

## イヌにおける慢性経口毒性試験

(毒性資料 No. 20)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1997年10月3日

検体の純度 : %  
試験動物 : ビーグル犬, 1群雌雄各4匹  
試験開始時 : 6ヵ月齢以下  
試験期間 : 1996年4月～1997年4月 (投与期間 ; 1年間)

### 【投与方法】

検体を0(対照群)、20、40、200、750ppmとなるように均質に飼料(1%コーン油と少量のアセトン添加)に混ぜ1年間投与した。飼料及び水は自由に摂取させた。検体を添加した飼料は、1週間に1回調製した。

投与用量設定の根拠 ;

### 【試験項目及び結果】

#### 1) 臨床症状

全動物の外観と行動を毎日数回観察した

全投与群で検体に起因した影響は認められなかった。

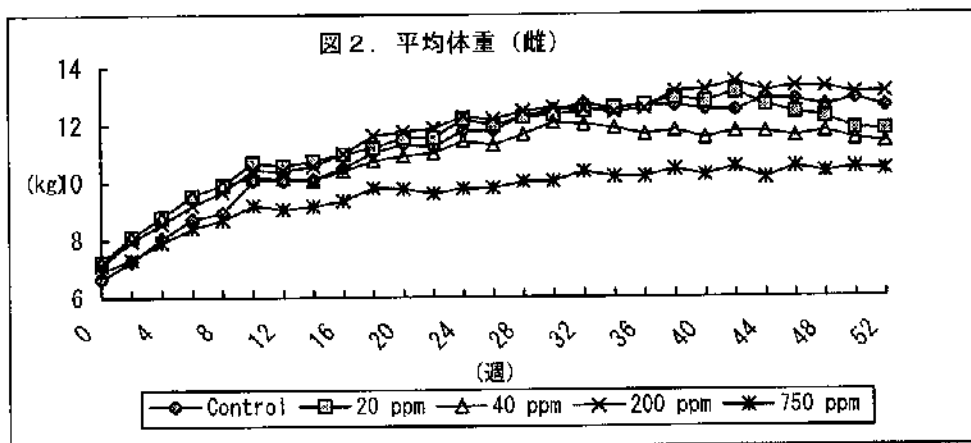
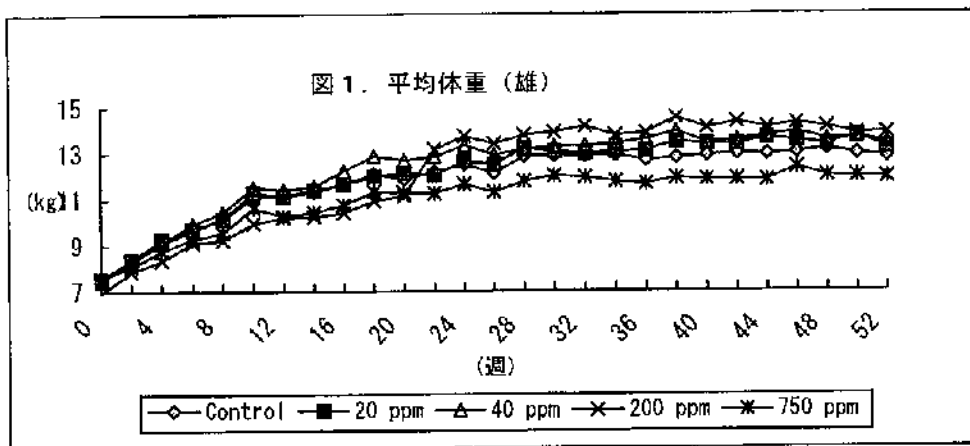
#### 2) 死亡率

1年間の試験期間中、全動物が生存し、死亡例は認められなかった。ただし、200ppm群の雄の1匹が試験途中で進行性消瘦と全身状態悪化のために投与開始後146日に切迫殺された。剖検では幽門狭窄と脳室の拡張がみられ、先天性の異常であったと思われた。

#### 3) 体重変化 (図1, 図2)

週に1回体重を測定した。

体重増加は750ppm群の雌雄で有意に低下し、検体の作用によるものと考えられた。



#### 4) 摂餌量及び検体摂取量

毎日、摂餌量を測定した。平均摂餌量は週毎に集計して比較した。

摂餌量について、750ppm 群の雄で有意に減少し、雌でも同じ傾向であった。

投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与用量 (ppm)		20	40	200	750
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	0.55	1.12	5.35	24.32
	雌	0.52	1.14	5.50	24.74

#### 5) 眼科学的検査

全動物について、動物の試験開始前、投与後 6 ヶ月及び実験終了直前に結膜、瞳孔反射、角膜、眼房水、水晶体、硝子体液、網膜、脈絡膜、神経円板、眼底の観察を行った。これらの検査に加え眼内圧及び角膜の厚みについて、動物の試験開始前及び実験終了直前に測定した。

その結果、どの検査時においても、検体に起因する所見は認められなかった。

#### 6) 臨床神経学的検査

各動物の一般行動、体位反応、歩行、脳神経反射、脊髄反射の神経学的検査に加えて胸部聴診と直腸温について、試験開始前と投与終了時に測定した。

どの検査時においても、検体に起因する所見は認められなかった。

#### 7) 心電図及び血圧

各動物のP波、R波、QRS時間について第II誘導により試験開始前と投与終了時に測定した。

どの検査時においても、検体に起因する所見は認められなかった。

#### 8) 血液生化学的検査

試験開始前（2日と9日）、投与後3、6、9、12ヵ月に全動物について、橈側皮静脈より血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、クレアチンキナーゼ (CK)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、総ビリルビン、コレステロール、血糖、クロリド、クレアチニン、カルシウム、カリウム、ナトリウム、リン、トリグリセリド、尿素、尿酸、総蛋白質、アルブミン、グロブリン、胆汁酸、トリヨードサイロニン (T3)、サイロキシシン (T4)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)。

750ppm 群では肝機能に関連する ALAT (雄: 9、12ヵ月、雌: 全検査時)、ALP (雌雄: 全検査時)、GGT (雄: 9ヵ月、雌: 全検査時) の有意な増加が認められた。200ppm 群においても同様に ALP (雌雄: 全検査時)、ALAT (雌: 全検査時)、GGT (雌: 6ヵ月) の有意な増加がみられた。さらに、40ppm 群では ALP (雌: 6、9、12ヵ月) の有意な増加がみられた。これらの変化は、直接・間接的に肝臓の代謝機能の変化や、後述の胆のう上皮の病変<sup>1)</sup>に関連しているものと考えられた。75ppm 群ではこれらの変化は認められなかった。

---

<sup>1)</sup>: 申請者による追記

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

有意差の認められた所見

検査月	3				6				9				12				
投与量	20	40	200	750	20	40	200	750	20	40	200	750	20	40	200	750	
—雄—																	
K	↑110	↑102		↑106	↑106	↑102	↑109	↑109									
ALP			↑282	↑446			↑257	↑550			↑240	↑738			↑270	↑752	
コレステロール								↓80									
ALAT											↑202					↑189	
GGT											↑166		↓62				
総蛋白質								↓90								↓90	
γGPT								↓79				↓84				↓80	
T4																↑212	
T3																↑137	
TSH											↑326					↑137	
—雌—																	
Na			↑102	↑101													
尿酸		↑150															
クレアチニン											↓85						
ALAT			↑215	↑266			↑210	↑214			↑227	↑363			↑374	↑262	
GGT				↑183			↑128	↑185				↑214				↑185	
ALP			↑118	↑483			↑157	↑214	↑182		↑200	↑381	↑1579		↑185	↑398	↑1564
総蛋白質								↓87			↓93	↓87				↓86	
γGPT			↓92	↓84			↓88	↓73			↓89	↓79			↓90	↓71	
カルシウム			↓92	↓95								↓94				↓93	

表中の値は、対照群に対する変動率(%)、  
 ↓↑: P < 0.05 で有意 (ANOVA + Student t-検定)

750ppm群でアルブミン(雄: 6、9、12ヵ月、雌: 全検査時)、総蛋白質(雄: 6、12ヵ月、雌: 6、9、12ヵ月)の有意な減少がみられた。200ppm群でアルブミン(雌: 全検査時)の減少がみられた。

カルシウムの低下は750ppm群の雌(3、9、12ヵ月)と200ppm群の雌(3ヵ月)にみられた。この低カルシウム血症は低アルブミン血症を示すイヌでの報告例\*があることから、血清アルブミンの減少による二次的な変化と推察された。

\*Veterinary Laboratory Medicine, second Ed. 1986  
 Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Fourth ed., 1989

T3 と T4 は 750ppm 群の雄の 12 ヶ月の検査で有意に増加した。これらホルモンの増加は、もともと測定値自体の変動が大きいこと、投与前値が比較的高かったことから、検体の投与によるものかどうか明確ではなかった。

一方、イヌの亜急性毒性試験では甲状腺ホルモンの低下がみられ、肝臓の薬物代謝酵素の誘導により排泄が促進されたことによる低下と考察された。また、別試験(毒性資料 No. 20-1)において、肝薬物代謝酵素、特に UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼが誘導されていることから、本試験において T3、T4 は亜急性毒性試験(毒性資料 No. 15)の場合と同様に一時的に低下したものの、その後 TSH の増加を伴って増加傾向を示した可能性が考えられた<sup>注)</sup>。

カリウムの有意な増加が 3、6 ヶ月の検査時に全投与群(3 ヶ月時の 200ppm 群を除く)の雄でみられたが、投与量との一定した関連はみられなかったことから、検体の影響とは考えられなかった。

その他の全ての項目については検体に関連のある所見は認められなかった。

#### 9) コリンエステラーゼ活性

血漿と赤血球コリンエステラーゼの測定は試験開始前、投与後 3、6、9、12 ヶ月に、脳コリンエステラーゼの測定は試験終了時に行われた。

いずれの時期のいずれのコリンエステラーゼ活性にも有意な阻害は認められなかった。

#### 10) 肝臓中の酵素活性

剖検時、肝臓の一部を切除し、O-デメチラーゼ(基質 4-ニトロアニソール)、N-デメチラーゼ(基質 アミノピリン)、チトクローム P450 の測定を全動物について行った。

N-デメチラーゼ、O-デメチラーゼは全投与群の雌雄とも有意に増加した。チトクローム P450 は 200ppm と 750ppm 群の雌雄と 40ppm 群の雌で有意に増加した。これらの所見から、検体が肝臓の薬物代謝酵素を誘導するものと考えられた。20ppm でも肝薬物代謝酵素が誘導されたが、肝障害逸脱酵素や、後述の重量の変化や病理組織学的所見を伴わなかったことから、この群での酵素誘導は毒作用というよりも生体外異物に対する生理学的反応と考えられた。また別試験(毒性資料 No. 20-1)において、検体投与によって誘導された肝薬物代謝酵素は投与を中止することによって、完全に回復することも確認されている<sup>注)</sup>。

注) 申請者による追記

有意差の認められた所見

投与量 (ppm)	N-デメチラーゼ	O-デメチラーゼ	チトクローム P450
—雄—			
20	↑ 308	↑ 194	
40	↑ 270	↑ 211	
200	↑ 562	↑ 394	↑ 218
750	↑ 818	↑ 464	↑ 186
—雌—			
20	↑ 195	↑ 175	
40	↑ 349	↑ 268	↑ 255
200	↑ 482	↑ 368	↑ 558
750	↑ 638	↑ 372	↑ 572

表中の値は、対照群に対する変動率(%)、  
↑ : P < 0.05 で有意 (ANOVA + Student t-検定)

11) 血液学的検査

試験開始前(2日と9日)、投与後3、6、9、12ヵ月に血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

白血球、赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、網状赤血球、血小板、赤血球形態、白血球百分率。

血小板数の有意な増加は全投与群の雄でみられた。750ppm 群の雌雄の変化は時間の経過とともに徐々に増加傾向を示したので、検体に起因した変化と考えられた。しかし、その他の群の変化は用量相関性がないこと、一部の時点でしか変化が認められなかったことから、検体に起因したものとは考えられなかった。

200ppm と 750ppm 群の雄の白血球分画の検査で分葉核好中球(3、6、12 [750ppm を除く]ヵ月)の比率の有意な減少がみられた。そして、200ppm と 750ppm 群の雄のリンパ球(6、12ヵ月)の比率の有意な増加がみられた。この所見のためにリンパ球と好中球の絶対数が測定された。しかし、リンパ球と好中球の絶対数には有意な変化はみられず、生物学的な意義はないものと考えられた。

その他の全ての項目について検体に関連のある所見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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

有意差の認められた所見

検査月	3				6				9				12			
投与量	20	40	200	750	20	40	200	750	20	40	200	750	20	40	200	750
—雄—																
血小板	↑148	↑135	↑139	↑166	↑153	↑130	↑140	↑174	↑147		↑136	↑167	↑150			↑194
HDW																↓93
好塩基球																
分葉好中球			↓83	↓88			↓87	↓84					↑104			↓86
リンパ球							↑130	↑137					↑119		↑128	↑117
網状赤血球										↑400	↑400			↑200	↑200	
LUC*													↓60			↓60
—雌—																
血小板				↑180				↑177					↑183			↑191
好塩基球		↑180														
分葉好中球												↓91				
リンパ球													↑125			
網状赤血球										↑225						

表中の値は、対照群に対する変動率(%)、  
 ↑↓: P < 0.05 で有意 (ANOVA + Student t-検定)  
 \*: Large Unstained Cells

12) 尿検査

試験開始前 (2週前) 投与後 3、6、9、12 ヶ月に全動物で外観、比重、ビリルビン、潜血、糖、ケトン体、pH、ウロビリノーゲン、白血球、蛋白、亜硝酸及び尿沈渣について尿検査を実施した。

その結果、本検体に関連した変動は認められなかった。

13) 剖検

試験終了時に、全動物を Fatal-Plus®麻酔下で放血致死させ剖検した。

その結果、雌雄 750ppm の肝臓 (肥大) と雄 750ppm の胆のう (肥厚) で認められた所見は、病理組織学的検査においてもそれらと関連した所見が認められおり、検体の影響が示唆された。その他の臓器については、本検体に関連した所見は認められなかった。

### 主な剖検所見

項目	用量 (ppm)	雄					雌				
		0	20	40	200	750	0	20	40	200	750
【検査数】		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
胆のう											
肥厚		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
肝臓											
肥大		0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
下垂体											
のう胞		0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
脳											
脳室拡張		0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
脾臓											
退色域		1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
胸腺											
小型化		1	0	0	1	0	0	0	0	0	1

$\chi^2$ 検定

#### 14) 臓器重量

全例について、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、甲状腺、副腎、胸腺、脳、下垂体の重量を測定すると共に、対体重比についても算出した。

肝臓重量は750ppm群（雄：実重量と対体重比、雌：対体重比）で対照群と比較して有意に増加した。40ppmと200ppm群では増加傾向にあった。統計的に有意であったのは200ppm群の雄（実重量）と40ppm群の雌（対体重比）であった。

甲状腺重量は750ppm群の雄で対体重比が増加し、200ppmと750ppm群の雌で実重量と対体重比が有意に増加した。その他の群では毒性学的に有意な変化はみられなかった。

副腎の重量は750ppm群の雄で対体重比が増加したが、関連する組織学的な所見がみられなかったことから、その意味は不明である。

#### 有意差の認められた所見

性別	群 (ppm)	雄				雌			
		20	40	200	750	20	40	200	750
肝臓	実重量			↑132	↑172				
	対体重比				↑184		↑157		↑212
甲状腺	実重量							↑162	↑147
	対体重比				↑184	↑136		↑161	↑186
副腎	対体重比				↑133				

表中の値は、対照群に対する変動率(%), ↓: P < 0.05 で有意 (ANOVA + Student t-検定)



#### 15) 病理組織学的検査

全動物を対象として、以下の臓器について病理標本を作製し、鏡検した。

脳（大脳，小脳，脳幹），脊髄（頸部，胸部，腰部），神経（視神経、坐骨神経），心臓，大動脈，気管，肺，舌，食道，胃，小腸（十二指腸，空腸，回腸），盲腸，結腸，直腸，肝臓，胆のう，膵臓，腎臓，膀胱，精巣，精巣上体，前立腺，卵巣，卵管，子宮，下垂体，甲状腺，上皮小体，副腎，脾臓，骨（胸骨，大腿骨，肋骨）、骨髓，胸腺，腸間膜リンパ節，咽頭後方リンパ節，唾液腺，皮膚，眼球，筋肉、乳腺及び肉眼的異常組織

胆のうと肝臓に、検体に起因した所見が認められた。胆のうでは、750ppm 群の雄の 2 例、200ppm の雄と 750ppm 群の雌の各 1 例に上皮過形成が認められた。肝臓では 200ppm と 750ppm 群の雌雄で肝細胞肥大が認められたおり、剖検所見と関連していた。

その他には検体の投与に起因する形態学的な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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

主な病理所見

項目	用量 (ppm)	雄					雌				
		0	20	40	200	750	0	20	40	200	750
【検査数】		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
副腎											
空胞化/皮質 (頻度)			1	1		3	3	1	2	1	2
(程度)			1.0	1.0		2.7	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0
胆のう											
上皮過形成					1	2					1
腎臓											
脂肪化						1					
小結石		2	2	1	1		1	2		2	1
肝臓											
肝細胞肥大					4*	4*				4*	4*
炎症			1								2
空胞変性											1
肺											
線維化				1							
過形成		1		1							
上皮小体											
のう胞		2	1	1	1	1	1	2	1		
下垂体											
うっ血		1		1							
のう胞				1			1	1		1	2
前立腺											
のう胞				1							
胸腺											
萎縮		1	3	2	1	1		1	2		2
甲状腺											
変性		1	1		2	1	1	1		1	
炎症/リンパ球性					1					1	3
過形成/C細胞		2	1	1	4	2	3	4	2	2	2

\* : P < 0.05 % で有意 (χ<sup>2</sup>検定)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

以上の結果から、本剤のイヌに対する12ヵ月間飼料混入による慢性毒性試験における影響として、750ppm群雌雄で体重増加の抑制と摂餌量の減少がみられた。

血液学的検査では、750ppm群雌雄で血小板の増加が認められ、血液生化学検査では、200ppm群以上の雄及び750ppm群の雌でALATの増加、200ppm群以上の雄及び40ppm群以上の雌でALPの増加が認められ、750ppm群の雄と200ppm群以上の雌でアルブミンや蛋白質の低下がみられた。750ppm群雄で肝薬物代謝酵素の誘導に伴ってT3、T4及びTSHの増加が認められた。

臓器重量では、200ppm群以上の雄、40ppm群以上の雌では肝臓重量の増加、750ppm群の雄と200ppm群以上の雌で甲状腺重量の増加がみられた。

剖検では、750ppm群雄で胆のうの肥厚や同群雌雄で肝臓の肥大が見られた。

病理組織学的検査の結果、胆のうでは200ppm群以上の雄と750ppm群の雌で上皮過形成がみられ、肝臓では200ppm群以上の雌雄で肝細胞の肥大が認められた。

肝薬物代謝酵素の測定では、20ppm群以上の雌雄でN-デメチラーゼ、O-デメチラーゼの活性の増加と200ppm群以上の雄と40ppm以上の雌でP-450の増加がみられた。従って20ppm雌雄では他の変化を伴っていない肝薬物代謝酵素の誘導のみが認められたため、本試験では無影響量は求められず、無毒性量は20ppm（雄：0.55mg/kg/日、雌：0.52mg/kg/日）であると判断される。

(10) 繁殖毒性及び催奇形性  
繁殖性に及ぼす影響

(毒性資料 No. 21)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1997年8月19日

検体の純度： %  
試験動物： ウィスター系ラット， 1群雌雄各 30匹， 投与開始時 5～6週齢  
世代数： 2世代， 第一産児で継代  
試験期間： 1996年1月～1996年11月  
投与期間： P世代； 実験開始から F<sub>1</sub>産児の離乳時までの約 19週間，  
F<sub>1</sub>世代； F<sub>2</sub>産児の離乳時までの約 19週間

【投与方法】

検体をラット用標準飼料に 0、20、300 及び 1800ppm の濃度に添加し動物に自由に摂取させた。

用量設定の根拠；

【方法及び試験項目】

概要を次頁の表にまとめた。

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
P	生育(12週間) (交配前)		一般状態の観察(毎日) 体重及び摂餌量の測定(週1回), 性周期の判定(交配前2週間), 血漿と赤血球 CHE の測定(投与後9週;雌雄各10匹)
	交配 (最長3週間)	雌雄1対1で交配。 膣栓又は膣垢中の精子の確認(妊娠0日)	交尾率の算定 交配終了時雄親動物の剖検
	妊娠(3週間)		<u>雌親動物</u> 体重測定(妊娠0, 7, 14, 20日) 摂餌量測定(妊娠7, 14, 20日)
	出産		<u>出産状況の観察</u> 新生児数, 死亡児数, 性比の算定, 新生児の体重測定と外表の観察
	哺育(4週間)	出産後4日目各同腹児数を雄4匹、雌4匹に調整	<u>雌親動物</u> 体重測定(出産0, 4, 7, 14, 21, 28日) 摂餌量測定(出産4, 7, 11, 14日) <u>新生児</u> 体重測定(出産0, 4, 7, 14, 21, 28日) 新生児の外表及び症状観察, 出産後4日目に淘汰された新生児の異常の観察
.....	離乳		<u>親動物</u> 病理組織学的検査, 臓器重量測定(脳、肝臓、精巣、卵巣) 脳 CHE の測定(最終計画殺時;雌雄各10匹)
F <sub>1</sub>	生育(12週間)		
	交配 (最長3週間)	(P世代に準ずる)	
	妊娠(3週間)		(P世代に準ずる)
	出産		(P世代に準ずる)
.....	哺育(3週間)	(P世代に準ずる)	
.....	離乳	(F <sub>1</sub> 世代に準ずる)	(F <sub>1</sub> 世代に準ずる)
F <sub>2</sub>	生育(4週間)		

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイオエルクroppサイエンス株式会社にある。

繁殖性に関する指標；次の指標を算出した。

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{精子が確認された雌動物数}^{\text{a)}}}{\text{雄と同居させた雌動物数}} \times 100$$

$$\text{受胎率 (\%)} = \frac{\text{受胎した雌動物数}^{\text{b)}}}{\text{精子が確認された雌動物数}} \times 100$$

$$\text{出産率 (\%)} = \frac{\text{生存児を出産した雌動物数}}{\text{受胎した雌動物数}} \times 100$$

$$\text{出産時生存率 (\%)} = \frac{\text{出産時生存新生児数}}{\text{総新生児数}} \times 100$$

$$\text{4日生存率 (\%)} = \frac{\text{4日目の調整前の生存新生児数}}{\text{出産時生存新生児数}} \times 100$$

$$\text{哺育率 (\%)} = \frac{\text{28日における生存新生児数}}{\text{4日目の調整後の生存新生児数}} \times 100$$

a);精子が確認されずに、妊娠した雌を含む, b);出産又は着床痕を有する雌を含む

病理組織学的検査；全ての親動物について以下の組織を採取し、10%緩衝ホルマリン溶液中に固定した。

身体標識部位, 子宮, 肉眼病変部, 肝臓, 下垂体, 前立腺, 精囊/凝固腺, 腔, 卵巢, 精巣, 卵管, 乳腺, 皮膚 (乳腺部位), 膀胱 (F<sub>1</sub>世代のみ), 副腎 (F<sub>1</sub>世代のみ)

以下の組織はダビッドソン液で固定した。

精巣, 精巣上体

## 【結果】

### 1) 親動物の観察

#### 一般観察

試験期間中、検体投与に起因した中毒症状は、いずれの世代においても認められなかった。また、P世代の0ppm(妊娠24日)、20ppm(妊娠11日)、300ppm(妊娠28日)群の雌各1例が死亡し、更にF<sub>1</sub>世代の20ppm(妊娠中)と1800ppm群の雌各1例を切迫殺したが、いずれも検体投与に起因するものではなかった。

#### 体重

P世代では全投与群の雌雄とも体重増加に有意な変化はみられなかった。F<sub>1</sub>世代の1800ppm群の雌雄で体重増加の抑制が認められた。その他の群では体重増加には検体投与の影響はみられなかった。

#### 摂餌量

摂餌量の統計学的に有意な増加がP世代の雌及びF<sub>1</sub>世代の雌雄の1800ppm群で認められ、検体に関連した変化と考えられた。P世代の雌の300ppm群でみられた摂餌量の有意な高値は、対照群との差が小さかったことから、検体の影響とは考えられなかった。

#### コリンエステラーゼ活性

血漿及び赤血球コリンエステラーゼ活性を投与9週後に、脳コリンエステラーゼ活性を屠殺時に測定した。

投与量 (ppm)	性別	P世代			F <sub>1</sub> 世代		
		血漿	赤血球	脳	血漿	赤血球	脳
20	雄						98
300		95				98	
1800		90	↓69	↓93		↓52	↓90
20	雌					↑132	98
300				↓93		84	↓91
1800			↓60	↓60		↓27	↓58

↓ : P<0.05, ↑↓ : P<0.01(補正Welsch検定による), 表中の数値は、対照群に対する変動率(%)  
 毒性学的に有意な阻害(20%以上の阻害、残存活性として80%以下)を下線で示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

P世代とF<sub>1</sub>世代のいずれも、1800ppm群の雌雄で赤血球コリンエステラーゼ活性の有意な阻害（20%以上の阻害）が、雌のみで脳コリンエステラーゼ活性の有意な阻害が認められ検体投与の影響と考えられた。

### 繁殖能

P世代及びF<sub>1</sub>世代において性周期、交配期間、交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間について、検体による影響は認められなかった。

### 親動物の剖検及び臓器重量

剖検の結果、両世代共に検体に起因した肉眼的変化は認められなかった。

臓器重量では、300ppm群まで両世代共に検体に影響した変化は認められなかった。

1800ppm群では肝臓で検体に関連した影響がみられ、両世代共に有意に増加した（雄：対体重比、雌：実重量と対体重比）。

このほか、精巣の対体重比（両世代）の有意な増加及び脳の実重量（F<sub>1</sub>世代）に有意な減少が認められたが、関連する病理組織学的な変化が認められていないことから、本検体の影響とは考えられなかった。

以上のことから、1800ppmで認められた肝臓重量の増加を本検体の影響としてとらえた。

### 病理組織学的検査

両世代に共通にみられた1800ppm群の雌雄での肝細胞の細胞質変化と肥大、F<sub>1</sub>世代での300ppm群の雌雄での肝細胞質変化（好酸性、微小顆粒）と雌での肝細胞肥大は、検体に起因した所見と考えられた。これらの肝細胞の所見は検体の投与による直接的な毒性というよりもむしろ適応反応とみなされる。さらに、F<sub>1</sub>世代のみで1800ppm群の雌で副腎皮質の空胞化がより高頻度に、300ppmの雌にも頻度の増加傾向が認められ、また1800ppm群の雌雄で膀胱の上皮過形成が認められた。この病変はラットを用いた亜急性毒性試験（毒性資料 No. 14）及び慢性毒性発がん性併合試験（No. 17）でみられたものと同様、膀胱上皮における細胞毒性とその再生に起因したものと考えられる<sup>註)</sup>。

---

注)：申請者による追記



## 2) 新生児の観察

### 性比

新生児の性比において、検体に関連した影響は認められなかった。

### 同腹児数

1800ppm 群の F<sub>2</sub> 産児の出生時同腹児数は対照群に比べわずかな減少 (P<0.01) が認められた。

一方、20ppm と 300ppm 群の同腹児数において、両世代共に検体に関連した影響は認められなかった。

### 出生時生存率

F<sub>1</sub> 世代の 1800ppm 群の出生時生存率において、対照群に比べ統計学的に有意ではないがわずかな低下傾向が認められた。しかし、F<sub>2</sub> 世代の 1800ppm 群では低下は認められなかったため、F<sub>1</sub> 世代の出生時生存率の低下はおそらく検体の影響ではないものと考えられた。

### 4日生存率及び哺育率

F<sub>1</sub> 世代の 1800ppm 群の 4日生存率と F<sub>2</sub> 世代の 1800ppm 群の哺育率において、対照群に比べ有意な低下がみられ、検体に起因した変化と考えられた。F<sub>2</sub> 世代の 300ppm 群の哺育率 (88.2%) において、対照群に比べ有意なわずかな低下がみられたが、背景データ範囲内 (F<sub>2</sub>; 71.1~98.4%) にあったため、検体の投与による作用とは考えられなかった。

### 新生児体重

両世代とも雌雄 1800ppm 群の出生時新生児体重は対照群と同等であったが、哺育期間中に体重増加の抑制が有意に認められた。20 と 300ppm 群では出生時及び哺育期間中の増体重抑制は認められなかった。

### 新生児の剖検及び臓器重量

4日淘汰新生児及び28日離乳児について剖検した結果、両世代共に検体に起因した所見は認められなかった。

28日離乳児における臓器重量では、300ppm まで対照群と比べ変動は認められなかった。1800ppm では、肝臓の対体重比の増加が、F<sub>1</sub> 産児雌雄及び F<sub>2</sub> 産児雌で認められた。さらに F<sub>2</sub> 産児雌雄で、脾臓の実重量及び対体重比の減少がみられたが、これは脾臓に対する毒性というよりはむしろ、体重の増加抑制によるものと考えられた。

以上の結果より、2世代にわたって検体を飼料中に混入して投与した場合、1800ppmでは繁殖毒性の指標として、新生児体重の増加抑制（F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>産児）、同腹児数のわずかな低下（F<sub>2</sub>産児）、4日生存率の低下（F<sub>1</sub>産児）、哺育率の低下（F<sub>2</sub>産児）が、一般毒性として親動物の摂餌量の増加（P世代、雌；F<sub>1</sub>世代、雌雄）、体重増加の抑制（F<sub>1</sub>世代、雌雄）、赤血球コリンエステラーゼ（両世代、雌雄）と脳コリンエステラーゼ（両世代、雌）の阻害、肝臓での重量の増加（両世代、雌雄）や肝細胞の細胞質変化と肥大（両世代、雌雄）、副腎皮質の空胞化（F<sub>1</sub>世代、雌）、膀胱の上皮過形成（F<sub>1</sub>世代、雌雄）、28日新生の肝臓重量の増加（F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>産児）が、300ppm群では一般毒性として肝細胞の細胞質変化（F<sub>1</sub>世代、雌雄）と肥大（F<sub>1</sub>世代、雌）、副腎皮質の空胞化（F<sub>1</sub>世代、雌）が認められ、20ppm群では検体による影響は認められなかった。

従って、無影響量及び無毒性量は、親動物に対して20ppm（雄；1.4mg/kg/日、雌；1.8mg/kg/日）、新生児に対して300ppmと判断した\*。また繁殖性に対して無影響量及び無毒性量は、300ppm（雄；21.4mg/kg/日、雌；28.1mg/kg/日）と判断した。

---

\*申請者<sup>(注)</sup>：報告では新生児に対する無影響量を20ppmとしているが、300ppmにおいて明確な影響が認められていないため、申請者は300ppmを無影響量とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

	世代 投与用量(ppm)	親:P, 児:F <sub>1</sub>				親:F <sub>1</sub> , 児:F <sub>2</sub>				
		0	20	300	1800	0	20	300	1800	
検体採取量#	♂		1.4	21.4	138.9		1.6	25.0	201.8	
	♀		1.8	28.1	204.0		2.2	32.1	259.2	
動物数	♂	30	30	30	30	30	30	30	30	
	♀	30	30	30	30	30	30	30	30	
死亡 <sup>1)</sup> 動物	♂	♀1	♀1	♀1			♀1		♀1	
一般観察										
親	体重								♂↓♀↓	
動物	摂餌量			♀↑	♀↑				♂↑♀↑	
動物	性周期(日/周期)	4.0	3.8	4.0	3.7	4.0	4.2	3.9	4.1	
動物	交尾率(%)	100	100	96.7	96.7	100	100	100	100	
動物	受胎率(%)	90	93.3	96.6	89.7	93.3	93.3	96.7	93.1	
動物	出産率(%)	96.7	96.4	96.4	100	100	100	93.1	100	
動物	妊娠期間(日)	22.6	22.3	22.5	22.5	22.5	22.4	22.0	22.2	
動物	剖検									
動物	臓器重量									
動物	肝臓				R↑				R↑	
動物					A↑,R↑				A↑,R↑	
動物	脳								A↓	
動物									A↓	
動物	精巣				R↑				R↑	
動物	卵巣					R↓	A↓R↓			
動物	病理組織所見/数									
動物	肝細胞質変化		♀1		♂15,♀21	♀2		♂8,♀4	♂21,♀23	
動物	肝細胞肥大	♀1			♀17		♀2		♀13	
動物	副腎皮質空胞化						♀1	♀5	♀28	
動物	膀胱上皮過形成					♂1			♂3,♀1	
新生児数(出生時)		261	259	279	163	316	283	284	257	
	死亡児数(出生時)	0	3	0	10	2	2	3	2	
出生時同腹児数		10.03	9.59	10.33	10.11	11.28	10.48	10.51	9.51**	
出生時生存率(%)		100	98.9	100	96.3	99.1	99.3	99.0	99.2	
4日生存率(%)		97.3	96.5	94.3	82.1**	96.8	96.5	98.6	97.7	
哺育率(%)		77.9	80.3	77.7	78.1	95.0	90.6	88.2*	73.6**	
動物	性比(%) 雄	50	50	46	52	45	46	53	49	
動物	哺育児体重0日									
		♂	6.4	6.2	6.3	6.3	6.3	6.2	6.3	6.4
動物		♀	5.9	5.9	6.1*	5.9	6.0	6.0	5.9	6.2**
動物	4日(選抜後)									
		♂	10.0	9.7	9.3	9.0**	10.3	10.3	10.5	10.2
動物		♀	8.9	9.4	9.6*	8.7	9.9	10.0	10.2	9.8
動物	7日									
		♂	15.1	13.5**	13.7*	12.9**	16.3	15.4	16.8	14.2**
動物		♀	13.6	13.9	14.5	12.9	15.7	15.0	15.7	14.1**
動物	14日									
		♂	30.6	29.0	29.9	27.3**	31.5	31.3	33.8**	29.5**
動物		♀	28.3	29.5	31.6**	27.6	31.1	31.0	32.8*	29.6**
動物	21日									
		♂	49.5	47.5	48.0	41.7**	48.1	50.1*	51.8**	43.5**
動物		♀	46.1	46.8	49.5**	41.5**	47.6	48.7	49.9**	43.4**
動物	28日									
		♂	80.7	74.7**	77.7	67.8**	75.2	77.3	80.9**	68.4**
動物		♀	72.6	71.3	75.2	65.4**	72.0	72.8	75.1**	66.5**

#: 交配前期間の平均摂取量, A: 臓器実重量, R: 対体重比,

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01 (Dunnett's test), ↑↓: P<0.05, ↑↓: P<0.01 (ANOVA+Dunnett's 検定)

## ラットを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 22)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日： 1996年 8月 22日

検体の純度 : %  
試験動物 : ウィスター系ラット 1群交尾雌 28匹  
(妊娠0日雌体重; 187~240g)  
試験期間 : 1995年3月~6月  
投与期間; 10日間(妊娠6~15日)

### 【試験方法】：

検体を、0.5% Tylose 水溶液に懸濁し、動物に 10ml/kg の容量で 0(対照群)、100、300、1000mg/kg の投与量を、妊娠 6 日目から 15 日目までの 10 日間毎日 1 回経口投与した。また交配は、無処理の雄 1 匹と雌 2 匹のラットを終夜同居させることによつて行い、翌朝臍垢中に精子が認められた日を妊娠 0 日とし、無作為に対照群と投与群に配分した。妊娠 20 日目に深麻酔下で動物を放血致死させ帝王切開した。

### 投与用量設定の理由：

### 試験項目：

妊娠動物について、交配後から帝王切開までの間、一般症状を毎日観察した。体重を妊娠 0 日、6~15 日までの毎日及び妊娠 20 日に測定し、摂餌量を妊娠 0~6、6~11、11~16、16~20 日に測定した。

帝王切開時には、内臓の肉眼的検査、黄体数、着床数、吸収胚数、死亡胎児数、生存胎児数及び胎盤の外観と重量について検査した。

生存胎児については性別、体重、外表奇形を観察し、その後各腹あたり約半数の胎児をブアン液と 70%エタノール液にそれぞれ固定した。前者は WILSON 法により内臓検査を実施し、後者はアリザリンレッド S で染色後骨格検査に供した。

### 【試験結果】

妊娠動物に検体の投与に起因した臨床所見は、観察されなかった。

妊娠動物の体重増加についても対照群と全投与群との間に有意な差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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

摂餌量において、対照群と全投与群との間に有意な差は認められなかった。

剖検において投与に関連した内臓所見は認められなかった。

1000mg/kg 群の妊娠率が対照群よりわずかに低下したが、2匹の母動物の総吸収胚によるものであった。この所見は本系統のラットで自然発生的にみられる現象であることと、予備試験での2000mg/kgの投与でみられていなかったことから、偶発的な所見と考えられた。

胎盤重量は1000mg/kgで対照群よりわずかな増加を示したが、母動物単位では有意ではなかった。胎盤の外観で充血が1000mg/kg群でわずかに高頻度でみられたが、母動物単位では有意ではなかったことから、投与に起因した変化とは考えられなかった。

黄体数、着床数、着床前死胚率、吸収胚数、生存胎児数、性比、胎児体重には対照群と全投与群の間で有意な差は認められなかった。

生存胎児の外表面検査では奇形は認められなかった。

内臓検査では数種の奇形が観察されたが、それらの出現頻度は低く、本系統のラットで一般的にみられる型であったことから、偶発的なものと考えられた。

骨格検査では、肩甲骨形成異常と脊椎奇形が300mg/kg群でのみに低頻度でみられた。これらの所見は本系統のラットで通常みられる奇形の型と頻度であったことから、偶発的と考えられた。骨化及び骨格の変異については、1000mg/kg群でダンベル型の第12胸椎弓、第4仙椎体と第2尾椎弓並びに第6尾椎体の骨化の促進、舌骨体の未骨化、泉門の拡張が胎児単位で有意に増加した。第4仙椎体の骨化促進のみは母動物単位でも有意な増加であった。しかし、これらのすべての所見は本系統のラットでの他試験と同様な頻度であったり、または投与量に関連した明らかな傾向を示さなかったことから、投与に関連した所見とは考えられない。また同一の化合物が同時にそれぞれ異なる部位の骨で骨化の促進と遅延を示すことや、少数の部位の骨のみに影響することもありえないことと考えられた。

以上の結果より、本検体を妊娠ラットに投与したときの母動物及び胎児における無毒性量及び無影響量は、1000mg/kg/日であった。また、本検体に催奇形性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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

投与量 mg/kg		0	100	300	1000		
交尾動物数		28	28	28	28		
着床動物数		24	25	26	26		
生存胎児を有する動物数		24	25	26	24		
母動物	全吸収胚母動物数	0	0	0	2		
	一般症状/死亡						
	体重 d						
	摂餌量 d						
	剖検所見						
					(a) 24例	(b) 26例	
	着床所見	黄体数 ★ d	14.3	14.0	13.7	14.6	14.2
		着床数 ★ d	12.6	11.5	11.5	11.7	11.3
		着床前死胚数★ k	1.7	2.4	2.2	2.9	2.8
		着床後死胚数★ k	0.9	0.6	0.8	0.7	1.2
		着床後死胚率 <sup>1)</sup> f	7.0	5.6	7.4	6.0	10.5
		着床後死胚率 <sup>2)</sup> k	6.6	6.5	7.0	6.4	13.6
		生存胎児数 ★ d	11.7	10.9	10.7	11.0	10.2
		雄の割合 k	46.9	45.2	47.6	46.3	
生存胎児体重(g) d	3.74	3.70	3.79	3.84			
胎児	胎盤重量(g)/母体単位 d	0.60	0.63	0.62	0.64		
	/胎児単位 d	0.60	0.61	0.59	0.64†		
	外表観察						
	尾の糸状端		1				
	胎児の褪色		3(1)	2(2)			
	肺の萎縮 <sup>#</sup>			1			
	心臓の分葉化 <sup>#</sup>			1			
	わずかな浮腫 <sup>#</sup>			1			
	骨格検査胎児数	147	142	147	134		
	変異	奇形 肩甲骨形成異常			1		
		脊椎奇形			2(1)		
		ダンベル型第12胸椎弓	8	14	19	23**	
		第4仙椎骨化不全	47(21)	35(16)	43(15)	19**(11*)	
		第6尾椎骨化	5	5	12	18*	
内臓検査胎児数	舌骨の未骨化	3	5	0	13*		
	泉門の拡張	0	3	1	7*		
	内臓検査胎児数	134	130	130	130		
奇形	重複奇形+		1				
	小眼球/無眼球症	2(2)	1	3(2)	2(2)		
	完全逆位		1				
	ヘルニア			1			
	甲状腺の分葉異常	1		2(2)	2(1)		
	分葉様心臓			1			

(a) 生存胎児を有する動物数, (b) 生存胎児を有する動物数+全吸収胚動物数

1) 各群総数で算出, 2) 各母動物で算出, ★: 1匹の母動物あたり, 空欄: 異常なし, ( ): 母動物数

d: Dunnett (†: P<0.01), k: Kruskal Wallis, f: Fisher 検定 (\*\*: P<0.01, \*: P<0.05),

#: 重複所見, +: 小眼球症、左側頸動脈の位置異常、食道の転移、心室中隔欠損、浮腫

## ウサギを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 23)

試験機関：

[G L P 対応]

報告書作成年月日： 1997年 1月 20日

検体の純度 : %  
試験動物 : ヒマラヤン系ウサギ 1群交尾雌 16匹  
(妊娠0日雌体重; 2165~2943g)  
試験期間 : 1995年3月~6月  
投与期間; 14日間(妊娠6~19日)

### 【試験方法】：

検体を、0.5% Tylose 水溶液に懸濁し、動物に 5ml/kg の容量で 0(対照群)、40、160、640mg/kg の投与量を、妊娠 6 日目から 19 日目までの 14 日間毎日 1 回経口投与した。なお、最低用量の 40mg/kg 群でも投与に起因したと考えられる流産がみられたため、無影響量を得るために 10mg/kg 群を追加した。

無処理の雌雄各 1 匹のウサギを同居させ、肉眼的に交尾を確認した。交尾が観察された雌を、無作為に対照群と投与群に配分した。交尾が確認された日を妊娠 0 日とし、妊娠 29 日目に深麻酔下で動物を帝王切開した。

### 投与用量設定の理由：

### 試験項目：

妊娠動物について、交配後から帝王切開までの間、一般症状を毎日観察した。体重を妊娠 0 日、6~19 日までの毎日及び妊娠 29 日に測定し、摂餌量を妊娠 0~6、6~10、10~14、14~20、20~24、24~29 日に測定した。

帝王切開時には、内臓の肉眼的検査、黄体数、着床数、吸収胚数・死亡胎児数、生存胎児数及び胎盤の外観と重量について検査した。

生存胎児については性別、体重、外表奇形を観察し、胎児を 70%エタノール液に固定した。内臓観察と脳に対する薄切の検査後にアリザリンレッド S で染色後骨格検査に供した。

### 【試験結果】

試験期間中に流産が 640、160、40mg/kg 群でそれぞれ 3、2、1 例にみられ、切迫殺は 640mg/kg 群で 2 例について行われた。これらの動物では流産や切迫屠殺の前に摂餌量の著明な減少、糞量の減少、糞の退色等がみられ、検体が母動物に強い毒性を示したことによるものと推測された。流産が全投与群でみられたので、10 mg/kg 群が追加され、他の投与群と同様に処理されたが、流産は観察されなかった。

一般所見として、640mg/kg 群で摂餌量の減少、糞量の減少、糞の退色、軟便が、160mg/kg 群で軟便が投与の影響としてみられた。

640mg/kg 群で妊娠 6 日から 9 日まで体重が低下したため、投与期間中の妊娠動物の体重増加が減少した。その他の群の体重は対照群との間に有意な差を示さなかった。

640mg/kg 群で妊娠 6 日から 10 日まで摂餌量が低下したが、妊娠 10 日から 14 日まででは逆に増加した。その他の投与群の摂餌量には対照群との間に有意な差は認められなかった。

剖検において投与に関連した肉眼所見は認められなかった。

妊娠率は、流産（40mg/kg 1 例、160mg/kg 2 例、640mg/kg 3 例）や全吸収胚（160 と 640mg/kg で各 1 例）の発現のためにこれらの群で低下した。10 mg/kg 群では流産も全吸収胚も観察されなかった。

黄体数、着床数、着床前死胚率、吸収胚数、生存胎児数、性比、胎児体重には対照群と 10mg/kg 群を含む全投与群の間で有意な差は認められなかった。

心室中隔欠損が 160mg/kg 群の 1 胎児でのみ観察されたが、偶発的なものと考えられた。関節拘縮症が対照群を含む全群で低頻度にみられたが、本系統のウサギで通常みられる奇形の型（関節拘縮症）と頻度 [背景データ：胎児数として 0~5] であったことから、これも偶発的な所見と考えられた。その他の奇形の出現は低頻度であり、投与によるものとは考えられなかった。

胎児の骨格の発育遅延と変異についての検査は 640mg/kg 群でも投与に関連した所見を示さなかった。胎児単位で評価したときに、3 数値に統計的有意差がみられたが、そのうち 2 数値で投与量と関連する傾向はなく（160mg/kg: 舌骨、40mg/kg: 第 6 胸骨）、第 3 の数値は骨化不全例の減少（骨化の促進）を示唆（640mg/kg: 舌骨）するものであった。更に、母動物単位での評価では対照群と各投与群間で有意な差はなかった。

10 mg/kg 群ではどの検査項目においても、検体の影響は認められなかった。しかし、



検体の妊娠ウサギに対する検体の毒性の精査と無影響量を明確にするために、さらに追加試験が実施された。

## 母動物毒性の確認のための追加試験

母動物への毒性の精査と無影響量を明確にするために、各群4匹のヒマラヤン系ウサギに0(対照群)、10、40、160、640mg/kgを妊娠6日から19日まで投与して、妊娠20日に剖検した。しかし、10mg/kg以上の群で赤血球コリンエステラーゼ活性に対する影響が認められたことから、2.5mg/kg群が追加された(検査は血漿、赤血球、脳コリンエステラーゼ活性および肝臓中のトリグリセリドの測定のみ)。検体の妊娠ウサギへの影響の評価は血液学(血液凝固系も含む)、血液生化学、血漿、赤血球、脳コリンエステラーゼ活性及び肝臓中のトリグリセリドの測定、臓器重量、剖検、病理組織学の所見に基づいた。

### 【追加試験結果】

#### 1. 血液学的検査

白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、ハインツ小体、白血球数、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積、網状赤血球数、血小板数、トロンボプラスチン時間について妊娠6日(投与直前)、妊娠7日、妊娠13日、妊娠20日に検査した。なお2.5mg/kg群については、検査を行わなかった。

全投与群で検体投与による影響は認められなかった。

#### 2. 血液生化学的検査

アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、クレアチンキナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、γ-グルタミルトランスフェラーゼ、乳酸脱水素酵素、総ビリルビン、コレステロール、クレアチニン、トリグリセリド、尿素、アルブミン、総蛋白質について妊娠6日(投与直前と)、妊娠7日、妊娠13日、妊娠20日に検査した。なお2.5mg/kg群については、検査を行わなかった。

γ-グルタミルトランスフェラーゼ(妊娠13日と20日)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(妊娠20日)活性の増加が160mg/kgと640mg/kg群でみられた。トリグリセリドは160mg/kg(妊娠20日)と640mg/kg群(妊娠13日と20日)で増加がみられた。その他の項目には投与に起因した変化は認められなかった。

検体の影響のみられた項目

検査項目	検査日	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg	640mg/kg
γ-グルタミルトランスフェラーゼ	妊娠 13 日			167	167
	妊娠 20 日			400	220
アラニアミントランスフェラーゼ	妊娠 20 日			330	217
トリグリセリド	妊娠 13 日				257
	妊娠 20 日			210	159

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

3. 血漿、赤血球、脳コリンエステラーゼ (ChE) の測定

血漿、赤血球 ChE 活性は妊娠 6 日 (投与直前と投与後 3 時間)、妊娠 7 日、妊娠 13 日、妊娠 20 日に測定した。脳 ChE 活性は妊娠 20 日の剖検後に摘出した脳で測定した。

血漿 ChE は 40mg/kg 以上の群で毒性学的に意味のある阻害 (20%以上の阻害) がみられた。赤血球 ChE は投与 3 時間後 (妊娠 6 日) では 640mg/kg 群でのみ有意な阻害が、投与 24 時間後 (妊娠 7 日) では 160mg/kg 以上の群で、妊娠 13 日、妊娠 20 日には 10mg/kg 以上の群で投与量に相関した阻害がみられた。このように赤血球 ChE の阻害は経時的に著明となった。しかし、脳 ChE には全投与群とも阻害は認められなかった。従って、検体の ChE への作用の無影響量は 2.5mg/kg であった。

検体の影響のみられた項目

	検査日	2.5mg/kg	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg	640mg/kg
血漿 ChE	妊娠 6 日				71	53
	妊娠 7 日			78	55	25
	妊娠 13 日			59	46	28
	妊娠 20 日			64	46	32
赤血球 ChE	妊娠 6 日					62
	妊娠 7 日				46	9
	妊娠 13 日		67	42	3	0
	妊娠 20 日		41	20	8	2

表中の数値は、対照群に対する変動率 (%)

#### 4. 肝臓中のトリグリセリドの測定

肝臓中のトリグリセリドについて、妊娠20日の剖検後に摘出した肝臓で測定した。

肝臓中のトリグリセリドは160mg/kgと640mg/kg群で著明に増加した。

	検査日	2.5mg/kg	10mg/kg	40mg/kg	160mg/kg	640mg/kg
トリグリセリド	妊娠20日				288	272

表中の数値は、対照群に対する変動率(%)

#### 5. 剖検、臓器重量、病理組織学所見

妊娠20日に剖検し肉眼的に内臓を検査した後、脳、肝臓、脾臓を摘出し、重量を測定後、10%ホルマリン液に固定した。その後病理組織学的検査を実施した。

剖検において、著変は認められなかった。

肝臓重量は640mg/kg群でのみ対照群と比較してわずかに増加した

病理組織学的検査において、肝臓で40mg/kg以上の群で小葉中心性又は小葉中間帯肝細胞肥大と細胞質変化(すりガラス様)を示した。これらの所見は肝薬物代謝の亢進に伴う肝臓の適応反応と考えられる。

以上の本試験の結果より、本検体を妊娠ウサギに投与したときの母動物において、640mg/kg群で摂餌量の減少、糞量の減少と糞の褪色、体重の低下が、160mg/kg以上の群で流産と全吸収胚の出現と軟便が、40mg/kg以上の群では流産の出現が認められたが、10mg/kg群で母動物に検体による影響は認められなかった。また、胎児に対しては全投与群で検体の影響は認められなかった。

追加試験の結果より、本検体を妊娠ウサギに投与したときの母動物において、640mg/kgと160mg/kg群でγ-グルタミルトランスフェラーゼとアラニンアミノトランスフェラーゼ活性の増加、トリグリセリドの増加が、また40mg/kg以上の群では赤血球(640mg/kg群では残存活性が妊娠7日以降に0~9%)と血漿コリンエステラーゼの阻害、肝細胞の細胞肥大と細胞質変化(すりガラス様)が、10mg/kg群では赤血球コリンエステラーゼの阻害が認められた。2.5mg/kgでは検体に起因した変化はなんら認められなかった。従って、本試験および追加試験の結果を考慮して、母動物における無毒性量及び無影響量は2.5mg/kgで、胎児における無毒性量及び無影響量は、640mg/kgであった。また、本検体に催奇形性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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

投与量 mg/kg		0	10	40	160	640			
交尾動物数		16&	16&	16	16	18&#			
着床動物数		15	15	15	16	15			
生存胎児を有する動物数		15	15	14	13	11			
母動物	全吸収胚数				1	1			
	流産			1	2	3			
	一般症状				軟便	軟便、糞の退色			
	体重 8-10日 d					↓			
	摂餌量 6-10日 d					↓			
	10-14日 d					↑			
	剖検所見				(a)13例	(b)14例	(a)11例	(b)12例	
	着床所見	黄体数 ★ d	8.3	9.0	7.8	8.7	8.3	7.6	7.4
		着床数 ★ d	8.0	8.7	7.5	8.2	7.9	6.6	6.5
		着床前死胚数★ k	0.3	0.3	0.3	0.5	0.4	1.0	0.9
		着床後死胚数★ k	0.9	1.0	0.6	0.5	0.7	0.2	0.6
		着床後死胚率 <sup>1)</sup> f	10.8	11.5	8.6	6.5	9.1	2.7	9.0
		着床後死胚率 <sup>2)</sup> k	9.6	11.4	9.9	7.5	14.1	3.0	11.0
		生存胎児数 ★ d	7.1	7.7	6.9	7.7	7.1	6.5	5.9
雄の割合 k		49.9	40.5	49.7	41.5		50.5		
生存胎児体重(g) d		35.9	35.5	36.8	34.9		37.3		
胎児	胎盤重量 d	4.12	4.00	4.23	4.12		4.13		
	検査胎児数	107	115	96	100		71		
	奇形	重複奇形				1+			
		関節拘縮症	1	5(4)	1	2(2)		2(2)	
		後肢位置異常		1					
		過剰腰椎		1	1				
		過剰腰椎、指節骨/中手骨欠損	1						
	変異	第6胸骨骨化不全	2	9	16**	9		4	
		舌骨骨化不全	39	43	36	59**		12*	
	奇形	心室中隔欠損				1			

(a) 生存胎児を有する動物数, (b) 生存胎児を有する動物数+全吸収胚動物数

1) 各群総数で算出, 2) 各母動物で算出, ★: 1匹の母動物あたり, 空欄: 異常なし, ( ): 母動物数  
d: Dunnett (↓: P<0.05 ↑: P<0.01), k: Kruskal-Wallis, f: Fisher (\*: P<0.05 \*\* : P<0.01) 検定,  
+ : 裸眼、口蓋裂、肝葉の短縮、頭蓋骨欠損、脊椎裂等

[&; 1例の子宮異常 及び #; 2例の切迫殺: 評価の対象からはずした。]

(11) . 変異原性

細菌を用いた復帰突然変異性試験

(毒性資料No.24)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1995年8月24日

検体の純度 : %

試験系 : 細菌(サルモネラ菌 (TA98、TA100、TA1535、TA1537) 大腸菌 (WP2uvrA) )

【試験方法】

試験用量設定の理由及び試験液の調製方法

Ames 試験(ブレインキューベーション法)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 4 株およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) の 1 株を用い、フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導したラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9-Mix) の非存在下及び存在下で Ames らの方法により変異原性を検定した。

各濃度とも 3 プレートを用いた。試験は再現性をみるために 2 回行った。

各菌株及び各濃度毎の平均復帰変異コロニー数が、溶媒対照の平均復帰コロニー数の 2 倍以上で用量相関性のある増加を示した場合を変異原性陽性と判定した。

### 【結果及び考察】

表 1、2 に示したように、2 回の試験とも代謝活性化の有無にかかわらず、どの菌株においても復帰変異コロニー数に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性のある増加は認められなかった。

一方、2 回の試験とも、陽性対照として用いた AF-2<sup>1)</sup>、NaN<sub>3</sub><sup>2)</sup>、9-AA<sup>3)</sup>では溶媒対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA<sup>4)</sup>は S-9 Mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有さないものと判断される。

- 1) : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
- 2) : Sodium azide
- 3) : 9-Aminoacridine
- 4) : 2-Aminoanthracene

表 1. 復帰変異試験成績 (第1回目)

物質	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレーム外型			塩基対置換型			フレーム外型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	0	-	94	13	13	16	7	+	84	10	19	26	13
			98	12	16	17	5		90	8	16	28	12
			84	10	7	17	5		96	5	25	29	11
			92	12	12	17	6		90	8	20	28	12
検体	313	-	88	5	7	16	6	+	95	7	18	31	8
			100	8	13	18	7		88	5	19	29	5
			82	5	15	23	8		82	9	20	36	9
			90	6	12	19	7		88	7	19	32	7
	625	-	85	4	10	19	6	+	86	5	18	19	9
			96	6	12	11	5		90	7	17	32	5
			74	9	10	25	4		67	9	13	34	5
			85	6	11	18	5		81	7	16	28	6
	1250	-	84	7	10	18	6	+	100	3	13	31	7
			86	4	9	23	8		94	5	18	26	6
			80	6	10	19	5		72	6	15	19	7
			83	6	10	20	6		89	5	15	25	7
	2500	-	88	5	15	17	9	+	89	11	25	28	6
			81	6	12	15	7		83	8	10	22	5
			80	5	13	23	6		85	9	17	30	8
			83	5	13	18	7		86	9	17	27	6
	5000	-	62	5	16	15	5	+	90	6	16	20	6
			84	7	20	15	8		99	3	14	19	7
			86	8	25	19	7		92	5	14	17	4
			77	7	20	16	7		94	5	15	19	6
陽性対照	-	412 <sup>a)</sup>	175 <sup>b)</sup>	184 <sup>a)</sup>	362 <sup>d)</sup>	379 <sup>d)</sup>	+	407 <sup>e)</sup>	176 <sup>d)</sup>	291 <sup>e)</sup>	188 <sup>b)</sup>	70 <sup>f)</sup>	
		357	172	194	303	441		451	192	315	192	78	
		379	182	197	333	392		477	186	304	196	83	
		383	176	192	333	404		445	185	303	192	77	

a)AF-2 : 0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

b)NaN<sub>3</sub> : 0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

c)AF-2 : 0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

d)9-AA : 80.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

e)2-AA : 1.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

f)2-AA : 2.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

g)2-AA : 10 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

h)2-AA : 0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

点線下の数値は平均値

表 2. 復帰変異試験成績 (第2回目)

物質	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレーム/型			塩基対置換型			フレーム/型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	0	-	91	9	13	34	16	+	98	11	13	36	10
			84	14	16	28	9		93	14	16	39	9
			89	15	14	21	8		96	11	22	40	10
			88	13	14	31	11		96	12	17	38	10
検体	313	-	93	10	14	23	11	+	81	11	20	27	10
			87	10	13	31	14		94	12	15	29	6
			84	9	8	34	11		86	12	16	37	10
			88	10	12	29	12		87	12	17	31	9
	625	-	89	15	10	34	7	+	79	11	13	27	8
			94	10	10	26	10		80	14	14	31	10
			95	7	12	24	10		83	8	22	40	12
			93	11	11	28	9		81	11	17	33	10
	1250	-	73	7	9	26	12	+	89	14	18	34	12
			86	14	13	23	9		88	15	10	33	8
			82	15	10	29	7		82	12	17	40	13
			80	12	11	26	9		86	14	15	36	11
	2500	-	84	13	13	25	4	+	101	11	12	31	7
			90	15	11	30	14		87	7	16	37	10
			90	10	14	30	12		90	13	23	40	15
			88	13	13	28	10		93	10	17	36	11
	5000	-	89	11	11	27	16	+	90	11	18	37	7
			77	7	10	35	10		81	16	16	35	11
			81	12	16	30	13		88	15	24	27	12
			82	10	12	31	13		86	14	19	33	10
陽性対照		-	387 <sup>a)</sup>	155 <sup>b)</sup>	147 <sup>a)</sup>	430 <sup>c)</sup>	463 <sup>d)</sup>	+	455 <sup>e)</sup>	115 <sup>f)</sup>	287 <sup>e)</sup>	179 <sup>h)</sup>	79 <sup>h)</sup>
			402	177	160	440	478		398	151	278	185	72
			424	163	158	448	442		404	122	265	162	83
			404	165	155	441	461		419	129	277	175	78

a)AF-2 : 0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

b)NaN<sub>3</sub> : 0.5  $\mu\text{g}/\text{プレート}$

c)AF-2 : 0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

d)9-AA : 80.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

e)2-AA : 1.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

f)2-AA : 2.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

g)2-AA : 10 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

h)2-AA : 0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

点線下の数値は平均値



チャイニーズハムスター由来 V79 細胞を用いた in vitro 染色体異常試験  
(毒性資料No.25)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1996年1月10日

検体の純度： %  
試験系： チャイニーズハムスター由来 V79 細胞  
試験期間： 4 時間処理後、18 時間(全濃度)及び 30 時間(溶媒対照, 最高濃度のみ)

培養後観察

**【試験方法】**

継代培養したチャイニーズハムスター由来 V79 細胞を用い、代謝活性化、非代謝活性化の条件下で染色体異常誘発性を検定した。

投与用量の決定

検体の調製

検体を所定量のアセトンに溶解し、2種の陽性対照物質はハンクス液に溶解した。

標本の作成

フラスコに牛胎仔血清を含む培地 20ml を入れ、そこに  $1 \times 10^6$  個の V79 細胞を播種した。これを一定時間炭酸ガス恒温器内で培養した。その後培養液を捨て、S9-Mix 非存在下では 20ml の新鮮な培地と 0.2ml の検体液を、S9-Mix 存在下では 19ml の新鮮な培地、1ml の S9-Mix、0.2ml の検体液を加えて 4 時間炭酸ガス恒温器内で処理した。その後さらに新鮮な培地と交換し、18 時間と 30 時間培養した。各培養の終了 2 時間前に中期分裂細胞を集めるためにコルセミドを培養液中に添加した。なお、S9 分画は Aroclor 1254 を投与したラット肝臓から調製されたものを用いた。各濃度と

も2連で培養した。

培養終了後、各染色体標本作製した。培養後の細胞を0.56% KCl液で低張処理をした後に、冷エタノール/酢酸混液(3:1)中で固定した。冷却した水に浸したスライドガラスに固定細胞液を滴下して乾燥後、ギムザ液で染色した。1培養当たり2枚のスライド標本(1枚はバックアップ用で通常評価には使用せず)を作製した。陽性対照では培養18時間後にのみ標本を同様に作製した。陽性対照物質として、S9-Mix非存在下の場合はマイトマイシンC (0.1µg/ml)、S9-Mix存在下の場合はシクロホスファミド (2.0µg/ml)を用いた。

### 有糸分裂指数

1培養あたり、1000個の細胞を算定することにより有糸分裂指数を求めた。

### 中期分裂細胞の検査

光学顕微鏡を用いてスライドあたり100個の中期分裂細胞の染色体と染色分体についてギャップ、切断、断片、欠失、交換、重複異常などの構造異常を検査した。従って、2連で培養を行っているので各濃度当たり200個の中期分裂細胞の染色体を観察した。また、数的異常についても観察した。

## 【結果】

### 1)細胞分裂頻度

S9-Mix 非存在下では、50 $\mu$ g/ml における 18 時間の標本で、有糸分裂指数は、溶媒対照に対して 33.2%が抑制された。一方、S9-Mix 存在下においては、いずれの処理群にも有糸分裂指数の抑制は認められなかった。

### 2)染色体異常

検査結果は、次頁の表に示した。

検体は S9-Mix の存在下及び非存在下の両者において、すべての処理群でいずれの標本作製時間においても染色体異常を示す中期分裂細胞数の増加を示さなかった。

陽性対照として使用したマイトマイシン C、シクロホスファミドでは染色体異常を示す中期分裂細胞が明らかに増加した。

染色体の数的異常の観察結果から、倍数性の中期分裂細胞数に有意な変化はみられなかった。

以上の結果より、検体は、代謝活性化を含む本試験条件下でチャイニーズハムスター由来 V79 細胞系で染色体異常を誘発しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

実験群 濃度 µg/mL	S9- Mix	回収 時間	観察 細胞数	ギャップ		異常の分類										構造異常細胞 <sup>C</sup>		倍数性 細胞		
						染色分体型			染色体型			その他				ギャップ	交換			
				g	ig	b	f	d	ib	if	id	ex	maE	ma	cd	含む	除外			
溶媒対照	-	18	200	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	25	25	1.0	18	
無処理			200	1	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	25	20	0.0	20
5			200	0	0	1	0	0	0	0	0	5	3	0	0	0	40	40	1.5	32
25			200	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	25	25	0.0	29
50			200	1	0	0	0	0	0	0	1	3	2	0	0	0	35	30	1.0	13
陽性対照 <sup>A</sup>			200	7	3	20	4	1	23	14	7	49	0	0	0	450*	435*	195*	13	
溶媒対照	+		18	200	1	0	1	0	0	2	1	3	1	0	1	0	5.0	4.5	0.5	23
無処理				200	0	0	1	1	0	2	0	4	3	0	0	0	4.5	4.5	1.5	24
10				200	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	2.0	1.5	0.5	20
50				200	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	2.5	2.5	0.0	27
100				200	1	0	0	0	0	0	3	6	0	0	0	0	3.5	3.5	0.0	12
陽性対照 <sup>B</sup>				200	2	10	9	3	0	35	14	3	32	1	0	0	980*	350*	150*	13
溶媒対照	-	30		200	1	0	0	1	0	1	2	3	0	0	0	0	4.0	3.5	0.0	20
50				200	3	0	2	0	0	1	0	2	2	0	0	0	5.0	3.5	1.0	38
溶媒対照	+			200	0	0	0	0	0	2	4	6	2	0	0	0	5.5	5.5	1.0	14
100				200	1	1	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	3.0	2.0	0.0	19

\* : P ≤ 0.01 (Fisher の直接確率法), A : マイトマイシン C (0.1 µg/ml), B : シクロホスファミド (2.0 µg/ml)

処理時間 : 4 時間

C : 百分率

g: 染色分体型ギャップ

ig: 染色体型ギャップ

b: 染色分体型切断

ib: 染色体型切断

f: 染色分体型断片

if: 染色体型断片

d: 染色分体型欠失

id: 染色体型欠失

ex: 交換

maE: 交換を含む重複異常

ma: 重複異常

cd: 染色体破損

## 細菌を用いた DNA 修復試験

(毒性資料No.26)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1997年2月27日

検体の純度：%

試験系：細菌(枯草菌(H17株、M45株))

### 【試験方法】

#### 試験用量設定の理由及び試験液の調製方法

#### Rec-assay (孢子法)

DNA 損傷の誘起作用を調べるために、*B. subtilis* の野生株である組み換え修復機構保持株(H17)とその変異株である欠損株(M45)の孢子を用いた。

両菌株の孢子は、孢子浮遊液として4℃で保持しているものを使用した。約45℃に保った孢子法用のニュートリエントアガー1Lあたり10mLの割合で孢子浮遊液を加え、攪拌後シャーレに10mLずつ分注し、室温で固化させた。代謝活性化させる場合は、S-9\* 0.1mL をシャーレに分注してから孢子法用のニュートリエントアガーをシャーレに10mLずつ分注し、冷蔵庫で固化させた。

次に検体あるいは対照物質を含む試料20μLをしみ込ませたディスク(直径8mmの円形濾紙)を1プレートに2枚置き、37℃の孵卵器で24時間培養した。代謝活性化させる場合は、ディスクに補酵素液20μL、検体あるいは対照物質を含む試料20μLをしみ込ませ同様な操作を行った。そして、両菌株の生育阻止円の直径を測定し、ディスクの直径を差し引いたものを生育阻止円(mm)の直径とした。その結果、両菌株の生育阻止円の直径の差が5mm以上の場合を陽性と判定した。

---

S-9\*：7週齢雄のSD系ラット肝ホモジネートから得た。誘導物質としてフェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボンを使用

【試験結果】

物質	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	S-9(-)			S-9(+)		
		阻止円 (mm)		差 (mm)	阻止円 (mm)		差 (mm)
		H17	M45		H17	M45	
検体	0.75	0	0	0	0	0	0
	1.5	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
	6	4	4	0	0	0	0
	12	6	7	1	0	0	0
マイマイシン C (MMC)	0.005	0	13	13			
	0.01	1	20	19			
2-アミノアントラセン (2-AA)	5	0	0	0	0	10	10
	20	0	0	0	0	12	12
硫酸カナマイシン (KM)	0.5	10	12	2			
	1.0	12	14	2			
ジメチルスルホキシド <sup>*</sup>	(20 $\mu\text{L}$ )	0	0	0	0	0	0

追加試験

物質	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	S-9(+)		
		阻止円 (mm)		差 (mm)
		H17	M45	
検体	3	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	2	1	-1
	48	2	3	1
2-アミノアントラセン (2-AA)	5	0	11	11
	20	0	13	13
ジメチルスルホキシド <sup>*</sup>	(20 $\mu\text{L}$ )	0	0	0

非代謝活性化試験において、6及び12 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ の濃度においては、両菌株に対しわずかな生育阻害が認められたが、生育阻止円の直径の差はわずかで、5mm以内であった。

代謝活性化試験において、12 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ 以下の濃度では生育阻害が認められなかった。24と48 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ の濃度においては、両菌株に対しわずかな生育阻害が認められたが、生育阻止円の直径の差はわずかで、5mm以内であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

一方、陽性対照物質である MMC(S-9 非存在下)及び 2-AA(S-9 存在下)では H17 株に比べ、M45 株で明らかな生育阻害が認められ、判定は陽性であった。陰性対照物質の KM(S-9 非存在下)では両菌株に対し生育阻害が認められたが、両菌株の差が 5mm 以内であり、陰性であった。

以上の結果より、検体は比較的低濃度で生育阻害を示すものの、代謝活性化を含む本試験条件下で DNA 損傷の誘発性を有さないものと判断される。

ラット初代肝臓培養細胞を用いた in vitro 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験  
(毒性資料No.27)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 1996 年 9 月 16 日

検体の純度 : %  
供試生物 : ラット初代培養肝細胞  
試験期間 : 処理開始後 24 時間培養

【試験方法】

ラットの初代肝培養細胞を用い、in vitro 系の変異原性試験を実施した。通常、in vitro 系の変異原性試験では S9-Mix を代表とする外因的な代謝活性化系が検体及びその代謝物の変異原性を検定するのに必須である。これに対して、肝初代培養細胞ではそれ自身が高い内因性の代謝能を有している点が特徴となっており、ここで使用されている陽性対照物質の 2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF)は代謝を受けて実際に変異原性を示すことが知られているものである。

1. 供試液の調製

検体及び陽性対照の 2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF)は DMSO に溶解した。

2. 肝細胞の単離

無処理の雄の SD 系ラットをネンブタール麻酔下でコラゲナーゼ液等で生体位灌流し、肝臓を摘出してから肝細胞を単離した。

3. 肝細胞毒性と用量設定

単離した肝細胞は、L-グルタミン、硫酸ゲンタマイシン、不活化牛胎児血清を添加した Williams E 培養液で培養した。

まず、単層細胞を得るために、ペトリ皿に  $7.5 \times 10^6$  個の肝細胞を加え、90~120 分間 5%炭酸ガス下の加湿された空気中で 37°C で培養した。その後 PBS (磷酸緩衝液) での洗浄により未接着の細胞を除去した後、所定の検体液を添加して 18~24 時間培養した。生存細胞の検査は、トリパンブルー色素排除法で行った。対照群の生存細胞数に対する検体処理群の生存細胞数から、相対的生存率を求めた。

細胞毒性を確認するための予備試験(0, 1.95~1000µg/mL, 20 時間培養)の結果、生存率は 250µg/mL 以上の群で著しく減少し、125µg/mL での相対的生存率は、42.1% であった。この結果に基づいて、本試験では 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150µg/mL を設定した。



#### 4. UDS 検査用標本の作製と観察

肝細胞毒性試験と同様に、単層細胞を得てから、所定の検体液とともに 10  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  の  $^3\text{H}$ -チミジンを含む培養液で 16~24 時間培養した。その後、1%クエン酸ナトリウムでの核の膨化処理に続いて、氷酢酸と純エタノール混液(1:3)で細胞の固定を行い、水洗後に風乾した。

オートラジオグラフィ処理のために、スライドガラスを NTB-2 写真用乳剤で処理し、暗箱中において  $-20^\circ\text{C}$  で 4~10 日間の保持後に定着固定した。さらに、スライドガラスをヘマトキシリンエオシンで染色した。

各濃度あたり 3 枚のスライドガラスを作製し、各スライドガラス 50 細胞 (各濃度あたり 150 細胞) を観察し、 $^3\text{H}$ -チンジンの取り込みを反映する核および細胞質中の粒子を、顕微鏡に接続した TV カラーモニターを用いて計測した。

#### 5. 観察結果の表示

補正核粒子数 = 平均核粒子数 - 同面積の細胞質中の平均粒子数  
細胞質粒子数の平均値 = 3 枚のスライドガラス (1 細胞あたり 3 ヶ所) での細胞質粒子数の平均値

5 個以上の粒子を有する核 (%) = 検査細胞数 (150 細胞) に対する 3 枚のスライドガラスにおける 5 個以上の補正粒子数を有する細胞数の百分率

生存率 (%) = 溶媒対照区と比較した生存細胞数

#### 6. 試験の評価

試験の信頼性については、主に下記の項目について評価した。

1. 溶媒対照区の生存細胞数は 16~24 時間後に 70%以上であること。ただし、50~70%でも使用は可能である。
2. 溶媒対照区の平均補正核粒子数は「-6~0 個」の範囲にあり、修復期の細胞が 5%を越えないこと。
3. 陽性対照物質の 2-AAF (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) において、補正粒子数を 5 以上有する細胞の割合が、60~100%であって、補正粒子数が 6~20 個の範囲にあること。
4. 5 個以上の補正粒子数を有する細胞の割合が 5%以上のときに、検体は陽性と判断される。

## 【結 果】

陰性対照群での初代肝培養細胞の生存率は79.9%であった。

本試験で得られた、補正した核粒子数、細胞質中の粒子数、5個以上の粒子を有する核(修復中の細胞)の要約を次の表に示した。

試 験 群 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	核当たりの補 正粒子数	核 当 たり の 粒 子 数	細胞質中の 平均粒子数	修復中の細 胞割合(%)	生 存 率 (%)
溶媒対照群	-1.11	0.39	1.49	0.0	100.0
検体群 1.0	-0.65	0.75	1.40	0.0	86.2
5	-0.29	0.80	1.09	0.0	84.6
10	-0.54	0.85	1.39	0.0	83.1
25	-0.38	0.91	1.29	0.0	84.5
50#	-0.82	1.14	1.96	0.0	68.9
100	評価不能				32.8
150	評価不能				18.7
陽性対照群 2-AAF 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6.10	7.53	1.43	71.33*	84.9

2-AAF: 2-アセチルアミノフルオレン #: スライドガラス2枚で評価

\*:  $P \leq 0.05$  ( $\chi^2$ 検定),

100 と 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度はきわめて細胞毒性が強く(生存率はそれぞれ 32.8 と 18.7%)、スライド上の細胞数が少なく、UDS を評価できなかった。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  でも細胞毒性がみられ、3枚の標本のうち1枚は評価不能であった。従って、UDS を指標とする評価には、100 と 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$  を除いた良好な生存率の幅(68.9~86.2%)が得られた5用量を核標識のための分析に用いた。一方、陽性対照物質(2-AAF; 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )は、本試験において細胞毒性を示さなかった。

1.0、5.0、10.0、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度の検体処理群では、溶媒対照群に比較して、核当たりの補正粒子数に増加傾向や修復中の細胞の割合について統計学的に有意な増加は認められなかった。陽性対照群では核当たりの補正粒子数と修復中の細胞の割合について著明な増加を示した。

以上の結果より、検体は、ラット肝臓の初代培養細胞における UDS を指標とした DNA 損傷性を有さないものと判断される。

## チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞を用いた HPRT を指標にした 前進突然変異性試験

(毒性資料No.28)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1996 年 4 月 25 日

検体の純度       ：       %

試験系         ：チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞

### 【試験方法】

#### 試験用量設定の理由及び試験液の調製方法

#### コロニー形成率と突然変異試験

4×10<sup>6</sup>個の V79 細胞を培養液中に播種して培養した。接着後（16～24 時間後）に、交換した培養液に各濃度の検体を添加して非代謝活性下及び代謝活性下条件で各々5 時間暴露した。その後、単層の細胞を PBS で洗浄し、トリプシン処理し、細胞浮遊液を作製した。250mL フラスコに 1.5×10<sup>6</sup>個の細胞を、また 3 枚のペトリディッシュそれぞれに 200 個の細胞を再播種した。

ペトリディッシュは 7 日間培養し、コロニー数を算定することにより細胞毒性を判定した。

一方、フラスコに再播種した細胞は、細胞増殖と誘発変異株の発現のために培養し、4 日と 7 日に継代した。最初の継代のときに、各用量群および対照群当たり 2 個の 250mL フラスコに 1.5×10<sup>6</sup>個の細胞を再播種し、ほぼ 7 日間培養した。変異株細胞選抜のために 100μg/mL の 6-チオグアニン(6-TG)を添加したヒポキサンチン無含有培養液のディッシュ（合計 8 ディッシュ）に 3×10<sup>5</sup>個の細胞を播種した。また絶対コロニー形成率を求めるためにディッシュ(3枚のディッシュ)に 200 個の細胞を培養液に播種した。

さらに、37℃、約5%の炭酸ガスの条件下で6～7日間培養した後、コロニーを固定し、ギムザ液で染色した。突然変異株選択用ディッシュでは6-TG耐性コロニー数を、またコロニー形成率測定用ディッシュではコロニー数を計測した。ただし50個以下の細胞から形成されるコロニーは除外した。

## 【結果及び考察】

### 1. コロニー形成率

突然変異試験の溶媒対照群の絶対コロニー形成率は非代謝活性化条件下で59.5～77.8%、代謝活性化条件下で58.5～95.0%の範囲であった。従って試験におけるコロニー形成状態は良好であった。

### 2. 非代謝活性化条件における突然変異

非代謝活性化条件下で2回の試験を行った。相対コロニー生存率と相対増殖率の用量相関的な減少が認められた。さらに、検体の沈殿が30µg/mL以上の濃度で発生した。溶媒対照群と比較して生物学的に意義があり、再現性のある突然変異の頻度の増加は認められなかった。2回の試験の結果、試験したいずれの濃度においても突然変異の頻度に統計的に有意な増加は認められなかった。陽性対照物質のEMSは2回の試験で明らかな変異原性を誘発した。したがって、検体は非代謝活性化条件で変異原性はないと評価した。

### 3. 代謝活性化条件における突然変異

代謝活性化条件で2回の試験を行った。両試験共に、細胞毒性はみられなかった。そこで、検体をこの培養条件下で溶解限界の60µg/mLまで試験した。溶媒対照群と比較して生物学的に意義があり、再現性のある突然変異の頻度の増加は認められなかった。2回の試験の結果、試験したいずれの濃度においても突然変異の頻度に統計的に有意な増加は認められなかった。陽性対照物質であるDMBAは明らかな変異原性を示した。したがって、検体は本試験系の代謝活性化の存在下で変異原性はないと評価した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で前進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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

群	濃度 μg/ ml	1回目試験					2回目試験				
		生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	コロニー 形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>	生存 細胞数	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	コロニー 形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>
非代謝活性化											
陰性対照		157.7	84.7	16	81.0	8.2	150.0	103.8	7	65.7	4.4
			110.2	27	81.7	13.8		105.0	10	62.5	6.7
溶媒対照		188.3	100	16	77.8	9.8	127.0	100	10	67.2	6.2
			100	21	59.5	14.7		100	9	61.3	6.1
陽性対照 EMS	900	41.7	19.7	1016	68.8	615.3	94.3	36.7	843	50.8	691.4
			26.9	921	50.7	756.9		35.0	845	62.7	641.8
検体	5	147.0	103.2	12	85.0	5.9	166.3	117.4	5	67.5	3.1
			88.4	14	88.5	6.6		87.0	6	60.7	4.1
	10	118.7	127.1	5	60.5	3.4	152.0	96.0	6	69.3	3.6
			93.6	12	81.3	6.2		102.3	4	71.7	2.3
	20	170.7	57.2	5	70.2	3.0	148.7	123.7	1	68.7	0.6
			79.5	16	60.5	12.6		88.2	3	75.5	1.7
	25	-	-	-	-	-	160.7	66.0	4	65.8	2.5
								52.2	8	56.7	6.7
	30	64.7	13.6	4	99.0	1.7	60.0	35.1	1	71.7	0.6
			20.6	5	62.8	3.3		11.6	5	81.3	2.6
	45	70.0	8.6	10	80.3	5.2	79.3	6.9	1	71.0	0.6
			13.6	6	80.5	3.1		29.5	7	79.3	4.2
	60	34.7	10.7	2	60.2	1.4	-	-	-	-	-
			11.3	18	78.5	10.9					
代謝活性化											
陰性対照		154.7	79.8	8	63.2	5.3	110.7	74.9	14	69.2	8.4
			87.9	5	68.7	3.0		88.8	28	78.0	15.0
溶媒対照		112.3	100	2	58.5	1.4	132.0	100.0	16	95.0	7.0
			100	5	69.2	3.0		100.0	15	67.8	9.2
陽性対照 DMBA	20	128.3	58.4	82	62.0	55.1	90.3	57.7	134	82.5	67.7
			54.3	89	61.0	57.9		49.5	151	88.7	70.9
検体	1.88	102.3	67.2	2	58.5	1.4	137.0	53.3	19	94.7	8.4
			87.0	7	69.8	4.2		77.6	9	75.2	5.0
	3.75	106.7	92.5	1	66.0	0.6	149.5	93.3	22	79.0	11.6
			66.1	1	93.3	0.4		85.9	18	63.2	11.9
	7.5	110.5	69.8	8	78.2	4.3	118.7	61.5	13	78.0	6.9
			72.7	13	72.2	7.5		76.9	7	72.7	4.0
	15	126.7	81.2	10	65.8	6.3	148.3	74.0	17	91.2	7.8
			50.5	5	73.7	2.8		74.8	12	71.7	7.0
	30	130.7	74.4	2	78.2	1.1	118.0	75.9	19	62.8	12.6
			79.9	3	83.5	1.5		53.3	15	70.5	8.9
	60	174.7	64.5	4	57.3	2.9	96.7	48.3	11	70.5	6.5
			88.9	7	60.7	4.8		34.5	22	69.5	13.2

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8ディッシュのコロニーの合計 C: 細胞 200 個あたりのコロニー形成率

EMS : エチルメタンサルホネート

DMBA : ジメチルベンズアントラセン

- : 実施せず

## マウスにおける小核試験

(毒性資料No.29)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年7月6日

検体の純度       ：       %  
試験系            ： NMRI系マウス、 1群雌雄各5匹  
                    (試験開始時 6～12週齢、体重 27～43g)  
試験期間         ： 16, 24, 48 時間

### 【試験方法】

検体を0.5%クレモホア液に懸濁して、1群雌雄各5匹のマウスに1500mg/kgを1回腹腔内投与し、16、24、48時間後に屠殺し、大腿骨の骨髄を摘出した。

陰性対照として0.5%クレモホア液のみを、陽性対照として脱イオン水に溶解したシクロホスファミドの20mg/kgを検体と同様に腹腔内投与した。24時間後に屠殺し、大腿骨の骨髄を摘出した。

投与容量は、検体、陰性対照で20mL/kg、陽性対照で10mL/kgとした。

検査用の標本はSchmidの方法により作製し、光学顕微鏡により評価した。即ち、1動物につき1000個の多染性赤血球を観察し、同時に正染性赤血球数も観察した。

投与量設定の根拠は、1群雌雄計5匹に検体の1000、1750、2500mg/kgをそれぞれ腹腔内投与した予備試験に基づいた。この予備試験では全群に鎮静、粗毛、歩行失調、けいれん、呼吸困難等がみられ、1750mg/kg群で5例中1匹、2500mg/kgでは5匹全例に死亡が観察された。この結果から本試験での投与量として1500mg/kgを選択した。

【試験結果】

1) 一般症状

腹腔内投与から屠殺までの間に、鎮静、粗毛、歩行失調、けいれん、呼吸困難等がみられた。

死亡例は認められなかった。

2) 突然変異誘発性 (表 1)

雌雄間に差は認められなかったので雌雄の結果をまとめて評価した。表に示すように、1500mg/kgの検体を腹腔内に投与した群と陰性対照群との間の小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、統計学的に有意な変化はなかった。小核を有するこれらの細胞の出現頻度は、陰性対照群では1.8/1000、検体投与群では、16、24、48時間後の屠殺でそれぞれ2.2/1000、1.6/1000及び1.8/1000であった。これらの頻度は陽性の結果を意味するものではなかった。また、検体投与群において、多染性赤血球に対する正染性赤血球の割合が検体投与群の48時間屠殺例で有意に増加した。しかし、この変化に対する毒性学的な意味は明らかではなかった。

陽性対照薬剤のシクロホスファミドの作用は、小核を有する多染性赤血球の著明な増加 (頻度は12.2/1000) がみられたことによって確認された。小核を有する正染性赤血球数は投与群と陽性対照群とも有意な増加を認めなかった。

以上の結果から、本検体には小核誘発作用はないものと判断された。

投与群	算定した多染性赤血球総数	1000個の多染性赤血球あたりの正染性赤血球数	小核を有する細胞数	
			1000個の正染性赤血球あたり	1000個の多染性赤血球あたり
陰性対照群	10000	798 ± 493	0.8 ± 1.2	1.8 ± 1.2
検体 16時間	10000	1130 ± 302	1.0 ± 0.8	2.2 ± 1.9
検体 24時間	10000	1982 ± 2099	1.2 ± 1.1	1.6 ± 1.0
検体 48時間	10000	2483* ± 528	0.8 ± 0.5	1.8 ± 1.8
陽性対照 シクロホスファミド*	10000	652 ± 196	1.3 ± 1.4	12.2* ± 3.6

\* : Wilcoxonの順位和検定で有意差 (p < 0.01) あり

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.18-6)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1997年9月10日



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(12) 生体の機能に及ぼす影響  
生体機能に及ぼす影響に関する試験

(毒性資料 No. 30)

試験機関：

報告書作成年月日：1997年7月8日

検体の純度           ：        %  
供試動物            ： ICR系マウス、SD系ラット、日本在来種ウサギ  
試験期間            ： 1997年1月～7月

【試験項目及び結果】

検体をクレモホア EL を加え摩砕後、注射用蒸留水に懸濁した（クレモホア EL 最終濃度；2%）。投与方法は経口投与とし、投与前 18～24 時間絶食した。検体の投与量は、マウスとラットで 1000mg/kg と 5000mg/kg の 2 濃度を、ウサギでは 500mg/kg と 2500mg/kg の 2 用量とした。いずれの検査時においても対照群として、溶媒のみが投与された。投与容量はいずれの動物種とも 20ml/kg とした。

なお、ウサギの投与量の設定にあたっては、当初 1000mg/kg と 5000mg/kg としたが、最初の検査のコリンエステラーゼ活性の測定時に 5000mg/kg 投与の 3 匹中 2 匹の死亡が投与翌日に認められたことから、500mg/kg と 2500mg/kg の 2 用量に変更した。（コリンエステラーゼ活性については、1000mg/kg と 5000mg/kg で試験を行っていたため、これらの結果も記載した。）

1. 一般状態及び行動に対する作用

1) マウスにおける一般状態

供試動物：ICR 系雄マウス，8 週齢，体重；25.9～29.6g，1 群各 5 匹

方 法：投与前、投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間に Irwin 法に準じた症状観察を行った。

結 果：Irwin 法に準じて観察した一般状態は、溶媒及び検体投与群ともに、投与前と比較して、投与後のいずれの観察時間においてもほとんど変化しなかった。

2) ウサギの一般状態

供試動物：日本在来種雄ウサギ，9 週齢，体重；1.7～1.9kg，1 群各 3 匹

方 法：投与前、投与後 0.5、1、2、4、6 時間、1、2、3、及び 7 日にケージ内で一般状態(全身状態，眼，吻，耳介等)の観察を行った。

結 果：溶媒及び検体投与群ともに、投与後のいずれの観察時間においても一般状態は、投与前と比較して著しい変化はなかった。

## 2. 中枢神経系に対する作用

### 1) マウスの自発運動量

供試動物：ICR系雄マウス，8週齢，体重；28.2～33.5g，1群各5匹

方 法：14時頃にSupermexの測定箱に収容し、16時に投与し、翌日7時までの運動量を水平及び垂直の成分に分け、1時間ごとに積算した。

結 果：検体投与群では、溶媒対照群と比較して著しい差は認められなかった。5000mg/kg群の5匹中1匹で、投与6時間後以降水平及び垂直方向の運動量がゼロとなった。この変化は、他の検査項目で投与の影響がみられなかったこと、一般症状やマウスの運動機能に投与の影響がみられなかったことから、個体差の可能性もあり、検体の影響とはみなされなかった。

### 2) ウサギの体温

供試動物：日本白色種雄ウサギ，9～11週齢，体重；1.6～2.0kg，1群各3匹

方 法：投与前に体温が安定していることが確認された雄ウサギを用い、経口投与前及び投与後6時間まで1時間ごとにそして投与後1、2、3、7日にパイロジェンテスト用温度計を用いて直腸温を測定した。

結 果：検体投与群のウサギの直腸温には、溶媒対照群と比較して差は認められなかった。

### 3. 自律神経系に対する作用

#### 1) ウサギの瞳孔

方 法：この検査は、ウサギの一般状態観察の試験と並行して実施された。経口投与前及び投与後 0.5、1、2、4、6 時間及び 1、2、3、7 日に、瞳孔径を三田式万能瞳孔計で測定した。

結 果：いずれの投与群でもウサギの瞳孔径に対して影響は認められなかった。

### 4. 呼吸・循環器系に対する作用

#### 1) 無麻酔ウサギの呼吸・血圧・心拍数・心電図

供試動物：日本在来種雄ウサギ，9～11 週齢，体重；1.9～2.2kg，1 群各 3 匹

方 法：動物をペントバルビタール・ナトリウム(50mg/kg)の静注で麻酔し、右大腿動脈にヘパリン加生理食塩液(100U/mL)で満たしたポリエチレン・カテーテルを挿入し、一端を体外に露出し固定した。翌日、動物を保定箱に保定し、鼻部に呼吸センサを取り付け呼吸数を、右大腿動脈に挿入したカニューレに装着した観血式血圧トランスデューサーを介して血圧を、血圧脈波で心拍数計の駆動により心拍数を、また、四肢に電極を取り付け、心電図を測定し記録した。なお、投与前、投与後 0.5、1、2、4、6 時間に各パラメーターを測定した。

結 果：無麻酔ウサギの呼吸、血圧、心拍数、心電図について投与の影響は認められなかった。各パラメータに変動は認められたが、溶媒投与群と検体投与群との間に著しい差はなかった。

### 5. 体性神経系に及ぼす作用

#### 1) マウスの運動機能

供試動物：ICR 系雄マウス，8 週齢，体重；27.4～31.4g，1 群各 5 匹

##### a. 回転棒法

方 法：予め運動機能を検査(毎分 5.26 回転する直径 3cm の回転棒上に 1 分間以上滞留できることを確認)を行い、更に検査当日に動物の運動機能を再確認した。検査は、回転棒上に 1 分間以上滞留できるかを指標として投与前と投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間に行った。

結 果：回転棒法により測定したマウスの運動協調性は投与により影響を受けなかった。

##### b. 懸垂法

方 法：a 項の回転棒法と並行して実施された。動物の前肢を直径 1.5mm の針金に

かけて懸垂させ、5 秒以内に針金に後肢をかけて体勢を保持できるものを正常と判定した。

結 果：懸垂法により測定したマウスの筋力及び運動協調性はいずれの投与群とも投与による影響を受けなかった。

## 6. 消化管に及ぼす作用

### 1) マウスの炭末輸送能

供試動物：ICR 系雄マウス，8 週齢，体重；27.7～32.9g，1 群各 5 匹

方 法：溶媒または検体経口投与 30 分後に 5%アラビアゴム液で調製した 5%炭末懸濁液(0.2ml/動物)を経口投与した。その 30 分後に動物を頸椎脱臼で屠殺し、全小腸を摘出して、炭末輸送状態を観察した。炭末輸送能の評価は、幽門から回盲弁までの長さを 100 とし、これに対する幽門から運ばれた炭末の先端までの長さを百分率で表し比較した。

結 果：マウスの消化管炭末輸送能に対して、検体群と溶媒対照群との間に差は認められなかった。

## 7. 腎機能に及ぼす影響

### 1) ラットの腎機能

供試動物：SD 系雄ラット，8 週齢，体重；244.6～279.7g，1 群各 5 匹

方 法：代謝ケージに個別飼育し、投与前 3 日間はこのケージ内で予備観察した。溶媒または検体投与後、給餌給水を断って 6 時間尿を採取した。そして、尿量、電解質 (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) 濃度を、電解質分析装置を用い測定した。また、pH を pH メーターで測定した。

結 果：1000mg/kg 群で投与後 0～6 時間の蓄尿でカリウム排泄量が増加したが、この変化は、対照群との差が極めて小さいことと尿量、尿中ナトリウム、塩素排泄量に変化みられなかったことから、検体の影響とは考えられなかった。5000mg/kg 群では尿量、尿中ナトリウム、塩素排泄量は減少し、カリウム排泄量は増加したが、いずれも有意な変化ではなかった。また pH 値はそれぞれ溶媒対照群と比較して差が認められなかった。従って、これらの腎機能に対する影響はわずかであり、検体の影響か否か明らかでない。

## 8. 血液に及ぼす影響

### 1) ラットでの血液凝固能

供試動物：SD 系雄ラット，8 週齢，体重；254.9～291.6g，1 群各 5 匹

方 法：溶媒または検体経口投与 1 時間後にペントバルビタール・ナトリウム麻酔

ド(50mg/kg、腹腔内)で腹部大静脈より抗凝固剤として3.8%クエン酸を用いて採血した。冷却遠心分離(1800×g, 10分間)により上清を分離してプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

結 果: ラットの血液凝固系に対して、すべての投与群で影響は認められなかった。

## 2) ラットでの血液の溶血性

供試動物: SD系雄ラット, 8週齢, 体重; 267.4~290.7g, 1群各5匹

方 法: 溶媒または検体経口投与1時間後にエーテル麻酔下で腹部大静脈より抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血した。

10%リン酸加食塩液を調製してこれを注射用蒸留水で1%溶液を作製した。これを0.05%づつ段階的に希釈して0.85~0.10%の溶液を調製した。各溶液を試験管に5mlづつ分注し、採血した血液の0.05mlを加えて転倒混和して室温に30分放置した。続いて再混和してから遠心後(700×g, 5分間)、得られた上清の540nmにおける吸光度を測定して溶血の有無を確認した。

結 果: 540nmにおける吸光度において、検体投与群と溶媒投与群との間に差は認められなかった。

## 9. コリンエステラーゼに対する影響の試験

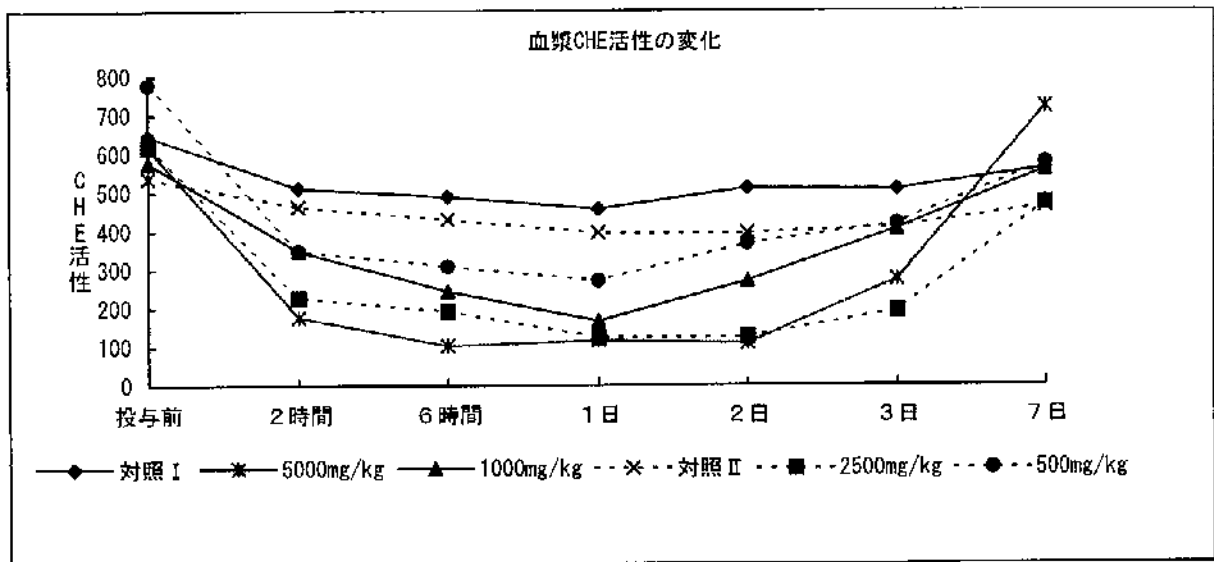
供試動物: 日本在来種雄ウサギ, 9週齢, 体重; 1.8~1.9kg, 1群各3匹

方 法: 投与前、投与後2、6時間、1、2、3及び7日に耳介静脈から採血し、血漿コリンエステラーゼ活性を測定した。

1回目の検査では1000mg/kgと5000mg/kgが投与された。5000mg/kg群3匹中2匹の死亡が投与翌日に認められた。有機リン剤の中毒死の時のような流涎、尿失禁等による体表の汚れは観察されなかった。死亡動物の剖検では胃内に飼料の充満と胃壁の非薄化が観察された。この結果に基づいて2回目の検査として、500mg/kgと2500mg/kg群が追加設定された。

結 果: 500mg/kg群では投与後1日に、1000mg/kg群では投与後6時間から1日に、2500mg/kg群では投与後2時間から3日、5000mg/kg群では投与後2時間及び6時間に、それぞれの同時刻における溶媒対照群と比較して有意に減少した。いずれも投与後7日までに回復していた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。



本検体は血漿コリンエステラーゼ活性を有意に阻害したが、本薬理試験での瞳孔径、無麻酔ウサギの血圧、心拍数、心電図、ウサギでの一般症状について、有機リン剤やカーバメート剤におけるようなコリン作動性の中毒症状は観察されなかった。

以上の試験結果より、本剤は、ラット及びマウスの生理機能に対して 5000mg/kg の投与量で、ウサギでは 500mg/kg 以上で阻害の認められたコリンエステラーゼ活性を除き、2500mg/kg で投与量で著しい影響を及ぼさないものと判断される。



「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)		投与 経路	投与量 mg/kg	動物数 /群	無作用量 mg/kg	作用量 mg/kg	備考
一般 状態	マウスの一般 状態 Irwin 法	経口	0, 1000, 5000	♂ 5	5000	—	
	ウサギの一般 状態 Irwin 法	経口	0, 500, 2500	♂ 5	2500	—	
中 枢 神 経 系	マウスの自発 運動量	経口	0, 1000, 5000	♂ 5	5000	—	
	ウサギの体温	経口	0, 500, 2500	♂ 3	2500	—	
自律 神経 系	ウサギの 瞳孔	経口	0, 500, 2500	♂ 3	2500	—	
呼吸 ・ 循環 器系	無麻酔ウサギ の呼吸数・ 血圧・心拍数・ 心電図	経口	0, 500, 2500	♂ 3	2500	—	
体 性 神 経 系	マウスの運動 機能						
	a)回転棒法 b)懸垂法	経口	0, 1000, 5000	♂ 5	5000	—	
消化 管	マウスの 炭末輸送能	経口	0, 1000, 5000	♂ 5	5000	—	
腎 機 能	ラットの尿排泄	経口	0, 1000, 5000	♂ 5	5000	—	
血 液	ラットの 血液凝固時間	経口	0, 1000, 5000	♂ 5	5000	—	
	ラットの溶血	経口	0, 1000, 5000	♂ 5	5000	—	
C H E	ウサギ血漿	経口	0, 500, 1000,2500, 5000	♂ 3	< 500	500	5000mg/kg の3匹中2 匹が投与翌 日に死亡

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイオルックロップサイエンス株式会社にある。

(13) その他

(毒性資料No.18-1)

試験機関 :

報告書作成年月日 : 1997年8月22日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.18-2)

試験機関 :

報告書作成年月日 : 1997年12月18日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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パイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料 No. 18-3)

試験機関：

報告書作成年月日：1997年11月11日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイオクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料 No. 18-4)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1998年1月23日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.18-5)

試験機関 :

報告書作成年月日 : 1998年1月13日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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パイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.18-7)

試験機関：

報告書作成年月日：2000年2月23日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.18-8)

試験機関：

報告書作成年月日：2000年2月24日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.19-1)

試験機関 :

報告書作成年月日 : 1997年8月22日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.19-2)

試験機関：

[非 GLP 対応]

報告書作成年月日 : 2000 年 6 月 16 日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイコルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.19-3)

試験機関：

[非 GLP 対応]

報告書作成年月日 : 2000 年 6 月 21 日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料 No. 20-1)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1997年12月11日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.20-2)

試験機関：

報告書作成年月日：2000年2月14日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.20-3)

試験機関：

報告書作成年月日：2000年2月14日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料 No. 30-1)

試験機関：

報告書作成年月日：1997年12月16日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイオエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料 No. 30-2)

試験機関：

報告書作成年月日：1999年10月5日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料 No. 30-3)

試験機関：

①報告書作成年月日：1999年11月1日

②報告書作成年月日：2000年2月4日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.30-4)

試験機関 :

[非 GLP 対応]

報告書作成年月日 : 2000年6月19日

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料 No. 30-5)

試験機関：

[非 GLP 対応]

報告書作成年月日：2000年6月16日



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。