

(5) フルミオキサジン原体のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害の種差
検討—ラット、マウスおよびイヌ肝臓のミトコンドリアを用いた検討—

(資料7-5)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1999年

検 体：フルミオキサジン原体

純 度：

試験動物：Crj:CD(SD)雌ラット(4週齢)

Crj:CD-1(ICR)雌マウス(4週齢)

雌ビーグル犬(7ヶ月齢)

試験目的：フルミオキサジンによるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(PPO)阻害の種差に関する検討の一環として本試験を実施した。

PPO測定方法：ラット、マウスおよびイヌの肝臓から調製したミトコンドリアを用い、プロトポルフィリノーゲンを基質としてインキュベートし、生成したプロトポルフィリンIX量を蛍光測定によって算出してPPO活性を求めた。また、ミトコンドリア調製純度を示すマーカーとしてチトクロームcオキシダーゼを測定した。

PPO阻害試験：肝臓ミトコンドリア(蛋白量：ラットでは0.25mg/mL、マウスおよびイヌでは0.5mg/mL)、基質(20 μ M)および様々な濃度のフルミオキサジン(イヌ； 10^{-4} ~ 10^{-9} M、ラットおよびマウス； 10^{-5} ~ 10^{-10} M)を20分間インキュベートさせ、PPO活性を測定した。得られたIC₅₀値を以下に示す。

組織	IC ₅₀ 値 (μ M、平均値 \pm SD)
ラット肝臓	0.00563 \pm 0.00390
マウス肝臓	0.0106 \pm 0.0060
イヌ肝臓	0.384 \pm 0.156

IC₅₀値から求めた各動物種におけるPPO阻害能は、ラット、マウス、イヌの順に高かった。なお、今回の試験でのラット肝臓のIC₅₀値は、以前の試験において得られた値である0.0808 \pm 0.0027 μ M(資料8-10)および0.00715 \pm 0.0021 μ M(資料8-11)とよく一致していた。

以上の結果から、フルミオキサジンのPPO阻害におけるIC₅₀値から求めた各動物種の相対的感受性は、ラット、マウス、イヌの順に高いことが明らかとなった。

(6) フルミオキサジン原体による貧血発生の種差に関する検討

—ラットおよびマウスを用いた検討—

(資料7-6)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1999年

検 体：フルミオキサジン原体

純 度：

試験動物：Crj:CD(SD)雌ラット(投与開始時5週齢、体重：104~117g)、1群6匹

Crj:CD-1(ICR)雌マウス(投与開始時5週齢、体重：20~25g)、1群6匹

試験期間：1週間および2週間(投与開始1999年10月8日、投与1週間後採血日：1999年10月15日、投与2週間後採血日：1999年10月22日)

試験目的：本剤により誘発されるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(PPO)阻害に起因した貧血発現の種差検討の一環として、フルミオキサジン原体をラットおよびマウスに、それぞれ1週間および2週間摂食投与し、貧血発現ならびにPPO阻害に関する指標について検討した。

投与方法：検体をラットに3000ppm、マウスに7000ppmの濃度で飼料中に混入して、1週間および2週間自由に摂取させた。

なお、飼料は投与開始前に1回調製した。

(投与量設定根拠)

検査項目および結果：

一般症状；全ての動物について、1日1回、一般症状を観察した。

ラットおよびマウスとも試験期間を通じて死亡および一般症状は認められなかった。

体重；投与1、8および15日目に体重を測定した。

ラットおよびマウスとも対照群に比較して有意な変化は認められなかった。

摂餌量；ケージ単位の摂餌量を投与1~3日目、投与8~10日目、13~15日目に測定した。

ラットにおいて、投与1週目に3000ppm群で一過性の摂餌量の低値が認められたが、マウスにおいては、対照群に比較して有意な変化は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の 1 日あたりの平均検体摂取量は、ラットの 3000ppm で 335.8mg/kg/day、マウスの 7000ppm で 1198.8mg/kg/day であった。
血液学的検査；計画屠殺例について、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血し、検査を行った。

EDTA-2K 処理の血液を用いて、以下の項目を測定した。

赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、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)、網赤血球数、赤芽球数、担鉄赤血球数

ヘパリンナトリウム処理の血液を用いて、以下の項目を測定した。

赤血球中遊離プロトポルフィリン濃度 (FEP)

対照群と比べて統計学的に有意差が認められた項目を以下の表に示す。

項目	動物種 (投与量)			
	雄		雌	
	ラット (3000ppm)		マウス (7000ppm)	
	投与期間 (週)			
	1	2	1	2
赤血球数	▼88			
血色素量	▼79	▼81		
ヘマトクリット値	▼80	▼85		
MCV	▼91	▼91		
MCH	▼90	▼87		
MCHC		▼96		
網赤血球数		▲190		
赤芽球数	△41800	13000 ^a		
担鉄赤血球数	▲6053	▲15983		
FEP	▲921	▲1322		△116

有意差の検定は Student の t 検定あるいは Aspin-Welch の検定を用いて行った (△, P<0.05; ▲▼, P<0.01)。

表中の数字は対照群を 100 とした時の比率 (%) を示す。

a: 統計学的有意差はないが、高値傾向を示した。

ラットの 3000ppm 群で投与 1 週間後に、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の低値、赤芽球数、担鉄赤血球数および赤血球中遊離プロトポルフィリン濃度の高値が認められた。投与 2 週間後に血

色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球色素量および平均赤血球色素濃度の低値、網赤血球数、担鉄赤血球数および赤血球中遊離プロトポルフィリン濃度の高値、赤芽球数の高値傾向が認められた。マウスの7000ppm群では投与1週間後にはいずれの項目においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。投与2週間後に赤血球中遊離プロトポルフィリン濃度の高値が認められたが、ラットと比較して極めて軽微な変化であった。

ラットにおいては、3000ppm群(335.8mg/kg/day)の投与1週間後において赤血球数、色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積および平均赤血球色素量の低値、担鉄赤血球数、赤芽球数および赤血球中遊離プロトポルフィリン濃度の高値が認められた。これらはヘム合成経路中のPPO阻害の結果として色素の合成が低下したことにより、小球性低色素性貧血が惹起されているとともに、赤血球中にヘムに取り込まれない鉄が蓄積したものと考えられた。投与2週間後においても同様に貧血および赤血球中遊離プロトポルフィリン濃度の高値が認められたが、一方で貧血に対する代償性変化を示唆する網赤血球数の高値が新たに認められた。以上の結果はフルミオキサジン原体のラットにおける混餌投与による貧血発現検討試験 試験1(資料7-4)をよく再現していた。

一方、マウスにおいては7000ppm群(1198.8mg/kg/day)の投与2週間後に赤血球中遊離プロトポルフィリン濃度の高値が認められたが、ラットと比較すると極めて軽微な変化であり、他の項目に影響は認められなかった。

以上の結果より、フルミオキサジンによる貧血発現ならびにPPO阻害の指標である担鉄赤血球数およびポルフィリン体の増加の程度についてはラットとマウスで明らかな種差が存在すると考えられた。

(7) フルミオキサジン原体による貧血発生の種差に関する検討　一イヌを用いた検討一

(資料 7-7)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1999年

検　　体：フルミオキサジン原体

純　　度：

試験動物：ビーグル犬（投与開始時 13 ヶ月齢、体重：8.5～10.0kg）、1群雌 2頭

投与期間：2週間（投与開始：1999年10月12日）

試験目的：本剤により誘発されるプロトポルフィリンノーゲンオキシダーゼ（PPO）阻害に起因した貧血発現の種差検討の一環として、検体をビーグル犬に2週間反復経口投与し、貧血発現ならびに PPO 阻害に関する指標について検討した。

投与方法：検体を 1000mg/kg の割合で硬ゼラチンカプセルに充填し、2週間（14日間）毎日1回経口投与した。対照群には、硬ゼラチンカプセルのみを検体投与群と同様に投与した。

[投与量設定の根拠]

試験項目および試験結果：

1. 一般症状および死亡：投与期間を通じ、毎日一定時間おきに症状を観察した。いずれの群においても死亡はなく、一般症状にも異常は認められなかった。
2. 体重：投与開始1週間前から投与期間終了まで、週2回測定した。いずれの群においても変化は認められなかった。
3. 血液学的検査：投与開始前に2回、ならびに投与1および2週に橈側皮静脈より採血し、検査を行った。

EDTA-2K 処理の血液を用いて、以下の項目を測定した。

赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、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、網赤血球数、赤芽球数、担鉄赤血球数

ヘパリンナトリウム処理の血液を用いて、以下の項目を測定した。

赤血球中遊離プロトポルフィリン濃度

いずれの群においても、血液学的検査の各項目に変化は認められなかった。

以上のように、イヌにおいては、ラットで認められているようなフルミオキサジン原体による貧血発現、ならびに PPO 阻害の指標である赤血球中遊離プロトポルフィリン濃度および担鉄赤血球数の増加は、1000mg/kg/日の投与によっても発現せず、それらの発現にはイヌとラットで明らかな種差があることが示唆された。

(8) フルミオキサジンのカニクイザルを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験

(資料 7 - 8)

試験機関：(株)新日本科学

報告書作成年：2010 年

試験目的：検体をカニクイザルに毎日 1 回 4 週間反復経口投与したときの貧血作用に対する毒性変化を検討するために実施した。

検体：フルミオキサジン

検体純度：

供試動物：カニクイザル、1 群雌 3 匹、馴化開始時年齢：4~7 才、群分け時（投与開始前日）体重：3.15~4.14 kg

投与期間：4 週間（2010 年 1 月 7 日~2010 年 2 月 3 日）とし、投与開始日を投与 0 日と計算した。

投与方法：検体を 0.5 w/v%メチルセルロース 400 (MC) 溶液に懸濁して、100、300 および 1000 mg/kg/日（投与液量 5 mL/kg）を毎日 1 回 4 週間にわたり（合計 28 回）、ディスポーザブルカテーテルおよび注射筒を用いて、鼻腔から胃内に投与した。なお、対照群には溶媒のみを同様の方法で投与した。検体投与液は用時調製した。

投与量設定根拠：

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；馴化期間中は毎日 1 回、投与期間中は毎日 3 回（投与前、投与後約 1 時間および投与後約 4 時間）、また、剖検日に 1 回、全動物について、一般状態および生死を確認した。

投与期間を通じて、いずれの群においても死亡はみられず、一般状態においても検体投与に起因したと考えられる変化はみられなかった。

体重変化；馴化開始日、馴化終了日、投与 6、13、20 および 27 日目（投与前）および剖検日に、全動物の体重を測定した。

投与期間を通じて、いずれの群にも対照群との間に統計学的有意差は認められず、検体投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。統計検定は Bartlett 法により等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合は Dunnett 法、等分散性が認められなかった場合は Dunnett 型検定 (Miller 検定) を用いて対照群との有意差検定を行った（両側検定、有意水準： $P < 0.05$ ）。

なお、個体別値では、1000 および 100 mg/kg/日群の各 2 例で投与期間中に体重

の減少傾向がみられたが、わずかな変動であり、投与開始前値と比較して 10% 以上の減少を示す個体はみられず、用量に依存した変化ではないことから、偶発的变化であると考えられた。

摂餌量；全動物の摂餌量を毎日測定した。

投与期間を通じて、いずれの群においても対照群との間に統計学的有意差は認められず、検体投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。統計検定は Bartlett 法により等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合は Dunnett 法、等分散性が認められなかった場合は Dunnett 型検定 (Miller 検定) を用いて対照群との有意差検定を行った (両側検定、有意水準：P < 0.05)。個体別値では、全給餌量 (108 g) の半量以上を食べ残した場合、摂餌量の減少と判断したところ、投与 0 日目に、1000 および 100 mg/kg/日群の各 1 例で摂餌量の減少がみられたが、対照群の 1 例でもみられていることから、偶発的变化であると考えられた。投与 11 日目には、1000 および 300 mg/kg/日群の各 1 例で摂餌量の減少がみられたが、一過性の変化であり、体重推移に検体投与に起因したと考えられる変化がみられていないことから、偶発的变化であると考えられた。

血液学的検査；-13 日目、投与 6、13 および 27 日目 (投与前) に全動物を対象として、大腿静脈から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間については血漿を用いて測定を行った。

赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、血小板数、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、網赤血球数、白血球分類、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

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

項目	検査 時期 (日)	投与量 (mg/kg/日)		
		雌		
		100	300	1000
赤血球数	6	97	↑109	102
	27	100	↑113	104
白血球数	13	114	↑171	↑184
ヘモグロビン濃度	27	98	↑108	103
平均赤血球容積	投与前	97	↓93	97
	6	100	↓94	100
	13	99	↓93	98
	27	99	↓93	96

項目	検査 時期 (日)	投与量 (mg/kg/日)			
		雌			
		100	300	1000	
平均赤血球血色素濃度	投与前	101	↑103	101	
	27	100	↑103	↑104	
白血球分類	リンパ球数	投与前	109	161	↑223
	リンパ球比率	投与前	125	134	↑203
	好中球数	13	166	190	↑318
	好中球比率	投与前	84	83	↓48
13		146	110	↑174	
プロトロンビン時間	13	101	96	↓90	

Bartlett 法により等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合は Dunnett 法、等分散性が認められなかった場合は Dunnett 型検定 (Miller 検定) を用いて対照群との有意差検定を行った (両側検定、 $\uparrow \downarrow: P < 0.05$ 、 $\uparrow \downarrow: P < 0.01$)。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の。

いずれの群においても検体投与に起因したと考えられる変化はみられなかった。対照群と比較して、検体投与群で以下の統計学的有意差がみられたが、個体別値ではいずれも背景値内であるか、わずかに背景値を逸脱する程度の値であること (本文表 1)、反復投与による増悪がみられていないこと、関連するパラメータに変化がみられていないこと、あるいは 1000 mg/kg/日群でみられていない変化であることから、偶発的变化であると考えられた。

投与 6 日目 ; 300 mg/kg/日群で赤血球数の高値および平均赤血球容積の低値

投与 13 日目 ; 1000 および 300 mg/kg/日群で白血球数の高値、1000 mg/kg/日群で好中球数および比率の高値ならびにプロトロンビン時間の短縮、300 mg/kg/日群で平均赤血球容積の低値

投与 27 日目 ; 1000 mg/kg/日群で平均赤血球血色素濃度の高値、300 mg/kg/日群で赤血球数、ヘモグロビン濃度および平均赤血球血色素濃度の高値ならびに平均赤血球容積の低値

[本文表 1]

投与量 (mg/kg/日)		300			1000			背景値 (Mean ± 2SD)
個体番号		7	8	9	10	11	12	
項目	検査時期 (日)							
赤血球数 ($10^6/\text{mm}^3$)	6	5.34	5.91	5.61				4.659~6.203
	27	5.72	5.99	5.81				
白血球数 ($10^3/\text{mm}^3$)	13	14.64	14.99	15.54	18.25	12.37	17.96	4.269~18.713
ヘモグロビン 濃度 (g/dL)	27	13.2	13.3	13.5				11.53~14.85
平均赤血球容積 (fL)	投与前	72.1	69.1	73.1				69.96~85.16
	6	69.9	69.4	73.6				
	13	71.1	67.6	73.6				
	27	72.2	68.1	72.2				
平均赤血球血色 素濃度 (g/dL)	投与前	31.5	32.1	31.7				28.79~33.99
	27	32.0	32.5	32.2	32.3	33.2	32.3	
白血球 分類	好中球数 ($10^3/\text{mm}^3$)	13			6.78	7.11	11.75	~8.147*
	好中球比率 (%)	投与前			28.3	29.5	36.2	9.65~60.81
	13				37.1	57.5	65.4	
プロトロンビン 時間 (秒)	13				9.3	8.5	8.5	8.29~10.25

背景値は試験機関において 2003 年から 2008 年の間に取得されたものを記載した。

* : Mean-2SD が負の値であるため、下限は記載しなかった。

また、背景値と比較して、検体投与群で以下の変化がみられたが、いずれも背景値をわずかに逸脱する程度の値であるか (本文表 2)、1000 mg/kg/日群で見られていない変化であること、関連するパラメータの変動を随伴していない変化であること、投与開始前値とほぼ同程度の値であること、あるいは反復投与による増悪がみられていない変化であることから、偶発的变化であると考えられた。

投与 6 日目 ; 1000 mg/kg/日群の 1 例でプロトロンビン時間の短縮、100 mg/kg/日群の 1 例でヘマトクリットの低値

投与 13 日目 ; 1000 mg/kg/日群の 1 例で好中球数および比率の高値、1000 mg/kg/日群の 2 例でプロトロンビン時間の短縮、300 mg/kg/日群の 1 例でヘマトクリットおよびヘモグロビン濃度の低値、100 mg/kg/日群の 1 例でヘマトクリットおよびヘモグロビン濃度の低値ならびに網赤血球数の高値

投与 27 日目 ; 1000 mg/kg/日群の 1 例で白血球数、好酸球数、好中球数の高値、
1000 mg/kg/日群の 1 例で好酸球比率の高値、300 mg/kg/日群の
1 例で好中球数の高値、100 mg/kg/日群の 1 例で好中球数および
比率の高値

[本文表 2]

投与量 (mg/kg/日)		100		300		1000			背景値 (Mean ± 2SD)	
個体番号		4	6	7	9	10	11	12		
項目	検査時期 (日)									
白血球数 ($10^3/\text{mm}^3$)	27					23.61			4.269~18.713	
ヘマトクリ ット値 (%)	6		35.9						36.19~47.95	
	13		33.9	35.1						
ヘモグロビン 濃度 (g/dL)	13		10.3	11.1					11.53~14.85	
網赤血球比率 (%)	13		3.7						0.28~2.52	
白血球分 類	好酸球数 ($10^3/\text{mm}^3$)	27				1.00			~0.737*	
	好酸球 比率 (%)	27					8.5		~5.78*	
	好中球数 ($10^3/\text{mm}^3$)	13							11.75	~8.147*
		27	10.54			9.63	11.71			
	好中球 比率 (%)	13							65.4	9.65~60.81
27		68.5								
プロトンピ ン時間 (秒)	6							8.2	8.29~10.25	
	13						8.5	8.5		

背景値は試験機関において 2003 年から 2008 年の間に取得されたものを記載した。

* : Mean-2SD が負の値であるため、下限は記載しなかった。

骨髄検査 ; 剖検時に全動物を対象として、胸骨から骨髄を採取し、骨髄有核細胞数を測定した。

いずれの群においても対照群との間に統計学的有意差は認められず、検体投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。統計検定は Bartlett 法により等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合は Dunnett 法、等分散性が認められなかった場合は Dunnett 型検定 (Miller 検定) を用いて対照群との有意差検定を行った (両側検定、有意水準 : $P < 0.05$)。

臓器重量；投与期間終了の翌日、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。なお、左右個別に測定した器官については、左右の合計値も算出した。

肝臓（胆嚢を含む）、心臓、腎臓、脾臓

いずれの群においても対照群との間に統計学的有意差は認められず、検体投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。統計検定は Bartlett 法により等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合は Dunnett 法、等分散性が認められなかった場合は Dunnett 型検定 (Miller 検定) を用いて対照群との有意差検定を行った (両側検定、有意水準： $P < 0.05$)。

個体別値では、1000 および 300 mg/kg/日群の各 1 例で肝臓の絶対重量あるいは対体重比の高値がみられたが、背景値をわずかに逸脱する程度の値であり (本文表 3)、剖検で重量高値を示す変化がみられていないことから偶発的变化であると考えられた。300 mg/kg/日群の 1 例では脾臓の絶対重量および対体重比の高値がみられたが (本文表 3)、剖検で重量高値を示す変化は認められず、ごく軽度の変化であることから、偶発的变化であると考えられた。

[本文表 3]

投与量 (mg/kg/日)	300	1000	背景値 (Mean ± 2SD)
個体番号	8	12	
肝臓	重量 (g)	89.8	36.29~82.57
	対体重比 (g/kg)	22.23	15.13~24.93

背景値は試験機関において 2003 年から 2008 年の間に取得されたものを記載した。

肉眼的病理検査；投与期間終了の翌日、全動物について剖検を行った。

いずれの群においても全例で肉眼的変化はみられなかった。

以上の結果から、フルミオキサジンのカニクイザルに対する 4 週間反復経口投与毒性試験において、いずれの群においても死亡はみられず、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、骨髄検査、剖検および臓器重量において、検体投与に起因したと考えられる変化はみられなかった。従って、本試験条件下において、1000 mg/kg/日まで貧血性の変化は認められなかった。

8. 繁殖性に及ぼす影響および催奇形性

(1) フルミオキサジン原体のラットにおける繁殖性試験

(資料 8-1)

試験機関: Argus Research Laboratories, Inc.

報告書作成年: 1992年 [GLP対応]

検体: フルミオキサジン原体

純度:

試験動物: CrI:CD・BR VAF/Plus・(Sprague-Dawley) 雌雄ラット

(投与開始時約6週齢、体重; 雄182~241g、雌136~184g)、1群雌雄各30匹

試験期間: 1990年6月12日 P1世代親動物投与開始、

1991年3月31日 F1世代母獣/F2世代児動物最終剖検日

投与期間: P1世代; 交配の83日前から F1世代児動物離乳時まで

F1世代; 離乳時から F2世代児動物離乳時まで

投与方法: 検体を0、50、100、200および300ppmの濃度で基礎飼料に混入し、自由に摂取させた。飼料は週1回以上の頻度で調製した。

[投与量の設定根拠]

試験方法および試験項目: 概要を次頁の表にまとめた。

一般状態および死亡; P1およびF1世代親動物について死亡の有無を1日2回以上観察し、一般状態を1日1回観察した。

体重および摂餌量; 親動物について週1回測定した。ただし、交尾が確認された雌については、妊娠0、6、10、15、20および25(必要ならば)日、哺育1、4、7、10、14、16、18および21日に測定した。

世代	期間	作業手順	試験項目
P1	生育 (83日間)	各群雌雄30匹6週齢より投与開始。	症状を1日1回観察。 体重、摂餌量を週1回測定。
	交配 (3週間)	雌雄1対1で交配。 交尾は膣スメア中の精子または膣栓の存在で確認(妊娠0日)。	性周期(交配1週間前~妊娠0日) 交尾率、交配期間を測定。
	妊娠 (3週間)		受胎率、妊娠率を算出。 妊娠0、6、10、15、20、(25)日に 体重、摂餌量を測定。
	分娩	分娩完了の確認(哺育1日)。	分娩状況の観察。 妊娠期間、出産率、産児数(生存 および死亡)、性比を算出。
	哺育 (3週間)	哺育4日に各同腹児数を8匹(可能な らば雄4匹、雌4匹)に調整。 これ以外の児動物は剖検。	哺育1、4、7、10、14、16、18、 21日に母動物の体重、摂餌量測定。 哺育行動観察。 生後1、4、7、14、21日に生存児数、 個体別児動物体重を測定。 生存率、離乳率を算出。
	離乳	哺育21日にF1親動物として各群 雌雄各30匹(一腹当たり雌雄各1匹 以上)を選抜。 選抜されなかった児動物の剖検。 P1世代親動物の剖検。	F1離乳児の剖検所見。 P1親動物の剖検所見、臓器重量 測定、病理組織学的検査。
F1	育成 (86日間 以上)	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	交配 (3週間)	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	妊娠 (3週間)	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
	分娩	F1雄親動物を剖検。	(P1世代に準ずる) F1雄親動物の剖検所見、臓器重量 測定、病理組織学的検査。
	哺育 (3週間)	(P1世代に準ずる)	(P1世代に準ずる)
離乳	哺育21日にF2児動物を剖検。 F1雌動物を剖検。	F2離乳児の剖検所見。 F1雌親動物の剖検所見、臓器重量 測定、病理組織学的検査。	

交配および妊娠の確認；P1世代については83日間、F1世代については最低86日間投与した後、同じ群の動物（雄1匹／雌1匹）を最高21日間同居させた。膣スミア中の精子の有無または膣栓の有無を観察することにより交尾の確認を毎日行い、交尾が確認された日を妊娠0日とした。

分娩および哺育；分娩の徴候について観察し、分娩が完了した日を哺育1日とした。児動物の死亡の有無を1日2回、また匹数と全身状態について、生後21日まで1日1回観察した。個体別体重を生後1、4、7、14および21日に測定した。生後4日に同腹児数が8匹（可能であれば、雄4匹、雌4匹）となるよう無作為に間引きを行い、21日間哺育した。生後21日に、F1世代の動物を各群雌雄各30匹となるよう、可能ならば各同腹児から雄雌各1匹以上を無作為に選抜した。

繁殖性に関する指標；交配、妊娠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：

性周期：交配期間の1週間前から妊娠が確認されるまで観察

交配日数：交配を開始してから交尾が成立するまでの日数

交尾率：(交尾が成立した雌(雄)動物数／交配に使用した雌(雄)動物数)×100

妊娠率：(妊娠雌動物数(交尾相手雌を妊娠させた雄動物数)／交尾が成立した雌(雄)動物数)×100

受胎率：(妊娠雌動物数(交尾相手雌を妊娠させた雄動物数)／交配に使用した雌(雄)動物数)×100

妊娠期間：妊娠0日から最初の児動物を出産した日までの日数

着床数：児動物を出産しなかった母獣のデータを含む。

出産率：(生存児出産雌動物数／妊娠雌動物数)×100

児動物：

分娩児動物数：生産児動物数＋死産児動物数＋生死不明児動物数

性比：(生後1日の生存雄児動物数／生後1日の生存児動物数)×100

4日生存率：(生後4日(間引き前)の生存児動物数／生後1日の生存児動物数)×100

離乳率：(生後21日の生存児動物数／生後4日(間引き後)の生存児動物数)×100

死亡児動物数

生存児動物数：全同腹児が死亡した腹は除外して平均値を算出した。

児動物体重：個体別に測定した。

病理検査；P1世代雄ラット全例はF1世代児動物離乳後に、P1世代雌ラットはF1世代児動物離乳後または妊娠25日（児動物を出産しなかった動物）に屠殺した。F1世代雄ラット全例はF2世代児動物分娩後に、F1世代雌ラットは哺育21日、交配期間終了後25日（交尾が確認されず、児動物を出産しなかった動物）または妊娠25～42日（交尾が確認されたが、児動物を出産しなかった動物）にそれぞれ屠殺した。

剖検では、体表および内臓の詳細な肉眼的観察を行い、脳、下垂体、生殖器（雄；左右精巣および精巣上体、凝固腺を含む精囊および前立腺、雌；頸管を含む子宮および左右卵巣）を摘出して重量を測定した。

また、これらの生殖器と膣および乳腺（雌のみ）、下垂体および肉眼的変化の見られた組織は、P1およびF1世代の対照群と最高用量群の雌雄全例について病理組織学的検査を行った。さらに、肉眼的変化の認められた組織のみは両世代の中間用量群についても検査を行った。

死亡が発見された動物も同様に死亡日に剖検を行った。

生後4日に間引かれた児動物は屠殺し、肉眼的に異常の有無を検査した。F1世代親動物に選抜されなかったF1児動物およびF2児動物は生後21日に屠殺して剖検した。

死産児および計画屠殺前に死亡した児動物も剖検した。
 児動物の剖検には、前頭頭頂骨縫合線での頭蓋の切断面の検査も含めた。

試験結果：概要を別紙に示した。

親動物；P1世代雄ラットでは死亡および症状の発現ならびに精巣および精巣上体の重量に変化が認められたが、対照群と同頻度の発現あるいは最高用量群では対照群と差のない変化であり検体投与とは関連がないと考えられた。したがって、一般毒性作用および繁殖性に対する影響はともに認められなかった。

P1世代雌ラットでは死亡は認められなかった。交配前期間と哺育期間中には症状所見は認められなかったが、妊娠期間中には300ppm群で胎児吸収に関連した所見として臏周囲に赤色物質が認められた。

体重では、交配前期間または哺育期間中には影響がなかったが、妊娠中には300ppm群で胎児の吸収や体重の低値に関連すると考えられる有意な低値または低値傾向が認められた。

摂餌量では、交配前期間中には影響がなかったが、妊娠中には300ppm群で増加傾向が認められ、哺育期間中には有意な低値が認められた。

尚、育成期間中の平均検体摂取量は下表のとおりであった。

表：平均検体摂取量

投与量 (ppm)		50	100	200	300
P1 (F0)	雄	3.2	6.3	12.7	18.9
	雌	3.8	7.6	15.1	22.7
F1	雄	3.7	7.5	15.0	22.4
	雌	4.3	8.5	17.2	25.6
平均	雄	3.5	6.9	13.9	20.7
	雌	4.1	8.1	16.2	24.2

剖検および病理組織学的検査に影響はなかった。

臓器重量では50ppm以上で卵巣重量の増加がみられたが、増加のみられたいずれの用量群ともほぼ同程度の重量であり、かつ、いずれも背景データの範囲内（別紙の表参照）であったことから検体投与とは関連がないと考えられた。

繁殖性に関しては、平均交配日数、交尾率、受胎率、妊娠率、妊娠期間および着床数には影響が認められなかったが、300ppm群で出産率が有意に低値であった。この群の母獣5例は1例も児動物を出産せず、全胎児が吸収されていた。

F1世代雄ラットでは300ppm群で検体投与によると考えられる死亡が1例認められ、同群では蒼白が認められた動物数が有意に多かった。

体重では、300ppm群で交配前期間中および剖検時の体重に有意な低値または低値傾向が認められ、摂餌量については、交配前期間中に有意な低値が認められた。200ppm群でも剖検時体重に軽度な低値が認められたが、10%以内の差であり、交配前期間には体重および体重増加量ともに差がないことから、投与による影響とは考えられなかった。

投与に関連した肉眼的および顕微鏡的病理変化は認められなかった。

臓器重量では、300ppm群で、左右精巣上体、左右精巣および脳の絶対重量および右精巣上体の脳重量比重量の有意な低値が認められ、前立腺の絶対重量の低値傾向も

認められた。これらの低値および低値傾向は体重の低値と相関していた。200ppm群でも左右精巣上体、左右精巣の絶対重量および右精巣上体の脳重量比重量の有意な低値が認められた。しかし、これらの変化は対照値に比べて10%以内の差であり、これら臓器の体重比臓器重量に変化がないことから、生物学的に意義のないもので、剖検時体重の軽度な低値に関連する変化と考えられた。繁殖性については、300ppm群で交尾率の低値傾向が認められたが、交配日数および授胎率には影響がなかった。

F1世代雌ラットでは300ppm群の5例が死亡し、このうち4例の死亡は検体の影響と考えられた。残りの1例の死亡は他の動物に同様の肉眼的病変が認められなかったことから、検体投与とは関連がないと推測された。

一般症状所見としては、300ppm群で交配前期間中に蒼白の認められた動物数が有意に多かった。妊娠および哺育期間中には検体投与の影響と考えられる症状所見は認められなかった。

体重では、300ppmで交配前期間中および妊娠期間中に有意な低値または低値傾向が認められたが、哺育期間中には変化は認められなかった。

摂餌量では、300ppmで交配前期間中、妊娠期間中および哺育期間中に有意な低値または低値傾向が認められた。100および200ppm群でも哺育期間中に有意な低値が認められたが、一過性であり検体投与の影響ではないと考えられた。

死亡した300ppm群の3例の剖検の結果、肝臓の黄色化が認められ、病理組織学的検査では、これら3例には軽度から中等度の肝臓の小葉中心性壊死が、2例には軽度な胆汁うっ滞が認められた。肝臓の黄色化は発現頻度が統計学的に有意であり、死亡したのが46～50日齢であったことから、これらの所見は被験物質の影響である可能性が考えられた。

生存例の病理組織学的検査および臓器重量には影響はなかった。なお、200ppm群で卵巣重量に変化がみられたが、最高用量では認められないことから検体投与によるものとは考えられなかった。

繁殖性に関しては、交配日数、交尾率、受胎率、妊娠率、妊娠期間および着床数に影響は認められなかったが、300ppm群では、出産率の低値傾向が認められた。300ppm群の1例も児動物を出産しなかった2例の母獣では、子宮内にそれぞれ17の着床があり、体重のデータから、胚吸収と考えられた。

児動物；F1世代児動物では、300ppm群で平均分娩児動物数および生産児動物数が有意に低値であった。また、この群では、生後1～4日に死亡した児動物数は有意に高値であり、生後4日生存率が有意に低値であった。100および200ppm群でも生後2～4日および1～4日に死亡した児動物数が高値で、生後4日生存率が有意に低値であったが、この低値は背景データの範囲内（生後4日生存率；93.8～100%、生後1～4日の死亡；0-21匹、0～8.7%）であったことから、検体投与の影響ではないと考えられた。

300ppm群では、出生後の期間を通じて一腹あたりの平均生存児動物数が有意に低値であった。

200ppm群では生後1日に、300ppm群では、生後1、4および7日に児動物体重の有意な低値がみられ、300ppmではさらに生後14および21日の児動物体重も低値傾向が認められた。

死産児動物数、離乳率および性比には影響がなかった。

一般状態では、300ppm群で衰弱が認められた児動物数が有意に多かった（3例）。

剖検では、腎臓の大型化・褪色および肝臓の黄褐色～暗赤色斑が認められたが、1例のみの所見であり用量設定試験でも認められなかったことから、検体投与の影響で

はないと考えられた。その他に検体の影響と考えられる肉眼的病変は認められなかった。

F2世代児動物では、平均分娩児動物数と生産児動物数が300ppm群で有意に低値であった。200ppm群では、死産児動物数の有意な高値とそれに相関して、生産児動物数の有意な低値が認められた。これよりも高濃度では妊娠初期に胚/胎児死亡が惹起されたため、死産児動物数は300ppm群では高値ではなかった。300ppm群では、生後4日生存率が有意に低値であり、一腹あたりの生存児動物数は、200ppm群では生後1および4(間引き前)日に低値傾向、300ppm群では出生後の期間を通じて有意に低値であった。また、300ppm群では、児動物体重の有意な低値が生後1、4(間引き前、間引き後)7および14日に認められた。離乳率および性比には影響がなかった。

一般状態では、300ppm群の1同腹児のうちの2例で低体温、同群の別の同腹児のうちの2例で尾の紋輪が認められた。

剖検では、死亡児において200ppm群の2例(1腹)および300ppm群の4例(4腹)では、胃内に乳汁が認められなかった。この所見は、これらの用量で認められた児動物死亡率の高値と関連しており、被験物質の影響と考えられた。

以上の結果より、2世代にわたって本剤を飼料中に混入して投与した場合、親動物では300ppmの用量で投与に関連した変化が認められた。すなわち、F1世代雌雄で死亡、P1世代雌で膈周囲赤色物質、F1世代雌雄で蒼白が認められた。また、P1世代雌の妊娠中、F1世代雄および雌の交配前および妊娠中に体重の低値が、P1世代雌の妊娠中に摂餌量の高値傾向が、P1世代雌の哺育期間中およびF1世代雌雄で投与期間を通じて摂餌量の低値が認められた。剖検ではF1世代雌で肝臓の黄色化およびこれに関連する所見として病理組織学的検査で小葉中心性壊死と胆汁うっ滞が認められた。また臓器重量では、F1世代雄で精巣、精巣上体、前立腺および脳重量の低値あるいは低値傾向が認められた。

繁殖性については、300ppmの用量でF1雄ラットの交尾率の低値傾向、P1およびF1世代親動物の出産率の低値が認められた。

児動物については、200ppmの用量でF1世代児動物の生後1日体重の有意な低値、F2世代児動物の死産児動物数の有意な高値とそれに相関した生産児動物数の有意な低値、生後1および4日(間引き前)の一腹あたりの生存児動物数の低値傾向が認められた。300ppmではF1およびF2世代児動物ともに、分娩児動物数、生産児動物数、生後4日の生存率、生後1日から21日までの一腹あたりの生存児動物数、ならびにF2世代の生後21日を除く生後1日から21日までの児動物体重の低値傾向または有意な低値、さらに一般症状として衰弱や低体温などが、また、剖検では胃内に乳汁がない児動物が認められた。

したがって、親動物の一般毒性および繁殖性についての無毒性量は200ppm(P1雄:12.7 mg/kg/日、P1雌:15.1 mg/kg/日、F1雄:15.0 mg/kg/日、F1雌:17.2 mg/kg/日)、児動物についての無毒性量は100ppm(P1雄:6.3 mg/kg/日、P1雌:7.6 mg/kg/日、F1雄:7.5 mg/kg/日、F1雌:8.5 mg/kg/日)と考えられた。

別紙

世代		親：P1、 児：F1					親：F1、 児：F2				
投与量 (ppm)		対照	50	100	200	300	対照	50	100	200	300
動物数 (雄/雌)		30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
死亡	雄	1	1	1	0	1	0	1	2	0	1
	雌	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5**)
一般状態：											
蒼白雄		1	1	0	0	0	0	0	0	0	3##
雌		0	0	0	0	0	0	0	0	0	3##
臈周囲赤色物質		1	0	1	1	9##	0	0	0	0	1
体重 (雄)											低値
体重 (雌)	交配前										低値
	妊娠中					低値					低値
	哺育期										
摂餌量 (雄)											低値
摂餌量 (雌)	交配前										低値
	妊娠中					高値					低値
	哺育期					低値			低値	低値	低値
検体摂取量 (交配前) mg/kg/日	雄	-	3.2	6.3	12.7	18.9	-	3.7	7.5	15.0	22.4
	雌	-	3.8	7.6	15.1	22.7	-	4.3	8.5	17.2	25.6
肉眼的病理所見											
肝臓：黄色											雌3##
病理組織学的検査											
肝臓：小葉中心性壊死											雌3
肝臓：胆汁うっ滞											雌2

空欄は特記すべき変化のないことを示す。

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

有意差の検定は二項分布の均一性についての分散検定を用いて行った (## : P<0.01, # : P<0.05)。

有意差の検定はDunn's多重比較法を用いて行った (** : P<0.01, * : P<0.05)。

a) : 4例は検体投与による死亡と考えられた。

(つづく)

別紙(つづき)

世代		親: P1、 児: F1					親: F1、 児: F2					
投与量(ppm)		対照	50	100	200	300	対照	50	100	200	300	
親	絶対臓器重量										▽ 94	
	脳										▽ 93	
	左精巣上体										▽ 93	
	右精巣上体										▽ 93	
	左精巣										▽ 94	
	右精巣										▽ 94	
	前立腺											89
	左卵巢	(0.060)	▲127 (0.076)	△120 (0.072)								▽ 85
	右卵巢	(0.059)	▲122 (0.072)	▲124 (0.073)			△119 (0.070)					
	背景値: 0.056~0.078g ()内の数値は絶対重量 g											
動物	体重比臓器重量											
	右卵巢			△100								
	脳比臓器重量											
	左精巣上体					▼ 91						
	右精巣上体					▼ 89				▽ 94	▼ 92	
	左精巣		▽ 93	▽ 93	▼ 89							
	右精巣		▽ 93		▼ 90							
	左卵巢		▲127				△118				▽ 86	
	右卵巢		▲122	△121			△119					
	性周期											
物	平均交配日数	雄 3.0 雌 4.0	3.2 4.9	3.4 3.4	2.3 3.8	2.5 3.2	3.5 4.0	2.7 5.5	3.8 4.5	3.6 5.5	3.5 6.4	
	交尾率(%)	雄 86.2 雌 93.3	86.2 93.3	93.3 93.3	90.0 100	86.7 90.0	89.6 93.3	75.0 96.7	82.8 86.7	73.3 86.7	69.5 84.6	
	受胎率(%)	雄 69.0 雌 76.7	75.9 73.3	86.7 86.7	83.3 93.3	70.0 70.0	75.9 76.7	53.6 70.0	62.1 63.3	50.0 60.0	56.5 69.2	
	妊娠率(%)	雄 80.0 雌 82.1	88.0 78.6	92.8 92.8	92.6 93.3	80.8 77.8	84.6 82.1	71.4 72.4	75.0 73.1	68.2 69.2	81.2 81.8	
	平均妊娠期間	23.0	22.8	23.1	22.8	23.2	22.9	23.0	22.8	22.9	23.0	
	平均着床数	16.1	15.9	15.5	16.5	15.4	17.6	15.1	17.3	15.3	16.3	
	出産率(%)	100	100	96.2	100	76.2**	100	95.2	100	100	88.9	

空欄は特記するべき変化のないことを示す。

太枠は検体の投与による影響であることを示す。(つづく)

臓器重量の数値は統計学的に有意差を示したものを対照群値に対する百分率(%)で示す。

有意差の検定はDunnett's検定、Dunn's多重比較法またはFisher's確率検定を用いて行った(△、▽: P<0.05、▲、▼: P<0.01)。

有意差の検定は二項分布の均一性についての分散検定を用いて行った(**: P<0.01、*: P<0.05)。

有意差の検定はDunn's多重比較法を用いて行った(**: P<0.01、*: P<0.05)。(つづく)

別紙(つづき)

世代		親: P1、 児: F1					親: F1、 児: F2					
投与量 (ppm)		対照	50	100	200	300	対照	50	100	200	300	
児 動 物	平均分娩児動物数	14.4	15.2	13.8	14.6	7.2**	15.8	13.6	15.7	13.4	9.6**	
	平均生産児動物数	14.2	14.8	14.2	14.5	7.0**	15.6	13.3	15.6	12.8**	9.4**	
	平均死産児動物数	0.1	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.6**	0.1	
	性比 (%)	52.5	51.6	55.6	49.2	53.2	50.6	51.5	47.2	54.4	56.9	
	死亡 児動物 数	1日	2 /326	2 /326	3 /354	5 /407	5** /112	0 /358	0 /251	2 /296	1 /230	5** /149
		2-4日	0 /324	3 /324	10** /351	15** /402	9** /107	5 /358	6 /251	6 /294	7 /229	26** /144
		1-4日	2 /326	5 /326	13* /354	20** /407	14** /112	5 /358	6 /251	8 /296	8 /230	31** /149
		5-7日	1	0	0	0	1	2	1	0	0	1
		8-14日	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
		15-21日	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4日生存率 (%)		99.4	98.5	96.3*	95.1**	87.5**	98.6	97.6	97.3	96.5	79.2**	
背景値: 93.8~100%												
離乳率 (%)		99.4	100	100	100	98.8	97.8	99.3	100	100	98.9	
一般状 態:	衰弱	0	0	0	0	3**	0	0	0	0	0	
	低体温	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	
	尾の紋輪	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	

空欄は特記すべき変化のないことを示す。太枠は検体の投与による影響であることを示す。

死亡児動物数: 1日、2-4日、1-4日については観察児数も示した。

有意差の検定はDunnett's検定、Dunn's多重比較法またはFisher's確率検定を用いて行った

(△、▽: P<0.05、▲、▼: P<0.01)。

有意差の検定は二項分布の均一性についての分散検定を用いて行った (**: P<0.01、*: P<0.05)。

有意差の検定はDunn's多重比較法を用いて行った (**: P<0.01、*: P<0.05)。

申請者注) F1児動物の生後4日生存率が100および200ppm群で対照群に比較して低値であった(生後4日生存率は生後4日生存児数/生後1日生存児数であらわされるので、この低値は生後1~4日死亡児数の高値を反映)。しかしながら、生後4日生存率および生後1~4日死亡児数の背景値は93.8%~100%および0~21(0~8.7%)であり、100および200ppm群の値はこれらの範囲内である。加えて、同じ用量を暴露されているF2児動物において、200ppmまででは生存率に影響は認められないことから、100および200ppmでみられたF1児動物の生後4日生存率の低値は検体投与の影響とは考えられなかった。

(つづく)

別紙(つづき)

世代		親: P1、 児: F1					親: F1、 児: F2					
投与量 (ppm)		対照	50	100	200	300	対照	50	100	200	300	
児動物	生存児動物数 (ノ腹)	1日	14.1	14.7	14.0	14.4	6.7**	15.6	13.2	15.5	12.7	9.1**
		4日 ^{b)}	14.1	14.6	13.6	13.8	7.0**	15.3	12.9	15.2	12.3	7.9**
		4日 ^{c)}	7.7	7.8	7.7	7.7	5.8**	8.0	7.4	8.0	7.7	6.3**
		7日	7.6	7.8	7.7	7.7	6.2*	7.9	7.3	8.0	7.7	6.2*
		14日	7.6	7.8	7.7	7.7	6.2*	7.8	7.3	8.0	7.7	6.2*
		21日	7.6	7.8	7.7	7.7	6.2*	7.8	7.3	8.0	7.7	6.2*
	児動物体重 (g)	1日	6.9	6.5	6.7	▼6.1	▼5.7	6.4	6.7	6.3	6.1	▼5.6
		4日 ^{b)}	10.5	9.7	10.1	9.5	▼8.5	9.0	9.8	8.9	9.2	▽8.0
		4日 ^{c)}	10.6	9.8	10.2	9.6	▼8.6	9.2	9.9	9.1	9.3	▽8.0
		7日	17.9	16.8	17.3	16.3	▽14.1	15.7	16.6	15.3	15.2	▼13.1
		14日	35.3	33.2	36.3	33.9	29.5	33.8	34.7	32.8	33.1	▼30.1
		21日	54.0	51.7	56.1	52.7	47.8	52.8	55.3	52.9	53.5	50.0
肉眼的病理所見												
腎臓:大型、褪色		0	0	0	0	1##	0	0	0	0	0	
肝臓:黄褐色～暗赤色斑						(0.9)						
胃内の乳汁なし		0	3	2	3	1	0	0	0	2	4	

空欄は特記すべき変化のないことを示す。太枠は検体の投与による影響であることを示す。有意差の検定はDunnnett's検定、Dunn's多重比較法またはFisher's確率検定を用いて行った (△、▽: P<0.05、▲、▼: P<0.01)。

有意差の検定は二項分布の均一性についての分散検定を用いて行った (##: P<0.01、#: P<0.05)。

有意差の検定はDunn's多重比較法を用いて行った (**: P<0.01、*: P<0.05)。

b): 間引き前

c): 間引き後

(2) フルミオキサジン原体のラットにおける催奇形性試験（経口投与）

(資料 8-2)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1990年 [GLP対応]

検 体：フルミオキサジン原体

純 度：

試験動物：Slc:SD・雌ラット（入荷時9週齢、体重185～226g）、1群22匹

試験期間：1989年3月27日交配開始、1989年8月24日胎児検査終了

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、1、3、10および30 mg/kgの投与レベルで妊娠6日^{*}から15日までの10日間、妊娠6日体重に基づいてそれぞれ5 mL/kgの割合で1日1回強制経口投与した。なお、対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

*) 膈垢中に精子を確認した日を妊娠0日として起算した。

[投与量設定根拠]

試験項目：

親動物：症状および死亡の有無を毎日観察した。体重は妊娠0、6、9、12、15および20日に測定し、妊娠20日体重から屠殺時の妊娠子宮重量を引いた値を最終体重とした。また、妊娠6、9、12、15および20日の1日間の摂餌量を測定した。

妊娠20日に屠殺し、帝王切開した。胸腔、腹腔および骨盤腔内の異常の有無を肉眼的に検査し、黄体数を数えた。子宮は、内容物とともに重量を測定し、また着床数、生存胎児および死亡胚/胎児の数および位置を調べた。

生存胎児：性別判定、体重測定および口腔を含む外形観察を行った。その後、各同腹児のうち外形異常のない胎児の約1/2はアリザリンレッドS染色を施して骨格観察を行い、残りの胎児はブアン液で固定後、内臓観察を行った。

結果：概要を次頁の表に示した。

親動物；死亡は認められなかった。一般状態および摂餌量に投与に関連した影響は認められなかった。体重増加量の低値が妊娠20日に30 mg/kg群で認められた。しかし、最終体重は差がなく妊娠子宮重量のみを減少させたことから、これは生存胎児数および胎児重量の低値によるもので、親動物の体重そのものへの影響ではなかった。剖検では、30 mg/kg群で子宮内に暗赤色液または暗赤色物質の貯留が認められたが、これらは胎児の死亡に関連するものと思われた。したがって、本試験では母獣毒性は認められなかったが、30mg/kgを超える用量では評価可能な十分数の生存胎児を得ることが難しいことから、催奇形性試験としては30mg/kgが上限と考えられた。子宮内所見では、30 mg/kgで生存胎児数の低値が認められ、胎児の死亡率が高値傾向にあったが、統計学的に有意ではなかった。黄体数および着床数に影響はなかった。

生存胎児；胎児体重の低値が30 mg/kgの用量で認められた。性比への影響、ならびに投与に関連した外形異常は認められなかった。心室中隔欠損を主とする心脈管系の異常を有する胎児の発生頻度が30 mg/kg群で高値であった。10 mg/kgの用量でもやや高値であったが、発生頻度はほぼバックグラウンドデータの範囲（0～7.6%）内であり、対照群と有意な差はなく、偶発的な発現と考えられた。骨格観察では、30mg/kg群で波状肋骨および肩甲骨彎曲の発生頻度の高値が認められた。また、胎児体重の低値に関連していると考えられる仙尾椎体化骨数の減少が30 mg/kg群で認められた。

以上の結果から、本剤を胎児器官形成期の妊娠ラットに経口投与したところ、母獣において検体投与に関連した影響は認められなかった。胎児に対して、30mg/kgの投与により、死亡の増加、心室中隔欠損や波状肋骨を主とする形態異常、ならびに胎児体重低下や化骨遅延を誘発したことから、胚致死作用、催奇形作用ならびに発育抑制作用が認められた。従って、母獣に対する無毒性量は30 mg/kgを上回る量、胎児に対する無毒性量は10mg/kgと考えられた。

申請者注：フルミオキサジンの最高投与量群で認められた心室中隔欠損について
ラットの胎児に認められた心室中隔欠損は、その発現メカニズムを検討した試験（資料8-7）
で示された通り、胎児貧血によって惹起された室間孔閉鎖の遅延によるものであると考えられた。

投与群 (mg/kg/day)		対照	1	3	10	30
1 群当り動物数		22	22 ^{a)}	22 ^{a)}	22	22 ^{b)}
親動物	検査親動物数	22	21	21	22	19
	一般症状					
	死亡数	0	0	0	0	0
	体重増加					低値 ^{c)}
	最終体重 ^{c)}					
	妊娠子宮重量					低値 ^{c)}
	摂餌量					
	剖検					
	子宮内暗赤色液/物質	0	0	0	0	1 ^{c)}
	子宮内所見					
平均黄体数	15	15	15	15	15	
平均着床数	15	14	15	14	14	
胎児死亡率 (%)	5.6	7.2	2.9*	6.3	20.4	
平均生存胎児数	14	13	14	14	▽11	

空欄は特記すべき変化がないことを示す。太枠内は検体の影響であることを示す。

有意差の検定はWilcoxon順位和検定 (*: P<0.05) または t 検定 (▽: P<0.05) を行った。

a) : 非妊娠1例を含む。

b) : 非妊娠3例を含む。

c) : 妊娠20日体重から屠殺時の妊娠子宮重量を引いた値。

d) : 最終体重に差が認められないことから、生存胎児数および胎児体重の低値に起因するものであり、親動物の体重そのものへの影響とは考えられない。

e) : 胎児の死亡に関連した所見と考えられた。

投与群 (mg/kg/day)		対照	1	3	10	30
生	体 重 (g)	3.51	3.53	3.53	3.54	▼3.00
	雌	3.34	3.39	3.34	3.34	▼2.79
	性 比 ^{f)}	46	53	52	44	53
存	外 形 奇 形	0/301	0/282	1 ^{g)} /297	0/297	1 ^{h)} /214
	内 臓 奇 形 ⁱ⁾ 心室中隔欠損 (%)	2/147	1/138	2/144	7/144	28/102 26 (25.5) **
胎	内 臓 軽 度 異 常 ^{j)}	3/147	4/138	6/144	4/144	5/102
	内 臓 変 異 ^{k)}	12/147	17/138	11/144	9/144	14/102
児	心脈管系の異常 ^{l)} (%)	8 (5.4)	7 (5.1)	10 (6.9)	13 (9.0)	36 (35.3) **
	骨 格 奇 形	0/154	1 ^{m)} /144	1 ⁿ⁾ /152	0/153	10 ^{o)} /111
	肩甲骨弯曲 (%)	0	0	0	0	10 (9.0) *
児	骨 格 軽 度 異 常 ^{p)}	1/154	2/144	7/152	0/153	27/111
	波状肋骨 (%)	1 (0.6)	1 (0.7)	7 (4.6)	0	27 (24.3) **
	骨 格 変 異 ^{q)}	8/154	12/144	4/152	7/153	7/111
	化 骨 進 行 度 ^{r)}	8.9	9.0	9.1	9.0	▼8.5
	雄					
	雌	8.8	8.9	8.8	8.9	▼8.2

空欄は特記すべき変化がないことを示す。太枠内は検体の影響であることを示す。
有意差の検定はWilcoxon順位和検定 (*: P<0.05, **: P<0.01) または t 検定 (▼: P<0.01) を行った。

f) : (雄胎児数 / 生存胎児数) × 100

g) : 小頭症

h) : 浮腫

i) : 心室中隔欠損、総房室口遺残、右大動脈弓、重複大動脈弓がみられた。

j) : 肺分葉形成不全、右肺分葉異常、腎乳頭欠損、肺動脈分岐異常がみられた。

k) : 胸腺頸部遺残、過剰冠状動脈口、副脾、左臍動脈遺残がみられた。

l) : 内臓奇形、軽度異常および変異のうち心脈管系の異常を集計した。心室中隔欠損、総房室口遺残、右大動脈弓、重複大動脈弓、肺動脈分岐異常、左臍動脈遺残、過剰冠状動脈口がみられた。

m) : 13肋骨欠損

n) : 頸椎弓癒合

o) : 肩甲骨弯曲、尺骨弯曲

p) : 波状肋骨、肋骨分岐がみられた。

q) : 13肋骨短小、14肋骨、頸肋、胸椎体分離、仙椎前椎骨数25、仙椎前椎骨数27がみられた。

r) : 仙尾椎体化骨数

(3) フルミオキサジン原体のウサギにおける催奇形性試験

(資料 8-3)

試験機関: Argus Research Laboratories, Inc.

報告書作成年: 1991年 [GLP対応]

検 体: フルミオキサジン原体

純 度:

試験動物: Hra: (NZW) SPF雌ウサギ (入荷時約5ヶ月齢)、1群20匹、試験開始時体重2.9~4.2 kg

試験期間: 1989年9月18日人工授精開始、1989年10月20日帝王切開終了

投与方法: 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、300、1000および3000 mg/kgの投与レベルで妊娠7日*から19日までの13日間、妊娠7日体重に基づきそれぞれ10 mL/kgの割合で1日1回強制経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

*人工授精日を妊娠0日として起算した。

[投与量設定根拠]

試験項目:

親動物; 症状、流産、早産および死亡の有無を毎日観察した。体重は妊娠0日と妊娠7~29日の毎日測定し、摂餌量は試験期間を通じて毎日測定した。

妊娠29日に屠殺し、帝王切開した。胸腔および腹腔を切開して肉眼的病変について検査し、黄体数を数えた。子宮を摘出し、着床数、早期および後期吸収胚ならびに生存および死亡胎児の数および位置を観察した。

生存胎児; 体重測定および肉眼的な外形観察を行った。その後、開腹して性別を判定し、内臓観察を行った。内臓除去後、アリザリンレッドS染色を施して骨格観察を行った。

結果: 概要を次頁の表に示した。

親動物; 投与に関連した死亡、流早産、症状および肉眼的病理所見は認められなかった。3000mg/kg群では体重増加抑制が妊娠16-20、7-19、7-11、7-12、7-18、7-21、7-22および7-23日に、摂餌量の低値が妊娠10-11、18-19、7-11、7-19、7-21および7-22日に認められた。また、黄体数、着床数、早期および後期吸収胚数ならびに生存および死亡胎児数に検体投与の影響は認められなかった。

生存胎児; 性比に検体投与の影響はなく、体重は3000mg/kg群で低値傾向にあったが統計学的に有意ではなかった。検体投与に起因する外形、内臓および骨格の異常(奇形)または変異は認められなかった。

以上の結果から、本剤を胎児器官形成期の妊娠ウサギに経口投与した場合、3000mg/kg/dayで母獣では体重増加抑制および摂餌量の低値が認められた。よって母獣に対する無毒性量は1000mg/kg/dayと考えられた。また、胎児に対しては最高用量である3000mg/kg/dayにおいても胚・胎児致死作用および催奇形作用は認められず、胎内発育にも影響しなかったことから、無毒性量は3000mg/kg/dayと考えられた。

投与群 (mg/kg/day)		対照	300	1000	3000	
1 群 当 り 動 物 数		18 ^{a)}	17 ^{b)}	18 ^{a)}	16 ^{c)}	
親 動 物	死 亡 数	0	0	0	0	
	流 産	1	0	0	0	
	早 産	1	0	0	0	
	一 般 状 態					
	体 重 増 加				低値	
	摂 餌 量				低値	
	剖 検					
	子 宮 内 所 見	検 査 親 動 物 数	16	17 ^{d)}	18	16
		平 均 黄 体 数	11.1	10.0	10.3	10.6
		着 床 率 (%) ^{e)}	81.3	73.1	80.0	90.2
平 均 生 存 胎 児 数		7.9	7.2	7.6	8.9	
死 亡 胎 児 数		0	0	0	0	
早 期 吸 収 胚 数		9	2	7	10	
後 期 吸 収 胚 数		7	2	2	1	
生 存 胎 児	体 重 (g) 雄	40.77	44.32	41.55	36.93	
	雌	40.13	44.09	40.47	36.95	
	性 比 ^{f)}	56.3	58.0	46.5	52.0	
胎 児 観 察	胎 異 常 発 現 例 数	47/127 (37.0)	37/123 (30.1)	61/137 (44.5)	55/142 (38.7)	
	奇 形 ^{g)} 発 現 例 数	2/127 (1.6)	2/123 (1.6)	5/137 (3.6)	2/142 (1.4)	
	変 異 ^{h)} 発 現 例 数	45/127 (35.4)	36/123 (29.3)	58/137 (42.3)	55/142 (38.7)	
	化 骨 進 行 度 ⁱ⁾					

空欄は特記すべき変化がないことを示す。太枠内は検体の影響であることを示す。
 有意差の検定には、Fisherの確率検定、Bartlettの検定、一元配置分散分析、Dunnettの検定、Kruskal-Wallis検定、Dunnの多重比較法、共分散分析、Kruskal-Wallisのノンパラメトリック一元配置分散分析、LeveneのF検定を用いた。

- a) : 非妊娠2例を除く。 b) : 非妊娠3例を除く。
- c) : 非妊娠4例を除く。 d) : 早期全胚吸収の親動物1例を含む。
- e) : (着床数/黄体数) × 100
- f) : (雄胎児数/生存胎児数) × 100
- g) : 外形観察では髄膜脊髄瘤、頭部ドーム状ならびに頭部小/浮腫/髄膜瘤、眼瞼開存、耳の低位置、鼻孔裂、口蓋裂、腹壁破裂および前肢欠損の合併症がみられ、内臓観察では水頭症、心臓/肺/胸腺の逸所およびねじれと肝臓の突出を伴った横隔膜ヘルニアの合併症が、骨格観察では頭頂骨大孔、尾椎不整列、胸椎の半椎、胸椎体/弓癒合、胸椎体分裂、肋骨癒合、腰椎の半椎および仙尾椎弓の解離が見られた。
- h) : 外形観察では後肢下方屈曲が、内臓観察では角膜周囲出血および肺中間葉形成不全が、骨格観察では頭骨化骨異常、大/小泉門拡大、頭頂骨小孔、舌骨翼屈曲、肋骨化骨肥厚部、胸骨核癒合、胸骨核非対称、恥骨不完全化骨/未化骨が見られた。
- i) : 舌骨、脊椎（頸椎、胸椎、腰椎、仙椎、尾椎）、肋骨、胸骨（胸骨柄、胸骨核、剣状突起）、前肢（手根骨、中手骨、指骨）および後肢（足根骨、中足骨、指骨）の骨化を指標とした。

(4) フルミオキサジン原体のラットにおける催奇形性試験 (経皮投与)

(資料 8-4)

試験機関:住友化学工業株式会社
報告書作成年:1991年 [GLP対応]

検 体 : フルミオキサジン原体
純 度 :

試験動物 : Slc:SD・雌ラット (入荷時9週齢、体重179~218g)、1群24または25匹

試験期間 : 1990年1月23日交配開始、1990年6月29日胎児検査終了

投与方法 : 検体をコーンオイルに懸濁し、30、100および300 mg/kgの投与レベルで妊娠6日^{*)}から15日までの10日間、妊娠6日体重に基づいてそれぞれ2 mL/kgの割合で毎日6時間頸背部に塗布して経皮投与した。対照群にはコーンオイルを同様に塗布した。

*) 膈垢中に精子を確認した日を妊娠0日として起算した。

[投与量設定根拠]

試験項目 :

親動物 : 症状および死亡の有無を毎日観察した。体重は妊娠0、6、9、12、15および20日に測定し、妊娠20日体重から屠殺時の妊娠子宮重量を引いた値を最終体重とした。また、妊娠6、9、12、15および20日の一日間の摂餌量を測定した。

妊娠20日に屠殺し、帝王切開した。胸腔、腹腔および骨盤腔内の異常の有無を肉眼的に検査し、黄体数を数えた。子宮は、内容物とともに重量を測定し、また着床数、生存胎児および死亡胚/胎児の数および位置を調べた。

生存胎児 : 性別判定、体重測定および口腔を含む外形観察を行った。その後、各同腹児のうち外形異常のない胎児の約1/2はアリザリンレッドS染色を施して骨格観察を行い、残りの胎児はブアン液で固定後、内臓観察を行った。

結果：概要を次頁の表に示した。

親動物；死亡は認められなかった。摂餌量には投与に関連した影響は認められなかった。妊娠後期に膈周囲の赤色物質付着が、また帝王切開時には胎児全例が死亡した親動物の子宮内に暗赤色物質貯留が300 mg/kg群で認められた。これらの所見は胎児の死亡に関連したものであると考えられた。体重増加量の低値が、妊娠15および20日に300 mg/kg群で認められた。しかし、最終体重に差がなく、妊娠子宮重量の低値が見られたことから、体重の低値は生存胎児数および胎児体重の低値に原因があり、親動物の体重そのものへの影響ではないと考えられた。子宮内所見では、30および300 mg/kgでは黄体数の低値が認められた。しかし、排卵は投与開始以前に行われたのだから、この所見は検体投与とは関係ないと考えられた。着床数に対する影響は認められなかった。胚死亡の発現頻度の高値、一腹当たりの生存胎児数の低値が300 mg/kg群で認められた。

生存胎児；雄胎児体重の低値および雌胎児体重の低値傾向が300 mg/kg群で認められた。300mg/kg群で性比が高値であったが、胎児に対して本試験と同様の影響が認められた経口投与による催奇形性試験では、性比に対する影響がなかったことから、この変化は突発的に発現したものと考えられた。外形異常は認められなかった。心室中隔欠損、右奇静脈遺残および過剰冠状動脈口を主とする心脈管系の異常を有する胎児の発生頻度が300 mg/kg群で高値であった。100 mg/kgの用量でも高値傾向であったが、発生頻度はほぼバックグラウンドデータの範囲（0～7.6%）内であり、対照群と有意な差はなく、偶発的な発現と考えられた。骨格観察では波状肋骨の発生頻度の高値が300mg/kg群で認められた。14肋骨の発現頻度が投与群で低値であったが、これは対照群の値が比較的高値であったためで、検体投与とは関連がないと考えられた。また、肩甲骨および尺骨の彎曲の発現頻度は統計学的に高値ではなく、検体投与に関連した変化であるか否かは明らかではなかった。さらに、胎児体重の低値に関連していると考えられた仙尾椎体化骨数の減少が300 mg/kg群で認められた。

以上の結果から、本剤を胎児器官形成期の妊娠ラットに経皮投与したところ、母獣において検体投与に関連した影響は認められなかった。胎児に対して、300mg/kgの投与により、死亡の増加、心室中隔欠損や波状肋骨を主とする形態異常、ならびに胎児体重低下や化骨遅延を誘発したことから、胚致死作用、催奇形作用ならびに発育抑制作用が認められた。従って、母獣に対する無毒性量は300mg/kgを上回る量、胎児に対する無毒性量は100mg/kgと考えられた。

申請者注：フルミオキサジンの最高投与量群で認められた心室中隔欠損について
ラットの胎児に認められた心室中隔欠損は、その発現メカニズムを検討した試験（資料8-7）
で示された通り、胎児貧血によって惹起された室間孔閉鎖の遅延によるものであると考えられた。

投与群 (mg/kg/day)		対照	30	100	300
1 群当り動物数		24	24	24	25
親動物	検査親動物数 ^{a)}	23	22	22	22
	一般症状				
	膈周囲赤色物質付着	1	0	2	4 ^{b)}
	死亡数	0	0	0	0
	体重増加		低値		低値 ^{c)}
	最終体重 ^{c)}				
	妊娠子宮重量				低値 ^{d)}
	摂餌量				
	剖検：子宮内暗赤色物質	0	0	0	9 ^{b)}
	子宮内所見	平均黄体数	15.3	▽14.3	15.0
平均着床数		14.4	13.0	14.2	13.6
胎児死亡率(%)		6.0	5.6	6.4	40.7 **
平均生存胎児数		13.6	12.2	13.3	▼8.1

空欄は特記すべき変化がないことを示す。太枠内は検体の影響であることを示す。
 有意差の検定はWilcoxon順位和検定 (** : P<0.01) または t 検定 (▽ : P<0.05、▼ : P<0.01) を行った。

- a) : 投与部位の創傷あるいは鼻の腫脹のため動物を除外した。
- b) : 胎児の死亡に関連した所見と考えられた。
- c) : 妊娠20日体重から屠殺時の妊娠子宮重量を引いた値。
- d) : 最終体重に差が認められないことから、生存胎児数および胎児体重の低値に起因するものであり、親動物の体重そのものへの影響とは考えられない。

投与群 (mg/kg/day)		対照	30	100	300
生	体重 (g) 雄	3.38	▲3.51	3.43	▽3.10
	雌	3.24	3.33	3.24	3.04
	性比 ^{e)}	50	45	52	62 **
	外形奇形	0/312	0/269	0/293	0/178
	内臓奇形 ^{f)}	1/153	1/133	2/144	13/88
	心室中隔欠損 (%)	1 (0.7)	1 (0.8)	2 (1.4)	13 (14.8) **
	内臓軽度異常 ^{g)}	2/153	1/133	2/144	3/88
存	内臓変異 ^{h)}	18/153	12/133	16/144	14/88
胎	過剰冠状動脈口 (%)	0	1 (0.8)	2 (1.4)	5 (5.7) *
	右奇静脈遺残 (%)	1 (0.7)	0	2 (1.4)	8 (9.1) **
	心脈管系の異常 ⁱ⁾ (%)	5 (3.3)	4 (3.0)	10 (6.9)	19 (21.6) **
児	骨格奇形	0/159	0/136	0/149	2 ^{j)} /90
	骨格軽度異常 ^{k)}	0/159	0/136	2/149	19/90
	波状肋骨 (%)	0	0	2 (1.3)	18 (20.0) **
	骨格変異 ^{l)}	16/159	10/136	6/149	2/90
	14肋骨 (%)	14 (8.8)	4 (2.9)	3 (2.0) *	0 (0.0) **
	化骨進行度 ^{m)} 雄	8.8	9.0	8.9	8.5
	雌	8.7	8.8	8.6	▽8.4

空欄は特記すべき変化がないことを示す。太枠内は検体の影響であることを示す。

有意差の検定はWilcoxon順位和検定 (* : P<0.05, ** : P<0.01) または t 検定 (▽ : P<0.05, ▲ : P<0.01) を行った。

e) : (雄胎児数 / 生存胎児数) × 100

f) : 心室中隔欠損、右大動脈弓

g) : 腎乳頭欠損、肺動脈分岐異常

h) : 胸腺頸部遺残、過剰冠状動脈口、左臍動脈遺残、右奇静脈遺残、副脾、尿管拡張、尿管蛇行がみられた。

i) : 内臓奇形、軽度異常および変異のうち心脈管系の異常を集計した。心室中隔欠損、右大動脈弓、肺動脈分岐異常、左臍動脈遺残、右奇静脈遺残および過剰冠状動脈口を含む。

j) : 肩甲骨弯曲、尺骨弯曲

k) : 波状肋骨、肋骨形成不全、胸骨核癒合がみられた。

l) : 13肋骨短小、14肋骨、頸肋、胸椎体分離、仙椎前椎骨数25がみられた。

m) : 仙尾椎体化骨数

(5) フルミオキサジン原体のラットにおける発生毒性の臨界期検索試験

(資料8-5)

試験機関：住友化学工業株式会社
報告書作成年：1993年

検 体：フルミオキサジン原体
純 度：

試験動物：Crj:CD・雌ラット（入荷時8週齢、体重164～199 g）
各群5匹（ただし妊娠15日投与群は4匹）

試験期間：1991年12月2日交配開始、1992年5月8日胎児観察終了

試験目的：フルミオキサジン原体をラットに投与すると、胚/胎児死亡、心室中隔欠損等の心脈系異常等の発生毒性が認められる（資料8-2、8-4）が、それらの毒性は妊娠11日から15日の期間中どの時期に投与した場合に最も強く発現するか（臨界期）を調べ、本剤の発生毒性の作用機序解明の一助とした。
尚、発生毒性の指標として、胚死亡率、心室中隔欠損発現率および胎児体重を設定した。

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、ラットに400 mg/kgの投与レベルで妊娠11日^{*}、12日、13日、14日および15日のいずれか1日のみ単回強制経口投与した。
^{*} 膈栓を確認した日を妊娠0日として起算した。

投与量および投与日設定根拠：

試験項目：

親動物（帝王切開所見）；妊娠20日に屠殺し、帝王切開した。胸腔、腹腔および骨盤腔内の異常の有無を肉眼的に検査し、黄体数を数えた。子宮は着床数、生存胎児および死亡胚/胎児の数および位置を調べた。

生存胎児；性別判定、体重測定および口腔を含む外形観察を行った。ブアン液で固定後、心室中隔欠損の有無を観察した。

結果：概要を次頁の表に示した。

親動物（帝王切開所見）；死亡あるいは肉眼的異常病理所見は認められなかった。胚死亡の発現率が最も高かったのは妊娠12日投与群であった。

生存胎児；胎児体重が最も低値であったのは妊娠12日投与群であった。また、心室中隔欠損の発現率が最も高かったのも妊娠12日投与群であった。

以上の結果から、フルミオキサジン原体（投与量：400 mg/kg）をラットに妊娠11日から15日のいずれかの日に単回強制経口投与すると心室中隔欠損、胚死亡および低胎児体重が誘発されるが、それらが発現する最も感受性の高い時期（臨界期）は妊娠12日であった。

投与日の妊娠日数		11日	12日	13日	14日	15日	
1群当り動物数		5	5	5	5	4	
親	死亡数	0	0	0	0	0	
	剖検						
動物	子宮内所見	平均黄体数	16.0	15.8	14.4	18.6	16.5
		平均着床数	14.8	14.2	12.4	14.2	12.0
		胎児死亡数(%) ^{a)}	2 (2.7)	28 (39.4)	10 (16.1)	7 (9.9)	3 (6.3)
		平均生存胎児数	14.4	8.6	10.4	12.8	11.3
生存胎児	体重(g)	雄	3.34	3.23	3.73	3.59	3.67
		雌	3.22	2.95	3.49	3.14	3.46
	性比 ^{b)}	51	35	54	59	62	
	外形奇形	1 ^{c)} /72	0/43	0/52	0/64	0/45	
	心室中隔欠損(%)	5/72 (6.9)	6/43 (14.0)	3/52 (5.8)	3/64 (4.7)	1/45 (2.2)	

空欄は特記すべき変化がないことを示す。

a) : (胎児死亡数/着床数) × 100

b) : (雄胎児数/生存胎児数) × 100

c) : 浮腫および曲尾

(6) フルミオキサジン原体のラットおよびウサギ胚における発生毒性の病理組織学的検査

(資料8-6)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1997年

検 体：フルミオキサジン原体

純 度：

試験動物：Crj:CD 雌ラット (11~14週齢)

JW-NIBS 雌ウサギ (6ヶ月齢)

試験目的：フルミオキサジンの発生毒性のメカニズム解明研究の一環として本試験を行った。ラットにおいてフルミオキサジンの胚致死作用、心室中隔欠損および胎児体重の低下が同時に顕著に認められる時期は妊娠12日である。胎児の心臓への直接的な作用によって心室中隔欠損を誘発する薬剤では、妊娠12日までに投与すると発現頻度が高くなり (Wilson et al., 1953, Okamoto et al., 1968, Taleporos et al., 1978, Miyagawa et al., 1988)、妊娠12日の投与では遅すぎる。よって、フルミオキサジンによる心室中隔欠損は心臓への直接的な作用ではなく、心臓血流動態の異常によって心臓の中隔に癒合不全が起こった結果と考えられた。試験では、胚を光学および電子顕微鏡で組織学的に検査することによって、フルミオキサジンの発生毒性が胚への直接的作用によるものか、間接的作用によるものか検討した。

投与方法：検体は0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、妊娠12日*)に1000mg/kgの投与量で単回経口投与した。

*) 膣栓を確認した日または人工授精日を妊娠0日とした。

投与量および投与日設定根拠：

検査項目：

外形検査：ラットは投与の6、12、24、36および48時間後に頸椎脱臼によって、ウサギは6、24および48時間後にペントバルビタールナトリウムを静脈内投与して屠殺した。胚は、胎盤とともに摘出し、実体顕微鏡を用いた外形検査に供した。外形異常の有無ならびに生存および死亡胚数を観察した。

臍帯血液塗抹標本検査：外形検査時に臍帯動脈から胚血液を採取した。血液はスライドガラス

ス上に塗抹し、細胞内の鉄分の検出のため、ベルリンブルー染色を施した。

光学顕微鏡検査：外形検査後、直ちに胚をリン酸緩衝 10%ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作製して、ヘマトキシリン・エオジンあるいはベルリンブルーで染色後光学顕微鏡で検査した。

電子顕微鏡検査：各群 2~5 例の胚の心臓と肝臓をアルデヒド混液で固定し、電子顕微鏡検査に供した。

結 果：

外形検査：ラットおよびウサギの胚死亡率を以下に示す。ラット、ウサギともに、いずれの検査時にも外形異常は認められなかった。

投与後の 経過時間	ラット		ウサギ	
	対照群	1000 mg/kg 群	対照群	1000 mg/kg 群
6 時間	0/15	0/29	0/17	0/17
12 時間	0/26	0/48	NE	NE
24 時間	0/46	0/64	0/19	0/18
36 時間	0/26	1/65	NE	NE
48 時間	0/45	41/44	0/16	0/21

表中の数値は（死亡胚数／検査胚数）を示す。

NE：検査せず

臍帯血液塗抹標本検査：ラットでのベルリンブルー染色標本の検査結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)		投与後の経過時間				
		6	12	24	36	48
0	検査胚数	3	7	15	5	15
	ベルリンブルー染色					
	(-)	3	5	2	0	0
	(+)	0	2	13	5	15
	(++)	0	0	0	0	0
	(+++)	0	0	0	0	0
1000	検査胚数	10	12	10	10	NE
	ベルリンブルー染色					
	(-)	10	1	0	0	NE
	(+)	0	1	0	0	
	(++)	0	10	0	0	
(+++)	0	0	10	10		

- (-) : 陰性
- (+) : 少数の陽性顆粒が細胞質中に散在
- (++) : 多数の微細陽性顆粒が核周囲部に偏在
- (+++): 陽性顆粒の塊状沈着
- NE : 検査せず

対照群では、ほとんどの赤血球が大型で、有核であった。また、ベルリンブルー染色は鉄を染色するが、赤芽球内のベルリンブルー陽性顆粒は、細胞質中に散在して観察された。投与群では、12時間後の赤芽球に多数の微細な陽性顆粒が核周囲部の細胞質に偏在して認められ、24時間後にはほとんどの赤芽球で陽性顆粒が増加し、塊状の沈着を形成していたことから、鉄が蓄積しているものと考えられた。

ウサギでは投与に関連した変化は認められなかった。

光学顕微鏡検査：ラットの投与群で認められた所見を次表に示す。対照群では異常は認められなかった。

所見	投与後の経過時間				
	6	12	24	36	48
検査胚数	6	4	9	15	2
血液：赤芽球変性		4	9	15	2
赤血球貪食		0	9	15	2
心臓：心室壁菲薄化		0	0	12	2
筋性中隔菲薄化		0	0	3	2
房室管心臓内隆起低形成		0	0	4	2
末梢血管：拡張		0	8	11	2
肝臓：類洞血管拡張		0	1	11	1
肝細胞壊死		0	0	0	2
腹側胸壁：菲薄化		0	0	0	2

最初にみられた病理組織学的変化は赤芽球の変性で、それに続いて胚の心臓と肝臓に変化が認められた。

12 時間後に変形核を有する赤芽球が最初に認められ、24 時間後には核濃縮が認められた。これらの変性赤芽球は、主に肝臓の類洞血管中でマクロファージによって貪食された。心臓の変化は 36 時間後に心室壁および筋性中隔の菲薄化、房室管心臓内隆起低形成がみられ、その他の脈管系異常として末梢血管拡張が 24 時間後から認められた。肝臓では 24 時間後から類洞血管拡張がみられ、48 時間後には肝細胞の壊死も発現した。

ウサギでは胚のいかなる組織にも、投与に関連した変化は認められなかった。

電子顕微鏡検査：ラット投与群で認められた所見を次表に示す。

所見	投与後の検査時間				
	6	12	24	36	48
血球（赤芽球）：					
ミトコンドリア内鉄沈着	+	+++	+++	+++	+++
ミトコンドリア拡張	+	++	++	+	+
核濃縮／核外膜拡張	-	+	++	+	+
水腫性（融解性）変化	-	+	++	++	+
赤芽球食食	-	+	++	++	++
肝臓：					
ミトコンドリア膨化	-	-	++	++	++

- *：多染性赤芽球に認められた。
- ：いずれの細胞にも認められなかった。
- +
- ++：多数の細胞に認められた。

6 時間後から赤芽球のミトコンドリア内に鉄の沈着がみられ、ミトコンドリアの拡張も認められた。12 時間後には水腫性変化など赤芽球の変性も起こり、主に肝臓の類洞血管中でマクロファージによって食食された。

肝臓では 24 時間後から肝細胞のミトコンドリア膨化が認められた。

心臓では投与に関連した心筋細胞の変化は認められなかった。

ウサギでは胚のいかなる組織にも、投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果から、投与に関連した組織学的変化はラットの胚にのみ認められた。最初にみられた変化は、赤芽球のミトコンドリア内の鉄沈着およびミトコンドリアの拡張で、臍帯血液塗抹標本においても赤芽球に鉄の蓄積が確認された。ポリフィリン合成能の低下によって、赤芽球では、通常はヘム合成時にポリフィリンと結合するはずの鉄の蓄積がおこる。また、ヘム合成はミトコンドリア内でおこなわれる。したがって、赤芽球でみられた鉄の蓄積は、妊娠ラットへの検体の投与により、胚でのポリフィリン生合成が阻害されたことを示していると思われる。また、拡張したミトコンドリアには鉄の蓄積がみられたことから、ミトコンドリアの拡張もヘム合成の抑制に関連したものと考えられた。

次に赤芽球の変性が認められ、変性した赤芽球は主に肝臓の類洞血管中でマクロファージによって食食された。胚の造血部位である卵黄嚢における造血の特性として、ほとんどの赤血球細胞は同期化して成熟し、ほぼ同じ状態にあることから (Tavassoli, 1991)、フルミオキサジンに暴露された胚ではほとんどの赤血球が同時に失われ、重篤な貧血が起こったと考えられる。

赤芽球の変化に遅れて、心臓に心室壁の菲薄化などの変化、および肝臓に類洞血管拡張が

発現した。貧血性低酸素症に対する代償性反応として、心臓での一回拍出量の増加および抹消血管の拡張が発現することが知られている (Varat et al, 1972)。従って、心室の拡張を示すと思われる心室壁の菲薄化および肝臓の類洞血管を含む末梢血管の拡張は、胚の貧血に対する代償性反応と考えられる。よって、心臓および肝臓でみられた組織学的変化は、胚の貧血による二次的な症状と考えられる。

以上のことから、フルミオキサジンはラット胚においてプロトポルフィリン合成を阻害し、正常なヘム合成が抑制された結果、胚に貧血が生じ、さらに貧血の代償性反応として、拍出量が増加して心臓に変化が生じたものと考えられた。しかしながら、心筋細胞に障害はなかった。ラットにおいて出生前の低酸素状態が心室中隔欠損を含む心脈管系異常を誘発することが知られている (Haring, 1965, Clemmer et al., 1966)。これらのことから、フルミオキサジンによってラット胚に惹起される心室中隔欠損は、心臓への直接的な障害性の作用によるものではなく、ヘム合成阻害によって胚に起こった貧血が、心臓の歪みや異常な血液動態をもたらすことで生じたものと考えられた。

(7) フルミオキサジン原体のラットにおける発生毒性の発現メカニズム検討試験

(資料8-7)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1997年

検 体：フルミオキサジン原体

純 度：

試験動物：Crj:CD 雌ラット (11~13週齢)

試験目的：ラット催奇形性試験において認められた胚致死作用、催奇形性作用（主に心室中隔欠損と波状肋骨）および発育遅延作用の誘発メカニズムを解明するための研究の一環として実施した。

先に行った試験で、胚へのプロトポルフィリン IX 蓄積が発生毒性と関連していることが示され、その結果、発生毒性とヘム合成酵素であるプロトポルフィリンノーゲン酸化酵素 (PPO) 阻害との関連が示されたが、本試験では、ラットの胚および胎児のさまざまな発生段階における個体発生と異常の病因について検討するため、本剤を妊娠 12 日にラットに投与して、妊娠 13 日から 20 日の胚/胎児について心臓肥大、浮腫、心室間孔閉鎖および波状肋骨を観察するとともに、赤血球数、ヘモグロビン濃度および血清蛋白濃度を測定した。

投与方法：検体は 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、妊娠 12 日^{*)}に 400mg/kg の投与量で単回経口投与した。

*) 膣栓を確認した日を妊娠 0 日とした。

投与量および投与日設定根拠：

検査項目：

外形観察：妊娠 13、14、15、16、17 および 20 日に、頸椎脱臼によりラットを屠殺した。子宮を摘出し、着床数と生存胎児数を数えて胚・胎児死亡率（ $(\text{着床数} - \text{生存胎児数}) / \text{着床数} \times 100$ ）を算出した。生存胎児について、実体顕微鏡を用いて心臓肥大および全身浮腫についての外形観察を行い、それぞれの発現頻度（ $\text{発現胎児数} / \text{生存胎児数} \times 100$ ）を算出した。

心室間孔の観察：妊娠 14、15、16、17 および 20 日に摘出した同腹児のおよそ半分について、臍帯動脈から生理食塩水を注入して血液と入れ替え、次いで 1%グルタルアルデヒドと 2%ホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液を注入して固定した。胎児の心臓を切開し心室壁を摘出して解剖顕微鏡下で心室間孔の有無を検査した。

血液学および血液生化学的検査：心室間孔の観察を行わなかった同腹児の臍帯動脈から

胎児の血液を採取し、分析に必要な量になるよう腹ごとにプールして以下の項目について検査した。

赤血球数、ヘモグロビン濃度、血清蛋白濃度

肋骨の検査：胎児は採血後、アルコールで固定した。妊娠 15、16、17 および 20 日の胎児の骨と軟骨をアルザリンレッド S とアルシアンブルーで染色した。

結果：結果の概要を付表に示す。

妊娠 14 日までは、投与群と対照群の胚／胎児死亡率に差はみられず、妊娠 15 日に増加したが、妊娠 15 日から 20 日の間に死亡率の増加は認められなかった。よって、投与による胎児の死亡は妊娠 15 日（投与後 72 時間）までに発現し、それまでに死亡しなかった胎児は妊娠末期まで生存すると考えられた。

外形検査では、心臓肥大の発現のピークは妊娠 14 および 15 日であったが、妊娠 16 日には胸壁の発育が進み厚く不透明になるため、心臓が明確には観察できなかった。浮腫は妊娠 14 日に観察されはじめ、発現のピークは妊娠 15 および 16 日であった。

心室間孔の観察では、心室間孔の閉鎖が対照群では妊娠 16 日に、投与群では妊娠 17 日に始まったが、投与群でその割合は低く、妊娠 20 日においても約半数であった。

血液学および血液生化学的検査では、妊娠 13 日から 16 日にヘモグロビン濃度と赤血球数に顕著な低値が認められた。血清蛋白は妊娠 15 および 16 日に顕著に低下した。

肋骨の観察では妊娠 17 日に化骨遅延が認められ、妊娠 20 日には波状肋骨および他の異常が発現した。

以上の結果から、本試験において最も初期に現れた影響は、妊娠 13 日から顕著に減少した赤血球数およびヘモグロビン濃度であった。ラット胚の造血部位である卵黄嚢で、ヘモグロビン生合成が最も活発な時期は妊娠 12 日と推察される。卵黄嚢造血では赤血球が同期化して成熟するため、ほとんどの赤血球が同じ状態にあることが知られている (Tavassoli, 1991)。したがって、妊娠 13 日から赤血球数およびヘモグロビン濃度が顕著に減少したのは、妊娠 12 日のフルミオキサジン投与により、多くの赤血球が一度に損傷を受けたためと考えられた。その後、造血部位は肝臓に移動するので、今回の試験で赤血球数とヘモグロビン濃度が妊娠 17 日に回復したのは、肝臓からの赤血球の供給によるものと思われる。

妊娠 14 日から発現した心臓肥大は、貧血性低酸素症に対する代償反応として、心臓での拍出量が増加することが知られているため (Varat et al., 1972)、ヘモグロビン濃度と赤血球数の減少に対する代償性の反応と思われた。また、妊娠 14 日以降に心臓が肥大するため、必然的に中隔部が融合できず、心室中隔の形成不全が生じるものと考えられ、このため通常は妊娠 15 日から 16 日の間に起こる心室間孔の閉鎖が十分に起こらないものと思われた。

貧血により肝臓が酸素欠乏障害を被ると、血清蛋白が減少することおよび血液状態の極端な変化は浮腫を伴うことが知られている (Craig, 1989)。本試験でも妊娠 14 日から浮腫が発現し、

妊娠 15 日以降には血清蛋白が減少した。ヘモグロビン濃度および赤血球数の減少は妊娠 13 日からみられ、血清蛋白の減少妊娠 15 日からみられており、その発現には時間的なずれがあったが、これは血清蛋白の減少が肝機能の低下後に生じるためと思われた。

また循環障害によって胎児の血清蛋白が減少すると、妊娠 17～20 日に骨芽細胞の発育遅延と胎児の血清アルカリ性ホスファターゼの低下が生じるという報告がある (Kast, 1994)。したがって、フルミオキサジン投与によって妊娠 17 日以降発現した肋骨の異常は、主に血清蛋白の減少によるものと考えられた。

これらのことから、胎児死亡に先立ち発現する貧血、心臓肥大および浮腫が胎児死亡と関連しているものと考えられた。また、心室間孔閉鎖前に誘発される心臓肥大が心室間孔閉鎖不全の発生に関連していると思われた。

付表

検査項目		妊娠期間 (日)						
		13	14	15	16	17	20	
外形検査	生存胚数 /着床数 (胚・胎児 死亡率 (%))	対照群	98/108 (9.3)	119/125 (4.8)	114/130 (12.3)	111/119 (6.7)	114/122 (6.6)	99/111 (10.8)
		投与群	125/133 (6.0)	220/238 (7.6)	127/225 (43.6)	97/270 (64.1)	159/248 (35.9)	149/243 (38.7)
	心臓肥大 (%)	対照群	0/98 (0.0)	0/119 (0.0)	0/114 (0.0)	0/111 (0.0)	0/114 (0.0)	0/99 (0.0)
		投与群	0/125 (0.0)	139/220 (63.2)	83/127 (65.4)	29/97 (29.9)	2/159 (1.3)	0/149 (0.0)
	浮腫 (%)	対照群	0/98 (0.0)	0/119 (0.0)	0/114 (0.0)	0/111 (0.0)	0/114 (0.0)	0/99 (0.0)
		投与群	0/125 (0.0)	32/220 (14.5)	62/127 (48.8)	40/97 (41.2)	9/159 (5.7)	1/149 (0.7)
心室間孔閉鎖 (%)	対照群	NE	NE	0/56 (0.0)	40/55 (72.7)	52/58 (89.7)	40/42 (95.2)	
	投与群	NE	NE	0/66 (0.0)	0/43 (0.0)	21/88 (23.9)	45/78 (57.7)	
血液検査	赤血球数 ($10^6/\mu\text{l}$)	対照群	0.36	0.66	0.64	0.83	1.44	2.24
		投与群	0.19	0.25	0.29	0.38	1.06	2.16
	ヘモグロビン 濃度 (g/dl)	対照群	2.6	5.2	5.8	6.6	6.7	10.9
		投与群	1.9	2.2	2.5	2.9	6.5	10.4
	血清蛋白濃 度 (g/dl)	対照群	0.39	0.25	0.33	0.73	1.07	1.57
		投与群	0.41	0.24	0.15	0.39	0.89	1.36
骨格検査	波状肋骨 (%)	NE	NE	0	0	0	17/71 (23.9)	
	肋骨化骨遅延 (%)	NE	NE	0	0	4/71 (5.6)	0	
	肋骨軟骨化不全 (%)	NE	NE	0	1/54 (1.9)	0	0	
	肩甲骨彎曲 (%)	NE	NE	0	0	0	6/71 (8.5)	
	橈骨彎曲 (%)	NE	NE	0	0	0	1/71 (1.4)	
	尺骨彎曲 (%)	NE	NE	0	0	0	1/71 (1.4)	

骨格検査の結果は投与群についてのみ示す。対照群には異常は認められなかった。
NE：検査しなかった。

(8) フルミオキサジン原体のラット、ウサギ胚におけるプロトポルフィリン IX の蓄積性

試験 1 (ラット、ウサギ胚におけるプロトポルフィリン IX 蓄積性の種差について)

(資料 8-8)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1996 年

検 体：フルミオキサジン原体

純 度：

試験動物：Crl:CD 雌ラット (11 週齢)

JW-NIBS 雌ウサギ (9 ヶ月齢)

試験目的：本剤により誘発される発生毒性の発現機序を解明するための一連の研究を進めるにあたり、本剤の除草活性の作用機序と標的酵素に注目した。本剤はポルフィリン合成酵素の一つであるプロトポルフィリノーゲン酸化酵素 (PPO) を阻害し、プロトポルフィリン IX (PPIX) を植物細胞内に蓄積させる。ポルフィリン合成経路はヘムおよびクロフィル合成経路の主要部分を構成し動植物に共通している。本剤がミトコンドリアにあるヘム合成経路中の PPO を阻害し、発生毒性を惹起している可能性を検討することとした。

PPIX は PPO の基質ではなく生成物である。PPO の阻害の結果、生成物である PPIX が蓄積する機序は次のように推定されている。ミトコンドリア内膜に存在している PPO が阻害されることにより基質であるプロトポルフィリノーゲンの酸化がおこらなくなる。蓄積したプロトポルフィリノーゲンはミトコンドリアから離脱して細胞質に移動し、細胞質中で非酵素的に酸化される。細胞内で正常な局在をしていないことから、生成された PPIX はミトコンドリア内膜にあるフェロキラーテースに到達できず鉄ポルフィリン(すなわちヘム)にもはや変換され得ないため PPIX が蓄積する。

本試験ではラットおよびウサギの胚ならびに肝臓について、PPO 阻害の結果おきる PPIX の蓄積を観察し、PPO 阻害と発生毒性の相関性を検討した。

投与方法：検体を 0.5%メチルセルローズ水溶液に懸濁し、妊娠 12 日*¹のラットおよびウサギに 1000mg/kg の投与量で単回経口投与した。

*¹ 膈栓を確認した日または人工授精日を妊娠 0 日とした。

投与量および投与日設定根拠：

検査項目：

組織内 PPIX 測定：ラットは投与の 2、6、12、18 および 24 時間後に頸椎脱臼により屠殺し、ウサギは 2、6、12、24 および 48 時間後に耳静脈からペントバルビタールナトリウムを静脈内投与して屠殺した。一腹当たり 3 つの胚を子宮から摘出して同腹毎にプールした。胚から Matsumoto and Duke 変法によって PPIX を抽出した。抽出物は蛍光分光光度計を接続した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システムを使って分析した。また、母獣から肝臓の一部 (0.2-0.4g) を摘出し、母獣肝臓中 PPIX を抽出して胚の場合と同様の方法で測定した。

結果：胚組織 1g 当たりの PPIX 量 ($\mu\text{g/g tissue}$) の平均値を次表に示す。

	投与後の経過時間						
	0	2	6	12	18	24	48
ラット	0.147	2.831 (19.3)	10.806 (73.5)	19.080 (129.8)	5.061 (34.4)	2.739 (18.6)	NE
ウサギ	ND	0.092*	0.104*	0.110	NE	0.061*	ND

() 内の数値は投与前値 (0 時) に対する変動倍率を示す。

NE：測定せず。

ND：測定限界以下。

*：測定限界以下の 1 検体を除く。

胚における PPIX 蓄積には著しい種差があった。ラット胚では検体投与後 2 時間ですでに PPIX 蓄積が認められた。ラット胚における PPIX 濃度は経時的に高くなり、投与 12 時間後に最高値になった。その後、濃度は急速に低下し、24 時間後には投与 2 時間後の測定値と同等となった。ラット胚とは対照的に、ウサギ胚の PPIX 濃度は測定した全時間において非常に低かった。

次表に母獣肝臓 1g 当たりの PPIX 量 ($\mu\text{g/g tissue}$) の平均値を示す。

	投与後の経過時間						
	0	2	6	12	18	24	48
ラット	0.111	1.078 (9.7)	1.383 (12.5)	1.259 (11.3)	0.359 (3.2)	0.358 (3.2)	NE
ウサギ	0.054	0.183 (3.4)	0.114 (2.1)	0.223 (4.1)	NE	0.160 (3.0)	0.079 (1.5)

() 内の数値は投与前の値 (0 時) に対する変動倍率を示す。

NE: 測定せず

ラット母獣肝臓でも明らかな PPIX 蓄積が認められたが、投与 2 から 12 時間後の濃度はほぼ一定であった。胚の場合とは違って、母獣肝臓では PPIX 濃度の鋭いピークは無く、濃度は胚組織の約 1/15 から 1/20 であった。ウサギ母獣肝臓では、投与 2 から 24 時間後の濃度は投与前値より数倍高かったものの、明らかな PPIX 蓄積は認められなかった。従って、フルミオキサジンに対する母獣肝臓の反応は、PPIX 蓄積に関しては胚と同様であった。

以上の結果から、妊娠 12 日のラットおよびウサギに対するフルミオキサジン投与は、ラット胚において PPIX の種特異的な蓄積を引き起こしたが、ウサギ胚の PPIX 濃度には影響しなかった。また、成獣肝臓での PPIX 蓄積の種差は胚で認められた種差と同様であった。PPIX 蓄積の種差はフルミオキサジンによる発生毒性の種差と一致することから、PPO 阻害あるいは PPIX 蓄積がこの毒性の原因である可能性が考えられた。

(9) フルミオキサジン原体のラット、ウサギ胚におけるプロトポルフィリン IX の蓄積性

試験 2 (ラット、ウサギ胚におけるプロトポルフィリン IX 蓄積の臨界期について)

(資料 8-9)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1997 年

検 体：フルミオキサジン原体

純 度：

試験動物：Crj:CD 雌ラット (11-13 週齢)

JW-NIBS 雌ウサギ (5 ヶ月齢)

試験目的：フルミオキサジンの発生毒性のメカニズム解明研究の一環として、先の試験でプロトポルフィリンノーゲン酸化酵素 (PPO) 阻害により起こるプロトポルフィリン IX (PPIX) 蓄積と発生毒性に対する感受性との間の関連性を検討した。

本試験は、ラットでの PPIX 蓄積の臨界期検索に加え、ウサギにおいては発生期のどの段階においても PPIX 蓄積が認められないことを確認するために行った。

投与方法：検体は 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、妊娠 10 日*から 15 日のいずれかの 19:30 頃に、ラットには 0 および 400mg/kg、ウサギには 1000mg/kg の投与量で単回経口投与した。

*) 膣栓を確認した日または人工授精日を妊娠 0 日とした。

投与量設定根拠：

検査項目：

組織中 PPIX 測定：ラットおよびウサギは投与 14 時間後 (PPIX 蓄積のピークにほぼ近い) にそれぞれ頸椎脱臼およびペントバルビタールナトリウムの静注により屠殺した。一腹当たり 3 つの胚を子宮から摘出して同腹毎にプールした。胚のプールから Matsumoto and Duke 変法によって PPIX を抽出した。抽出物は蛍光分光光度計を接続した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システムを使って分析した。また、母獣から肝臓の一部 (0.16-0.4g) を摘出し、母獣肝臓中 PPIX を抽出して胚の場合と同様の方法で測定した。

結果：ラット胚の湿重量 (mg) の平均値を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	投与日の妊娠日数					
	10	11	12	13	14	15
対照	3.9	19.0	64.7	140.6	257.3	429.0
400	4.0 (103)	20.2 (106)	56.8 (88)	123.3 (88)	240.5 (93)	386.7 (90)

() 内の数値は対照群 (0mg/kg) の平均値に対する変動率 (%) を示す。

妊娠 10 日または 11 日に投与し 14 時間後に測定したラットの胚の湿重量は、対照群と差がなかったが、妊娠 12、13、14 あるいは 15 日に投与し 14 時間後に測定した場合は、対照群よりやや低い値であった。しかし、先の研究では妊娠 12 日に 1000mg/kg 投与しても、14 時間後の胚湿重量に影響はなかった (対照：60.1mg、1000 mg/kg 投与：61.1 mg)。よって、これらの湿重量のわずかな低下は、投与 14 時間後の発育への影響を示しているとは考えられなかった。

ウサギ胚の湿重量は、いずれの妊娠日 (妊娠 10~15 日) においても対照群との差はなかった。

ラット胚組織 1g 当たりの PPIX 量 ($\mu\text{g/g tissue}$) の平均値を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	投与日の妊娠日数					
	10	11	12	13	14	15
対照	0.183	0.148	0.104	0.055	0.075	0.095
400	3.335 (18.2)	10.214 (69.0)	8.701 (83.7)	0.610 (11.1)	0.648 (8.6)	1.853 (19.5)

() 内の数値は対照群 (0mg/kg) の平均値に対する変動倍率を示す。

対照群と投与群間で、ラット胚中の PPIX 蓄積量に明らかな差が見られた。特に、妊娠 11 日および 12 日の PPIX 量は、対照群に対する変動率でも、絶対量で

もピークに達した。従って、妊娠 11 日および 12 日に投与した場合にラット胚に PPIX が最も蓄積しやすいと考えられる。

ラット母獣肝臓組織 1g中のPPIX量 ($\mu\text{g/g tissue}$) の平均値を次表に示す。今回の投与量では母獣肝臓中のPPIX量は増加しなかった。

投与量 (mg/kg)	投与日の妊娠日数					
	10	11	12	13	14	15
対照	0.555	0.317	0.297	0.309	0.261	0.230
400	0.245 (0.4)	0.364 (1.1)	0.359 (1.2)	0.220 (0.7)	0.287 (1.1)	0.275 (1.2)

() 内の数値は対照群 (0mg/kg) の平均値に対する変動倍率を示す。

ウサギ胚および肝臓組織 1g当たりのPPIX量 ($\mu\text{g/g tissue}$) の平均値を次表に示す。ウサギの胚および母獣肝臓中にはPPIX蓄積が殆ど見られなかった。

	投与日の妊娠日数					
	10	11	12	13	14	15
胚	ND	0.060*	ND	0.047*	0.045*	0.077
母獣肝臓	0.080	0.256	0.175*	0.137	0.121*	0.109*

ND : 測定限界以下

* : 測定限界以下であった検体を除く。

妊娠 10-15 日のいずれかの日の 19:30 にフルミオキサジン 400mg/kg を単回経口投与し、ラット胚中の PPIX 蓄積の臨界期を調べた結果、妊娠 11 日および 12 日の 19:30 に投与した場合に PPIX が最も蓄積した。

PPIX 蓄積が誘発される臨界期は、ラット胚に発生毒性が誘発される臨界期とよく一致している。この関係は、PPO 阻害とその結果起こる PPIX 蓄積がフルミオキサジン投与により起こる発生毒性に作用的に関連していることを示唆している。

ウサギには検体投与による発生毒性は認められておらず、ウサギで PPIX 蓄積が起こらないことは、PPO 阻害、PPIX 蓄積および発生毒性が互いに関連していることを更に裏付けている。

(10) フルミオキサジン原体のラットおよびウサギ組織中のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害試験 (PPO阻害試験1)

(資料8-10)

試験機関: SRI International

報告書作成年: 1993年

検体: フルミオキサジン原体および構造類似化合物

純度: フルミオキサジン原体;

構造類似化合物A (S-23121) * ;

構造類似化合物B (S-23031) * ;

試験動物: Cr1:CD (SD) 雌ラット (11~13週齢)

ニュージーランドホワイト雌ウサギ (5~6ヶ月齢)

試験目的: フルミオキサジンの発生毒性とプロトポルフィリノーゲン酸化酵素 (PPO) の阻害との関連性を検討する一連の検討試験の一環として本試験を実施した。

フルミオキサジンとその構造類似化合物 (S-23121, S-23031) によるPPOの阻害に種差ならびに化合物差があるか否かを検討した。また、今後の試験を胚を用いずに肝のPPOにて実施できるか否かも検討した。

実験1にて、阻害実験のための条件を検討し、実験2にて阻害実験を行った。

試験方法: ラットおよびウサギの肝臓ならびにそれらの妊娠12日および15日の胚から調製したミトコンドリアを用い、プロトポルフィリノーゲンを基質としてインキュベートし、生成したプロトポルフィリンIX量を蛍光測定によって算出し、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (PPO) 活性を求めた。また、ミトコンドリア調製純度を示すマーカーとしてチトクロームcオキシダーゼを測定した。

実験1; 基質濃度を一定にして60ないし120分間の反応の時間経過を検討した。その後、反応が直線的である一時点で、種々の基質濃度でのPPO活性を測定し、最大反応速度 (V_m) およびミハエリス定数 (K_m) を算出した。

実験2; 各ミトコンドリアと基質 ($15 \mu M$) および様々な濃度の検体 (フルミオキサジン、S-23121は $10^{-5} \sim 10^{-10} M$ 、S-23031は $10^{-4} \sim 10^{-9} M$) を20分間 (肝ミトコンドリア) または30分間 (胚ミトコンドリア) インキュベートさせ、PPO活性を測定して各検体のIC₅₀値を求めた。

結果:

実験1; PPO活性はラットの肝臓のミトコンドリアでは約20分間、今回試験した他の組織では少なくとも40分間は直線的に推移した。最高反応速度 (V_{max}) は今回試験した3種の組織ではいずれもウサギよりもラットのミトコンドリアの方が高値であった。反応速度データを以下に示す。

申請者注

*: 構造類似化合物A (S-23121, 一般名:フルミオピリン)、B (S-23031, 一般名:フルミクラックベンチル) は住友化学の開発農薬である。

動物種	組織	V _{max} (pmol PPIX/mg 蛋白/分)	K _m (μ M)
ラット	肝臓	93.2	3.1
ウサギ	肝臓	26.7	1.8
ラット	12日 齡胚	179	5.3
ウサギ	12日 齡胚	81.9	2.7
ラット	15日 齡胚	270	8.2
ウサギ	15日 齡胚	161	12.3

実験2；両動物種のすべての組織のミトコンドリアでの相対的なPP0阻害能は、フルミオキサジン、S-23121、S-23031の順で高かった。動物種間で被験物質による阻害に対するPP0の感受性に差が認められ、ラットの組織ではウサギに比べ高かった。肝臓と胚のミトコンドリアでは、被験物質による阻害に対するPP0の感受性はほぼ同じであった。IC₅₀値 (μ M) を以下に示す。

動物種	組織	フルミオキサジン	S-23121*	S-23031*
ラット	肝臓	0.00808	0.0108	0.793
ウサギ	肝臓	0.0519	1.56	4.75
ラット	12日 齡胚	0.0121	0.0467	0.344
ウサギ	12日 齡胚	0.0950	6.49	5.92
ラット	15日 齡胚	0.00590	0.0200	0.204
ウサギ	15日 齡胚	0.308	1.27	5.09

結論：3種の被験物質による阻害に対して、PP0の感受性に種差が認められた。つまり、ラット組織のPP0はウサギ組織のPP0よりもより強く阻害された。被験物質の相対的酵素阻害能に差があることはin vivoでの化合物の影響に差があることを示唆するものである。さらに、被験物質による阻害に対する肝と胚のミトコンドリアのPP0の感受性はほぼ同じであった。今後の実験では肝のPP0を材料としても、被験物質によるPP0阻害試験を行えることが示唆された。

申請者注

*：構造類似化合物A (S-23121, 一般名:フルミ^oピ^oン)、B (S-23031, 一般名:フルミ^oラ^oク^oパ^oン) は住友化学の開発農薬である。

(11) フルミオキサジン原体のラット、ウサギおよびヒトの肝臓におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害試験 (PPO阻害試験2)

(資料8-11)

試験機関: SRI International

報告書作成年: 1996年

検 体: フルミオキサジン原体

純 度:

試験動物: CrI:CD (SD) 雌ラット (11~13週齢)

ニュージーランドホワイト雌ウサギ (4~6ヶ月齢)

ヒト (女性, 15~71歳)

試験目的: フルミオキサジンの発生毒性とプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (PPO) 阻害との関連性を検討する研究の一環として本試験を実施した。

本試験では、ヒト肝臓ミトコンドリアを用いてフルミオキサジンによる

PPO阻害実験を行い、ヒトにおけるPPO阻害をラットおよびウサギと比較した。

PPO測定方法: ヒト (脳死患者6人)、ラットおよびウサギの肝臓から調製したミトコンドリアを用い、プロトポルフィリノーゲンを基質としてインキュベートし、生成したプロトポルフィリンIX量を蛍光測定によって算出してPPO活性を求めた。また、ミトコンドリア調製純度を示すマーカーとしてチトクロームcオキシダーゼを測定した。

ヒト肝臓におけるPPO測定条件の設定: 基質濃度を $2.5\mu\text{M}$ として60分間、反応の時間経過を検討した。また、反応が直線的である一時点 (20分) で、種々のミトコンドリア蛋白濃度でのPPO活性に対する影響を検討した。

ヒト肝臓ミトコンドリアでは、PPO活性は約40分間直線的に推移した。蛋白濃度が上昇するに従って見かけの活性 (加熱処理したミトコンドリア中の活性を引く前の値) は低下したが、 $0.13\sim 1.0\text{mg/mL}$ の蛋白濃度範囲では、実質PPO活性には差がなかった。

これらの結果から、反応時間を20分、ミトコンドリア蛋白濃度を 0.13mg/mL として種々の基質濃度でのPPO活性を測定し、最大反応速度 (V_{max}) およびミハエリス定数 (K_{m}) を算出した。ヒト肝臓ミトコンドリアにおけるPPOの V_{max} および K_{m} を次表に示す。

標本番号	Vmax (pmolPPIX/mg蛋白/分)	Km (μ M)
H87	213	0.673
H88	52.1	0.117
H89	67.1	0.193
平均値 \pm SD	111 \pm 88.9	0.328 \pm 0.301

1人の肝臓が、他の2人の肝臓に比べはるかに高いVmaxの値を示したが、この差は、ヒトでは一般的に認められる正常な個体差の範囲にあるものであった(Shimadaら、1994)。ヒトPPOと以前の試験で得られたラットおよびウサギPPOの反応速度パラメータを比較したところ、Vmaxはヒトとラットでほぼ同じであった。しかし、ヒトのKmはラットに比べてはるかに低く、約1/10であった。

PPO阻害試験：肝臓ミトコンドリア(蛋白量：ヒトでは0.13mg/mL、ラットおよびウサギでは0.25mg/mL)、基質(ヒトでは1.0 μ M、ラットおよびウサギでは15 μ M)および様々な濃度のフルミオキサジン(ヒト；10⁻⁴~10⁻⁹M、ラットおよびウサギ；10⁻⁵~10⁻¹⁰M)を20分間インキュベートさせ、PPO活性を測定した。得られたIC₅₀値を次表に示す。

組織	IC ₅₀ 値 (μ M、平均値 \pm SD)
ラット肝臓	0.00715 \pm 0.0021
ウサギ肝臓	0.138 \pm 0.074
ヒト肝臓*	0.0173 \pm 0.0044

*：標本 H92、H93 および HAL3 を用いた。

IC₅₀ 値から求めた各動物種における PPO 阻害能は、ラット、ヒト、ウサギの順に高かった。なお、今回の試験でのウサギ肝臓の IC₅₀ 値は、以前の試験において得られた値(0.0519 \pm 0.028 μ M)に比べわずかに高かったが、ラット肝臓ミトコンドリアの IC₅₀ 値は、以前の値(0.00808 \pm 0.0027 μ M)ときわめてよく一致していた。

以上の結果から、フルミオキサジンの PPO 阻害における IC₅₀ 値から求めた各動物種の相対的感受性は、ラット、ヒト、ウサギの順に高いことが明らかとなった。

(12) フルミオキサジン原体およびその主要代謝物 (3-OH-S-53482、4-OH-S-53482、APF) のラット肝臓ミトコンドリアにおけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害

(資料 8-12)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2011年

試験目的：フルミオキサジン原体およびその主要代謝物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性阻害能を確認する目的で、ラット肝臓ミトコンドリア画分を用いて *in vitro* で試験を実施した。

検体：フルミオキサジン原体

3-OH-S-53482

4-OH-S-53482

APF

検体純度：フルミオキサジン原体

3-OH-S-53482

4-OH-S-53482

APF

試験方法：9週齢の Crl:CD (SD) 系雌ラットの肝臓から調製したミトコンドリア画分を用い、プロトポルフィリノーゲン IX を基質としてインキュベートし、生成したプロトポルフィリン IX (PPIX) 濃度を蛍光測定によって測定してプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (PPO) 活性を求めた。

PPO 阻害試験では、以下の最終濃度となるよう各検体を DMSO で希釈した。

フルミオキサジン原体	10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} M
3-OH-S-53482	10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M
4-OH-S-53482	10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} M
APF	10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} M

希釈した検体または溶媒対照 DMSO を 1 μ L ずつ分注した 96 穴プレートに肝臓ミトコンドリア溶液 50 μ L (最終濃度 0.25 mg 蛋白/mL) を添加し、37°C で 10 分間プレインキュベートした後、プロトポルフィリノーゲン IX 溶液 49 μ L (最終濃度 15 μ M) を添加して、PPIX 生成による蛍光変化を 1 分間隔で 60 分間にわたり測定した。

得られた蛍光時間曲線から、全てのサンプルでほぼ直線性が得られた 30 および 40 分時を PPO 活性評価時点として選択し、PPO 活性 (pmol/min/mg 蛋白) および溶媒対照に対する相対活性を算出した。

試験は検体・濃度ごとに 2 連で、それぞれ 3 回行った。

結果：検体の PPO 阻害曲線および平均 IC₅₀ 値を以下に示す。

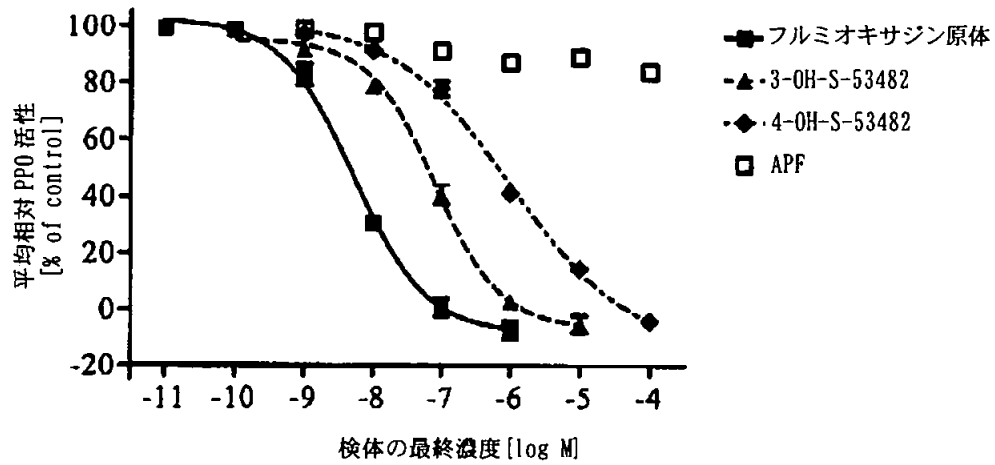


図1 PPO に対する阻害曲線

検体	IC ₅₀ 値 (平均±SD, log M)
フルミオキサジン原体	-8.342 ± 0.059 (0.00455 μM)
3-OH-S-53482	-7.204 ± 0.109 (0.0625 μM)
4-OH-S-53482	-6.176 ± 0.123 (0.667 μM)
APF	未確定

平均 IC₅₀ 値の比較から、試験した検体のうちフルミオキサジン原体の PPO 活性阻害能が最も強く、代謝物 3-OH-S-53482 および 4-OH-S-53482 がこれに次ぎ、その PPO 活性阻害能はフルミオキサジン原体のそれぞれ 1/13.7 および 1/147 であった。代謝物 APF については、100 μM でも PPO に対する阻害作用は認められなかった。

以上の結果から、代謝物 3-OH-S-53482 および 4-OH-S-53482 の PPO 活性阻害能はフルミオキサジン原体に比べて弱く、代謝物 APF には 100 μM まで PPO 活性阻害能がないと判断された。

(13)フルミオキサジン原体の K562 細胞におけるヘム合成経路および細胞増殖に及ぼす影響
(資料 8-13)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2012 年

試験目的：ヒト赤血球系細胞におけるヘム合成経路に対するフルミオキサジン原体の影響を確認する目的で、慢性骨髄性白血病患者由来の K562 細胞を酪酸ナトリウム処理により分化させた赤血球系細胞にフルミオキサジン原体を処理し、ヘムおよびプロトポルフィリン IX (PPIX) 濃度を測定する試験を実施した。

検体：フルミオキサジン原体

検体純度：

試験方法：

試験培養液の調製；検体を DMSO に溶解し希釈した後、1.0 mM 酪酸ナトリウム含有 RPMI 培養液 (NaB 培養液) で希釈して、5.0、1.0、0.1 および 0.01 μM の濃度に調製した。無処理対照としては 0.5% DMSO 含有 NaB 培養液を用いた。

検体処理；K562 細胞を各試験培養液に懸濁し、24 穴プレートに 1×10^5 細胞/mL/well の濃度で播種して CO_2 インキュベータで培養した。播種日を 0 日として、2、4、6 および 8 日目に培養細胞を PBS (-) で洗浄し、細胞濃度を測定後、 -80°C で保存し、ヘムおよびプロトポルフィリン IX (PPIX) 測定に供した。なお、4 日目には 1×10^5 細胞/mL/well の濃度で新しいプレートに継代培養した。

ヘムおよび PPIX の測定；K562 細胞を室温で融解後、内部標準 (deuteroporphyrin IX : 50 ng/mL、PPIX- d_4 : 0.2 ng/mL) を含む塩基性メタノール (メタノール : 0.1 M アンモニア溶液 = 9 : 1, v/v) を添加してヘムおよび PPIX を抽出し、固相抽出用プレートを用いて精製したサンプルを LC/MS 分析に供した。

試験結果：試験は 4 回行った。分化 K562 細胞の増殖、PPIX 蓄積およびヘム合成に対する検体の影響を次の図に示した。

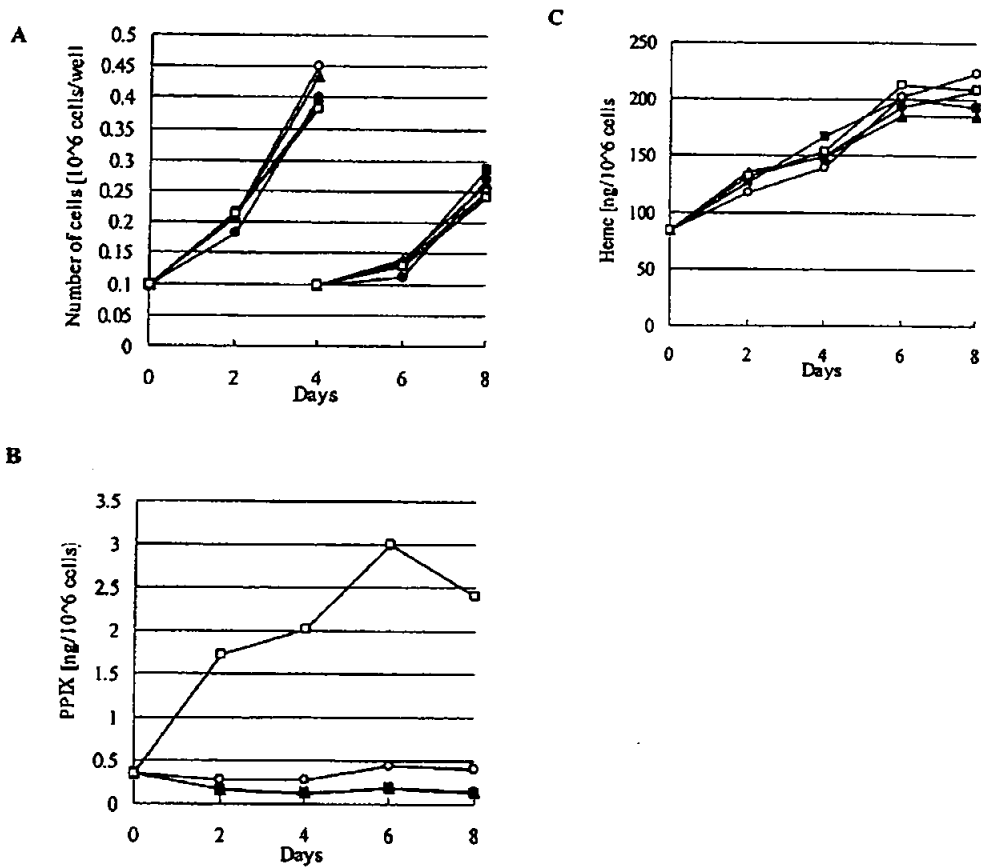


図1 分化 K562 細胞のヘム合成および増殖に対する検体の影響

A) 細胞数、B) PPIX 量、C) ヘム量

検体処理用量は 0.01 μ M (■)、0.1 μ M (▲)、1.0 μ M (○)、5.0 μ M (□)、および無処理 (●)

1.0 μ M 以上の検体処理で、用量依存性に PPIX は分化 K562 細胞に蓄積した。しかし、5.0 μ M の用量でも細胞増殖およびヘム合成に対する影響は認められなかった。

以上の結果から、フルミオキサジン原体処理によりヒト由来赤血球系細胞においてプロトポルフィリン IX 蓄積はみられるが、5 μ M 以下ではヘム合成および細胞増殖には影響しないと判断された。

(14) フルミオキサジン代謝物 (3-OH-S-53482、4-OH-S-53482、APF) の K562 細胞におけるヘム合成経路および細胞増殖に及ぼす影響

(資料 8-14)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2012 年

試験目的：ヒト赤血球系細胞におけるヘム合成経路に対するフルミオキサジン主要代謝物の影響を確認する目的で、慢性骨髄性白血病患者由来の K562 細胞を酪酸ナトリウム処理により分化させた赤血球系細胞にフルミオキサジン原体およびその主要代謝物を処理し、ヘムおよびプロトポルフィリン IX (PPIX) 濃度を測定する試験を実施した。

検体：フルミオキサジン原体

3-OH-S-53482

4-OH-S-53482

APF

検体純度：フルミオキサジン原体

3-OH-S-53482

4-OH-S-53482

APF

試験方法：

試験培養液の調製；各検体を DMSO に溶解し、1.0 mM 酪酸ナトリウム含有 RPMI 培養液 (NaB 培養液) で希釈して、5.0 μ M の濃度に調製した。無処理対照としては 0.02% DMSO 含有 NaB 培養液を用いた。

検体処理；K562 細胞を各試験培養液に懸濁し、6 cm シャーレに 5×10^5 細胞/5 mL/dish の濃度で播種して CO₂ インキュベータで培養した。播種日を 0 日として、2、4、6 および 8 日目に各シャーレから細胞懸濁液 1 mL を採取し、PBS (-) で洗浄して細胞濃度を測定後、-80℃ で保存し、ヘムおよびプロトポルフィリン IX (PPIX) 測定に供した。なお、4 日目には 5×10^5 細胞/5 mL/dish の濃度で新しいシャーレに継代培養した。

ヘムおよび PPIX の測定；K562 細胞を融解後、内部標準 (deuteroporphyrin IX: 50 ng/mL、PPIX-d₄: 0.2 ng/mL) を含む塩基性メタノール (メタノール: 0.1 M アンモニア溶液 = 9:1, v/v) を添加してヘムおよび PPIX を抽出し、固相抽出用プレートを用いて精製したサンプルを LC/MS 分析に供した。

試験結果：試験は 3 回行った。K562 細胞の増殖、PPIX 蓄積およびヘム合成に対する検体の影響を次の図に示した。

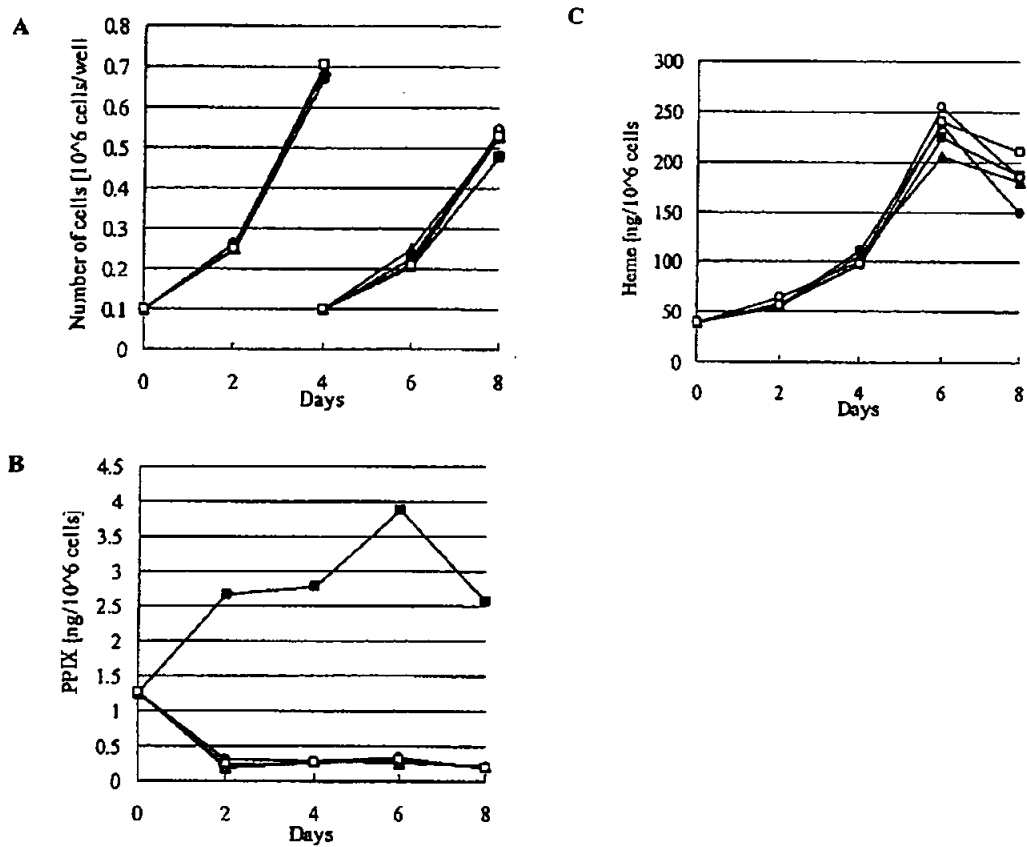


図1 分化 K562 細胞のヘム合成および増殖に対するフルミオキサジン原体およびその代謝物の影響

A) 細胞数、B) PPIX 量、C) ヘム量
 ■ ; フルミオキサジン原体 5.0 μ M、▲ ; 3-OH-S-534825 5.0 μ M、
 ○ ; 4-OH-S-53482 5.0 μ M、□ ; APF 5.0 μ M、● ; 無処理

分化 K562 細胞をフルミオキサジン代謝物で処理しても PPIX 含量、ヘム合成および細胞増殖に対する影響は認められなかった。フルミオキサジン原体処理ではプロトポルフィリン IX 蓄積はみられたが、ヘム合成および細胞増殖には影響しなかった。

以上の結果から、フルミオキサジン原体によりヒト由来赤芽球系細胞においてプロトポルフィリン IX 蓄積はみられたものの、ヘム合成および細胞増殖には 5 μ M 以下では影響せず、また試験したフルミオキサジン代謝物は 5 μ M 以下ではプロトポルフィリン IX 蓄積、ヘム合成および細胞増殖のいずれにも影響しないと判断された。

(15) 卵黄嚢造血中ラット胎児における循環赤芽球の形態およびその構成の経時変化

(資料8-15)

試験機関：住友化学株式会社

報告書作成年：2011年

試験目的：胎齢11日から14日のラット胎児血液細胞を採取して、卵黄嚢由来赤芽球の形態の経時変化を検索する目的で実施した^{申請者注}。

供試動物：CrI:CD (SD) 系妊娠ラット、12匹、交配開始時週齢：雌10週齢

試験方法：

交配方法：雌雄を1対1で一晩同居させ、翌朝に膣栓が確認できた日を胎齢0日とした。

胎児赤芽球の回収：胎齢11、12、13または14日の午前中にイソフルラン麻酔下で妊娠雌動物から子宮を摘出し、胎児を取り出してDPBS中で洗浄後、L-グルタミンおよび20% FBS含有IMDM培地に移した。胎齢11日から14日の各胎児について切断した臍帯から放血させ、同腹児の胎児血液細胞を採取し、プールした。

胎児赤芽球の形態分析：約 5.0×10^4 個の胎児血液細胞をスライドグラスに遠心塗抹し、乾燥させた後に、メタノールで固定してメイグリュンワルド・ギムザ染色を施した。各胎齢3腹の塗抹標本について、500個の胎児赤芽球を無作為に選択し、形態学的分類を行った。

結果：

胎児赤芽球形態の経時変化を次図に示す。

申請者注：本試験は、胎齢11日から14日のラット胎児血液細胞を採取し卵黄嚢由来の赤芽球の形態の経時変化を検索することで、フルミオキサジンのヘム合成阻害による貧血と、発生毒性の最も感受性の高い時期（臨界期）との関連を明らかにする目的で実施した。

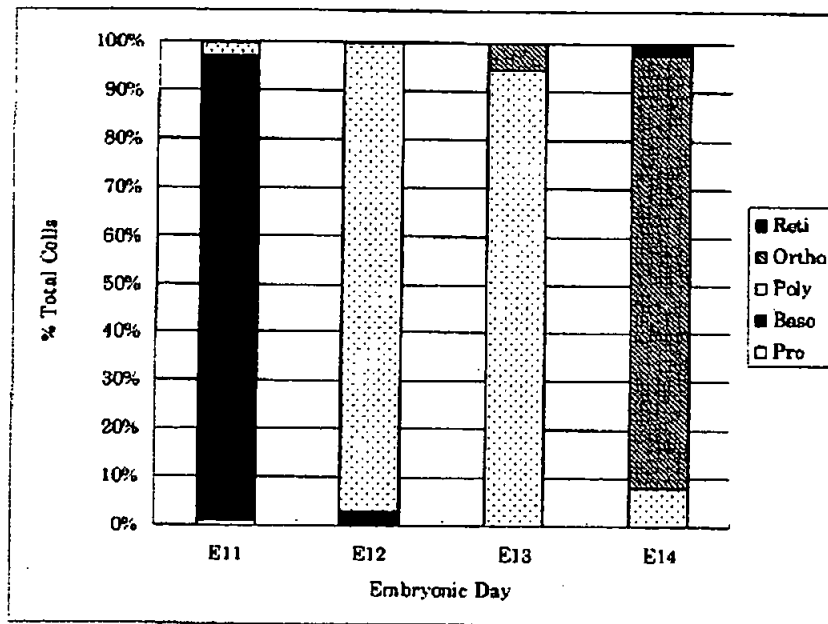


図1 胎齢11日から14日のラット胎児における赤芽球の構成

Pro: 前赤芽球、Baso: 好塩基性赤芽球、Poly: 多染性赤芽球、
Ortho: 正染性赤芽球、Reti: 網状赤血球

E11: 胎齢11日、E12: 胎齢12日、E13: 胎齢13日、E14: 胎齢14日

胎齢11日では循環赤芽球の95%以上が好塩基性赤芽球であったが、胎齢12日から13日では主な細胞は多染性赤芽球であった。胎齢14日では多染性赤芽球数は急激に減少し、主な細胞は正染性赤芽球となった。また、少数の網状赤血球も認められた。

以上のことから、胎齢11日から14日のラット胎児では循環赤芽球は同期して分化することが明らかとなった^{申請者注}。

申請者注: 胎齢12日の胎児では、循環赤血球のほとんどがヘモグロビンの生合成が活発とされる多染性赤芽球であり、このことが本剤のラットにおける発生毒性の臨界期が妊娠12日であることの要因の一つである可能性が示唆された。

9. 変異原性

(1) フルミオキサジン原体の細菌を用いた復帰変異試験

(資料9-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1989年 [GLP対応]

検体：フルミオキサジン原体

純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537, TA1538株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2uvrA株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9mix) の存在下および非存在下で Amesらの方法で変異原性を検討した。

溶媒としてDMSO (ジメチルスルホキシド) を用いた。

[用量設定根拠]

試験結果：試験結果を次頁にまとめた。

S9mix非存在下および存在下ともに検体処理群の復帰変異コロニー数が溶媒対照値の2倍を越えて濃度依存的に増加することはなかった。

一方、S9mix非存在下および存在下の各菌株に対する陽性対照である2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、ベンゾ(a)ピレンおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の明瞭な増加を認めた。

以上の結果から、本試験条件下では、フルミオキサジン原体には変異原性はないと結論した。

フルミオキサジン原体の細菌を用いた復帰変異試験結果 (試験 I)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S 9 mix	復帰変異コロニー数/プレート ^{a)}					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 ^{b)}		-	109	10	15	21	14	9
フルミオキサジン原体	50	-	105	17	16	22	8	10
	100	-	112	10	17	28	14	11
	200	-	108	8	20	27	10	7
	500	-	91	14	14	24	14	5
	1000	-	<u>103</u>	<u>10</u>	<u>23</u>	<u>26</u>	<u>11</u>	<u>9</u>
	2000	-	<u>97</u>	<u>11</u>	<u>16</u>	<u>18</u>	<u>9</u>	<u>9</u>
陽性対照		-	290 ^{c)}	288 ^{d)}	314 ^{e)}	279 ^{f)}	1861 ^{g)}	530 ^{h)}
溶媒対照 ^{b)}		+	104	16	29	45	23	32
フルミオキサジン原体	50	+	91	12	23	47	20	41
	100	+	100	15	20	61	26	44
	200	+	107	13	28	49	29	45
	500	+	107	19	25	64	23	53
	1000	+	<u>94</u>	<u>14</u>	<u>21</u>	<u>65</u>	<u>22</u>	<u>58</u>
	2000	+	<u>99</u>	<u>14</u>	<u>18</u>	<u>70</u>	<u>24</u>	<u>57</u>
陽性対照		+	812 ⁱ⁾	259 ^{j)}	646 ^{k)}	427 ⁱ⁾	188 ⁱ⁾	208 ⁱ⁾

a) : 数値は2枚のプレートの平均値

b) : ジメチルスルホキシド

c) : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド 0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

d) : アジ化ナトリウム 0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

e) : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン 2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

f) : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド 0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

g) : 9-アミノアクリジン 80 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

h) : 2-ニトロフルオレン 2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

i) : ベンゾ(a)ピレン 5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

j) : 2-アミノアントラセン 2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

k) : 2-アミノアントラセン 10 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

— : 検体の析出を認めた。

フルミオキサジン原体の細菌を用いた復帰変異試験結果（試験Ⅱ）

薬物	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 ^{a)}					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 ^{b)}		-	118	14	18	30	15	16
フルミオキサジン原体	50	-	113	14	15	31	13	15
	100	-	115	12	22	32	9	22
	200	-	113	15	24	28	8	22
	500	-	98	14	17	27	10	17
	1000	-	<u>105</u>	<u>10</u>	<u>21</u>	<u>25</u>	<u>11</u>	<u>21</u>
	2000	-	<u>120</u>	<u>11</u>	<u>20</u>	<u>26</u>	<u>9</u>	<u>17</u>
陽性対照		-	335 ^{c)}	346 ^{d)}	344 ^{e)}	318 ^{f)}	1713 ^{g)}	610 ^{h)}
溶媒対照 ^{b)}		+	90	11	23	43	25	31
フルミオキサジン原体	50	+	86	15	21	42	19	45
	100	+	84	16	22	52	27	42
	200	+	102	9	25	47	18	53
	500	+	103	14	23	51	18	58
	1000	+	<u>108</u>	<u>13</u>	<u>21</u>	<u>55</u>	<u>22</u>	<u>48</u>
	2000	+	<u>106</u>	<u>9</u>	<u>23</u>	<u>56</u>	<u>20</u>	<u>47</u>
陽性対照		+	790 ⁱ⁾	267 ^{j)}	558 ^{k)}	319 ⁱ⁾	180 ⁱ⁾	160 ⁱ⁾

- a) : 数値は2枚のプレートの平均値
 b) : ジメチルスルホキシド
 c) : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド 0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
 d) : アジ化ナトリウム 0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
 e) : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン 2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
 f) : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド 0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
 g) : 9-アミノアクリジン 80 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
 h) : 2-ニトロフルオレン 2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
 i) : ベンゾ(a)ピレン 5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
 j) : 2-アミノアントラセン 2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
 k) : 2-アミノアントラセン 10 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
 — : 検体の析出を認めた。

(2) フルミオキサジン原体のチャイニーズハムスター卵巣由来の線維芽細胞 (CHO-K1) を用いた
in vitro 染色体異常試験

(資料9-2)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1987年

検体：フルミオキサジン原体

純度：

試験方法：チャイニーズハムスター卵巣由来の線維芽細胞 (CHO-K1) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9mix) の存在下および非存在下で検体を処理した後、染色体標本を作製し、顕微鏡下で観察した。検体の処理時間はS9mix存在下では6時間、非存在下では24時間とした。

・用量設定根拠

試験結果：試験結果を次頁にまとめた。

S9mix非存在下では 5×10^{-4} Mの濃度で細胞生存率が低く、分裂中期像が観察できなかった。その他の処理濃度においては溶媒対照と比較して有意な染色体異常の増加を認めなかった。陽性対照は有意に染色体異常を誘発した。

一方、S9mix存在下では 5×10^{-4} Mの濃度で細胞生存率が低く、分裂中期像が観察できなかった。 1×10^{-4} Mおよび 2×10^{-4} Mの処理において溶媒対照と比較して有意な染色体異常の濃度依存的増加を認めた。陽性対照は有意に染色体異常を誘発した。

以上の結果から、フルミオキサジン原体は、本試験条件下のS9mix存在下において、CHO-K1細胞に対して染色体異常誘発性があると結論した。

化合物	濃度 (M)	構造異常 ^{a)}								異常細胞 (%) ^{b)}		増殖率 (%)
		N	ctg	ctb	cte	csb	cse	frg	MT	TAG	TA	
S 9 mix非存在下 (検体処理時間: 24時間-回復時間: 0時間)												
DMSO ^{c)}	-	100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	100
フルミキサジン	3x10 ⁻⁶	100	0	0	1	0	0	0	0	1	1	101.3
原体												
フルミキサジン	1x10 ⁻⁴	100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	73.2
原体												
フルミキサジン	2x10 ^{-4d)}	100	0	0	0	1	0	0	0	1	1	44.5
原体												
フルミキサジン	5x10 ^{-4e)}	- ^{e)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22.7
原体												
MMC ^{f)}	1.5x10 ⁻⁷	100	6	13	34	1	1	0	0	40**	37**	66.8
S 9 mix存在下 (検体処理時間: 6時間-回復時間: 18時間)												
DMSO ^{c)}	-	100	3	4	4	0	0	0	0	9	6	100
フルミキサジン	3x10 ⁻⁶	100	4	5	3	0	0	0	0	13	9	96.5
原体												
フルミキサジン	1x10 ⁻⁴	100	13	13	23	0	1	0	0	34**	26**	90.8
原体												
フルミキサジン	2x10 ^{-4d)}	100	28	47	41	0	0	1	0	56**	53**	59.4
原体												
フルミキサジン	5x10 ^{-4d)}	- ^{e)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.5
原体												
BP ^{g)}	2.5x10 ⁻⁶	100	6	12	58	1	1	0	0	48**	45**	94.0

- a) N: 観察細胞数、ctg: 染色分体ギャップ、ctb: 染色分体切断、cte: 染色分体交換、csb: 染色体切断、cse: 染色体交換、frg: 分裂、MT: 10個以上の異常をもつ細胞。
 b) TAG: ギャップを異常に含める場合、TA: ギャップを異常に含めない場合。
 c) ジメチルスルホキシド、培地における最終濃度: 0.5%。
 d) 軽度な析出が認められた。
 e) 分裂中期像が観察できなかった。
 f) マイトマイシンC: 陽性対照。
 g) ベンゾ(α)ピレン: 陽性対照。
 **: p<0.01。

(2) フルミオキサジンのチャイニーズハムスター細胞 (V79) を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 9-3)

試験機関: Harlan Cytotest Cell Research GmbH

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体: フルミオキサジン原体

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター細胞 (V79) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、6-チオグアニン存在下でのコロニー増殖を指標とするヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子座の突然変異誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。試験は 2 連制とし、試験 1 では S9 mix 存在下および非存在下ともに細胞を検体で 4 時間処理した。試験 2 では S9 mix 存在下では 4 時間、S9 mix 非存在下では 24 時間の処理時間とした。

用量設定根拠:

結果: 結果を次表に示した。

2 回の試験において、S9 mix の有無にかかわらず、最高濃度まで溶媒対照群の 3 倍を越える用量依存性のある突然変異率の増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質であるエチルメタンサルホン酸および 7, 12-ジメチルベンズアントラセンでは明らかな突然変異率の増加が認められた。

以上の結果から、フルミオキサジンは代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下において、突然変異誘発性を有しないものと判断された。

試験 1 (上段:シャーレ 1、下段シャーレ 2)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間 (h)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	相対コロニ ー形成率 ^{b)} (%)	突然 変異率 ^{c)} ($/10^6$ 細胞)
陰性対照 (培養液)	0	4	-	100.0	100.0	15.1
				100.0	100.0	17.3
溶媒対照 (DMSO)	0	4	-	100.0	100.0	15.7
				100.0	100.0	24.2
フルミオキ サジン原体	14.1	4	-	94.6	101.1	33.6
				88.4	87.5	21.2
	28.1	4	-	89.8	100.9	16.7
				87.0	70.3	13.4
	56.3	4	-	86.1	98.9	22.8
86.0				77.5	27.1	
225.0 ^P	4	-	91.4	95.1	13.4	
			89.0	84.4	14.3	
陽性対照 (EMS)	150.0	4	-	80.5	82.7	32.3
				80.1	59.6	12.4
陰性対照 (培養液)	0	4	+	80.4	82.1	192.5 *
				78.1	70.3	148.4 *
溶媒対照 (DMSO)	0	4	+	100.0	100.0	15.0
				100.0	100.0	29.8
溶媒対照 (DMSO)	0	4	+	100.0	100.0	28.2
				100.0	100.0	26.3
フルミオキ サジン原体	14.1	4	+	90.2	112.9	17.3
				86.6	102.1	27.7
	28.1	4	+	94.3	127.7	14.8
				92.1	113.7	13.5
	56.3	4	+	45.4	92.5	23.8
47.9				88.3	22.2	
112.5 ^P	4	+	29.6	102.7	19.8	
			26.4	108.6	34.7	
陽性対照 (DMBA)	1.1	4	+	24.0	112.0	14.6
				16.9	113.8	27.3
陽性対照 (DMBA)	1.1	4	+	41.7	84.2	703.7 *
				34.7	71.8	1158.3 *

EMS: エチルメタンスルホン酸

DMBA: 7, 12-ジメチルベンズアントラセン

P: 処理終了時、検体の析出が認められた。

*: 溶媒対照群の3倍を超える突然変異率の増加が認められた。

a): 相対細胞生存率 = (処理直後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の処理直後の生存コロニー数) \times 100、2 反復の平均値

b): 相対コロニー形成率 = (発現期間後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の発現期間後の生存コロニー数) \times 100、2 反復の平均値

c): 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 $\times 10^6$ / (接種細胞数 \times コロニー形成率))、10 反復の平均値 (ただし、コロニー形成率: (コロニー数 / 接種細胞数))

試験 2 (上段:シャーレ 1、下段シャーレ 2)

薬物	濃度 (μg/mL)	処理時間 (h)	S9 mix の有無	相対細胞生存率 ^{a)} (%)	相対コロニー形成率 ^{b)} (%)	突然変異率 ^{c)} (/10 ⁶ 細胞)
陰性対照 (培養液)	0	24	-	100.0	100.0	23.1
				100.0	100.0	31.4
溶媒対照 (DMSO)	0	24	-	100.0	100.0	33.6
				100.0	100.0	26.0
フルミオキサジン原体	14.1	24	-	107.2	97.0	49.9
				110.3	94.4	37.0
	28.1	24	-	112.0	89.9	30.5
				97.1	94.4	31.2
	56.3	24	-	113.6	99.3	23.0
94.9				94.7	30.9	
112.5 ^P	24	-	97.5	93.1	20.4	
			98.8	96.0	31.3	
225.0 ^P	24	-	-	43.5	89.4	10.3
				62.7	80.4	50.5
陽性対照 (EMS)	150.0	24	-	83.0	87.7	537.6 *
				93.8	84.2	539.0 *
陰性対照 (培養液)	0	4	+	100.0	100.0	19.6
				100.0	100.0	22.0
溶媒対照 (DMSO)	0	4	+	100.0	100.0	23.4
				100.0	100.0	29.7
フルミオキサジン原体	28.1	4	+	74.4	96.7	21.4
				103.2	94.9	25.7
	56.3	4	+	61.2	112.8	24.4
				89.5	98.1	22.0
	112.5 ^P	4	+	65.4	98.1	33.4
87.4				98.9	30.5	
337.5 ^P	4	+	84.5	67.4	24.1	
			90.0	96.6	28.1	
450.0 ^P	4	+	73.2	64.2	39.3	
			79.1	100.1	24.4	
陽性対照 (DMBA)	1.1	4	+	39.4	61.7	1322.3 *
				52.9	93.0	636.8 *

EMS: エチルメタンサルホン酸

DMBA: 7,12-ジメチルベンズアントラセン

P: 処理終了時、検体の析出が認められた。

*: 溶媒対照群の3倍を超える突然変異率の増加が認められた。

a): 相対細胞生存率 = (処理直後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の処理直後の生存コロニー数) × 100、2反復の平均値

b): 相対コロニー形成率 = (発現期間後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の発現期間後の生存コロニー数) × 100、2反復の平均値

c): 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 × 10⁶ / (接種細胞数 × コロニー形成率))、10反復の平均値 (ただし、コロニー形成率: (コロニー数 / 接種細胞数))

(4) フルミオキサジン原体のマウスを用いた小核試験

(資料9-4)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1988年

検体：フルミオキサジン原体

純度：

試験方法：8週齢のICR系マウス（体重；33~39g）を1群当り4匹用い、コーンオイルに懸濁させた検体を300、1000および5000mg/kgの用量で単回腹腔内投与して、24時間後に屠殺した。屠殺後大腿骨を摘出し、常法に従い骨髓細胞の塗抹標本を作成し、顕微鏡下で観察した。

試験結果：試験結果を以下にまとめた。

化合物	投与量	処理時間 (hr)	動物数	PCE ^{a)}	
				PCE+NCE (%±SD)	MNPCE ^{a)} PCE (%±SD)
コーンオイル	- ^{b)}	24	4	40.5±7.1	0.10±0.12
フルミオキサジン原体	300	24	4	26.6±10.5	0.13±0.10
フルミオキサジン原体	1000	24	4	19.1±8.6**	0.25±0.13
フルミオキサジン原体	5000	24	4	11.6±3.1**	0.26±0.06 ^{c)}
CP ^{d)}	80	24	4	20.6±6.8**	5.63±1.70**

a) PCE：多染性赤血球、NCE：正染性赤血球、MNPCE：小核をもつ多染性赤血球。

b) 20mg/kg。

c) 4例中2例において、PCEの割合が非常に低かったので、MNPCEの出現頻度の決定ができなかった。

d) シクロホスファミド

*：p<0.05、**：p<0.01。

検体投与群では、いずれの用量においても溶媒対照と比較して小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意差はなかった。

一方、陽性対照物質であるシクロホスファミド投与群では顕著な小核の増加を認めた。

以上の結果から、本試験条件下では、フルミオキサジン原体はマウス骨髓細胞に小核を誘発しないと結論した。

(5) フルミオキサジン原体のラット骨髓細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験

(資料 9 - 5)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1990年 [GLP対応]

検体：フルミオキサジン原体

純度：

試験方法：動物は、7～8週齢のSD系ラット（体重；雄250～302g、雌149～232g）を1群当り雄5匹および雌5匹の割合で用いた。

経時変化試験では、コーンオイルに懸濁した検体を雄ラットについては5000mg/kgおよび雌ラットについては4400mg/kg*の用量で単回経口投与し、6、12、24および48時間後に屠殺した。屠殺後大腿骨を摘出し、常法に従って骨髓細胞の染色体標本および塗抹標本を作成し、顕微鏡下で観察した。（*標的用量は5000mg/kgであったが、投与液の調製ミスのために実際の用量は4400mg/kgであった。）

用量・反応試験では、コーンオイルに懸濁した検体を0、1250、2500および5000mg/kgの用量で雌雄のラットに単回経口投与し、24時間後に屠殺した。屠殺後大腿骨を摘出し、常法に従って骨髓細胞の染色体標本を作成し、顕微鏡下で観察した。

試験結果：試験結果を次頁にまとめた。

経時変化試験では、いずれの骨髓細胞採取時点においても検体は溶媒対照と比べて染色体異常数を増加させなかった。検体は雄ラットの分裂指数を有意に抑制しなかったが、雌ラットでは6時間目と24時間目の分裂指数が有意に減少し、48時間目の分裂指数が有意に増加していた。また、検体は5000mg/kgを投与した雄ラットにおける処置後12、24および48時間目、4400mg/kgを投与した雌ラットにおける処置後24および48時間目のPCEの割合を有意に減少させた。

用量・反応試験では、いずれの用量においても検体は溶媒対照と比べて染色体異常数を有意に増加させなかった。雄ラットでは、検体はいずれの用量でもPCEの割合を有意に減少させたが、分裂指数の有意な減少は観察されなかった。雌ラットでは、検体は1250および5000mg/kgの用量でPCEの割合を有意に減少させ、5000mg/kgで分裂指数の有意な増加が観察された。

一方、陽性対照物質であるシクロホスファミド投与群（40mg/kg、経口投与、24時間処置）では、染色体異常の出現頻度の増加を認めた。

以上の結果から、フルミオキサジン原体はラット骨髓細胞に対する染色体異常誘発能はないと結論した。

化合物	投与量 (mg/kg)	処理 時間 (hr)	動物数	性別	観察 細胞数	構造的染色体異常 ^{a)}						異常細胞 (%) ^{b)}		分裂指数 ^{c)} (%)	PCN ^{d)} PCE+NCE (%)	
						ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	MA	-Gap			+Gap
コーオイル	— ^{e)}	24	5	雄	250	1	1						0.4	0.8	3.8±2.0	45.1±10.9
フルミオキサジン	5000	6	5	雄	250	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	3.4±1.2	35.6±9.5
フルミオキサジン	5000	12	5	雄	250	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	5.0±1.8	26.6±6.8*
フルミオキサジン	5000	24	5	雄	250	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	3.3±3.3	25.2±7.1**
フルミオキサジン	5000	48	5	雄	250	1	0	0	0	0	0	0	0.0	0.4	6.0±2.2	12.5±7.1**
CP ^{f)}	40	24	5	雄	250	42	126	110	3	8	0	18	49.6**	52.0**	0.7±0.4	25.5±5.9**
コーオイル	—	24	5	雌	250	1	1	0	0	0	0	0	0.4	0.8	3.6±0.4	30.5±9.0
フルミオキサジン	4400	6	5	雌	250	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	2.3±0.7**	37.8±8.0
フルミオキサジン	4400	12	5	雌	250	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	4.0±1.3	30.5±5.5
フルミオキサジン	4400	24	5	雌	250	2	0	0	0	0	0	0	0.0	0.8	1.3±1.4**	17.1±6.8*
フルミオキサジン	4400	48	5	雌	250	1	0	0	0	0	0	0	0.0	0.4	6.4±1.1**	8.3±3.1**
CP	40	24	5	雌	250	20	95	44	1	1	0	14	33.6**	37.2**	1.3±0.5**	11.7±3.4**
コーオイル	—	24	5	雄	250	1	0	0	0	0	0	0	0.0	0.4	2.9±2.4	42.3±11.2
フルミオキサジン	1250	24	5	雄	250	0	0	0	1	0	0	0	0.0	0.4	3.7±3.4	17.4±3.0**
フルミオキサジン	2500	24	5	雄	250	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	3.1±3.5	22.8±5.2**
フルミオキサジン	5000	24	5	雄	250	1	1	0	1	0	0	0	0.4	1.2	1.9±2.5	20.5±4.2**
CP	40	24	5	雄	250	48	153	43	2	0	0	18	43.6**	49.2**	0.6±0.4	14.1±7.2**
コーオイル	—	24	5	雌	250	1	0	0	0	0	0	0	0.0	0.4	2.2±2.2	32.2±14.8
フルミオキサジン	1250	24	5	雌	250	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	2.0±1.8	13.3±5.0*
フルミオキサジン	2500	24	5	雌	250	0	1	0	0	0	0	0	0.4	0.4	4.4±1.2	15.7±4.4
フルミオキサジン	5000	24	5	雌	250	1	0	0	0	0	0	0	0.0	0.4	5.6±0.8**	11.4±4.4*
CP	40	24	5	雌	250	16	74	60	0	1	0	3	27.2**	31.6**	1.1±1.0	7.8±2.7*

a) ctg: 染色体ギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体交換, csg: 染色体ギャップ, csb: 染色体切断, cse: 染色体交換, MA: 10個以上の異常をもつ細胞。

b) -Gap: ギャップを異常に含めない場合, +Gap: ギャップを異常に含める場合。

c) 各動物について最低500細胞を分析した。

d) PCE: 多染性赤血球, NCE: 正染性赤血球, 各動物について1000個の赤血球を計数した。

e) 20ml/kg。

f) シクロホスファミド。

*: p<0.05, **: p<0.01。

(6) フルミオキサジンの細菌を用いたDNA修復試験

(資料9-6)

試験機関：食品農医薬品安全性評価センター

報告書作成年：1996年 [GLP対応]

検体：フルミオキサジン原体

純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) M45株 (DNA修復能欠損変異株) およびH17株 (野生株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9mix) の存在下および非存在下で、胞子法によりDNA損傷誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。各用量あたり3枚のディスクを用い、37℃で24時間培養した。

[用量設定根拠]

試験結果：結果を次頁に示す。

検体処理では、S9mix非存在下および存在下のいずれにおいても、M45株およびH17株に対して生育阻止作用を認めなかった。一方、S9mix非存在下および存在下の陽性対照であるマイトマイシンCおよびTrp-P-1処理では、M45株とH17株に対する生育阻止帯径の差が4mm以上となり、DNA損傷性を認めた。また、陰性対照であるカナマイシン処理では、両菌株の生育阻止帯径の差が2mmを越えることはなかった。

以上の結果から、フルミオキサジン原体は本試験条件下でDNA損傷誘発性はないと結論した。

薬物	処理濃度 μg/ディスク	S9非存在下			S9存在下		
		生育阻止帯径 (mm)		差 (mm)	生育阻止帯径 (mm)		差 (mm)
		M45	H17		M45	H17	
DMSO ^{a)}	0	—	—	—	0.0	0.0	0.0
フルミオキサジン	113	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	225	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	450	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	900	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1800	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	3600	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7200	0.0	0.0	0.0	—	—	—
カナマイシン ^{b)}	0.3	9.6	9.4	0.2	—	—	—
マイトマイシン ^{c)}	0.02	12.2	0.0	12.2	—	—	—
Trp-P-1 ^{c)}	20	—	—	—	11.6	0.0	11.6

結果は3枚のディスクの平均値を示した。

- a) : 溶媒対照
- b) : 陰性対照
- c) : 陽性対照