピンはMEPおよびMEP-オキシソンの作用に影響しなかったが、2-PAMは両者の作用に対して拮抗した。

摘出耳殻血管に対する作用

供試動物：雄ウサギ、体重2~3kg

方法：雄ウサギを用い、ヘパリン処理後屠殺し、de La Landeらの方法に従って摘出耳殻中心動脈灌流標本を作製した。灌流は栄養液（95%O₂、5%CO₂ 飽和Krebs-bicarbonate液、37℃）を1分間約5mlの割合で行い、灌流圧変化および血管の張力の変化を記録した。MEP及びMEP-オキソンはその1/4量の乳化剤Sorpilを添加後、生理食塩水で希釈し、 10^{-5} ~ 10^{-2} Mのものを調製した。それらを灌流液中に注入（動脈内壁より適用）または液槽内添加（動脈外壁より適用）し、その作用を検討した。

結果：MEPおよびMEP-オキソンはともに、 10^{-2} Mの高濃度液0.1mLを灌流液中に注入した場合および 10^{-3} Mの液を血管外に適用した場合のいずれにおいても、灌流圧に影響を与えなかった。また、ノルアドレナリン血管外適用による灌流圧上昇時に、MEPおよびMEP-オキソン 10^{-2} M 0.1mLを灌流液中に注入したが、ノルアドレナリンの作用には影響しなかった。

摘出腸管に対する作用

供試動物：雄ウサギ、体重2~3kg

モルモット、体重200~500g

方法：雄ウサギおよびモルモットから摘出した腸管を用い、Magnus法により栄養液(タイロード液、 O_2 飽和、 $37^\circ C$)中で実験を行った。MEP及びMEP-オキソンはSorpolを添加後、タイロード液で希釈したものをを用い、その濃度は液槽内の最終濃度をモルで示した。

結果：MEP $5 \times 10^{-6} M$ 以下の濃度では影響しなかったが、 $10^{-5} M$ 以上においてウサギ摘出腸管運動を抑制した。この作用は緩やかに発現し、洗浄操作によって容易に除去された。

MEP-オキソンでは $10^{-7} M$ 以下で影響しなかったが、 $5 \times 10^{-7} M$ で腸管運動の振幅は増大し、 $5 \times 10^{-6} M$ 以上では腸管収縮を惹起した。この収縮作用はアセチルコリンやエゼリンによる収縮と同様であり、アトロピンや2-PAMの適用によって拮抗された。また、洗浄操作によっても消失した。

ウサギ摘出腸管に対するアセチルコリンの収縮作用に対してMEPは抑制的に作用したが、MEP-オキソンは増強した。モルモット摘出腸管に対するヒスタミンおよびBa⁺⁺の収縮作用に対しMEPは明らかな抑制作用を示したのに対し、MEP-オキソンでは溶媒相当のSorpolと同程度の抑制作用を認めたのみであった。

神経筋接合部に対する作用

供試動物：SD系雄ラット、体重約200g

方法：雄ラットを用い、摘出横隔神経-横隔膜標本を作製し、Magnus法により栄養液(95% O_2 、5% CO_2 飽和 Krebs-bicarbonate液、 $35^\circ C$)中で実験を行った。神経および筋に対しては矩形波電気刺激(パルス幅0.1~1 msec、強度2~10V、頻度0.1/sec)を1分間隔で交互に行い、その刺激による横隔膜の収縮に対する検体の作用を調べた。MEP及びMEP-オキソンはその1/4量の乳化剤Sorpolを添加後、生理食塩水で希釈したものをを用い、その濃度は液槽内の最終濃度をモルで示した。

結果：MEPは 10^{-4} M以下の濃度では影響しなかった。MEPは、 5×10^{-4} Mの適用によって神経刺激による横隔膜収縮を抑制したが、筋直接刺激による収縮にはほとんど影響しなかった。この抑制作用はアトロピンや2-PAMによって拮抗されなかった。

MEP-オキソンにおいては、 10^{-6} M以下で影響しなかったが、 5×10^{-6} M以上において、神経刺激収縮を増強し、 10^{-4} Mの高濃度では一過性の増強後、抑制する二相性の作用を示した。2-PAMは増強作用にのみ拮抗したが、アトロピンでは影響を与えなかった。一方、筋直接刺激収縮に対してMEP-オキソンは影響を示さなかった。MEP-オキシソンのこれらの作用は、エゼリンの作用に類似のものであった。

以上のように、MEPの脳波および血圧作用等その生体作用はMEP-オキシソンのそれと類似し、アトロピンや2-PAMで拮抗され、また、アセチルコリンの作用を増強し、さらにはこれら作用発現の遅速等その生体作用発現におけるコリンエステラーゼ阻害作用の関与が推定される。一方、摘出臓器に対しては、MEPの作用は必ずしもMEP-オキソンと同一ではなく、MEPの直接作用も認められた。

MEP原体の「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目		動物種	投与経路 (溶媒)	適用量および 例数	作用量	無作用量	結果の概要
急性毒性	症状観察 (72時間) LD50値算出	マウス	P.O. (Sorpil 1200)	800, 936, 1095, 1281, 1499 (mg/kg) 雌雄各 8 匹/群	800 (mg/kg)	—	自発運動の減少、呼吸促進、呼吸困難、流涎、振顫、流涙 936mg/kg以上で死亡 LD50(mg/kg): ♂1117, ♀1161
			S.C. (Sorpil 1200)	2000, 2440, 2977, 3632, 4431, 5405 (mg/kg) 雌雄各 8 匹/群	2000 (mg/kg)	—	自発運動の減少、流涎、拳尾、振顫、跳躍 2440 mg/kg以上で死亡 LD50(mg/kg): ♂2832, ♀3542
			I.P. (Sorpil 1200)	500, 550, 605, 666, 732 (mg/kg) 雌雄各 8 匹/群	500 (mg/kg)	—	自発運動の減少、拳尾、跳躍、流涎、流涙、呼吸困難、771- 550mg/kg以上で死亡 LD50(mg/kg): ♂597.7, ♀583.7
角膜および結膜に対する作用	角膜および結膜反射の有無、瞳孔径測定	ウサギ	点眼 (Sorpil 1200)	0.1, 1, 10 (%)	MEP 10 MEPネリン 0.1 (%)	MEP 1.0 MEPネリン — (%)	MEP:10%液で催涙および結膜充血 MEP-ネリン: 0.1%液で縮瞳、1%以上で角膜および結膜反射抑制、10%液で催涙、結膜充血
脳波	皮質脳波(感覚野より誘導)、深部脳波(海馬回、扁桃核、脳幹網様体より誘導)を測定	ネコ ウサギ	I.V. (Sorpil 1200)	≤1, 2mg/kg	MEP 2 MEPネリン 2 (mg/kg)	MEP 1 MEPネリン 1 (mg/kg)	MEPおよびMEP-ネリン2mg/kgで覚醒波出現 覚醒波は771-の投与により消失
血圧	大腿動脈圧又は頸動脈圧を測定 直接作用 771-、2-PAM、NA、Achとの相互作用	ネコ ウサギ	I.V. (Sorpil 1200)	MEP:1~3, 5~10, 20mg/kg MEPネリン:0.1~0.3, 0.5, 1, 5mg/kg	MEP 1 MEPネリン 0.5 (mg/kg)	MEP - MEPネリン 0.3(mg/kg)	MEP:1~3mg/kgで軽度血圧下降、5mg/kg以上では用量に相関した血圧下降、10mg/kg以上では二相性変化 MEP-ネリン:0.5mg/kg以上で血圧下降 MEPおよびMEP-ネリンによる持続性血圧下降は771-および2-PAMで拮抗された。MEPおよびMEP-ネリンはAchの降圧作用を増強 NAの昇圧作用に影響なし
心電図	第II誘導	ネコ ウサギ	I.V. (Sorpil 1200)	≤2mg/kg	MEP - MEPネリン —	MEP 2 MEPネリン 2 (mg/kg)	影響なし
脳局所血流	頸動脈血流量は矩形波電磁血流計で、脳局所血流の測定は熱電対法に従って測定	ネコ ウサギ	I.V. (Sorpil 1200)	≤1, 2mg/kg	MEP 2 MEPネリン 2 (mg/kg)	MEP 1 MEPネリン 1 (mg/kg)	MEPおよびMEP-ネリンともに2mg/kgで頸動脈血流量および脳局所血流が増加。これらの作用は、771-および2-PAMで拮抗された。

試験項目		動物種	投与経路 (溶媒)	適用量および 例数	作用量	無作用量	結果の概要
摘出心房	マグ双法：直接作用 アトピン、2-PAM、NA、AChとの相互作用	モルモット	in vitro (Sorpel 1200)	MEP: $\leq 10^{-6} \sim 10^{-4}$ (M) MEPオキソ: $\leq 10^{-6} \sim 10^{-3}$ (M) アトピン、2-PAM前処置: MEP: 3.2×10^{-5} (M) MEPオキソ: 10^{-4} (M) NA, ACh相互作用 MEP: 10^{-5} (M) MEPオキソ: 10^{-5} (M)	MEP 10^{-5} MEPオキソ 10^{-5} (M)	MEP 10^{-6} MEPオキソ 10^{-6} (M)	MEP: 10^{-5} M以上で収縮および拍動数抑制。アトピン前処置の影響はなく、2-PAM前処置で拮抗された。NA、ACh作用には影響なし。 MEPオキソ: 10^{-5} M以上で収縮および拍動数抑制。アトピン、2-PAM前処置で拮抗されたAChの陰性変力作用及び陰性変時作用を増強。NA作用には影響なし。
摘出乳頭筋	マグ双法：矩形波電気刺激による収縮直接作用 アトピン、2-PAMとの相互作用	モルモット	in vitro (Sorpel 1200)	MEP: $\leq 10^{-6} \sim 3.3 \times 10^{-4}$ (M) MEPオキソ: $\leq 10^{-6} \sim 10^{-3}$ (M)	MEP 10^{-5} MEPオキソ 10^{-5} (M)	MEP 10^{-6} MEPオキソ 10^{-6} (M)	MEPおよびMEPオキソ共に 10^{-5} M以上で収縮抑制。アトピン前処置の影響はなく、2-PAM前処置で拮抗された。
摘出耳殻血管	摘出耳殻中心動脈灌流標本を用い、灌流圧および血管張力の変化を記録。 直接作用 NAとの相互作用	ウサギ	in vitro (Sorpel 1200)	$10^{-5} \sim 10^{-2}$ (M)	—	内壁適用: 10^{-2} (M) 外壁適用: 10^{-3} (M)	影響なし
摘出腸管	マグ双法：直接作用 AChとの相互作用	ウサギ	in vitro (Sorpel 1200)	MEP: $\leq 5 \times 10^{-6} \sim 10^{-3}$ (M) MEPオキソ: $\leq 10^{-7} \sim 10^{-3}$ (M) ACh相互作用 MEP: 5×10^{-3} (M) MEPオキソ: 5×10^{-6} (M)	MEP 10^{-6} MEPオキソ 5×10^{-7} (M)	MEP 5×10^{-6} MEPオキソ 10^{-7} (M)	MEP: 10^{-5} M以上で腸管運動を抑制。ACh収縮を抑制。 MEPオキソ: 5×10^{-7} M以上で振幅増大、 5×10^{-6} M以上で腸管収縮を惹起。この収縮はアトピン、2-PAMで拮抗された。ACh収縮を増強。
摘出腸管	マグ双法: His、Ba ²⁺ との相互作用	モルモット	in vitro (Sorpel 1200)	MEP: $\leq 5 \times 10^{-6} \sim 10^{-4}$ (M) MEPオキソ: 10^{-4} (M)	MEP 10^{-5} (M) MEPオキソ —	MEP 5×10^{-6} MEPオキソ 10^{-4} (M)	MEP: His、Ba ²⁺ 収縮を抑制 MEPオキソ: 影響なし
神経筋接合部	マグ双法：横隔膜筋、横隔神経の電気刺激による収縮に対する作用	ラット	in vitro (Sorpel 1200)	MEP: $\leq 10^{-4}$ 、 5×10^{-4} (M) MEPオキソ: $\leq 10^{-6} \sim 10^{-1}$ (M)	MEP 5×10^{-4} MEPオキソ 5×10^{-6} (M)	MEP 10^{-4} MEPオキソ 10^{-6} (M)	MEP: 5×10^{-4} M以上で神経刺激収縮を抑制。 MEPオキソ: 5×10^{-6} M以上で神経刺激収縮を増強。 10^{-1} Mで増強後、抑制。 増強作用は2-PAMで拮抗された。

13. 解毒および治療

(1) マウス、ラットにおける MEP 急性中毒に対するアトロピンおよび 2-PAM の解毒効果

(資料 13-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1974 年

検 体：MEP 原体

硫酸アトロピン（市販品；E.Merck）

2-PAM（製剤用原末；住友化学）

検体の純度：

供試動物：dd 系雄マウス、6 週齢、1 群 8~10 匹

SD 系雄ラット、6 週齢、1 群 10 匹

方 法：[実験 I] 10%Tween-80 水溶液に懸濁した MEP を雄マウスに経口投与し、72 時間観察した。アトロピンおよび 2-PAM は、それぞれ単独もしくは併用して MEP 経口投与直後に腹腔内投与した。解毒剤無処置の対照群には生理食塩水を同様に投与した。

LD₅₀ 値は Litchfield & Wilcoxon の方法で計算し、対照群における LD₅₀ 値と解毒剤投与群のそれとの比を求めた。

[実験 II] 10%Tween-80 水溶液に懸濁した MEP の中毒量 (200mg/kg) または致死量 (800mg/kg) を雄ラットに経口投与し、直後にアトロピン（皮下投与） および 2-PAM（腹腔内投与）を単独もしくは併用して処置し、中毒症状および生死を 24 時間観察した。

結 果：

[実験 I] MEP の経口投与を行ったマウスにおけるアトロピンおよび 2-PAM の解毒効果

解毒剤# 投与量 (mg/kg)		MEP	
アトロピン (腹腔内)	2-PAM (腹腔内)	LD ₅₀ (mg/kg)	LD ₅₀ 値の比
0	0	970	1
25	0	1280*	1.32
50	0	1440**	1.48
0	50	1090	1.13
25	50	1360**	1.40

#MEP 投与後すぐに投与。

* : p<0.05, ** : p<0.01

〔実験Ⅱ〕 MEP の経口投与を行ったラットにおけるアトロピンおよび 2-PAM の解毒効果

MEP 投与量 (mg/kg) (経口)	解毒剤 ^(a) 投与量 (mg/kg)		動物数	中毒症状 ^(b)				生存率 (%)	
	アトロピン (皮下)	2-PAM (腹腔内)		振戦	流涎	運動失調	その他の 症状 ^(c)	4 時間後	24 時間後
200	0	0	10	+++	++	++	++	100	90
200	10	0	10	±	-	-	-	100	100
200	25	0	10	±	-	-	-	100	100
200	0	50	10	++	++	+	++	100	100
200	10	50	10	±	-	-	-	100	90
800	0	0	10	+++	+++	+++	+++	50	10
800	10	0	10	+	-	-~±	-	100	30
800	25	0	10	+	-	-~±	-	100	20
800	50	0	10	+	-	-~±	-	100	20
800	0	50	10	++	+++	+	++	100	0
800	0	100	10	++	+++	+	++	100	0
800	25	50	10	+	-	-	-	100	30

(a) MEP 投与後すぐに投与。

(b) 中毒症状は MEP 投与後 4 時間に観察された。

- : 正常 ± : ごく軽度 + : 軽度 ++ : 中等度 +++ : 重度

(c) 流涎、眼球突出、立毛、呼吸困難

マウス（実験Ⅰ）においては、それぞれの解毒剤の単独あるいは併用投与によって LD₅₀ 値が 1.13~1.48 倍まで上昇した。また、無処置対照群（MEP 投与のみ）では投与後 1~4 時間に死亡を認めたのに対し、2-PAM あるいはアトロピン処置によってそれぞれ 3~24、4~48 時間まで生存時間が延長し、明らかな延命効果が認められた。アトロピンは腺分泌亢進症状（流涎、流涙）の緩解に有効であった。

ラット（実験Ⅱ）においても、アトロピン処置によって MEP による中毒症状は緩解し、生存率の増加にも効果があった。2-PAM では中毒症状の緩解が軽度に認められ、生存時間の延長が観察されたが、24 時間後の生存率に対してはあまり効果がなかった。

これらの実験においては、アトロピン、2-PAM の有用な併用効果は認められなかった。

(2) ウサギにおける MEP 急性中毒に対する 2-PAM およびアトロピンの解毒効果

(資料 13-2)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1986 年

検体：MEP 原体

硫酸アトロピン（市販品；和光純薬）

2-PAM（パム注射液住友®；住友製薬）

検体の純度：

供試動物：日本在来白色種雄ウサギ、体重 2～3 kg、1 群 2～7 匹

方法および結果：

〔実験 I〕 2-PAM およびアトロピンの中毒症状および死亡率に対する効果

10% Tween-80 液に懸濁した MEP の完全致死量 30mg/kg 又は 40mg/kg(静脈内注射による LD₅₀ は 20.5mg/kg)をウサギの側の耳静脈内に注射し、5 分後又は 15～20 分後に 2-PAM(2.5%注射液)またはアトロピン(生理食塩水に溶解)あるいは両者を併用して他側の耳静脈内に注射した。

結果を表 1 に示す。2-PAM の単独処置は処置時間が早いほど効果は大きく、2-PAM とアトロピンとの併用効果も明らかに認められた。

表 1 ウサギにおける MEP 中毒に対する 2-PAM およびアトロピンの解毒効果 (実験 I)

MEP 投与量 (mg/kg) (静脈内)	解毒剤投与量 (mg/kg)		MEP 投与後の解毒剤の処置時間		中毒症状 a)			生存率 b) (%)
	2-PAM (静脈内)	アトロピン (静脈内)	2-PAM	アトロピン	流涎	縮腫	筋攣縮	
30	0	0	—	—	+++	+++	+++	0
30	100	0	5	—	—	—	—	100
30	0	5	—	15	—	—	++	100
30	100	0	15～20	—	++	++	—	57
30	100	5	20	15	—	—	—	100
40 ^{c)}	100	0	5	—	+	—	—	0

a) —：正常 +：軽度 ++：中等度 +++：重度

b) MEP 30mg/kg 静脈内注射により、強い中毒症状を発現し、30 分以内に全例死亡した。

c) MEP 40mg/kg 静脈内注射直後に痙攣等の強い中毒症状を発現し、痙攣消失の 5 分後に 2-PAM を処置したが 10～15 分後に全例 (2 例) 死亡した。

【実験Ⅱ】 2-PAMのコリンエステラーゼ賦活効果

実験Ⅰと同様に MEP 30mg/kg をウサギの耳静脈内に注射し、5分後にアトロピン 5mg/kg 又は 2-PAM100mg/kg をそれぞれ1回、ならびに5分後にアトロピン 5mg/kg を1回静脈内注射した後 MEP 投与 30分後から1時間ごとに 2-PAM50mg/kg を5回反復投与した時の血漿および血球コリンエステラーゼ活性を経時的に測定した。結果を図1および図2に示す。2-PAM1回処置に比べ、アトロピン処置下、2-PAM反復処置の方が血漿および血球コリンエステラーゼ活性の回復は速やかであり、2-PAM をくり返し投与する方が1回投与よりも MEP 中毒において阻害されたコリンエステラーゼの賦活により有効であることが示唆された。

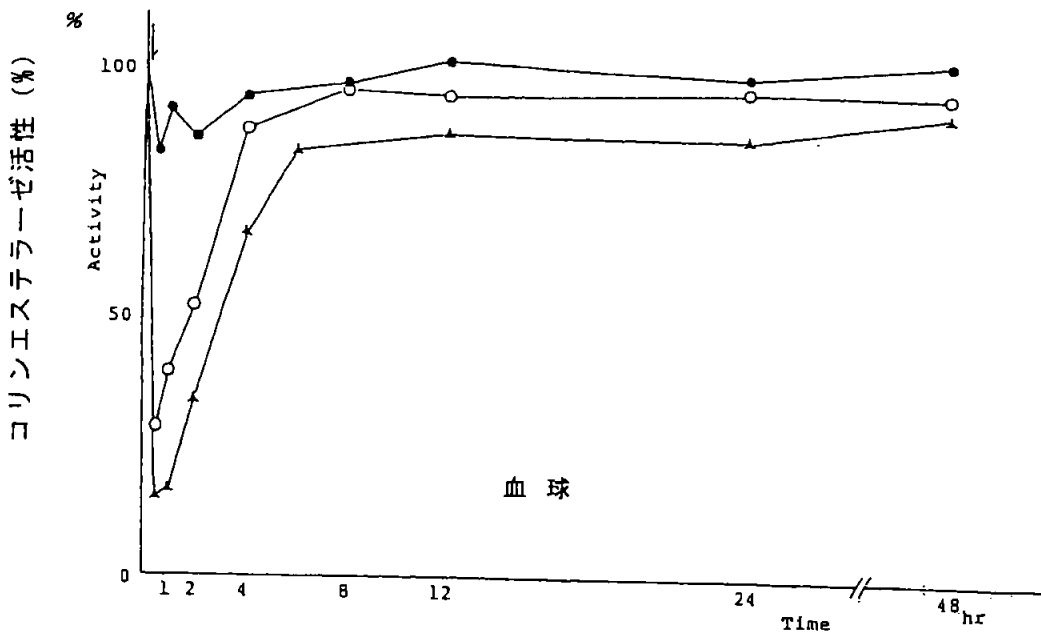
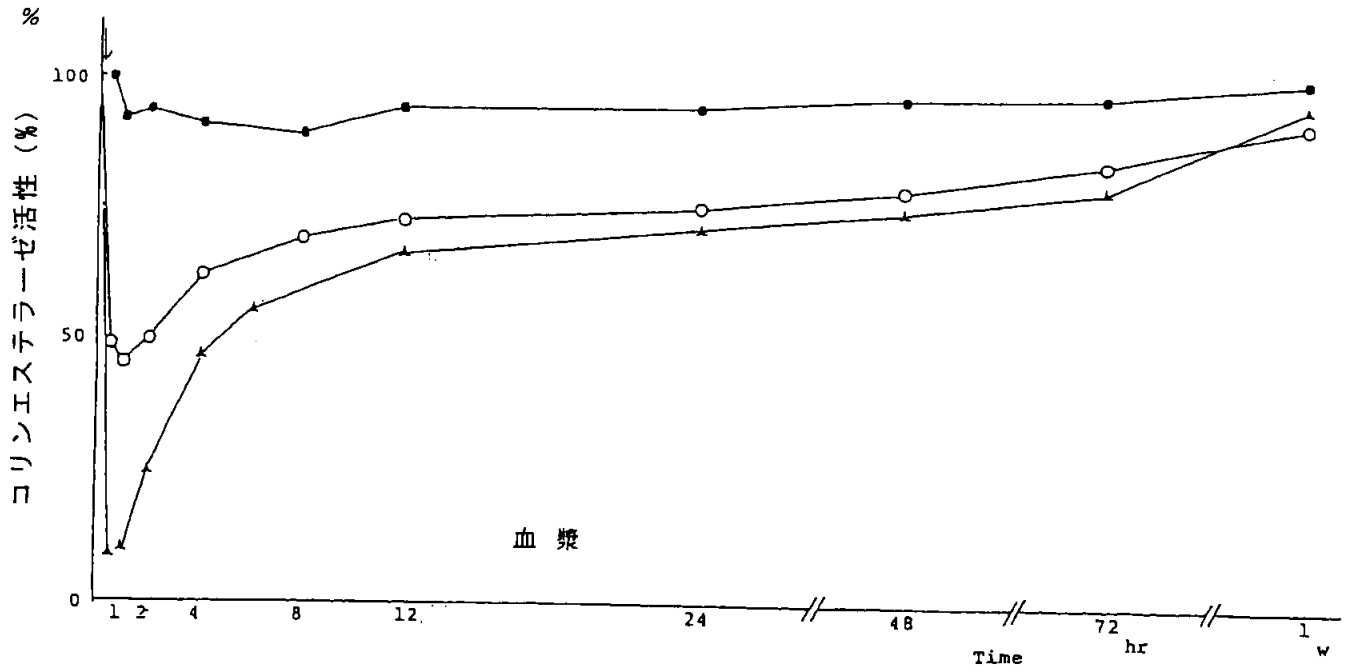


図1. MEP 静脈内投与後のウサギ血漿および血球コリンエステラーゼ活性に対する2-PAMの効果(実験Ⅱ)

- 対照群
- ▲—▲ MEP (30 mg/kg) + アトロピン (5 mg/kg, 静脈内投与)
- MEP (30 mg/kg) + 2-PAM (100 mg/kg, 静脈内投与)
- ↓ 2-PAM 処置 (MEP 投与5分後)

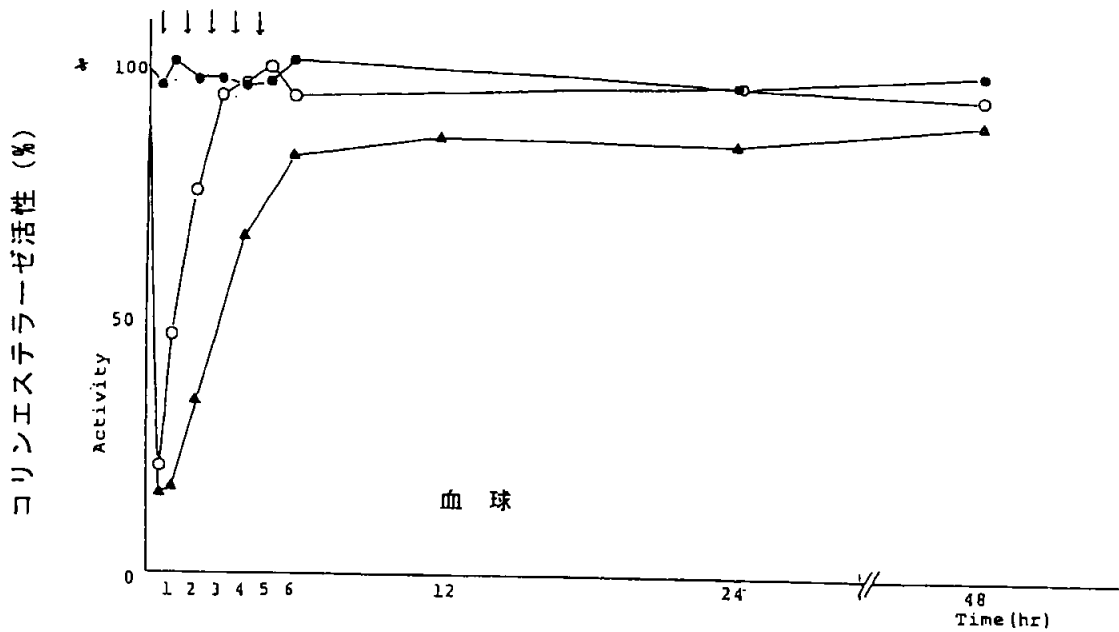
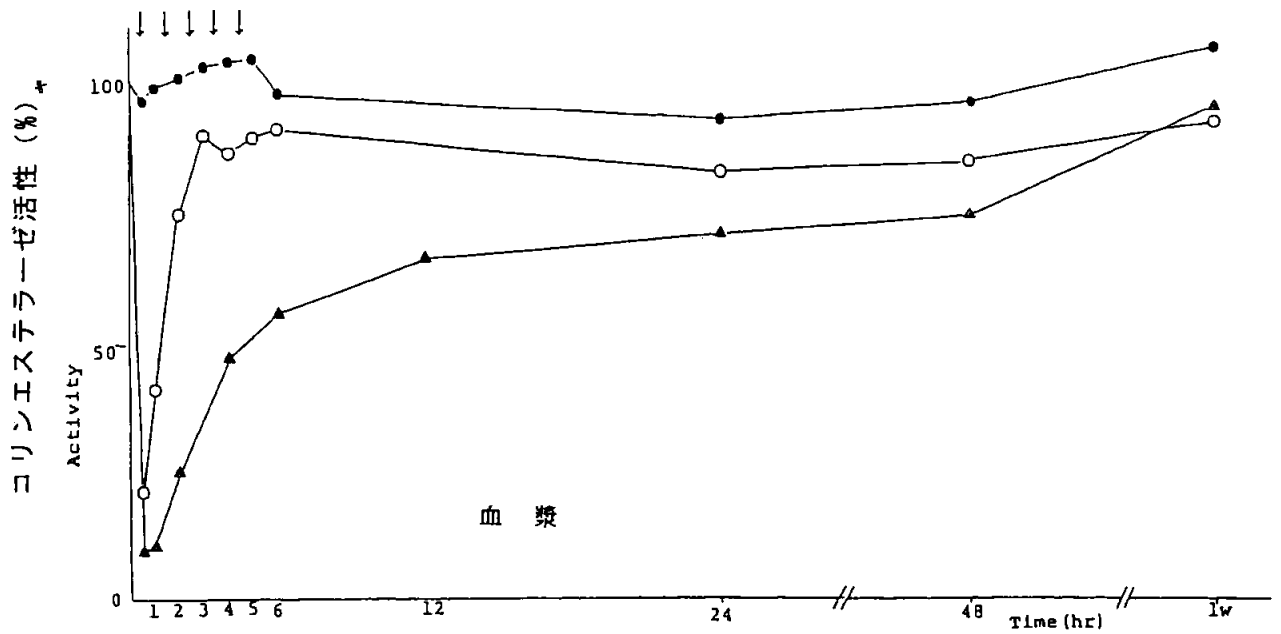


図2. MEP静脈内投与後のウサギ血漿および血球コリンエステラーゼ活性に対する2-PAMの効果(実験Ⅱ)

- 対照群
- ▲—▲ MEP (30mg/kg)
- MEP (30mg/kg) + 2-PAM (50mg/kg, 静脈内投与) × 5回

↓ 2-PAM処置
 ※いずれのウサギにも, MEP投与5分後にアトロピン(5mg/kg)を静脈内投与した。

14. 補足試験

15. 参考試験

