

8.5 慢性毒性および発がん性

8.5.1 イヌを用いたカプセル経口投与による慢性毒性試験 (資料 No.T-3.1)

試験機関

報告書作成年 1995年 [GLP 対応]

検体純度：

試験動物： ビーグル種イヌ、1群雌雄各4匹、投与開始時雄4~5ヶ月齢、
雌5ヶ月齢

投与期間： 12ヶ月 (雄1992年5月29日~1993年5月27日)
(雌1992年5月14日~1993年5月12日)

投与方法： 検体をゼラチンカプセルに雄は0、0.4、2.0、10.0及び50.0 mg/kg/day、
雌は0、2.0、10.0及び50.0 mg/kg/dayとなる様に封入し、1日1回経
口投与した。個体別の投与量は最新の体重を基に計算した。

試験項目及び試験結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日観察した。

検体投与に関連した徴候及び死亡の発生はなかった。

体重変化；投与開始前、投与開始から13週間は週1回、その後は4週間に1回及
び剖検直前にすべての生存動物の体重を測定した。

50.0 mg/kg/day 群の雌雄の16週から終了時まで低値が認められた。

摂餌量；全動物の摂餌量を毎日測定した。

50.0 mg/kg/day 群の雌1例で16週に減少したが、20週には回復した。
この変化は肝障害に起因するものと判断された。

血液学的検査；投与開始前、13、26及び52週に、全動物を対象として、橈側皮
静脈から採血し、以下の項目の測定を行った。

赤血球数(RBC)、血色素量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、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)、
血小板数(Plat)、白血球数(WBC)、白血球分類(Diff-WBC；L,リンパ球、N,
好中球、St,桿状核球、Seg,分葉核球、E,好酸球、B,好塩基球、M,単球、UC:
分類不能)、プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチ
ン時間(PTTK)、フィブリノーゲン濃度(Fb)、

0.4 mg/kg/day 群の雄で 26 週に M の有意な増加が、10.0 mg/kg/day 群の雌で投与開始前に Plat の有意な増加が、52 週に WBC の有意な増加が認められたが、投与用量及び投与期間との関連性がないことから偶発性変化と判断された。

血液生化学的検査；血液学的検査で使用した血液及び食欲低下を示した 50.0 mg/kg/day 雌 1 例で 17 週に採血した血液から得られた血漿を用い、以下の項目の測定を行った。

アルカリホスファターゼ(AP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、γ-グルタミルトランスペプチターゼ(GGTP)、クレアチンホスホキナーゼ(CPK)、クレアチニン(Creat)、尿素窒素(BUN)、総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、グロブリン(Glb)、アルブミン/グロブリン比(A/G)、ブドウ糖(BS)、総コレステロール(TCh)、トリグリセライド(TG)、総ビリルビン濃度(TBil)、カルシウム(Ca)、リン(P)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロライド(Cl)

50.0 mg/kg/day 群の雄で 26 及び 52 週に、食欲低下を示した 50.0 mg/kg/day 群の雌 1 例で 17 週に AP、ALT の増加傾向が認められ、これらの変化は 90 日間反復経口毒性試験の高用量群 (50 mg/kg/day 群以上の投与群) の雌雄にも認められていることから、検体投与による肝障害を示唆する変化と判断した。

他に 0.4 mg/kg/day 群の雄で 52 週及び 2.0 mg/kg/day 群の雄で 26 週に TBil の有意な増加、2.0 mg/kg/day 群の雄で 52 週及び 50.0 mg/kg/day 群の雌で投与開始前に P の有意な減少が認められたが、これらの変化は投与用量及び投与期間との関連性がないことから偶発性変化と判断された。

尿検査：血液学的検査と同時期に採取した尿について以下の項目を検査した。

外観、尿量、比重、pH、蛋白、ブドウ糖、ケトン体、ビリルリン、潜血、ウロビリノーゲン、沈渣

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

2.0 及び 50.0 mg/kg/day 群の雌で 13 週に尿量の有意な減少が認められたが、その他の尿検査項目に変化はなく、尿路系組織には病理組織学的にも異常がなかったことから、検体投与による影響ではないと考えられた。

眼科学的検査；投与開始前と 26 及び 52 週に直接型検眼鏡で全動物に対して以下の項目を検査した。

眼球、眼瞼、結膜、角膜、前眼房、瞳孔、虹彩、水晶体、硝子体、眼底

0.4 mg/kg/day 群の雄 1 例で 26 及び 52 週に角膜混濁が認められ、52 週で完全消失したが、高用量群では眼科学的検査で異常が認められなかったことから、本変化は偶発性変化と判断された。

臓器重量；投与終了時の全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、下垂体、甲状腺(上皮小体を含む)、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣または卵巣

2.0 mg/kg/day 以上の投与群の雄で、甲状腺重量の有意な減少が認められ、さらに甲状腺重量体重比は 2.0 及び 10.0 mg/kg/day 群の雄で有意な減少が認められたが、実施試験機関における 12 ヶ月間の慢性毒性試験の背景データと比較すると、正常範囲内の重量であり、更に全ての検体投与群の雄において甲状腺には組織学的異常は認められなかったことから、これらの変化は検体投与による影響ではないと考えられた。他に検体投与に起因すると考えられる変化はなかった。

病理解剖学的検査；投与期間終了時の全動物を対象として剖検を実施した。検体投与に関連のある変化は認められなかった。

病理組織学的検査；病理解剖学的検査を実施した動物を対象として、以下の臓器、組織について常法により標本作製し、鏡検した。

脳(大脳、小脳、橋、延髄を含む8カ所)、脊髓(頸部、胸部、腰部)、末梢神経(座骨神経)、下垂体、胸腺、甲状腺・上皮小体(両側)、副腎(両側)、脾臓(2カ所)、骨・骨髓(胸骨、大腿骨、肋骨)、リンパ節(頸部、腸間膜)、心臓(3カ所)、大動脈、唾液腺、舌、食道、胃(噴門部、胃底部、幽門部)、肝臓(3カ所)、胆嚢、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、気管、鼻腔、咽喉、肺(主要気管支を含む2カ所)、腎臓(両側)、膀胱、精巣(両側)、精巣上体(両側)、前立腺、卵巣(両側)、子宮(角部、体部、頸管部)、眼球(両側)、骨格筋、皮膚、乳腺(雌のみ)、肉眼的異常部位。

10.0 および 50.0 mg/kg/day 群の雌雄の肝臓で炎症細胞浸潤、肝細胞壊死、肝細胞腫大及び胆管増生が認められた。これらの変化は90日間反復経口毒性試験の高用量群(50.0 mg/kg/day 以上の投与群)の雌雄にも認められていることから、検体投与に起因する変化と判断した。肝臓の炎症細胞浸潤は2.0 mg/kg/day 群の雄1例にも認められたが、当研究所における12ヶ月間の慢性毒性試験の対照群の30例中2例に同様の病変が認められていることから、2.0 mg/kg/day 群の雄1例の本変化と検体投与の関連性を明確にすることはできなかった。この他に対照群と検体を投与した雌雄の腎臓で髄質石灰化、0.4 および 10.0 mg/kg/day 群の雄、2.0、10.0 および 50.0 mg/kg/day 群の雌で甲状腺のC細胞増生とリンパ球性甲状腺炎がみられたが、これらの変化は対照群でもみられた変化であり、投与用量との関連性がないことから、検体投与による影響ではないと考えられた。

以上の結果から、本剤のイヌに対する12ヶ月カプセル経口投与による慢性毒性試験における影響として、50.0 mg/kg/day 投与群に雌雄の体重増加抑制、雌の1例でみられた摂餌量減少、血液生化学検査でのAP、ALTの増加傾向及び病理組織学的検査における肝臓の変化が認められ、10.0 mg/kg/day 投与群においても病理組織学的検査で肝臓に変化がみられた。

従って、本試験における無影響量は2.0 mg/kg/day、最小中毒量は10.0 mg/kg/day、確実中毒量は50.0 mg/kg/day と判断された。

8.5.2 ラットを用いた飼料混入投与による慢性毒性／発がん性併合試験（資料 No.T-3.2）

試験機関

報告書作成年 1995 年 [GLP 対応]

検体純度：

試験動物： Fischer (F344/DuCrj)系ラット、主群は 1 群雌雄各 50 匹、衛星群は 1 群雌雄各 35 匹、投与開始時 5 週齢
投与開始後 26、52 及び 78 週時に、衛星群の各群雌雄 10 匹を中間屠殺した。
78 週間投与終了後の衛星群の残余動物は、検査に供試せず安楽死させ廃棄した。

試験期間： 104 週間（雄 1991 年 10 月 7 日～ 1993 年 10 月 6 日）
（雌 1991 年 8 月 6 日～ 1993 年 8 月 8 日）

投与方法： 検体を雄には 0、40、400、2000 ppm、雌には 0、40、400、4000 ppm の濃度で飼料に混入し、104 週間にわたって自由摂取させた。検体を混入した飼料は 4 週間に 1 回調製した。

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日観察した。

一般状態は 4000 ppm 群の雌において、脱毛および被毛の汚れ（すべて外陰部の汚れ）の発生頻度、2000 ppm 群の雄において、削瘦、行動不活発、呼吸促迫、眼球の混濁と退色および皮膚の蒼白化の発生頻度が対照群に比し有意に増加した。その他の用量群で散見された変動は、すべて発生頻度の減少であり、毒性的意義はないと判断された。

死亡率（次表参照）では、2000 ppm 群の雄において、72 週時より死亡率が対照群に比し有意に増加し、93 週までに全例が死亡ないし切迫殺に供された。これらの動物の主たる死因は腎障害であった。40 ppm 群の雄において、104 週時に死亡率が対照群に比し有意に増加したが、当研究所における背景対照の変動範囲（20~38%）内であり、検体投与によるものではなかったと判断した。その他の投与群では対照群に比し有意な死亡率の増減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石原産業株式会社にある。

試験終了時の死亡率を下表に示す。

投与量 (ppm)		0	40	400	2000	4000
死亡率 (%)	雄	12	28	22	100	—
	雌	28	20	14	—	26

体重変化；投与開始から 13 週間は週 1 回、16 週以降は 4 週間に 1 回すべての生存動物の体重を測定した。

4000 ppm 群の雌では投与期間を通じて有意な低体重が持続した。2000 ppm 群の雄では投与 4 週より全例が死亡した時期まで対照群に比し有意な低体重が持続した。400 ppm 群の雄では、投与 24 週、68 週、72 週、80 週から 96 週および 104 週時に、雌では 40 週、48 週および 52 週時に対照群に比し有意な低体重が認められた。40 ppm 群の雌雄では体重は対照群と同様に推移した。

摂餌量；主群の全ケージについて、投与開始から 13 週間は毎週 1 回、16 週以降は 4 週に 1 度測定した。

4000 ppm 群の雌において、飼料摂取量が対照群に比し有意に低い週が投与期間を通じて散見された。投与期間中の群平均飼料摂取量は、対照群の 95%であった。2000 ppm 群の雄において、飼料摂取量が投与 1 週および 52 週から 88 週時に対照群に比し有意に低い値を示した。投与期間中の群平均飼料摂取量は、対照群の 91%であった。400 ppm 群および 40 ppm 群の雌に認められた摂取量の有意な増加は、投与期間中の群平均飼料摂取量が対照群と同程度であったことから、偶発的変動と判断した。同群の雄では飼料摂取量に異常は認められなかった。

食餌効率；投与開始週より投与開始後 13 週時まで毎週、体重増加量と摂餌量から算出した。

4000 ppm 群の雌の食餌効率は対照群に対し概ね低い値で推移し、13 週までの平均食餌効率は対照群の 89%にとどまった。2000 ppm 群の雄の食餌効率は対照群に対し概ね低い値で推移し、13 週までの平均食餌効率は対照群の 94%にとどまった。400 ppm 以下の投与群の雌雄の食餌効率は対照群の値に対し増減したが、一定の変動は認められず、偶発的変動と判断された。

検体摂取量；投与期間中 (104 週間)の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)		40	400	2000	4000
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	1.313	13.26	70.1	—
	雌	1.601	16.45	—	172.6

眼科的検査；投与開始前に全例、投与 25、51、77 及び 103 週時には主群の対照群と最高用量群 (103 週時の雄については 400 ppm 群)の全生存動物について検査した。検体投与に関連のある異常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石原産業株式会社にある。

尿検査： 投与開始後 13、26、52 及び 78 週時に衛星群から各群雌雄 10 匹、104 週時には主群の各群 10 匹から採取した尿について以下の項目を検査した。

比重、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン、尿量、尿色、尿沈渣。

4000 ppm 群の雌では、13 週時に尿量が対照群に比し有意に増加し、尿蛋白が有意に減少した、78 週時に尿 pH の上昇（4/10 例で pH 値 7.5 以上を示す）がみられた。2000 ppm 群の雄では、13 週、26 週、52 週および 78 週時に尿量が対照群に比し有意に増加した。26 週時に尿 pH が有意に上昇し（6/10 例で pH 値 7.5 以上を示す）、52 週および 78 週時に尿外観の退色の発生が有意に増加した。また、78 週時では全例の尿沈渣中に針状結晶が認められた。

尿比重は、52 週および 78 週時に有意に減少した。400 ppm 群の雄では、78 週および 104 週時に尿沈渣中に針状結晶が認められ、104 週時に尿量が有意に増加した。

これらはいずれも被験物質投与に起因する腎毒性に伴う変化であると考えられた。同群の雌では、26 週時に尿蛋白の有意な増加がみられたが、投与用量との関連性がないことから偶発性変化と判断した。40 ppm 群の雌雄には異常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石原産業株式会社にある。

血液学的検査；13週間投与終了後に、衛星群から各群雌雄 10 匹を選び、軽麻酔下で眼窩静脈から採血した。また、26、52、78 週間投与終了後には衛星群から、104 週間投与終了後には主群から、各群雌雄 10 匹を選び、麻酔下で後大静脈より採血し、以下の項目の測定を行った。

赤血球(RBC)、血色素量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、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)、血小板数(PLT)、白血球数(WBC)、白血球分類(Diff-WBC)、網赤血球(Reti)

2000 ppm 群の雄では、13 週、52 週および 78 週間投与終了後に Ht と RBC の有意な減少がみられた。また、52 週および 78 週間投与終了後では Hb の有意な減少および PLT、WBC および Diff-WBC における分葉核好中球数の有意な増加が認められた。

78 週間投与終了後では MCV、MCH、MCHC および Reti の有意な増加が認められた。これらのうち、MCV の増加は赤血球の大球化を示し、MCH および MCHC の増加はおそらく著しい赤血球の減少に伴う見かけ上の変化と判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

一方、Reti と Plat の増加は骨髓における造血機能に異常のないことを示すものと判断した。

400 ppm 群の雄では 52 週間投与終了後に Hb が有意に減少したが、これは被験物質に起因する軽度な貧血を示唆する変化と判断した。その他、雄の 40 ppm 群および雌では対照群に比し有意に変動した測定項目はみられなかった。

血液生化学的検査；26、52、78 及び 104 週間投与終了後に、血液学的検査を実施した主群あるいは衛星群の血液から得られた血漿を用い、以下の項目の測定を行った。

アルカリホスファターゼ(AP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ(GGTP)、クレアチンホスフォキナーゼ(CPK)、クレアチニン(Creat)、尿素窒素(BUN)、総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、グロブリン(Glb)、アルブミン/グロブリン比(A/G)、ブドウ糖(Gluc)、総コレステロール(T.Chol)、総ビリルビン濃度(T.Bil)、カルシウム(Ca)、リン(P)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロライド(Cl)

4000 ppm 群の雌では、78 週間投与終了後に BUN が有意に増加した。2000 ppm 群の雄では、52 週および 78 週間投与終了後に GGTP、Creat、BUN、T.Chol、Ca、P および K が対照群に比し有意に増加し、A/G 比が有意に減少した。78 週間投与終了後では CPK が有意に増加した。52 週間投与終了後には Glb が有意に増加した。

Alb は 26 週間投与終了後には対照群に比し有意に増加したが、52 週および 78 週間投与終了後には有意に減少した。400 ppm 群の雄において、104 週間投与終了後に GGTP、Creat、BUN、T.Chol が有意に増加し、Na が減少した。同群の雌には、対照群に比し有意に増減した検査項目はなかった。BUN、Creat、T.Chol、Ca、P、K および Na の変動は腎毒性、GGTP の変動は肝毒性に関連するものと判断された。また、A/G 比と Glb の変動は蛋白代謝に対する影響をそれぞれ示唆するものと思われた。

上記以外にも各検体投与群において、統計学的に有意な変動が観察されたが、毒性学的に意義のない変化あるいは投与量との関連性のない偶発性変化と解釈した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

臓器重量；26、52 及び 78 週間投与終了時に衛星群から、104 週間投与終了後に主群から各群 10 匹ずつを対象として以下の臓器重量を測定し、最終体重に基づいて対体重比も算出した。

脳、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

4000 ppm 群の雌では、腎臓の絶対および相対重量の有意な増加が 52 週および 104 週間投与終了後に認められ、また、相対重量の増加が 26 週および 78 週間投与終了後にみられた。肝臓の相対重量の増加が 52 週および 78 週間投与終了後に認められた。

2000 ppm 群の雄では、腎臓の絶対および相対重量ならびに肝臓の相対重量の増加が 26 週、52 週および 78 週間投与終了後に認められた。脾臓の相対重量の増加が 52 週および 78 週間投与終了後にみられ、脾臓の絶対重量の増加が 52 週間投与終了後に認められた。

400 ppm 群の雄では、腎臓の絶対および相対重量の増加が 52 週、78 週および 104 週間投与終了後に、肝臓の相対重量の増加が 26 週、52 週および 104 週間投与終了後に認められた。同群の雌では対照群に比し有意に重量が変動した臓器は認められなかった。

上記以外にも各検体投与群において、統計学的に有意な変動が観察されたが、毒性学的に意義のない変化あるいは投与用量との関連性のない偶発性変化と解釈した。

肉眼病理学的検査；主群については、死亡・切迫殺例及び 104 週間投与終了後の最終計画殺を含む全動物について剖検を行った。尚、衛星群については途中計画殺動物について剖検し、死亡・切迫殺動物は剖検せずに廃棄した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

4000 ppm 群の雌では、腎臓の暗調化の発生頻度が 52 週、78 週、104 週後計画殺動物および主群全動物で増加した。52 週および 78 週後計画殺動物では外陰部被毛の汚れの発生頻度が増加した。

2000 ppm の雄では、腎臓の表面粗造の発生頻度が 52 週、78 週後計画殺動物、主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物において対照群に比し有意に増加した。削瘦の発生頻度が 78 週後計画殺動物、主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物で増加した。腎臓の腫大の発生頻度が 52 週後計画殺動物で、肝臓の

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

混濁の発生頻度が 78 週後計画殺動物で増加した。上皮小体の腫大および眼球の白濁の発生頻度が主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物で増加した。大動脈の硬化、腺胃壁白色化、小腸および大腸の黒色内容物、腎臓の退色およびのう胞ならびに精巣の軟化の発生頻度が主群全動物で増加した。

400 ppm 群の雄では、腎臓の表面粗造および暗調化の発生頻度が 104 週後計画殺動物および主群全動物で、腎臓の腫大の発生頻度が 78 週後計画殺動物で増加した。同群の雌では、統計学的に有意な増加を示した所見は認められなかった。

上記以外にも統計学的に有意な変動がみられたが、いずれも発生頻度の減少であるいは投与量との関連性がない変化であり、毒性学的に意義のある変化ではなかった。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、26 および 78 週間投与終了後には全群の雌雄の腎臓のみを、52 週間投与終了後には対照群および雌雄の最高用量（雄 2000 ppm、雌 4000 ppm）群について下記に示す全身臓器を、その他の用量群については肺、肝臓、腎臓および肉眼的異常部位を検索した。104 週間投与終了後には、雄の最高用量（2000 ppm）群が全例死亡ないし切迫殺に供されていた為、雄では 400 ppm 群、雌では 4000 ppm 群について全臓器を、その他の用量群については肺、肝臓、腎臓および肉眼的異常部位を検索した。また、主群の死亡・切迫殺例については全臓器を検索し、衛星群の計画殺以外の動物は検査をせず廃棄した。以下病理組織学的検査対象臓器を示す。

- ： 脳(大脳、小脳、延髄)、脊髄(頸部、胸部、腰部)、末梢神経、下垂体、胸腺、甲状腺・上皮小体(両側)、副腎(両側)、脾臓、骨・骨髓(胸骨、大腿骨)、リンパ節(頸部、腸間膜)、心臓、大動脈(胸部)、唾液腺、食道、胃(前胃、腺胃)、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、気管、肺、腎臓(両側)、膀胱、精巣(両側)、精巣上体(両側)、前立腺、精囊及び凝固腺、卵巣(両側)、子宮(角部、頸管部)、眼球及びハーダー腺(両側)、骨格筋、皮膚、乳腺(雌のみ)ならびに肉眼的異常部位(正常組織との境界部も含む)。
- △： 肺、肝臓、腎臓、肉眼的異常部位(正常組織との境界部、腫瘍の場合には異常を認めた近傍リンパ節を含む)
- ： 腎臓
- ×： 廃棄処分のため臓器、組織を採取せず

〔非腫瘍性病変〕

認められた主要な非腫瘍性病変を別表 1 に示す。

4000 ppm 群の雌では、慢性腎症の発生頻度の有意な増加が 104 週後計画殺動物および主群全動物にみられた。また、腎臓の近位尿細管腔拡張の発生頻度の有意な増加が 78、104 週後計画殺動物、主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物に認められた。近位尿細管上皮褐色色素沈着増加の発生頻度の有意な増加が 104 週後計画殺動物および主群全動物にみられた。

2000 ppm 群の雄では、腎臓の初期慢性腎症¹⁾の発生頻度の有意な増加が 26 週後計画殺動物において、慢性腎症²⁾の発生頻度の有意な増加が 52、78 週後計画殺動物、主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物に認められた。腎臓の近位尿細管上皮硝子滴沈着増加と近位尿細管腔拡張の発生頻度の有意な増加が、26、52、78 週後計画殺動物、主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物に認められた。腎臓の近位尿細管上皮褐色色素沈着増加の発生頻度の有意な増加が 52、78 週後計画殺動物、主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物にみられた。腎臓の腎盂粘膜上皮過形成の発生頻度の有意な増加が 78 週後計画殺動物、主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物において、石灰沈着の発生頻度の有意な増加が主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物において認められた。

これらの腎障害の原因を検索すべく、Fischer 系雄ラットに本被験物質を 800 および 400mg/kg/day の用量で 2 週間強制経口投与したところ、近位尿細管上皮細胞内において $\alpha 2u$ グロブリンの沈着量の増加が確認された。また、心臓の動脈壁石灰化、大動脈の壁石灰沈着、脾臓の褐色色素沈着増加、肺の肺胞壁石灰沈着、腺胃の石灰沈着、上皮小体の過形成、胸骨および大腿骨の線維性骨異栄養症の発生頻度の有意な増加が主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物でみられた。脾臓に観察された褐色色素はベルリン青染色による検査の結果、大部分が陽性を示し、褐色色素の本体は鉄であることが判明した。前胃の石灰沈着、腺胃の粘膜下水腫、大腸のびらん・潰瘍ならびに眼球の角膜炎、角膜石灰沈着および虹彩炎の発生頻度の有意な増加が主群全動物で認められ、これらの変化は $\alpha 2u$ グロブリン沈着に起因する重度の慢性腎症による腎臓の機能障害のため引き起こされた腎症二次性上皮小体機能亢進症の結果あるいは関連した変化であると推察された。

400 ppm 群の雄では、腎臓の初期慢性腎症の発生頻度の有意な増加が 52 週後計画殺動物において、慢性腎症の発生頻度の有意な増加が 78、104 週後計画殺動物、主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物において認められた。また、すべての検査時期の動物および主群全動物において腎臓の近位尿細管上皮硝子滴沈着増加の発生頻度が有意に増加した。腎臓の近位尿細管腔拡張の発生頻度の有意な増加が 52、78、104 週後計画殺動物、主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物において、近位尿細管上皮褐色色素沈着増加の発生頻度の有意な増加が 104 週後計画殺、主群の死亡・切迫殺動物および主群全動物において認められた。この雄における腎障害は、2000 ppm 群と同様に $\alpha 2u$ グロブリン沈着量の増加も関与しているものと考えられた。4000 ppm 群の雌と 2000 ppm 群の雄において観察された腎臓近位尿細管上皮細胞の褐色色素は、ベルリン青染色およびシュモール反応による検査の結果いずれの用量群でも陽性を示し、鉄およびリポフスチンであることが判明した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

さらに腎臓では、腎盂粘膜上皮過形成の発生頻度の有意な増加が 104 週後計画殺動物および主群全動物に認められた。同群の雌では主群全動物で肝臓の肝細胞小増殖巣（好酸性細胞）の発生頻度が有意に増加した。40 ppm 群では雌雄とも、統計学的に有意な変動は認められなかった。上記以外にも、各臓器において統計学的に有意な変動が認められたが、いずれも発生頻度の減少であった。

〔腫瘍性病変〕

認められたすべての腫瘍性病変を別表 2 に示す。

精巣の間細胞腫の発生頻度の増加が、主群の 40 ppm 以上の群の雄の死亡・切迫殺動物で認められた。対照群においては死亡率自体も低く、更にその 6 例のうち精巣の間細胞腫がみられたのはわずかに 1 例にすぎなかった。主群全例の総発生頻度における検定を行うと、精巣の間細胞腫の発生頻度に対照群と比較して優位な差は認められず、この変動は偶発的なものと判断した。上記以外にも各検体投与群において統計学的に有意な変動が認められたが、いずれも発生頻度の減少であった。

以上の結果から、本剤のラットに対する 104 週間飼料混入投与による慢性毒性試験における影響として、雄の 2000 および 400 ppm 群において $\alpha_2\text{u}$ グロブリン腎症が認められ、一方、雌においても 4000 ppm 群に腎障害が認められ、確実中毒量であると判断した。しかし、雌雄いずれの被験物質投与群においても腎臓腫瘍を含む腫瘍性病変の被験物質投与による発生頻度の増加ないし発生時期の早期化は認められず、本被験物質の雌雄の Fischer 系ラットにおける最大無作用量及び確実中毒量は以下のように判断した。

	雄	雌
最大無作用量	40 ppm (1.313 mg/kg/day)	40 ppm (1.601 mg/kg/day)
確実中毒量	400 ppm (13.26 mg/kg/day)	4000 ppm (172.6 mg/kg/day)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.5.3 マウスを用いた飼料混入投与による発がん性試験 (資料 No.T-3.3)

試験機関
報告書作成年 1995 [GLP 対応]

検体純度 :

試験動物 : CD-1(ICR系)マウス、1群雌雄各60匹、投与開始時5週齢

投与期間 : 18カ月 (1992年3月5日~1993年9月17日)

投与方法 : 検体を0、500、3500および7000 ppmとなるように飼料に混合し、18ヶ月間にわたって自由摂取させた。検体を混入した飼料は毎週1回調製した。

試験項目及び試験結果 :

一般状態及び死亡率 ; 一般状態及び死亡率を毎日観察した。

皮膚の脱毛及び痂皮形成、角膜混濁、腹部膨満等の症状が対照群を含む全群に認められたが、いずれも投与によるものとは考えられなかった。

試験終了時の死亡率を下表に示す。

投与量(ppm)		0	500	3500	7000
死亡率 (%)	雄	13	17	25	17
	雌	15	17	25	25

体重変化 : 全動物について第13週まで1週間に1回、その後解剖まで4週間に1回測定した。3500 ppm群及び7000 ppm群の雌において第12週まで体重増加抑制が有意に認められた。

摂餌量 : 全動物について第13週まで1週間に1回、その後解剖まで4週間に1回測定した。雄では試験期間を通じて全投与群で相対的摂餌量が高かったが、用量との関連性は認められず、投与に起因するものとは考えられなかった。雌では3500及び7000 ppm群において忌避によると考えられる摂餌量の有意な減少が認められた。

検体摂取量 : 投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)		500	3500	7000
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	70.4	497.8	987.4
	雌	88.5	596.4	1165.5

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

血液学的検査；投与 12 ヶ月及び 18 ヶ月後に各群雌雄の全生存動物について、眼窩静脈洞から採血し塗沫標本から白血球分類 (Diff-WBC) を検査した。
以下に統計学的有意差の認められた項目を示す。

7000 ppm 群の雌雄で、E の有意な増加が認められた。7000 ppm 群の雌を除く全ての投与群で M の有意な増減が認められたが、用量との関連性がなく、12 カ月時と 18 カ月時で変動に一貫性がないため検体投与に起因するものとは考えられなかった。12 カ月時の雄の L の増加も偶発的なものと考えられた。

臓器重量；試験終了時に全生存動物の内、各群 10 匹の脳、肝臓、腎臓、副腎及び精巣の重量を測定し、対体重比及び対脳重量比を算出した。

以下に統計学的有意差の認められた項目を表に示す。

3500 及び 7000 ppm 群の全ての動物について、肝臓の絶対重量、対体重比ならびに体脳重量比の有意な増加が認められ、検体投与による起因すると考えられた。

病理組織学的検査；対照群及び7000 ppm群の全ての動物について、以下の組織について常法に従い組織標本を作製し鏡検した。尚500及び3500 ppm群については*印の組織についてのみ検査した。

脳、下垂体、甲状腺、上皮小体、胸腺、*肺、気管支、心臓、胸骨骨髓、*大腿骨、唾液腺、*肝臓、胆嚢、脾臓、*腎臓、副腎、膵臓、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、膣、子宮、子宮頸部、大動脈、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、大腸、直腸、膀胱、腸管膜リンパ節、頸部リンパ節、坐骨神経、大腿二頭筋、眼、乳腺、皮膚、脊髄及び*肉眼的異常の認められた組織。

「非腫瘍性病変」

認められた主要な変化を別表1に示す。非腫瘍性病変として、3500および7000 ppm群の雌雄において小葉中心性肝細胞の肥大が認められた。また、7000 ppm群の雄において軽度な肝細胞内色素沈着も認められた。これらの変化は投与に起因するものと考えられた。

7000ppm投与群の雄において、大腿骨の線維骨性病変の発生増加を認めた。加えて、大腿骨病変が認められた7000ppm投与群の雄2匹については同様に胸骨の線維骨性病変を示した。線維骨性病変の発生率はわずかに対照群と比較して増加しており、これらの所見は検体投与の影響があるかもしれない。しかし線維骨性病変の重症度は対照群の雄の重症度と同等であったことから、毒性学的に重要な所見とは考えられなかった。

雌雄の対照群、投与群における大腿骨と胸骨の線維骨性病変は概して最小から軽度であった。また、この所見は雌マウスの加齢性の変化として通常みられるもので、雌での発生は報告されたコントロール幅の範囲内(1)に十分おさまっていたことから、これらの所見は雌において検体投与に関係すると考えられなかった。雄の500ppm投与群、3500ppm投与群における大腿骨の線維骨性病変の発生率は非常に低く、対照群の雄と比較して減少していたことから、検体投与による影響は関係しないと考えられた。

(1) Albassam, M.A. and Courtney, C. L. (1996) Non-neoplastic and neoplastic lesions of the bone. In: Pathobiology of the Aging Mouse (U. Mohr, D. L. Dungworth, C. C. Capen, W. W. Carlton, J. P. Sundberg, and J. M. Ward, eds.), Vol. 2, pp. 425 - 437. ILSI (International Life Sciences Institute) Press, Washington, D. C.

肺胞性慢性炎症は対照群、処理群の雌雄で認められた。雌雄どちらも所見は概して最小から軽度であった。雄において、すべての投与群における発生は対照群よりも少なかった。雌では7000ppm投与群における発生率は雌の対照群と比較して増加したが、雄の対照群の発生率と同等であった。この種の肺炎はマウスの加齢性変化として様々な頻度で起こりうる。雌雄の肺でその他の病理学的所見または毒性所見は認められなかった。したがって雌雄でみられた肺胞性慢性炎症は検体投与に関係しないと考えられた。

「腫瘍性病変」

認められた主要な腫瘍性変化を別表 2 に示す。検体投与によると考えられる腫瘍の発生率の増加は認められなかった。

結 論： 以上の結果より、検体のマウスに対する 18 カ月間混餌投与による発がん性試験における影響として、3500 ppm 以上の投与群の雌雄に、肝重量増加、小葉中心性肝細胞肥大および肝細胞内色素沈着が認められた。しかし、腫瘍の発生率増加は認められなかった。
従って、無影響量は 500 ppm (雄：70.4mg/kg/day、雌 88.5 mg/kg/day)であるとされる。また、催腫瘍性は無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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.6 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

8.6.1 ラットを用いた繁殖試験 (資料 No.T-4.1)

試験機関

報告書作成年

1995年 [GLP 対応]

検体純度:

試験動物: CD系ラット、1群雄30匹、雌30匹、投与開始時6週齢

投与期間: P世代; 投与開始からF₁児離乳時までの18週間
F₁世代; 離乳時からF₂児離乳時までの20週間
(1992年8月17日~1993年6月8日)

投与方法: 検体を0、200、2000、10000 ppm含有した飼料を自由に摂食させた。

方法及び試験項目: 概要を次頁の表にまとめた。

一般状態及び死亡率; 全動物の全試験期間中死亡及び毒性徴候の観察を毎日行い、詳しい臨床徴候の観察を週1回行った。

交配及び妊娠の確認; 雌雄1対1で同居させ翌日膣栓或は精子により交尾の有無を確認した。生存或は死亡児を出産した雌、或は解剖時に子宮内に胎児がいるというような明かな妊娠の証拠を示した雌動物を妊娠動物とした。

繁殖性に関する指標; 交配、妊娠、分娩および哺育期間の観察に基づき次の指標を算出した。

親動物指数;

$$\text{交尾率} = \frac{\text{交尾成立が認められた雌動物数}}{\text{交配した総雌動物数}} \times 100$$

$$\text{受精率} = \frac{\text{妊娠した雌動物数}}{\text{交尾成立が認められた雌動物数}} \times 100$$

$$\text{出生率} = \frac{\text{0日目に生存児のいた腹数}}{\text{総腹数}} \times 100$$

$$\text{死産率} = \frac{\text{死産児のいた腹数}}{\text{総腹数}} \times 100$$

$$\text{生存率} = \frac{\text{出生児数}}{\text{総出産児数}} \times 100$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

$$\text{児損失率} = \frac{\text{21日目に児のいなかった腹数}}{\text{0日目に生存児のいた腹数}} \times 100$$

産児指数；

$$\text{出生率} = \frac{\text{出生児数}}{\text{総出産児数}} \times 100$$

$$\text{死産率} = \frac{\text{死産児数}}{\text{総出産児数}} \times 100$$

$$\text{性 比} = \frac{\text{出生雄数}}{\text{総出生児数}} \times 100$$

$$\text{4日目生存率} = \frac{\text{4日目の生存児数 (間引き前)}}{\text{総出生児数}} \times 100$$

$$\text{哺育率} = \frac{\text{21日目の生存児数}}{\text{4日目の生存児数 (間引き後)}} \times 100$$

病理組織学的検査；対照及び最高投与量群については膣、卵巢、子宮角、頸管、精巣、精巣上体、精囊、凝固線、前立腺、腎臓、肝臓、肺、心臓、下垂体、および全ての肉眼病変について病理標本を作製し鏡検した。低、中間投与群については肉眼病変及び腎臓について鏡検した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

10000 ppm では試験中を通じ、雌雄の平均体重及び摂餌量が対照群と比較し有意に低い値を示した。週毎の体重増加量も雌雄共に 10000 ppm 群において投与 5 週目までは一貫して統計学的に有意な低値を示し、その後も対照群よりも低い傾向が見られ、体重は試験期間を通じ対照群よりも統計学的に有意な低値を示している。一方、200 及び 2000 ppm 群においては投与 1、2 週目で統計学的に有意な体重増加量の低値が見られるが、3 週目以降では対照群と同等の増加傾向が見られている。しかし、これらの群で見られた初期の体重増加量の低値は体重差に反映し、その後の試験期間を通じそれらの体重差はほとんど縮小することなく、特に 2000 ppm 群雄では対照群との体重差は終始統計学的に有意であった。しかしながら、1、2 週目の体重増加量及び摂餌量の低値と飼料のこぼし量の増加が顕著であったことならびにその後の順調な体重増加等から、摂餌忌避の存在が強く示唆される。

妊娠及び哺育期間中の母動物の体重においては、F₀ の哺育期間中全投与群で統計学的に有意な低値が見られた。しかし、この間の週毎の体重増加量においてはいずれの群においても対照群に比較し統計学的に有意な減少は認められなかった。また、哺育 7 日目の 10000 ppm 群の体重増加量は F₀ と F₁ 共に対照群を上回っており、14 日目では F₁ で上回っている。哺育期間中の母動物の体重は体重測定時間と摂餌及び授乳とのタイミングにより変動が大きいことが推測され、この間に認められた体重の統計学的有意差は、試験期間を通じ持続した生育期間初期の摂餌忌避の影響に加え哺育期間中の生理的体重変動が加算された結果によるものと考えられる。哺育 14～21 日間の母動物は、対照群を含む全群で顕著な体重低下を示している。これは授乳のために過剰に貯蔵していた脂肪組織が離乳が近づくにつれ正常な量まで減少するためと考えられる。10000 ppm 群ではこの間の体重減少は他の群ほど顕著ではないが、これは生育期間から妊娠、哺育期間を通じて認められる体重増加抑制から推察されるように、貯蔵脂肪量が少なかった可能性が考えられる。以上のことから、200 及び 2000 ppm 群で見られた体重変化は毒性学的に意義がないと考えられる。

10000 ppm 群の児動物の平均体重が、F₁ 世代は哺育 7 日目以降、F₂ 世代では哺育期間を通じ有意に低い値であった。

その他の親動物に関する繁殖指数、児動物における指数とともに検体投与に起因すると考えられる影響は認められなかった。

親の肉眼的病理検査で F₀ 及び F₁ の 10000 ppm 群の雄で腎臓の変色や腫大等の増加が認められた。病理組織学的検査では、F₀ 雄及び F₁ 雌雄で腎症及び尿細管拡張等の増加が見られた。腎臓に対する影響は雄の 200 ppm 群、雌の 2000 ppm 以下の群では認められなかった。

児動物の肉眼的病理検査では、検体投与に起因するすると考えられる所見は認められなかった。

以上の結果から、無影響量は親動物に対して 200 ppm (F₀ 雄 13.7 mg/kg/day、F₀ 雌 15.7 mg/kg/day、F₁ 雄 14.6 mg/kg/day、F₁ 雌 16.3 mg/kg/day)、児動物に対して 2000 ppm (F₀ 雄 134.8 mg/kg/day、F₀ 雌 155.0 mg/kg/day、F₁ 雄 147.8 mg/kg/day、F₁ 雌 164.9 mg/kg/day)、繁殖性について 10000 ppm (F₀ 雄 674.6 mg/kg/day、F₀ 雌 760.2 mg/kg/day、F₁ 雄 760.5 mg/kg/day、F₁ 雌 841.5 mg/kg/day) と判断される。

8.6.2 ラットにおける催奇形性試験 (資料 No.T-4.2)

試験機関

報告書作成年 1988年 [GLP 対応]

検体純度:

試験動物: Wistar-Imamichi 系妊娠ラット、13週齢、1群 23匹

試験期間: 動物実験期間 25日間 (1988年4月18日~1988年5月13日)

投与方法: 検体を 1%CMC 水溶液に懸濁して 0、100、300 及び 1000 mg/kg/day の投与レベルで妊娠後6日目から15日目 (交尾確認の日を妊娠0日として起算)までの10日間、毎日1回経口投与した。なお、対照群には溶媒の1%CMC 水溶液のみを同様に投与した。1000 mg/kg/day 群の1例は妊娠0日から6日までに著しい体重減少を示したために投与は行わず、試験より除外した。

試験項目:

親動物: 一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠0、6、9、12、15、18及び21日目に体重および摂餌量を測定した。

妊娠21日目に帝王切開し、黄体数、死亡胚数、生存及び死亡・吸収胎児数、生存胎児の性別及び体重、胎盤重量を検査した。胎児摘出後には肉眼的検査を行った。

生存胎児: 性別、体重及び外表異常の観察を行った。

各同腹児群の約半数の胎児については骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については内臓異常の有無を検査した。

試験結果: 結果を次表に示した。

親動物: 一般状態に変化はなく、死亡動物もみられなかった。300 mg/kg/day 群で体重増加量の低下と摂餌量の減少がみられ、1000 mg/kg/day 群ではこれらの変化に加えて体重にも有意な低値がみられた。

帝王切開時の剖検では、いずれの投与群の動物にも異常はみられなかった。

帝王切開成績: 黄体数、着床数、着床率、生存胎児数、性比及び胎盤重量の各指標に対して検体投与によると考えられる変化はみられなかった。しかし、1000 mg/kg/day 群で胎児死亡率の軽度上昇と生存胎児体重の有意な減少がみられた。胎児死亡率の上昇は統計学的には有意ではなかったが、吸収胚または死亡胎児を2個以上持つ腹の頻度は増加 (対照群 5/23、1000 mg/kg/day 群 9/22) しており、検体投与の影響と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

胎児の形態学的検査成績；検体投与によると考えられる外表異常や骨格異常はみられなかったが骨格変異として第 14 肋骨の有意な増加及び中足骨の化骨遅延が 1000 mg/kg/day 群でみられた。また内臓異常として心室中隔欠損の有意な増加が 300 及び 1000 mg/kg/day 群でみられた。

以上のことから、本検体を妊娠ラットに投与したときの母体及び胎児における無影響量は 100 mg/kg/day、最小中毒量は 300 mg/kg/day であった。

[申請者注：母動物の無毒性量は 100 mg/kg/day、胎児の無毒性量は 300 mg/kg/day であり、最高投与量の 1000 mg/kg/day においても催奇形性はないと判断された。]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.6.3 ラットにおける催奇形性試験（再試験）（資料 No. T4.3）

試験機関

報告書作成年

1996年 [GLP 対応]

試験目的： 先に 100、300、1000 mg/kg/day の投与量で実施された試験（資料 No. T6.2）の 300 及び 1000 mg/kg/day 群において、試験に使用した Wistar-Imamichi 系ラットに自然発生的にかなりの頻度で発生する心室中隔欠損の有意な増加が認められた。同試験ではこの変化は発育抑制に起因した変化と解釈されたが、確認のため通常用いられる SD 系統のラットを用い再試験を実施した。

検体純度：

試験動物： CD (SD)系ラット、65 日齢（交配開始時）、1 群雌 24 匹

試験期間： 動物実験期間 29 日間（1994 年 11 月 23 日～12 月 22 日）

投与方法： 検体を 1%CMC 水溶液に懸濁して 0、100、300 及び 1000 mg/kg/day の用量で妊娠 6 日目から 15 日目まで（交尾確認日を妊娠 0 日として起算）、1 日 1 回経口投与した。対照群には媒体の 1%CMC 水溶液のみを同世に投与した。

試験項目：

親動物： 一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠 0、6、9、12 及び 20 日目に体重および摂餌量を測定した（摂餌量は 16 日目にも測定した）。妊娠 20 日目に帝王切開し、黄体数、生存及び死亡・吸収胎児数および着床跡を検査し、肝臓重量を測定した。

生存胎児： 外表異常検査、性分け、体重測定を行った。全ての胎児について顕微解剖による内臓検査をし、半数を剃刀切断による検査を、残りの胎児は骨格標本作製し検査した。

試験結果： 結果を次表に示した。

親動物： 100 mg/kg/day 群では投与の影響が見られなかった。

300 mg/kg/day 群では肝臓重量体重比の有意な増加が見られた。

1000 mg/kg/day 群では肛門性器周辺の着色や脱毛の見られる動物が増加し、体重及び体重増加、摂餌量が有意に低い値を示し、肝臓重量体重比の有意な増加が認められた。

胎児： 1000 mg/kg/day 群では胎児体重の有意な低下がみられ、骨格検査においても化骨遅延に起因すると考えられる第 4 胸骨不完全化骨、第 6 胸骨未化骨、仙椎横断面未化骨、胸椎体分裂、第一頸椎横断面未化骨の発生頻度が有意に増加した。

仙椎横断面未骨化の発生頻度は、100 及び 300 mg/kg/day 群でも統計学的に有意であったが、いずれの発生頻度（8%及び 12%）も実施試験機関における背景対照データの範囲（0～13.8%）内であり、また対照群の発生率が背景データの平均発生率（4.8%）と比較して低値であったことによると考えられ、検体投与に起因する変化とは考えられなかった。その他に 100 及び 300 mg/kg/day 群では投与に起因すると考えられる変化はなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに投与したときの母体に対する無毒性量は 100 mg/kg/day、胎児に対する無毒性量は 300 mg/kg/day であった。また、最高投与量の 1000 mg/kg/day においても胎児に対する催奇形性作用を及ぼさないと判断される。尚、心室中隔欠損はいずれの投与群にも認められなかった。

8.6.4 ウサギにおける催奇形性試験 (資料 No. T-4.4)

試験機関

報告書作成年 1988年 [GLP 対応]

検体純度:

試験動物: New Zealand White 種妊娠ウサギ、6ヶ月齢、1群 17匹

試験期間: 動物実験期間 36日間 (1988年5月10日~1988年6月15日)

試験方法: 検体を 1%CMC 水溶液に懸濁して 0、50、150 及び 450 mg/kg/day の投与レベルで妊娠 6日目から 18日目(交尾確認日の翌日を妊娠 0日として起算)までの 13日間、毎日 1回経口投与した。なお、対照群には溶媒の 1%CMC 水溶液のみを同様に投与した。

試験項目:

親横物: 一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠 0、3、6、9、12、15、18、19、23 及び 28日目に体重を測定した。また、摂餌量は個体別に毎日測定した。

妊娠 28日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡・吸収胎児数および胎盤重量を検査した。胎児摘出後に体表、体孔、胸腔および腹腔の肉眼的観察を行った。

生存胎児: 性別、体重及び外表異常の観察を行った後、脳、胸腔及び腹腔内臓器の観察を行った。全動物を固定後内臓検査し、心臓については西村の顕微解剖法に準じて心臓中隔欠損の有無を検査した。内臓検査終了後骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。

試験結果: 結果を次表に示した。

親動物: 試験中、対照群の 1例で沈静、横臥を示したため屠殺した。対照群、50 及び 150 mg/kg/day 投与群の各 1例と 450 mg/kg/day 投与群の 5例(うち 3例で 3日以上摂餌の途絶が認められた)が流産徴候を示したため屠殺した。450 mg/kg/day 投与群の流産は投与の影響と考えられた。

各投与群の体重、体重増加量及び摂餌量とも対照群との間に有意な差はみられなかったが、450 mg/kg/day 投与群では投与開始後 14例中 6例の母動物に摂餌の途絶がみられ、投与の影響と考えられた。

各投与群の体重および体重増加量は対照群と同等であった。摂餌量についても投与群と対照群との間に有意な差はみられなかったが、投与開始後 3日以上摂餌の途絶を示した母動物の数は、対照群、50 および 150 mg/kg/day 群では 2~3例だったが、450 mg/kg/day 群では 14例中 6例で認められ、有意差はなかったものの検体投与の影響と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

帝王切開成績；黄体数、着床数、生存胎児数、性比、生存胎児体重及び胎盤重量、着床率、胎児死亡率の各指標に対して、検体投与によると考えられる変化はみられなかった。

胎児の形態学的検査成績；検体投与によると考えられる外表異常、あるいは内臓異常はみられなかった。また、骨格変異の増加ならびに化骨状態の異常もみられなかった。

結 論： 以上の結果から、本検体を妊娠ウサギに投与したときの母体における最大無作用量は 150 mg/kg/day であり、胎児における最大無作用量は 450 mg/kg/day であった。また、最高投与量の 450 mg/kg/day でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.7 変異原性

8.7.1 細菌を用いた復帰変異試験 (資料 No. T-5.1)

試験機関

報告書作成年 1987年 [GLP]対応

検体純度：

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA100、TA1537、TA98)及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9Mix)の存在下または非存在下で、Ames等の方法で復帰変異誘発性を検定した。

検体は、ジメチルスルホキシド溶液中では著しく不安定であるため、滅菌純水に懸濁した。予備試験においてサルモネラ菌では $100 \mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で、また大腸菌では $5000 \mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で抗菌性が認められたので、本試験はサルモネラ菌では $200 \mu\text{g}/\text{プレート}$ を、大腸菌では $5000 \mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量として実施した。

試験用量は、サルモネラ菌は $2 \sim 200 \mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で7用量、大腸菌は $100 \sim 5000 \mu\text{g}/\text{プレート}$ で6用量とした。試験は2枚のプレートを用い、2回行った。結果の判定は、対照値の少なくとも2倍以上の復帰変異コロニーが出現し、再現性と用量-反応効果が認められる場合を陽性とした。

試験結果： 結果を次表に示した

2回の試験において、検体はS9Mixの有無にかかわらず、菌株の生育障害を起こさない最高用量においても、いずれの菌株においても溶媒対照に比べて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、ENNG、9-AAではMixの無添加において、また2-AAではS9Mixの添加により明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において復帰変異誘発性を有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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.7.2 チャイニーズハムスターの CHL 細胞を用いた in vitro 染色体異常試験
(資料 No. T-5.2)

試験機関

報告書作成年 1988 年 [GLP 対応]

検体純度：

試験方法： チャイニーズハムスター肺由来の継代培養した CHL 細胞を用い、代謝活性化および非活性化によって染色体異常誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド中では著しく不安定であるため、滅菌水に懸濁した。

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験の最高濃度は直接法では $3.3 \times 10^{-4} \text{M}$ 、代謝活性化法では $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ とした。試験用量は、直接法は $2.1 \times 10^{-5} \text{M} \sim 3.3 \times 10^{-4} \text{M}$ ($85.5 \sim 1344 \mu \text{g/mL}$) の範囲で 5 用量、代謝活性化法は $6.3 \times 10^{-4} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ ($257 \sim 4073 \mu \text{g/mL}$) の範囲で 5 用量とした。

染色体異常試験の直接法は細胞播種 24 時間後に検体懸濁液を加え、その 24 及び 48 時間後に染色体標本作製した。代謝活性化法は細胞播種 24 時間後に検体懸濁液と S9Mix を加え、6 時間後に新鮮培地に交換し、その 12 及び 18 時間後に染色体標本作製した。陽性対照は直接法では MMC を、代謝活性化法では B(a)P を用いた。

各濃度、各標本作製時間で 200 個の分裂中期像を観察した。染色体異常出現頻度の計測は、何らかの異常が 1 個でも存在する細胞を異常細胞とした。ギャップを含めた異常細胞出現率が 5%未満を陰性、5%以上 10%未満を擬陽性、10%以上を陽性とした。

試験結果： 結果を次表に示した。

検体処理群は直接法及び代謝活性化法のいずれの試験においても染色体異常を有する細胞の出現率は 5%を超えなかった。

一方、陽性対照の MMC は直接法で、また B(a)P は代謝活性化法でそれぞれ染色体異常を有する細胞が著しく増加した。

以上の結果より、代謝活性化を含む本試験条件下では、検体は染色体異常誘発性を有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石原産業株式会社にある。

8.7.2A チャイニーズハムスター肺腺維芽細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(再試験)

(資料 No.T-5.2A)

試験機関：

報告書作成年：2014年

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター肺由来の CHL/IU 細胞株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、短時間処理法 (\pm S9 mix : 6-18 時間) 及び連続処理法 (-S9 mix : 24 時間) により検体の染色体異常誘発性を検索した。

検体は生理食塩水に溶解した。各濃度 2 枚のプレートを使用し、1 プレートにつき 100 個、1 濃度 200 個の分裂中期像を観察した。

試験結果：結果を次表に示す。

代謝活性化の有無にかかわらず、短時間処理法及び連続処理法ともに全ての処理群で染色体異常を示す分裂中期細胞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マイトマイシン C (MMC) 及びベンゾ(a)ピレン (B(a)P) では、染色体異常を示す分裂中期細胞の割合の明らかな増加を示した。

以上の結果から、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性は有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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.7.3 マウスにおける小核試験 (資料 No.T-5.3)

試験機関

報告書作成年 1995年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験動物 : ICR 系雄雌マウス、6~8 週齢、1 群雄雌各 5 匹

試験期間 : 1993 年 5 月 4 日~1993 年 8 月 26 日

試験方法 : 検体は 0.5%CMC 水溶液に懸濁させ単回強制経口投与した。最高 5000 mg/kg を単回経口投与した予備試験において死亡はなかった。従って小核試験の投与量は 0 (溶媒)、1250、2500 及び 5000 mg/kg を設定し、投与 24、48 及び 72 時間後に骨髓細胞を採取し、常法により塗沫標本を作製した。

陽性対照には CP を用い、投与 24 時間後に骨髓細胞を採取した。

骨髓細胞標本は顕微鏡下で観察し、多染性赤血球 1000 個中の小核赤血球数及び全赤血球に占める多染性赤血球の割合を求めた。

試験結果 : 結果を次表に示した。

いずれの用量群においても死亡も臨床症状も認められなかった。

雄雌のいずれの用量群においても、溶媒対照と比べて小核を有する多染性赤血球数の有意な増加は認められなかった。また全赤血球に占める多染性赤血球の割合の減少も認められなかった。

一方、陽性対照の CP では、雄雌ともに小核を有する多染性赤血球数の有意な増加 ($P \leq 0.05$) が認められた。

結論 : 以上の結果から、本試験条件下において検体はマウスの骨髓細胞に対して増殖抑制を示さず、また小核誘発性も有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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.7.4 マウスリンフォーマを用いた突然変異試験 (資料 No. T-5.4)

試験機関

報告書作成年 1993年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験方法 : L5178YTK+/-マウスリンフォーマを用い、代謝活性化および非代謝活性化試験によって突然変異誘発性を検定した。

検体はアセトンに溶解し、試験は Clive 等による方法に従って実施した。

用量設定のために実施した細胞増殖試験結果より、突然変異試験の試験用量は 500 ~ 0.6 μ g/mL の範囲で 16 用量とし、検体処理後のクローニングは 500 ~ 20 μ g/mL の範囲の 10 用量について行った。細胞は突然変異試験に使用する前に自然突然変異体を取り除いて用いた。

代謝活性化の存在および非存在下で検体を添加し、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、4 時間の処理後正常培地に移し突然変異形質の発現のために 48 時間培養した。次に寒天を含む選択培地で 12 日間培養して TK^{-/-} 突然変異細胞をクローニングした。同時に正常培地で培養して生存細胞を生育させた。そしてプレート当たりの突然変異頻度ならびに誘発突然変異頻度を求めた。陽性対照は非代謝活性化試験には EMS を用い、代謝活性化試験には 7, 12-DMBA を用いた。

結果の判定は、細胞生存率が 10%以上を示す濃度で突然変異頻度が用量相関性を伴って増加し、その増加がバックグランド値の 2 倍以上であるとき陽性とした。突然変異頻度が用量相関性を伴って増加しない場合であって、細胞生存率が 10%以上を示す何れかの 1 濃度で突然変異頻度がバックグランド値の 2 倍以上に増加するとき擬陽性とした。突然変異頻度が用量相関性を伴って増加せず、また細胞生存率が 10%以上を示す濃度で突然変異頻度がバックグランド値の上限の 2 倍以上に増加しないとき陰性とした。

試験結果 : 結果を次表に示した。

初回試験および確認試験共に、非代謝活性化ならびに代謝活性化の両試験で検体処理群の突然変異頻度は溶媒対照の平均値の 2 倍を超えなかった。また検体処理群のトータルグロウスは溶媒対照の 75% ~ 128%を示した。一方、陽性対照の EMS は非代謝活性化系で、また、7, 12-DMBA は代謝活性化系で突然変異誘発頻度の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、検体は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。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.7.5 細菌を用いた DNA 修復試験 (資料 No. T-5.5)

試験機関

報告書作成年

1987 年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験方法 : 枯草菌 *Bacillus Subtilis* の組換修復能保持株 (H17,rec⁺)及び欠損株 (M45,rec⁻)を用い、孢子法により代謝活性化及び非活性化法によって DNA 損傷誘発性を検定した。検体は DMSO 中では著しく不安定になるため滅菌水に懸濁した。懸濁液の最大調製可能濃度が 50 mg/mL であったので、本試験は 50 mg/mL (1000 μ g/ディスク)を最高用量として 6 用量 (20~1000 μ g/ディスク)で実施した。結果の判定は、H17 株に僅かな生育阻止帯 (直径 0~4 mm)を示す用量において両株の生育阻止帯の差が明確に 5 mm 以上である場合を陽性とした。

試験結果 : 結果を次表に示した

2 回の試験において、検体は S9Mix の有無にかかわらず、菌株の生育障害を起こさない最高用量においても、いずれの菌株においても溶媒対照に比べて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、ENNG、9-AA では Mix の無添加において、また 2-AA では S9Mix の添加により明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

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 DNA 損傷誘発性を有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石原産業株式会社にある。

8.8 生体の機能に及ぼす影響

8.8.1 生体の機能に及ぼす影響に関する試験 (資料 No.T-6.1)

試験機関

報告書作成年 1988年 [GLP 対応]

検体純度：

試験機関： 1988年3月～1988年9月

1) 中枢神経系に対する作用

(1) マウスの一般症状

供試動物： ICR系 SPF マウス、投与時7週齢、1群雌雄各3匹、
体重雄 30.5～37.6 g、雌 23.0～26.8 g

試験方法： 検体を1%Tween80水溶液に懸濁し10 mL/kgの容量で、0、19.5、78.1、156、313、625、1250、2500及び5000 mg/kgを単回腹腔内投与し、投与前と投与後0.5、1、2、4及び8時間に、また翌日以降は毎日1回、7日目までマウスの一般症状をIrwinの方法に従って観察した。

試験結果： 検体投与によりマウスは沈静、昏睡を示唆する種々の症状が発現し、高用量群で死亡が認められた。すなわち雌雄共投与当日～1日目にかけて1250 mg/kg以上の群の認知力、運動性、中枢興奮、姿勢、運動失調、筋緊張、自律神経系の各項目に種々の異常が認められた。5000 mg/kg群の雌雄全例、2500 mg/kg群の雄2例及び雌全例が投与当日に死亡した。生存例の症状は3日目には正常に回復した。313 mg/kg以下の群には雌雄共検体投与に起因する異常は認められなかった。

【申請者注：625mg/kgの雄で運動性、筋緊張、自律神経系の各項目に作用発現が疑われたが、8時間後以降は消失していた。625mg/kgの雌で運動性、筋緊張、自律神経系の各項目で種々の作用発現が疑われたが2時間後以降は消失していた。】

(2) 雄ウサギの一般症状

供試動物： 日本白色種 SPF 雄ウサギ、投与時11～12週齢、体重2.34～2.80kg、1雄3匹。

試験方法： 1%Tween80水溶液に懸濁した検体を10 mL/kgの容量で0、313、1250及び5000 mg/kgを単回経口投与し、投与前と投与後0.5、1、2、4、8時間に翌日以降は毎日1回、7日目まで一般症状を多元観察した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

試験結果：5000 mg/kg 群で投与後1日以内に1例が死亡し、1～7日にかけて糞便量の減少がみられた。1250 mg/kg 以下の群には検体投与に起因すると思われる明確な異常はみられなかった。

[申請者注：短期ばく露評価に関して、影響が認められなかった最高用量1250 mg/kg はカットオフ値の500 mg/kg を超えている。]

2) 呼吸、循環器系に対する作用

供試動物：日本白色種 SPF 雄ウサギ、投与時に11～12週齢、体重2.34～2.80 kg、1群雄3匹。

試験方法：1%Tween80水溶液に懸濁した検体を10 mL/kgの容量で、ウレタン麻酔下の雄ウサギに0、313、1250及び5000 mg/kgを単回経口投与し、投与後4時間まで観察して呼吸、血圧及び心電図に対する影響を調べた。

試験結果：5000 mg/kg 群に血圧低下がみられた以外に明確な変化は認められなかった。

3) 結 論

以上の結果および急性毒性試験（資料 No. T-1.1～T-1.4）の結果から検体の急性毒性は弱い事が示唆されたが、大量に摂取された場合には急性中毒の発現が予想された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.9 その他の毒性

8.9.1 ラットを用いた強制経口投与による 14 日間反復経口投与毒性試験 (資料 No. T-7.1)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.9.2 ラットにおける2週間混餌経口投与毒性試験（資料 No. T-7.2）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.9.3 雌マウスを用いた飼料混入投与による 28 日間反復経口投与免疫毒性試験

(資料 No. T-7.3)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10 代謝物の毒性

8.10.1 のマウスにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-1)

試験機関

報告書作成年 1992年 [GLP 対応]

検体純度:

試験動物: CD-1 (ICR)系マウス、1群雌雄各5匹、投与時6週齢、
体重 雄 27.1~33.5g、雌 21.8~26.8g

試験期間: 単回投与後14日間観察

試験方法: 検体を0.5%CMC水溶液に懸濁させ、20 mL/kgの容量で2~3時間の絶食後に経口投与

試験項目: 臨床症状及び生死を14日間観察。投与前、7及び14日目に体重を測定。死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼病理学的検査を実施した。

試験結果:

投与量 (mg/kg)	雄雌共	250、400、640、1024、1638、2621
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄	737 (525~1035)
	雌	1073 (841~1370)
死亡開始終了時間	雄	投与後3時間目~2日目
	雌	投与後1時間目~3日目
症状発現消失時間	雄	投与後1時間目に発現、生存例では4日目までに消失
	雌	投与後1時間目に発現、生存例では2日目までに消失
体 重	雄雌共	7日目に少数例で体重減少も、14日目には回復
LD ₀ (mg/kg)	雄	250
	雌	640

死 亡

投与量 (mg/kg)	250	400	640	1024	1638	2621
死亡数 雄	0/5	1/5	1/5	4/5	5/5	5/5
死亡数 雌	0/5	0/5	0/5	2/5	5/5	5/5

臨床症状; 雌雄ともに中間用量群から高用量群にかけて、自発運動の低下、沈静、昏睡、振戦、眼瞼下垂および口周囲被毛の汚れ等がみられ、死亡した動物には痙攣及び異常呼吸音がみられた。生存例では4日目までに回復した。死亡は3日目まで起こった。

剖検所見; 途中死亡例の剖検では、胃内黒色内容物、前胃部又は腺胃部赤色斑、小腸内黒色又は水様性内容物が認められた。生存例の剖検では1024 mg/kg投与群の雄1例に前・腺胃境界部狭窄が認められた以外に、検体投与に起因する変化は認められなかった。

8.10.2 の細菌を用いた復帰変異試験(資料 No.TM-2)

試験機関

報告書作成年 1992年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験期間 : 1988年4月18日~1988年5月19日

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella Typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98、TA100)の4株及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 uvrA株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9Mix)の存在下または非存在下で、Ames等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体はジメチルスルフォキシド (DMSO)に溶解した。予備試験の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず全ての菌株において菌の生育阻害が認められなかったため本試験の最高用量を 5000 μ g/plateとした。

結果の判定は復帰変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上で、しかも用量相関性及び再現性が認められる場合を陽性とした。なお、菌株の生育阻害は復帰変異コロニー数の減少、あるいは、バックグラウンドの菌の生育状態を指標にして判定した。

試験結果 : 次表に示す様に、陽性対照として用いた AF-2、SA、2NF、9-AA では S9Mix の無添加において、また 2-AA、B(a)P では S9Mix の添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。これに対し、検体では S9Mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの用量においても溶媒対照に比べて復帰変異コロニーの増加は認められなかった。

結 論 : 本試験条件下における検体の復帰変異誘発性は陰性である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.3 のマウスにおける急性経口毒性試験(資料 No.TM-3)

試験機関

報告書作成年 1995年 [GLP 対応]

検体純度：

試験動物： CD-1 (ICR)系マウス、1群雌雄各5匹、投与時6週齢、
体重雄 30.4~34.6 g、雌 22.4~24.8 g

試験方法： 検体を1.0%CMC水溶液に懸濁させ、20 mL/kgの容量で2~3時間の絶食後に経口投与

試験項目： 臨床症状及び生死を14日間観察。投与前、7日及び14日目に体重を測定。死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼病理学的検査を実施した。

試験結果

投与量 (mg/kg)	雄雌共	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌共	>5000
死亡	雄 雌	1/5 0/5
死亡開始終了時間	雄 雌	投与後2日目 死亡なし
症状発現消失時間	雄 雌	投与後15分目に発現、生存例では投与後1日目までに消失 投与後15分目に発現、生存例では投与後2日目までに消失
体重	雄雌共	少数例で軽度~軽微な体重減少
LD ₀ (mg/kg)	雄 雌	<5000 5000

臨床症状： 投与に起因する徴候は、沈静、呼吸緩徐、腹臥位姿勢であった。これらの徴候は投与後15分より発現し、生存例では投与2日後までに消失した。死亡は、投与後2日目に起こった。

剖検所見： 途中死亡例の剖検では、肺の赤色化、腺胃部黒色点散在、胃から十二指腸へかけての黒色内容物が認められた。生存例の剖検では検体投与に起因する変化は認められなかった。

8.10.4 の細菌を用いた復帰変異試験(資料 No.TM-4)

試験機関

報告書作成年 1994 年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験期間 : 1994 年 7 月 11 日 ~ 1994 年 8 月 18 日

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella Typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98、TA100) の 4 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9Mix) の存在下または非存在下で、Ames 等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体はジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した。予備試験の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらずサルモネラ 4 菌株では 2000 μ g/プレート以上の用量で、また大腸菌に対しては 5000 μ g/プレートの用量で生育障害が認められたので本試験の最高用量を 5000 μ g/プレートとし、以下 2500、1250、625、313、156 及び 78 μ g/プレートの 7 用量で試験を行った。
結果の判定は復帰変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍以上で、しかも用量相関性及び再現性が認められる場合を陽性とした。なお、菌株の生育障害は復帰変異コロニー数の減少、あるいは、バックグラウンドの菌の生育状態を指標にして判定した。

試験結果 : 次表に示す様に、陽性対照として用いた AF-2、SA、2NF、9-AA では S9Mix の無添加において、また 2-AA、B(a)P では S9Mix の添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。これに対し、検体では S9Mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの用量においても溶媒対照に比べて復帰変異コロニーの増加は認められなかった。

結 論 : 本試験条件下における検体の復帰変異誘発性は陰性である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.5 のマウスにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-5)

試験機関

報告書作成年 1995 年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験動物 : CD-1(ICR)系マウス、1 群雌雄各 5 匹、投与時 6 週齢、体重雄 29.2~37.6 g、雌 22.5~29.9 g

試験期間 : 単回投与後 14 日間観察

試験方法 : 検体を 1.0%CMC 水溶液に懸濁させ、20 mL/kg の容量で 2~3 時間の絶食後に経口投与

試験項目 : 臨床症状及び生死を 14 日間観察。投与前、7 及び 14 日目に体重を測定。死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼病理学的検査を実施した。

試験結果 :

投与量 (mg/kg)	雄雌共	911、1276、1786、2500、3500
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄	2417(2020~2893)
	雌	1847 (1551~2199)
死亡開始終了時間	雄	投与後 1 日目~投与後 5 日目
	雌	投与後 1 日目~投与後 4 日目
症状発現消失時間	雄	投与後 15 分目に発現、生存例では 3 日目までに消失
	雌	投与後 15 分目に発現、生存例では 2 日目までに消失
体 重	雄雌共	順調に増加
LD ₀ (mg/kg)	雄	1786
	雌	1276

死 亡

投与量 (mg/kg)	911	1276	1786	2500	3500
死亡数 雄	0/5	0/5	0/5	3/5	5/5
死亡数 雌	0/5	0/5	2/5	5/5	5/5

臨床症状 ; 投与に起因する徴候は、沈静、呼吸緩徐、腹臥位姿勢、歩様蹠踉、痙攣、昏睡および下腹部被毛湿潤であった。これらの徴候は、投与後 15 分より発現し、生存例では投与後 3 日目までに消失した。死亡は、投与後 1 日から 5 日目にかけて起こった。

剖検所見 ; 途中死亡例の剖検では、肺の暗赤色化、腺胃の赤色斑又は赤色化が認められた。生存例の剖検では検体投与に起因する変化は認められなかった。

8.10.6 の細菌を用いた復帰変異試験(資料 No.TM-6)

試験機関

報告書作成年 1994年 [GLP 対応]

検体純度：

試験期間： 1994年7月11日～1994年8月11日

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella Typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98、TA100)の4株及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 uvrA株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系(S9Mix)の存在下または非存在下で、Ames等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体はジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解した。予備試験の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず全菌株で5000 μ g/プレート用量で生育阻害が認められたので本試験の最高用量を5000 μ g/プレートとし、以下2500、1250、625、313及び156 μ g/プレートの6用量で試験を行った。

結果の判定は復帰変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上で、しかも用量相関性及び再現性が認められる場合を陽性とした。なお、菌株の生育阻害は復帰変異コロニー数の減少、あるいは、バックグラウンドの菌の生育状態を指標にして判定した。

試験結果： 次表に示す様に、陽性対照として用いたAF-2、SA、2NF、9-AAではS9Mixの無添加において、また2-AAではS9Mixの添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。これに対し、検体ではS9Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの用量においても溶媒対照に比べて復帰変異コロニーの増加は認められなかった。

結論： 本試験条件下における検体の復帰変異誘発性は陰性である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.7 のマウスにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-7)

試験機関

報告書作成年 1995年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験動物 : CD-1 (ICR)系マウス、1群雌雄各5匹、投与時6週齢、
体重 雄 30.5~38.0 g、雌 22.4~28.5 g

試験期間 : 単回投与後 14日間観察

試験方法 : 検体を 1.0%CMC 水溶液に懸濁させ、20 mL/kg の容量で 2~3 時間の絶食後に経口投与

試験項目 : 臨床症状及び生死を 14日間観察。投与前、7及び14日目に体重を測定。死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼病理学的検査を実施した。

試験結果 :

投与量 (mg/kg)	雄雌共	2959、3846、5000、6500、8450
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌共	>5000
死亡開始終了時間	雄 雌	死亡なし 投与後 1日目~投与後 3日目
症状発現消失時間	雌雄共	投与後 15分目に発現、生存例では 2日目までに消失
体 重	雄雌共	7日目に少数例で体重が減少するも 14日目には回復少
LD ₀ (mg/kg)	雄 雌	5000 2959

死 亡

投与量 (mg/kg)		2959	3846	5000	6500	8450
死亡数	雄	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	雌	0/5	1/5	1/5	1/5	1/5

臨床症状 ; 投与に起因する徴候は、沈静、呼吸緩徐、腹臥位姿勢及び痙攣であった。これらの徴候は、投与後 15分より発現し、生存例では投与後 2日目までに消失した。死亡は、投与後 1日から 3日目にかけて起こった。

剖検所見 ; 途中死亡例の剖検では、腺胃に黒色点が認められた。生存例の剖検では検体投与に起因する変化は認められなかった。

8.10.8 の細菌を用いた復帰変異試験 (資料 No.TM-8)

試験機関

報告書作成年 1995年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験期間 : 1994年7月11日~1994年8月25日

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella Typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98、TA100)の4株及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA)株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9Mix)の存在下または非存在下で、Ames等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体はジメチルスルフォキシド (DMSO)に溶解した。予備試験の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず全ての菌株において菌の生育阻害が認められなかったので本試験の最高用量を5000 μ g/プレートとした。

結果の判定は復帰変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上で、しかも用量相関性及び再現性が認められる場合を陽性とした。なお、菌株の生育阻害は復帰変異コロニー数の減少、あるいは、バックグラウンドの菌の生育状態を指標にして判定した。

試験結果 : 次表に示す様に、陽性対照として用いたAF-2、SA、9-AAではS9Mixの無添加において、また2-AAではS9Mixの添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。これに対し、検体ではS9Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの用量においても溶媒対照に比べて復帰変異コロニーの増加は認められなかった。

結 論 : 本試験条件下における検体の復帰変異誘発性は陰性である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.9 のマウスにおける急性経口毒性試験 (資料 No.TM-9)

試験機関

報告書作成年 1995 年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験動物 : CD-1 (ICR)系マウス、1 群雌雄各 5 匹、投与時 6 週齢、
体重 雄 30.7~35.2 g、雌 23.0~27.8 g

試験期間 : 単回投与後 14 日間観察

試験方法 : 検体を 1.0%CMC 水溶液に懸濁させ、20 mL/kg の容量で 2~3 時間の絶食後に経口投与

試験項目 : 臨床症状及び生死を 14 日間観察。投与前、7 及び 14 日目に体重を測定。死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼病理学的検査を実施した。

試験結果 :

投与量 (mg/kg)	雄雌共	911、1276、1786、2500、3500
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 雌	1975 (1485~2628) 1727 (1322~2255)
死亡開始終了時間	雄 雌	投与後 1 時間目~投与後 3 日目 投与後 1 日目~投与後 3 日目
症状発現消失時間	雄 雌	投与後 15 分目に発現、生存例では 5 日目 までに消失 投与後 15 分目に発現、生存例では 2 日目 までに消失
体 重	雄雌共	7 日目に少数例で体重が減少するも 14 日目 には回復少
LD ₀ (mg/kg)	雄雌共	911

死 亡

投与量 (mg/kg)	911	1276	1786	2500	3500
死亡数 雄	0/5	1/5	2/5	3/5	5/5
死亡数 雌	0/5	1/5	3/5	4/5	5/5

臨床症状 : 投与に起因する徴候は、沈静、呼吸緩徐、腹臥位姿勢、痙攣及び眼瞼閉鎖であった。これらの徴候は、投与後 15 分より発現し、生存例では投与後 5 日目までに消失した。死亡は、投与後 1 時間目から 3 日目にかけて起こった。

剖検所見 : 途中死亡例の剖検では、肺の暗赤色化、腺胃の赤色又は黒色点及び黒色内容物が認められた。生存例の剖検では検体投与に起因する変化は認められなかった。

8.10.10 の細菌を用いた復帰変異試験(資料 No.TM-10)

試験機関

報告書作成年 1995 年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験期間 : 1994 年 7 月 19 日 ~ 1994 年 9 月 1 日

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella Typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98,TA100) の 4 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9Mix) の存在下または非存在下で、Ames 等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体はジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した。予備試験の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず全ての菌株において菌の生育阻害が認められなかったため本試験の最高用量を 5000 μ g/プレートとした。

結果の判定は復帰変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍以上で、しかも用量相関性及び再現性が認められる場合を陽性とした。なお、菌株の生育阻害は復帰変異コロニー数の減少、あるいは、バックグラウンドの菌の生育状態を指標にして判定した。

試験結果 : 次表に示す様に、陽性対照として用いた AF-2、SA、9-AA では S9Mix の無添加において、また 2-AA では S9Mix の添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。これに対し、検体では S9Mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの用量においても溶媒対照に比べて復帰変異コロニーの増加は認められなかった。

結 論 : 本試験条件下における検体の復帰変異誘発性は陰性である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.11 のマウスにおける急性経口毒性試験 (資料 No.TM-11)

試験機関

報告書作成年 1991年

検体純度 :

試験動物 : CD-1(ICR)系マウス、1群雄5匹、投与時5週齢、体重雄25.9~30.2g

試験期間 : 単回投与後14日間観察

試験方法 : 検体をとうもろこし油に懸濁させ、10 mL/kgの容量で経口投与した。

試験項目 : 臨床症状及び生死を14日間観察。投与前、7及び14日目に体重を測定。死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼病理学的検査を実施した。

試験結果 :

投与量 (mg/kg)	雄	300、1000、3000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄	>3000
死亡	雄	0/5
死亡開始終了時間	雄	死亡なし
症状発現消失時間	雄	投与後30分目に発現、1日目までに消失
体重	雄	順調に増加
LD ₀ (mg/kg)	雄雌共	3000

死 亡

投与量 (mg/kg)	300	1000	3000
死亡数 雄	0/5	0/5	0/5

臨床症状 ; 投与に起因する徴候は、自動能低下、呼吸困難および嗜眠であった。これらの徴候は投与後30分目により発現し、投与後1日目には消失した。死亡は発現しなかった。

剖検所見 ; 投与に起因する肉眼病理学的所見は肝臓の軽度腫大であった。

8.10.12 の細菌を用いた復帰変異試験 (資料 No. TM-12)

試験機関

報告書作成年 1991 年

検体純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella Typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98,TA100) の 4 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9Mix) の存在下または非存在下で、Ames 等の方法で復帰変異誘発性を検定した。

検体はジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した。試験は 5000 μ g/プレート を最高に 1000、500、100 及び 50 μ g/プレートの 5 用量で行った。

結果の判定は、対照値の少なくとも 2 倍以上の復帰変異コロニーが出現し、再現性と用量-反応性効果が認められる場合を陽性とした。

試験結果 : 結果は次表に示した。

検体は S9Mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても溶媒対照に比べて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、NaN₃、ENNG、ICR-191 では S9Mix の無添加において、また 2-AA、BP では S9Mix の添加により明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

結 論 : 本試験条件下における検体の復帰変異誘発性は陰性である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.13
染色体異常試験

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 (CHL)を用いた *in vitro*
(資料 No. TM-13)

試験機関：

報告書作成年：2003年 [GLP 対応]

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター肺由来の CHL/IU 細胞株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、短時間処理法 (\pm S9 mix : 6-18 時間) 及び連続処理法 (-S9 mix : 24 時間) により検体の染色体異常誘発性を検索した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。各濃度 2 枚のプレートを使用し、1 プレートにつき 100 個、1 濃度 200 個の分裂中期像を観察した。

試験結果：結果を次表に示す。

S9 mix の有無にかかわらず、短時間処理法では全ての処理群で染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加は認められなかった。一方、連続処理法において、1150 μ g/mL 以上の濃度で構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度の増加が用量に対応して認められた。

陽性対照として用いたマイトマイシン C (MMC) 及びシクロホスファミド水和物 (CPA) には、異常を有する分裂中期細胞数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体の染色体異常誘発性は陽性であると結論した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.14

マウスリンフォーマ細胞を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 No. TM-14)

試験機関：

報告書作成年：2003年[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：マウスリンフォーマ細胞 L5178Y を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、チミジンキナーゼ遺伝子の突然変異誘発性を検索した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。試験は短時間処理法 (3 時間処理、±S9 mix) 及び連続処理法 (24 時間処理、-S9 mix) にて行った。短時間処理法及び連続処理法ともに 283~2260 µg/mL の範囲で 4 濃度を設定した。細胞を各濃度の検体で処理した後、2 日間の発現期間を設けた。細胞を回収して培地に再懸濁させた後、トリフルオロチミジンを加え、96 穴プレートに播種し、12 日間培養後に変異コロニー数をカウントした。各濃度 2 枚の培養器を使用し、1 培養器あたり 1 枚の 96 穴プレートに播種した。ただし、陰性対照群は 1 培養器あたり 2 枚の 96 穴プレートに播種した。

試験結果：結果を次表に示す。

短時間処理法及び連続処理法ともに、溶媒対照群と比較していずれの検体処理群にも突然変異頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたメタンスルホン酸メチル (MMS) 及びシクロホスファミド水和物 (CP) には、突然変異頻度の増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体の突然変異誘発性は陰性であると結論した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.15

マウスを用いた小核試験

(資料 No. TM-15)

試験機関：

報告書作成年：2003年[GLP 対応]

検体純度：

供試動物：NMRI マウス、馴化開始時 8～10 週齢、1 群雌雄各 5 匹

投与開始時体重 雄 41.4 g、雌 31.1 g

試験方法：検体をコーンオイルで調製し、187.5、375 及び 750 mg/kg 体重の用量で、各群雌雄各 6 匹の動物に 24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。投与容量は 10 mL/kg 体重とした。陰性対照群にはコーンオイルを投与した。陽性対照群にはシクロホスファミド (40 mg/kg 体重) を 1 回強制経口投与した。

各投与から約 1、2～4、6 及び 24 時間後に動物の一般状態を観察した。

最終投与から 24 時間後に動物を安楽死させ、大腿骨骨髓を採取して骨髓塗抹標本を作製した。

各標本について、動物 1 匹あたり少なくとも 2000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球の割合を求めた。また、動物 1 匹あたり赤血球 2000 個中の多染性赤血球数を求めた。各群雌雄各 5 匹の標本を評価した。

試験結果：結果を次表に示す。

750 mg/kg 体重群において、雌 1 例が死亡した。その他、全ての投与群で自発運動量の低下、腹臥位、眼瞼閉鎖及び被毛粗剛が認められた。さらに 750 及び / または 375 mg/kg 体重群では痙攣及び無気力が認められた。

いずれの検体投与群においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して生物学的あるいは統計学的に有意な増加は認められなかった。

陽性対照として用いたシクロホスファミド (CP) には、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。検体投与群における多染性赤血球数は減少せず、骨髓における細胞毒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石原産業株式会社にある。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体は骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性であると結論した。

8.10.16

マウスを用いた小核試験に関するトキシコキネティクス

(資料 No. TM-16)

試験機関：

報告書作成年：2017年[GLP 対応]

検体純度：

供試動物：ICR系 SPF マウス [CrI:CD1]、投与時 7 週齢、1 群雄各 4 匹
投与時体重 34.8 g (31.2～38.2 g)

試験方法：検体をコーンオイルに懸濁し、小核試験における最高用量である 750 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与した。投与容量は 10 mL/kg 体重とした。試験群は、無処置群及び採血時間ごとに 4 群（投与後 0.5、1、2 及び 24 時間）の合計 5 群設定した。

採血後直ちに血漿を分析し、検体濃度を測定した。分析は妥当性が確認された方法で行った。

また、各時点の採血前に動物の一般状態を観察した。

試験結果：結果を次表に示す。

死亡は認められなかった。一般状態の観察において、自発運動量の低下、立毛及び腹臥位が認められた。

血漿中の検体濃度は、無処置群では検出限界以下であった。750 mg/kg 群における投与後 0.5、1、2、及び 24 時間の検体の平均濃度は、それぞれ 222、143、205 及び 73.9 mg/L であった。

以上の結果から、過去に実施された小核試験（2003 年）と同一の実験条件下において検体は血液中に速やかに吸収され、全身に循環したことが示された。したがって、過去に実施された小核試験において、その骨髄細胞は検体に十分に暴露されていたと結論した。

8.10.17

細菌を用いる復帰突然変異試験 (資料 No. TM-17)

試験機関：

報告書作成年：2014年[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98、TA100 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pKM101) 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で復帰突然変異試験を行った。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。試験は 3 回行った。試験 1 はプレート法にて 5~5000 µg/プレートの範囲で 7 濃度、試験 2 はプレインキュベーション法にて 50~5000 µg/プレートの範囲で 5 濃度設定した。試験 2 の TA98 株において復帰変異コロニー数の増加が認められたことから、その結果を確認する目的で、試験 3 を TA98 株のみを用いて代謝活性化系非存在下でプレインキュベーション法にて行った。試験 3 は 150~5000 µg/プレートの範囲で 6 濃度設定した。各濃度 3 枚のプレートを使用した。

試験結果：結果を次表に示す。

試験 1 において、代謝活性化系非存在下の TA1535 及び WP2 *uvrA* 株の 1500 ないし 5000 µg/プレートならびに代謝活性化系存在下の TA100 及び TA1535 株の 500、1500 ないし 5000 µg/プレートで生育阻害が認められた。代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株のいずれの濃度にも対照群と比べて復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験 2 では、代謝活性化系存在下の TA98 株において、5000 µg/プレートで生育阻害が認められた。代謝活性化系非存在下の TA98 株では、5000 µg/プレートで 1 枚のプレートに復帰変異コロニー数の増加が認められた。平均値は溶媒対照の 2.6 倍であった。その他の菌株には、いずれの濃度においても代謝活性化系の有無にかかわらず対照群と比べて復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験 3 では、生育阻害は認められなかった。またいずれの濃度においても変異原性は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (NaN₃)、9-アミノアクリジン (AAC)、4-ニトロキノリン-1-オキシド (NQO)、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

ベンゾ(a)ピレン (B(a)P) 及び 2-アミノアントラセン (AAN) は、対応する全ての菌株において復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体の細菌に対する突然変異誘発性は陰性であると結論した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.19

マウスリンフォーマ細胞を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 No. TM-19)

試験機関：

報告書作成年：2003年[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：マウスリンフォーマ細胞 L5178Y を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、チミジンキナーゼ遺伝子の突然変異誘発性を検索した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。試験は短時間処理法 (3 時間処理、±S9 mix) 及び連続処理法 (24 時間処理、-S9 mix) にて行った。短時間処理法の S9 mix の非存在下では 452~1600 µg/mL の範囲で 13 濃度、S9 mix の存在下では 366~1166 µg/mL の範囲で 12 濃度設定した。連続処理法は 125~1166 µg/mL の範囲で 11 濃度設定した。また、追加試験を行い、短時間処理法は S9 mix の存在下及び非存在下ともに 350~1050 µg/mL の範囲で 11 濃度、連続処理法は 150~750 µg/mL の範囲で 11 濃度設定した。培地に各濃度の検体を処理後、細胞を回収して、96 穴プレートに播種し、12 日間培養後コロニー数をカウントした。検体投与群及び陽性対照群は 2 プレート、溶媒対照群は 8 プレート使用した。

試験結果：結果を次表に示す。

追加試験の結果、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び連続処理法では、溶媒

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

対照群と比較していずれの検体処理群にも突然変異頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。一方、短時間処理法の S9 mix 存在下において、突然変異頻度に統計学的に有意な増加が認められた。しかし、この値は陰性対照群の突然変異頻度の 2 倍未満であり、また、背景対照データの最大値 (274.9) をわずかに超える程度のものであることから、生物学的意義はないと考えられた。

一方、陽性対照として用いたメタンスルホン酸メチル (MMS) 及びシクロホスファミド (CP) には、突然変異頻度の増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体の突然変異誘発性は陰性であると結論した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.20 チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 (CHL)を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 No. TM-20)

試験機関：

報告書作成年：2003年 [GLP 対応]

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター肺由来の CHL/IU 細胞株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、短時間処理法 (\pm S9 mix : 6-18 時間) 及び連続処理法 (-S9 mix : 24 時間) により検体の染色体異常誘発性を検索した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。各濃度 2 枚のプレートを
使用し、1 プレートにつき 100 個、1 濃度 200 個の分裂中期像を観察した。

試験結果：結果を次表に示す。

S9 mix 非存在下の短時間処理法及び連続処理法では全ての処理群で染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加は認められなかった。短時間処理法の S9 mix 存在下において、1500 μ g/mL で構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度の増加及び数的染色体異常を有する細胞の出現頻度の軽度の増加が認められた。確認試験では、1100 及び 1500 μ g/mL で構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度の軽度の増加が認められ、結果の再現性が確認された。数的染色体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。

陽性対照として用いたマイトマイシン C (MMC) 及びシクロホスファミドー水

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

和物（CP）には、異常を有する分裂中期細胞数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体の染色体異常誘発性は陽性であると結論した。しかし、最高濃度における異常細胞の発生頻度は 11.0%であり、かつ、明らかな用量反応関係もないことから、その異常誘発性は非常に弱いものであると考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.21

マウスリンフォーマ細胞を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 No.TM-21)

試験機関：

報告書作成年：2003年【GLP 対応】

検体純度：

試験方法：マウスリンフォーマ細胞 L5178Y を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、チミジンキナーゼ遺伝子の突然変異誘発性を検索した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。試験は短時間処理法 (4 時間処理、±S9 mix) 及び連続処理法 (24 時間処理、-S9 mix) にて行った。短時間処理法は S9 mix の存在下及び非存在下で 62.5~1000.0 µg/mL、連続処理法は 50.0~800.0 µg/mL の範囲でそれぞれ 6 濃度設定した。培地に各濃度の検体を処理後、細胞を回収してプレートに播種し、10~15 日間培養後コロニー数をカウントした。各濃度につき 2 培養、各々 2 枚のプレートを使用した。

試験結果：結果を次表に示す。

S9 mix の有無にかかわらず、短時間処理法及び連続処理法ともに突然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メタンサルホン酸メチル (MMS) 及び 3-メチルコラントレン (3-MC) には、突然変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体の突然変異誘発性は陰性であると結論した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.22

マウスを用いた小核試験

(資料 No. TM-22)

試験機関：

報告書作成年：2003年[GLP 対応]

検体純度：

供試動物：NMRI マウス、馴化開始時 8～10 週齢、1 群雌雄各 5 匹
投与開始時体重 雄 41.2 g、雌 32.6 g

試験方法：検体をコーンオイルで調製し、500、1000 及び 2000 mg/kg 体重の用量で、各群雌雄各 6 匹の動物に 24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。投与容量は 10 mL/kg 体重とした。陰性対照群にはコーンオイルを投与した。陽性対照群にはシクロホスファミド (CP) (40 mg/kg 体重) を 1 回強制経口投与した。各投与から約 1、2～4、6 及び 24 時間後に動物の一般状態を観察した。最終投与から 24 時間後に動物を安楽死させ、大腿骨骨髓を採取して骨髓塗抹標本を作製した。各標本について、動物 1 匹あたり 2000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球の割合を求めた。また、動物 1 匹あたり赤血球 2000 個中の多染性赤血球数を求めた。各群雌雄各 5 匹の標本を評価した。

試験結果：結果を次表に示す。

2000 mg/kg 体重群において、雌 1 例が死亡した。その他、全ての投与群で自発運動量の低下、腹臥位、眼瞼閉鎖、被毛粗剛及び無気力が認められた。さらに 2000 mg/kg 体重群では痙攣及び振戦、1000 mg/kg 体重群では鼻出血が認められた。

いずれの検体投与群においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して生物学的あるいは統計学的に有意な増加は認められなかった。

陽性対照として用いたシクロホスファミドには、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

検体投与群における多染性赤血球数は減少せず、骨髄における細胞毒性は認められなかった。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体は骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性であると結論した。

8.10.23

細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 No. TM-23)

試験機関：

報告書作成年：2014年[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98、TA100 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pKM101) 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で復帰突然変異試験を行った。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。試験は 2 回行い、試験 1 はプレート法にて 5~5000 µg/プレートの範囲で 7 濃度、試験 2 はプレインキュベーション法にて 50~5000 µg/プレートの範囲で 5 濃度設定した。各濃度 3 枚のプレートを使用した。

試験結果：結果を次表に示す。

試験 1 及び試験 2 において、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株のいずれの濃度にも対照群と比べて復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、生育阻害及び検体の析出は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (NaN₃)、9-アミノアクリジン (9-AA)、4-ニトロキノリン-1-オキシド (NQO)、ベンゾ(a)ピレン (B(a)P) 及び 2-アミノアントラセン (2-AA) は、対応する全ての菌株において復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体の細菌に対する突然変異誘発性は陰性であると結論した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

試験結果：結果を次表に示す。

S9 mix の存在下及び非存在下において構造的染色体異常を有する細胞の出現が有意に認められ、用量に対応して増加した。

陽性対照として用いたマイトマイシン C (MMC) 及びシクロホスファミド水和物 (CP) には、異常を有する分裂中期細胞数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体の染色体異常誘発性は陽性であると結論した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.25

チャイニーズハムスター培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 No. TM-25)

試験機関：

報告書作成年：2016年[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター培養細胞 V79 を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、HPRT 遺伝子の突然変異誘発性を検索した。検体は純度換算を行って秤量し、0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 (CMC) に懸濁して使用した。試験は2回行い、試験1では短時間処理法 (4時間処理、±S9 mix) 及び連続処理法 (24時間処理、-S9 mix) を行った。短時間処理法の S9 mix 非存在下では 695~3930 µg/mL の範囲で6濃度、S9 mix 存在下では 1070~1960 µg/mL の範囲で8濃度設定した。連続処理法は 880~1800 µg/mL の範囲で9濃度設定した。試験2は連続処理法のみを実施し、800~1400 µg/mL の範囲で9濃度設定した。

細胞を各濃度の検体で処理した後、7日間の発現期間を設けた。細胞を回収後、さらに6・チオグアニン培地で7日間培養し、変異コロニー数をカウントした。各濃度2枚のプレートに処理し、1処理あたり3枚の60-mm プレートを用いて相対細胞毒性、生存率、突然変異頻度を求めた。

試験結果：結果を次表に示す。

短時間処理法及び連続処理法ともに、溶媒対照群と比較していずれの検体処理群にも突然変異頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたメタンスルホン酸エチル (EMS) 及びジメチルニトロソアミン (DMN) には、突然変異頻度の増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体の突然変異誘発性は陰性であると結論した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.26

マウスを用いた小核試験

(資料 No. TM-26)

試験機関：

報告書作成年：2016年 [GLP 対応]

検体純度：

供試動物：ICR系 SPF マウス [CrI:CD1]、投与時 7 週齢、1 群雄各 5 匹
投与時体重 35.4 g (32.0~38.4 g)

試験方法：検体を 0.5%メチルセルロース水溶液 (0.5%MC) に懸濁し、500、1000 及び 2000 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与した。投与容量は 10 mL/kg 体重とした。陰性対照群には 0.5%MC を投与した。陽性対照群にはマイトマイシン C (MMC; 0.5 mg/kg) を 1 回腹腔内投与した。

投与後 1、3、5、24 及び 48 時間に動物の一般状態を観察し、投与前及び安楽殺前に体重を測定した。

投与 24 時間後に陰性対照群、500、1000 及び 2000 mg/kg 群、ならびに陽性対照群について、投与 48 時間後に陰性対照群及び 2000 mg/kg 群について各 5 例の動物を安楽死させた。各動物から大腿骨骨髓を採取してスライドガラス上に塗抹し、メタノールで固定後、3%ギムザ液で染色し骨髓標本を作製した。

各標本について、動物 1 匹あたり 4000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球を計数して小核出現頻度を求めた。さらに赤血球を 1000 個観察し、多染性赤血球数と正染性赤血球数より多染性赤血球数の割合を求めた。

試験結果：結果を次表に示す。

死亡は認められなかった。2000 mg/kg 群において 1 例に軟便が認められた。体重に変化は認められなかった。

いずれの投与群においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

陽性対照として用いた MMC には、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下において、本検体は骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性であると結論した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.27

マウスを用いた小核試験に関するトキシコキネティクス

(資料 No. TM-27)

試験機関：

報告書作成年：2017年[GLP 対応]

検体純度：

供試動物：ICR系SPFマウス [CrI:CD1]、投与時7週齢、1群雄各4匹
投与時体重 31.8 g (29.1~34.0 g)

試験方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液(0.5%MC)に懸濁し、小核試験における最高用量である2000 mg/kgの用量で1回強制経口投与した。投与容量は10 mL/kg体重とした。試験群は、無処置群及び採血時間ごとに4群(投与後0.5、1、2及び24時間)の合計5群設定した。

採血後直ちに血漿を分析し、検体濃度を測定した。分析は妥当性が確認された方法で行った。

また、各時点の採血前に動物の一般状態を観察した。

試験結果：結果を次表に示す。

死亡は認められず、一般状態の観察においても異常は認められなかった。

血漿中の検体濃度は、無処置群では検出限界以下であった。2000 mg/kg群における投与後0.5、1、2、及び24時間の検体の平均濃度は、それぞれ7.02、7.00、4.84及び0.02 mg/Lであった。したがって、血漿中の検体濃度のピークは投与後0.5または1時間であった。

以上の結果から、過去に実施された小核試験(2016年)と同一の実験条件下において検体は血液中に速やかに吸収され、全身に循環したことが示された。したがって、過去に実施された小核試験において、その骨髄細胞は検体に十分に暴露されていたと結論した。

8.10.28

ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No. TM-28)

試験機関：

報告書作成年：2017年 [GLP 対応]

検体純度：

試験方法：健康な成人から採取した末梢血リンパ球を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系(S9 mix)の存在下及び非存在下での染色体異常誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、陽性対照にはマイトマイシンC(MMC)またはシクロホスファミド(CP)を用いた。すべての用量に対し2培養を用い、各培養からそれぞれ1枚のプレートを作成した。用量あたり1000細胞中の分裂中期細胞数から分裂指数を算出し、細胞毒性を調べた。染色体の観察は各プレートあたり150個、1濃度あたり300個の分裂中期細胞について行い、染色体異常を有する細胞の出現率を算出した。検体処理時間は短時間処理では3時間および連続処理で21時間とし、処理開始21時間後に細胞を回収した。少なくとも1用量以上の濃度で統計学的に有意な増加がみられ、用量依存性を示し、背景溶媒対照データの範囲を超えている場合を陽性と判定した。

試験結果： 本試験及び追加試験の結果を表1～3に示す。(数値は細胞300個に対する値)
全処理用量における分裂指数及び沈殿の有無を表4に示し、背景溶媒対照データを表5に示す。

短時間処理の本試験では、S9mixの存在下及び非存在下とも552 µg/mLで沈殿がみられ、染色体異常を検査したいずれの濃度でも分裂指数の統計学的に有意な低下はみられなかった。また、最高用量の331.2 µg/mLまで構造異常を有する細胞率の統計学に有意な増加はみられなかった。一方、追加試験では、S9mixの存在下及び非存在下とも552 µg/mLで沈殿がみられたが、統計学的に有意な分裂指数の低下はみられなかった。染色体構造異常においては、S9mix非存在下で552 µg/mLに統計学的に有意なギャップを含む構造異常を有する細胞率の増加 ($p < 0.01$) がみられたが、ギャップを除く場合の構造異常を有する細胞率では有意差はみられず、背景溶媒対照データの範囲内であったため、この生物学的有意性は疑わしいと考えられた。また、S9mix存在下では、119.23 µg/mL以上の用量でギャップを含む及び除く場合の構造異常を有する細胞率の統計学に有意な増加がみられ、背景溶媒対照データの範囲を上回った。しかし、これらの増加はCochran-Armitage傾向検定で直線性を示さなかったため、疑わしいと考えられた。(申請者註：前述に加え、本試験の結果では331.2 µg/mLまで構造異常を有する細胞率はむしろ対照群より少なく、追加試験のデータは再現性がなかったこと、追加試験における構造異常を有する細胞率は3.3%と低かったことから陽性と判断するのは難しいと思われる) 連続処理では、441.6 µg/mLで沈殿がみられ、331.2 µg/mLで分裂指数が49%に低下した。染色体構造異常では、270.26及び331.2 µg/mLで統計学的に有意な構造異常を有する細胞率の増加がギャップを含む ($p < 0.001$) 及び除く ($p < 0.001$) 場合ともみられ、傾向検定で直線性を示し、背景溶媒対照データの範囲を上回った。なお、いずれの試験においても数的異常の増加はみられなかった。一方、陽性対照として用いたMMCおよびCPでは染色体異常を示す分裂中期細胞が明らかに増加した。

結論： 本試験条件下において、検体は染色体異常(構造異常)誘発性を有すると考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.29 代謝物 HTPP のマウスリンフォーマ細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験
(資料 No. TM-29)

試験機関 :
報告書作成年 : 2017 年 [GLP 対応]

検体純度 :

試験方法 : マウスリンパ腫細胞 (L5178Y *TK*^{+/+}-3.7.2c 株) を用いて、マイクロウェル法により *tk* 遺伝子座における突然変異誘発性を評価した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で 3 時間ならびに S9 mix の非存在下で 24 時間細胞に処理した。溶媒対照として DMSO を、陽性対照としてメタンサルホン酸メチル (MMS) 及びベンゾ(a)ピレン (B(a)P) を用いた。結果の判定は、突然変異頻度について行い、総合的評価ファクター (GEF: 126×10^{-6}) も考慮した。

試験結果 : 遺伝子突然変異試験結果を表 1 に示した。
3 時間処理では、S9 mix 存在下及び非存在下とも最高用量の 920 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間処理では 632.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で沈殿が認められた。また、RTG は、3 時間処理の 920 $\mu\text{g/mL}$ で S9mix 非存在下では 34%、存在下では 60%及び 24 時間処理の 575 $\mu\text{g/mL}$ では 13%であった。突然変異頻度の評価には、相対総増殖率 (RTG) が約 10-100%の範囲の用量を選択し、3 時間処理では試験した全用量について行い、24 時間処理では 115~575 $\mu\text{g/mL}$ の用量について行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

いずれの処理法及び用量においても突然変異頻度及び GEF の明らかな増加は認められなかった。陽性対照として用いた MMS 及び B(a)P では突然変異頻度の明らかな増加が認められた。

結論： 以上の結果より、本試験条件下において、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、マウスリンパ腫細胞 (L5178Y *TK*^{+/+}-3.7.2c 株) に対して遺伝子突然変異を誘発しないと判断される。

8.10.30

マウスを用いた *in vivo* 小核試験

(資料 No. TM-30)

試験機関

報告書作成年 2017 年 [GLP 対応]

検体純度：

供試動物： ICR 系マウス、投与開始時 8 週齢、体重：31.48～38.80 g、小核試験群：1 群雄 5 匹、トキシコキネティクス (TK) 群：各採血時雄 3 匹

試験方法： 検体を 0.5%メチルセルロース (MC) に懸濁し、雄マウスに 500、1000 及び 2000 mg/kg 体重/日 (投与液量 10 mL/kg 体重) で 1 日 1 回、24 時間間隔で合計 2 回強制経口投与した。最終投与 24 時間後に、各動物の右大腿骨から骨髓細胞を採取し、ホルマリン固定後、アクリジンオレンジ染色してスライドグラス上に骨髓標本作製した。

各動物について、計 4000 個の幼若赤血球を観察し、小核を有する幼若赤血球数 (MNIME) を計数した。また、各動物について 1000 個の赤血球を観察し、幼若赤血球 (IME) の割合を算出した。溶媒対照群には 0.5%MC を投与し、陽性対照群には、20 mg/kg の Cyclophosphamide monohydrate (CP) を投与して同様に骨髓標本作製した。

また、骨髓細胞が検体に暴露されたことを確認するために TK 群を設定して、検体の血漿中濃度を測定した。雄マウスに最高用量の 2000 mg/kg 体重/日を単回経口投与し、投与 1、2、6 及び 24 時間後に各 3 匹の下大静脈から採血し、血漿中の検体濃度を LC-MS/MS を用いて測定した。

試験結果： 骨髓標本の観察結果を表 1、検体の血漿中濃度を表 2 に示す。

2000 mg/kg 体重/日投与群の全例に自発運動量の減少が第 1 回投与の 1 時間後にみられ、第 2 回投与の 1 時間後も 2 例に同所見がみられたが、それ以降はみられなかった。500 及び 1000 mg/kg 体重/日投与群では、毒性徴候は認められなかった。また体重への影響はいずれの投与群においても認められなかった。

いずれの投与群においても、MNIME に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、全赤血球に対する IME の割合に統計学的に有意な低下はみられなかった。

また、TK 試験の結果、検体の平均血漿中濃度は投与 1 時間後で 93940 ng/mL、投与 2 時間後で 13760 ng/mL であったことから、試験動物が検体に全身暴露されたことが確認された。

陽性対照である CP 投与群では、溶媒対照群と比較して MNIME の有意な増加が認められた。

結論： 本試験条件下において、検体はマウスの骨髓細胞に対して小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.10.31 マウスを用いた 90 日間反復経口毒性試験

(資料 No.TM-31)

試験機関
報告書作成年 2019 年 [GLP 対応]

検体純度：

試験動物： CD1 (ICR)系マウス、主群・回復群ともに 1 群雌雄各 12 匹、投与開始時 5 週齢

試験期間： 投与期間 91 日間(主群および回復群)、回復期間 28 日(回復群)

投与期間

雄； 2018 年 7 月 18 日～10 月 17 日

雌； 2018 年 7 月 19 日～10 月 18 日

回復期間

雄； 2018 年 7 月 18 日～11 月 14 日

雌； 2018 年 7 月 19 日～11 月 15 日

投与方法： 検体を 0、50 (主群のみ)、200、800 及び 3000 ppm の濃度で飼料に混入し、91 日間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は 1 週間に 1 回調製した。回復群の動物は投与期間終了後、基礎飼料を 28 日間随時摂食させた。

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日観察した。

いずれの群にも検体投与によると考えられる症状は認められなかった。

主群の 3000 ppm 投与群の雌 1 例が投与期間中に死亡したが、病理組織学的検査結果を含め死因を特定することはできなかった。

詳細な状態の観察；投与開始前と投与期間及び回復期間中 1 週間に 1 回、全生存例を対象として、以下の項目について観察した。

ホームケージ： 体位/姿勢、呼吸、振戦/痙攣、常同行動、異常行動

ハンドリング： 取り出し易さ、取り扱い易さ、筋緊張、立毛、被毛の変化、皮膚、球/眼球、可視粘膜、瞳孔径、流涙、流涎、その他の分泌物/排泄物の変化

オープンフィールド：歩行、運動協調性、刺激に対する反応性、探索行動、排泄、常同行動、異常行動、攻撃性

いずれの投与群にも検体投与による影響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石原産業株式会社にある。

機能検査；主群は投与 13 週時、回復群は回復 4 週時に全生存例を対象として、視覚、接触、聴覚及び痛覚に対する感覚運動反応、姿勢反応、正向反射の判定を行い、さらに自発運動量を測定した。

いずれの投与群にも検体投与による影響は認められなかった。

体重変化；投与期間中は主群・回復群ともに投与開始時、投与開始 3 および 7 日後、以降は回復期（回復群）を含め 1 週間毎に、全生存動物について体重を測定した。対照群と比べ統計学的有意差が認められた投与週を次表に示す。

性別	投与量 (ppm)	雄				雌			
		50	200	800	3000	50	200	800	3000
投与期間（主群及び回復群）									
日	3	98	99	98	94↓	98	98	97	93↓
	7	98	99	99	96	98	97	97	96↓
	14	98	99	98	96	100	97	96↓	96↓
	21	97	98	97	95↓	100	98	98	97
	28	98	98	97	95↓	100	96	96	98
	56	100	98	98	95↓	97	98	94↓	95
	70	100	99	98	95↓	101	98	96	96
	77	99	98	97	94↓	99	97	96	96
	84	99	98	97	94↓	100	101	98	99
	90	99	98	97	95↓	99	99	97	96
体重増加量		99	95	93	84↓	103	96	90	89
回復期間（回復群）									
日	0	-	95	96	92↓	-	103	98	98
	28	-	96	98	94	-	101	98	99
体重増加量		-	127	148	178	-	22	104	126

Dunnett 検定 ↓； $P \leq 0.05$ 、↑↓； $P \leq 0.01$

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

【投与期間】

3000 ppm 投与群の雄では、投与開始 3、21、28、56 及び 70 日後以降、体重が統計学的に有意な低値で推移し、投与期間を通じた体重増加量も有意な低下を示した。同群の雌では、投与開始 3～14 日後の間、体重が有意な低値で推移した。これらの変化は検体投与の影響と考えられた。

800 ppm 投与群の雌では、投与開始 14 及び 56 日後に有意な体重の低値が認められたが、一時的なもので用量との関連性が明らかでないことから、有害性変化と判断しなかった。同群の雄では有意な変化は認められなかった。

200 ppm 以下の投与群では、有意な変化は認められなかった。

【回復期間】

3000 ppm 投与群の雄では、回復期間開始時の体重が有意な低値を示したが、3 日以降は有意な変化は認められなかった。同群の雌では、有意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石原産業株式会社にある。

摂餌量； 全ケージについて、投与期間中は主群・回復群ともに投与開始時、投与開始 3 および 7 日後、以降は回復期（回復群）を含め 1 週間毎に、ケージ別摂餌量を測定した。対照群と比べ統計学的有意差が認められた投与週を次表に示す。

性別 投与量 (ppm)	雄				雌				
	50	200	800	3000	50	200	800	3000	
投与期間									
日	3	95	96	90↓	75↓	99	97	89↓	72↓
	7	96	95	93	88↓	99	96	97	90↓
	14	93	94	94	92↓	99	102	98	95
	21	94	96	94	93↓	99	102	102	98
	35	96	95	96	93↓	100	105	101	100
	56	98	93↓	96	94	97	102	101	97
	63	99	92↓	94	93	103	104	104	101
	84	99	96	96	96	104	110↑	107	102
回復期間									
日	7	-	95	102	104	-	107	108	118↑
	14	-	88↓	93	93	-	95	101	93

Dunnett 検定 ↑↓ ; $P \leq 0.05$, ↑↓ ; $P \leq 0.01$

表中の数値は変動の日安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

【投与期間】

3000 ppm 投与群の雄では、投与開始 3~21、35 日後の間、統計学的に有意な低値で推移した。同群の雌では、投与開始 3 及び 7 日後に有意な低値が認められた。これらは検体投与の影響と考えられた。

800 ppm 投与群の雌雄で認められた投与初期の摂餌量の低下は同時期の体重値に影響しないことから調製飼料に対する忌避と考えられた。

【回復期間】

3000 ppm 投与群の雌で、回復期間 7 日後に有意な増加が認められた。同群の雄では有意な変動は認められなかった。

800 ppm 投与群の雌雄では有意な変動は認められなかった。

200 ppm 投与群の雄で、回復期間 14 日後に有意な低下が認められたが、用量反応性を欠くことから偶発性のものと判断した。同群の雌では有意な変動は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		50	200	800	3000
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	7.71	30.2	122	455
	雌	8.73	36.6	146	519

眼科学的検査；投与開始前に全動物、また投与 13 週時に主群の対照群と高用量投与群の全生存動物について、スリットランプと検眼鏡、並びにデジタル眼底カメラによる検査を行った。

主群の高用量投与群において検体投与による影響は認められなかった。したがって主群の他の用量群並びに回復群に対する眼科学的検査は実施しなかった。

尿検査；主群は 13 週時、回復群は回復 4 週時に、それぞれ全生存動物について新鮮尿を採取し、以下の項目及び方法によって検査した。

pH、たん白質、グルコース、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血、比重

【主群】

3000 ppm 投与群の雄において pH、同群の雌では尿比重が有意な低下が認められたが、腎臓に対する病理組織学的な影響が認められないことから毒性学的意義を持つものではないと判断した。

【回復群】

800 投与群の雄において比重の低下が認められたが、用量との関連性がないため偶発性のものと判断した。

血液学的検査；主群は投与期間終了時、回復群は回復期間終了時に、それぞれ全生存動物を対象として、剖検前 3~4 時間の絶食期間の後、イソフルラン吸入麻酔下で腹部大動脈から採血した。各用量群の動物番号の早いもの半数から得た血液を血液学的検査に用い、以下の項目を検査した。

赤血球数、ヘマトクリット値、血色素量、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、白血球数、網赤血球数、白血球のディファレンシャルカウント (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球)、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

【主群】

3000 ppm 投与群の雄において網状赤血球数の有意な増加が認められた。脾臓で髄外造血亢進が認められたことから、検体投与に関連する変化と判断した。同群の雌では有意な変動は認められなかった。

50、200 および 800 ppm 投与群の雌において好酸球、200 及び 800ppm 投与群の雌では単球の有意な低下が認められたが、用量との関連性がないため偶発性のものと判断した。

【回復群】

200 ppm 投与群の雄において血色素量の有意な減少が認められたが、用量との関連性がないため偶発性のものと判断した。

血液生化学的検査；血液学的検査で採取した血液のうち各用量群の動物番号の後半の個体から血漿を分離し、以下の項目について検査した。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、総ビリルビン (T.Bil)、血糖、総コレステロール (T-Chol)、トリグリセライド、総蛋白 (TP)、尿素窒素、クレアチニン (Crea)、ナトリウム、カリウム、カルシウム、無機リン (IP)、アルブミン/グロブリン比、アルブミン、グロブリン (α 1-G、 α 2-G、 β -G、 γ -G)

【主群】

3000 ppm 投与群では、雄において T-Cho、TP および α 2-G の有意な増加、T-Bil と Crea の有意な減少が認められた。同群の雌では T-Cho の増加、T-Bil と Crea の減少が認められた。T-Cho、TP および α 2-G の増加は、これらの動物で肝臓への影響が認められたことから、検体投与に関連するものと考えられた。

800 ppm 投与群では、雌雄において T-Bil と Crea の減少が認められた。

200 ppm 投与群の雄では T-Bil の減少が認められた。同群の雌では有意な変動は認められなかった。

50 ppm 投与群では雌雄ともに有意な変動は認められなかった。

検体投与群でみられた T-Bil と Crea の減少は、毒性学的意義はないものと判断した。

【回復群】

200 ppm 以上の投与群の雄で ALT が有意に減少し、800 ppm 投与群の雄で AST が減少した。さらに 200 ppm 投与群の雄では IP が減少した。これらの変動は主群には認められず、あるいは用量との関連性が認められないことから、検体投与に関連するものではないと判断した。

雌では有意な変動は認められなかった。

臓器重量；主群は投与期間終了時、回復群は回復期間終了時にそれぞれ全生存動物を対象として剖検を行い、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

肝臓、腎臓、心臓、脾臓、胸腺、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、脳
対照群と比べ統計学的有意差が認められた項目を次ページの表に示す。

【主群】

3000 ppm 投与群では、雄において肝臓と脾臓の絶対及び相対重量の有意な増加、腎臓の絶対重量の増加傾向と相対重量の有意な増加が認められた。同群の雌では、肝臓の絶対及び相対重量の有意な増加、脾臓の相対重量の有意な増加が認められ、これらの変化は検体投与による影響と考えられた。800 ppm 投与群の雌では肝臓の相対重量の増加が認められたが、絶対重量に有意差は認められなかった。800 ppm 投与群の雄、ならびに 200 ppm 以下の投与群の雌雄では有意な変動は認められなかった。

【回復群】

3000 ppm 投与群の雄で肝臓の相対重量の有意な増加が認められ、回復後も軽微な影響が残ったものと考えられた。同群の雌、800 ppm 投与群の雌雄では有意な変動は認められなかった。

200 ppm 投与群の雄で副腎の相対重量が有意に増加したが、用量との関連性が認められないことから、検体投与に関連するものではないと判断した。同群の雌では有意な変動は認められなかった。

肉眼的病理検査；全供試動物を対象に、剖検を行った。

検体投与に起因すると考えられる所見を次ページの表に示す。

【主群】

3000 ppm 投与群では、胃の境界縁肥厚が 2 例の雄、1 例の雌、肝臓の暗褐色が 5 例の雄、2 例の雌、脾臓の暗調化が 4 例の雄、2 例の雌で認められ、病理組織学的所見と併せ、検体投与の影響と考えられた。

800 ppm 以下の投与群の雌雄ではこれらの所見は認められなかった。

【回復群】

検体投与の影響は認められなかった。

病理組織学的検査；全動物より、以下の組織を採取した。

脳（大脳、小脳、橋、延髄）、脊髄（頸部、胸部、腰部）、下垂体、胸腺、甲状腺、上皮小体、副腎、脾臓、心臓、食道、胃（前胃、腺胃）、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板を含む）、盲腸、結腸、直腸、肝臓、胆のう、膵臓、唾液腺（顎下腺、舌下腺）、気管、肺（気管支を含む）、大動脈、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精のう、凝固腺、卵巣、子宮（角部、頸部）、膾、眼球、ハーダー腺、皮膚（腹部）、乳腺（雌のみ、腹部）、胸骨及び骨髄、大腿骨及び骨髄、リンパ節（顎下、腸間膜）、大腿二頭筋、坐骨神経、及び肉眼的異常部位

主群については、対照群と 3000 ppm 投与群の全動物、並びに試験途中の死亡動物を対象に、全採取組織の病理組織学的検査を実施した。50、300 及び 800 ppm 投与群では全動物を対象に胃（前胃、腺胃）、肝臓、腎臓、脾臓、及び膀胱の病理組織学的検査を実施した。回復群については、主群で認められた検体投与に関連すると考えられる変化の回復性を確認する目的で、全動物の肝臓、0、800 及び 3000 ppm 投与群の雌雄と 200 ppm 投与群の胃（前胃、腺胃）、並びに 0、800 及び 3000 ppm 投与群の雌雄の脾臓と雄の膀胱について病理組織学的検査を実施した。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた所見、あるいは投与に関連すると考えられる所見を次ページの表に示す。

【主群】

3000 ppm 投与群では、雌雄で前胃の境界縁角化亢進、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、雄ではさらに膀胱の尿路上皮肥大の発生頻度が統計学的有意に増加した。さらに有意差はないものの、雄 4 例に腺胃の限局性粘膜上皮肥大と、雄 3 例と雌 2 例で脾臓の髓外造血亢進 (赤芽球) が認められた。

なお、同群の雌の死亡例 (1 例) では、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大 (中等度) のみ認められた。

800 ppm 投与群では、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大の発生頻度が雄で有意に増加した。小葉中心性肝細胞肥大と前胃の境界縁角化亢進が雌においてそれぞれ 2 例に認められたが有意な変動ではなかった。

200 ppm 投与群では、雄 1 例に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、雌 2 例に前胃の境界縁角化亢進が認められたが、有意な変動ではなかった。

50 ppm 投与群の雌雄では検体投与に関連する変化は認められなかった。

【回復群】

3000 ppm 投与群の雄 2 例に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が認められたが、主群と比べ軽微であった。その他の検索組織において異常は認められず、3000 ppm 投与群の雄における肝臓に対する軽微な影響を除き、回復性が確認された。

以上の結果から、検体のマウスに対する飼料混入投与による 90 日間反復経口投与毒性試験における影響として、3000 ppm 投与群の雌雄で体重と摂餌量の低下、T-Chol の増加、肝臓と脾臓重量の増加、並びに胃の境界縁肥厚と前胃の境界縁角化亢進、肝臓の肉眼的暗褐色と小葉中心性肝細胞肥大、脾臓の肉眼的暗調化と髄外造血亢進、さらに雄で網状赤血球数、TP と α -G の増加、並びに腺胃の限局性粘膜上皮肥大、肝臓の単細胞壊死、膀胱の尿路上皮肥大が認められた。一方、200 および 800 ppm 投与群の雌雄における変化は、3000 ppm 投与群と比べ頻度、程度ともに軽微であり、回復群で認められなかったことから有害性は乏しいと判断した。

従って、無毒性量は雌雄ともに 800 ppm (雄: 122 mg/kg/day、雌: 146 mg/kg/day) と判断した。