

(3) ウサギを用いた催奇形性試験

(資料No. 原体-20)

試験機関:

報告書作成年: 2001年 [GLP対応]

検体純度:

供試動物: Himalayanウサギ、1群雌23匹(未経産)、週齢 5~10ヶ月齢、
体重 2.4~2.5kg

投与期間: 23日間(妊娠6日~28日)(2000年2月28日~4月6日)

投与方法: 検体を1%メチルセルロース水溶液に懸濁して0、5、20及び60mg/kgの投与量で
妊娠6日から28日まで毎日1回強制経口投与した。
対照群の動物には1%メチルセルロース水溶液のみを同様に投与した。
人工授精を行った日を妊娠0日とした。

投与量設定根拠

観察・検査項目:

親動物: 一般状態、生死及び妊娠状態を毎日観察し、体重を妊娠0、3、6、8、10、13、16、
19、23及び29日目に、摂餌量は妊娠0-3、3-6、6-8、8-10、10-13、13-16、16-19、
19-23、23-26及び26-29日目に測定した。

妊娠29日目に母動物を屠殺剖検した。胎児を摘出し子宮重量、黄体数、着床数、
早期及び後期吸収胚数、生存及び死亡胎児数を検査した。

生存胎児: 全胎児の体重を測定し、性別及び外表異常の観察し、内臓及び骨格検査を行っ
た。

試験結果: 概要を次頁に示した。

試験結果：

投与群 (mg/kg/日)		0	5	20	60
1群当たり動物数		23	23	23	23
親動物	妊娠動物数	23	20	22	23
	不妊動物数	0	3	1	0
	流産した動物数	0	0	0	0
	死亡動物数	0	0	0	3
	未熟児出産後切迫屠殺動物数	0	0	1	15
	生存胎児出産動物数	22	20	21	5
	一般状態		影響は認められなかった	便減少	便減少、不活発、立毛、軟便、尿退色
	体重変化		投与による影響は認められなかった		26～29日に有意に減少 ↓
	摂餌量		投与による影響は認められなかった		23～29日に有意に減少 ↓
	剖検所見		投与による影響は認められなかった		胃膨満6例、膀胱及び子宮に赤色液体2例、肝黄褐色化1例
妊娠子宮重量 (g)		375.7	360.8	379.8	303.9
着床所当見り	検査動物数	22	20	21	5
	黄体数	8.3	8.3	8.4	8.2
	着床数	7.5	7.6	7.8	7.0
	着床前胚損失率 (%)	10.76	9.15	7.70	16.07
	着床後胚損失率 (%)	4.09	12.16	10.85	10.33
	早期吸収胚数	0.27	0.90	0.62	0.40
	死亡胎児数	0.05	0.05	0.14	0.20
	生存胎児数	7.1	6.6	7.0	6.4

↓ : p<0.05 (wilcoxon検定, t検定)

投与群 (mg/kg/日)		0	5	20	60	背景データ(%)		
胎 児	総胎児数		157	132	147	32		
	胎児体重(g)		37.8	38.8	39.4	32.4 ↓		
	性 比 (%雄)		53.5	58.3	51.7	43.8		
	頭臀長(mm)		93.3	93.9	95.1	88.1 ↓		
	胎盤重量(g)		4.91	5.13	5.00	4.53		
	外 表 異 常	検査胎児数		157	132	147	32	
		大 奇 形	短指症	1	0	0	0	
	動 骨 格 異 常 形	検査胎児数		157	132	147	32	
		化 骨 遅 延	尾椎骨化遅延	33	24	33	9	
			胸骨分節未骨化	76	56	72	16	
後肢第5指骨未骨化			3	2	0	0		
変 異		第7頸椎短小/長	10	5	6	1		
		13肋骨短小/長	2	2	1	1		
大 奇 形		頭頂骨分裂	2	1	0	1		
		頭頂骨穿孔	10	1	3	0		
		頭頂骨裂溝	1	3	5	0		
		側後頭骨異形性	1	0	0	0		
	心肥大/左心房形成不全	1	0	0	0			
	第10肋骨無形性、異形性、短小、癒合	1	0	0	0			
	尾椎中心癒合	0	2	0	0			
胸骨分節異形性、断片化、垂直転位	10	4	7	0				
内 臓 異 常 形	検査胎児数		157	132	147	32		
	変 異	右腎臓位置変異	10	6	3	0		
		胃位置変異	14	10	6	1		
小 奇 形	肺癒合/形成不全/二裂		8	7	14	0		

↓ : P<0.05 (t検定及びwilks検定)、 * : P<0.05 (Jackknife t検定)
背景データは51試験の対照群からの値を集積した。

親動物；

一般状態及び死亡：60mg/kg群で妊娠24日以降に3匹死亡が認められた。また15匹は妊娠22-29日目に未熟児を早産し、その後切迫屠殺した。これらの動物では便減少、摂餌量減少、不活発化、立毛、軟便及び尿の退色などの一般状態の変化が妊娠14日以降に認められた。20mg/kg群の1匹は妊娠27日目に便減少、摂餌量減少が認められ、妊娠28日目に未熟児を早産し、その後切迫屠殺した。
これらの群のその他の動物及び5mg/kg群では、一般状態の異常は認められなかった。

妊娠率：妊娠率は全群で87~100%の範囲であった。20mg/kg群で1例、5mg/kg群で3例が妊娠しなかった。流産した動物は認められなかった。60mg/kg群では15例が未熟児を出産し、これら未熟児の多くは死亡胎児であった。20mg/kg群では1例が未熟児を出産したが、この1匹は妊娠27日目に便減少、摂餌量減少が認められたのみでその他の項目に特に投与に関連した変化は認められないことから、偶発所見と考えられた。60 mg/kg群では妊娠子宮重量の軽度減少が認められたが有意差は認められなかった。20及び5mg/kg群では対照群と同様であった。

体重変化：60mg/kg群では、妊娠26-29日目に有意な体重減少が認められた。
5及び20mg/kg群では投与の影響は認められなかった。

摂餌量：60mg/kg群では、妊娠23-29日に有意な減少が認められた。5及び20mg/kg群では投与の影響は認められなかった。

肉眼的病理検査：剖検では60mg/kg群に胃の膨満6例、膀胱及び子宮に赤色液体2例、肝臓黄褐色化が認められた。5及び20mg/kg群では投与に関連した肉眼所見は認められなかった。

同腹児データ：平均黄体数、平均着床数に投与の影響は認められなかった。
死亡及び生存胎児数は全群と同様であった。
性比及び胎盤重量に影響は認められなかった。頭腎長の有意な減少が認められた。

胎児；

体重：60mg/kg群では平均胎児体重が有意に減少した。その他の群では対照群と同様であった。

外表検査：認められた異常は全て自然発生的なもので、投与の影響は認められなかった。

内臓検査：投与に関連した影響は認められなかった。

骨格検査：遅延、変異及び奇形のいずれも投与による影響は認められなかった。

以上の結果、親動物60mg/kg群では投与期間の後半より死亡例がみられ、未熟児早産の増加が認められ、体重増加量及び摂餌量の減少が認められた。

胎児動物では60mg/kg群で体重減少及び頭腎長の減少が認められた。

これらのことから、親動物及び胎児動物に対する無毒性量は20mg/kgと判断された。

また、最高用量の60mg/kgでも胎児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

13. 変異原性

(1) 細菌を用いた復帰変異性試験-1

(資料No. 原体-21)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 2001年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98及びTA100) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2uvrA) を用い、S-9mixの存在下及び非存在下で Amesらの方法により変異原性を検定した。

検体をDMSOに溶解し、1.6~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の6濃度で実施した。

試験は3連制とし、2回行った。

用量設定根拠:

陽性対照としてS-9mixの非存在下では、アジ化ナトリウム(NaN₃)、9-aminoacridine(AAC)、2-nitrofluorene (2NF)、4-nitroquinoline 1-oxide(NQO)、S-9mixの存在下ではBenzo[a]pyrene(B[a]p)、2-aminoanthracene (AAN) を用いた。

試験結果: 次頁に結果の表を示す。

検体はサルモネラ菌及び大腸菌を用いて行った2回の試験ともS-9mixの有無にかかわらずいずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験1では1000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、試験2では500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈澱が認められた。

一方、陽性対照ではいずれも顕著な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、検体は代謝活性化を含む本試験条件下ではサルモネラ菌及び大腸菌に対し、復帰変異誘発性は有しないものと判断された。

試験1.

(平均値 : n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照(DMSO)	100 μl	-	109	23	20	44	14
検体	1.6	-	105	22	20	50	16
	8		108	26	17	49	21
	40		97	26	21	48	19
	200		95	22	18	48	14
	1000*		103	34	25	50	17
	5000*		91	20	13	42	14
陽性対照	2NF	-				1051	
	NaN3		622	574			
	AAC						227
	NQO				645		
溶媒対照(DMSO)	100 μl	+	99	20	23	50	18
検体	1.6	+	114	22	20	60	20
	8		110	20	22	56	21
	40		104	18	18	50	17
	200		111	25	19	49	19
	1000*		118	22	19	50	18
	5000*		108	21	17	37	19
陽性対照	AAN	+	1764	184			266
					241		
	B[a]p					296	

2NF : 2-nitrofluorene

NaN3 : アジ化ナトリウム

AAC : 9-aminoacridine

NQO : 4-nitroquinoline 1-oxide

AAN : 2-aminoanthracene

B[a]p : Benzo[a]pyrene

* : 沈澱

試験2.

(平均値 : n=3)

薬 物	濃 度 (μ g/プレート)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照(DMSO)	100 μ l	-	128	29	16	31	15
検体	31.25	-	129	26	12	30	9
	62.5		149	25	15	29	12
	125		133	24	12	28	13
	250		129	21	16	26	18
	500*		131	26	14	24	8
	1000*		130	25	10	26	14
陽性対照	2NF	-				1362	
	NaN3		654	700			
	AAC		50				240
	NQO		2		854		
溶媒対照(DMSO)	50 μ l	+	129	21	22	33	14
検体	31.25	+	131	24	12	36	12
	62.5		133	21	17	39	15
	125		127	25	20	33	17
	250		141	22	21	42	20
	500*		123	21	22	32	15
	1000*		133	18	17	32	15
陽性対照	AAN	+	2074	246			444
			10		49		
	B[a]p		10			330	

2NF : 2-nitrofluorene

NaN3 : アジ化ナトリウム

AAC : 9-aminoacridine

NQO : 4-nitroquinoline 1-oxide

AAN : 2-aminoanthracene

B[a]p : Benzo[a]pyrene

* : 沈澱

(1) 細菌を用いた復帰変異性試験-2

(資料No. 原体-22)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2000年

検体の純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98及びTA100) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2uvrA) を用い、S-9mixの存在下及び非存在下で Amesらの方法により変異原性を検定した。

検体をDMSOに溶解し、50～5000 µg/プレート^{*}の範囲の5濃度で1回目はプレート法、2回目はプレインキュベーション法で実施した。但し1回目にS-9mixの存在下のTA98で復帰変異コロニー数の増加がみられたことから、TA98については2回の確認試験を50～5000 µg/プレート^{*}の範囲の8濃度でプレート法にて実施した。さらにプレインキュベーション法ではTA98のS-9mixの存在下についてのみ同様に50～5000µg/プレート^{*}の範囲の8濃度とした。試験はいずれも3連制で行った。

試験結果：次頁に結果の表を示す。

本試験において5000µg/プレート^{*}でも生育阻害はみられなかった。一方、500 µg/プレート^{*}以上で結晶析出がみられた。

S-9mixの非存在下においては2回の試験のいずれの菌株においても検体による復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

S-9mixの存在下ではプレート法による1回目の試験においてTA98で復帰変異コロニー数の増加が5000µg/プレート^{*}でみられた。そこで同系について濃度を加えて2回の確認試験を行なったところ、結晶析出が生じる濃度ではあるが復帰変異コロニー数の増加又はその傾向が認められた。また、プレインキュベーション法による2回目の試験においてもTA98については2000µg/プレート^{*}以上で2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。さらにTA1537でも5000µg/プレート^{*}で増加の傾向が窺われた。

一方、陽性対照ではいずれも顕著な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、検体は結晶析出を生じる濃度で、代謝活性化条件下において復帰変異誘発性を有すると考えられた。

試験1. プレート法

(平均値 : n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	100 μL	-	116	8	28	24	6
検体	50	-	125	9	31	24	5
	160		134	11	29	26	5
	500*		138	7	19	19	6
	1600*		139	13	19	22	5
	5000*		110	11	20	22	7
陽性対照	2NF	-				342	
	NaN_3		580	565			
	AAC						113
	NQO				447		
溶媒対照 (DMSO)	100 μL	+	139	9	34	24	8
検体	50	+	138	10	29	25	8
	160		148	9	30	25	7
	500*		129	9	30	24	7
	1600*		119	12	29	33	8
	5000*		151	8	33	69	11
陽性対照	AAN	+	1285			1060	
				169			178
					194		

2NF : 2-nitrofluorene

NaN_3 : アジ化ナトリウム

AAC : 9-aminoacridine

NQO : 4-nitroquinoline 1-oxide

AAN : 2-aminoanthracene

* : 結晶析出

試験1. プレート法 (確認試験 1)

(平均値 : n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	100 μL	+				30	
検体	50	+				23	
	160					31	
	500*					28	
	1600*					37	
	2000*					42	
	3000*					48	
	4000*					60	
5000*				42			
陽性対照 AAN	0.5	+				712	

試験1. プレート法 (確認試験 2)

(平均値 : n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	100 μL	+				29	
検体	50	+				23	
	160					24	
	500*					30	
	1600*					42	
	2000*					41	
	3000*					61	
	4000*					62	
5000*				74			
陽性対照 AAN	0.5	+				918	

AAN : 2-aminoanthracene

* : 結晶析出

試験2. プレインキューベーション法

(平均値 : n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	100 μL	-	82	4	22	18	6
検体	50	-	82	5	26	20	4
	160		81	8	27	17	4
	500*		80	3	29	18	4
	1600*		88	6	28	23	5
	5000*		90	8	28	18	5
陽性対照	2NF	-				466	
	NaN_3		1	329	283		
	AAC		50				153
	NQO		0.5			180	
溶媒対照 (DMSO)	100 μL	+	116	9	31	27	6
検体	50	+	112	10	31	26	4
	160		111	9	29	32	5
	500*		136	7	27	31	8
	1600*		120	9	34	44	5
	2000*					58	
	3000*					70	
	4000*					62	
	5000*		142	10	32	71	12
陽性対照	AAN	+	0.5	717		829	
			1		123		120
			10			151	

2NF : 2-nitrofluorene

NaN_3 : アジ化ナトリウム

AAC : 9-aminoacridine

NQO : 4-nitroquinoline 1-oxide

AAN : 2-aminoanthracene

* : 結晶析出

(1) 細菌を用いた復帰変異性試験-3

(資料No. 原体-23)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2001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* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解した。

陽性対照として、2-ニトロフルオレン(2NF)、アジ化ナトリウム(NaN_3)、9-アミノアクリジン(AAC)、4-ニトロキノリン 1-オキシド(NQO)、2-アミノアントラセン(AAN) およびベンゾピレン(B[a]P)を用いた。

試験は2回実施し、下記濃度で実施した試験1で1000 μg /プレート以上で検体の析出を認めたため、試験2では最高濃度1000 μg /プレートで実施した。

また、試験2では、S-9 Mix+においてプレインキュベーションを行った。

試験1

全株 (S-9 Mix +/-)

溶媒対照、1.6、8、40、200、1000および5000 μg /プレート

試験2

全株 (S-9 Mix +/-)

溶媒対照、31.25、62.5、125、250、500および1000 μg /プレート

変異原性の陽性判定基準

- 1) 有意水準1%のDunnett検定で、有意($P \leq 0.01$)かつ用量相関性を示した場合。
- 2) 1)で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

試験結果: 結果は次頁の表に示した。

いずれの試験も、検体はS-9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

試験2でS-9(-)のTA1535でのみわずかにコロニー数が増加し有意となったが中間用量の1濃度のみでの変化で用量に関連したものでなく、偶発性のものと考えられた。

一方陽性対照では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復帰変異誘発性は陰性と考えられた。

試験 1

(3反復の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	100 μl		114±18	24±3	20±5	44±5	14±3
検体	1.6	-	114±9	29±6	21±3	42±16	15±2
	8		103±15	28±4	15±2	55±6	22±1
	40		105±24	30±1	13±2	38±11	16±6
	200		108±8	26±2	19±5	50±7	18±8
	1000		102±8†	31±5†	19±6†	45±9†	12±3†
	5000		109±8†	28±9†	18±3†	52±8†	17±1†
溶媒対照	100 μl		98±15	21±5	25±5	51±8	18±5
検体	1.6	+	111±6	20±6	23±8	49±2	18±7
	8		113±5	18±2	20±4	52±14	21±2
	40		97±13	21±3	25±14	42±6	23±3
	200		102±31	20±4	20±6	51±3	20±6
	1000		114±12†	26±8†	15±3†	50±1†	14±2†
	5000		107±7†	17±5†	25±3†	65±3†	26±4†
陽性 対照	2NF	5				1107±29	
	NaN ₃	2	626±16	573±12			
	AAC	50					224±13
	NQO	2			657±120		
	AAN	5	1757±62	187±14			266±35
	AAN	10			242±27		
	B[a]P	10				300±22	

(Dunnett検定)

†析出

- 溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド
 陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン
 NaN₃ : アジ化ナトリウム
 AAC : 9-アミノアクリジン
 NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド
 AAN : 2-アミノアントラセン
 B[a]P : ベンゾピレン

試験 2

(3反復の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	100 μl		122±11	28±2	16±4	35±15	14±2
検体	31.25	-	138±11	29±3	9±3	36±8	13±2
	62.5		144±10	30±10	17±9	37±7	16±5
	125		143±4	43±7*	13±1	40±5	14±4
	250		145±12	35±6	16±5	36±14	14±3
	500		136±19	24±3	19±8	38±6	14±7
	1000		127±11†	21±4†	16±2†	42±3†	13±2†
溶媒対照	100 μl		128±6	23±4	23±5	39±11	15±2
検体	31.25	+	130±10	25±3	21±2	41±3	18±4
	62.5		126±4	22±9	17±7	40±4	18±6
	125		122±1	19±4	21±4	34±6	13±4
	250		122±10	23±2	23±4	40±13	17±7
	500		116±9	23±3	35±5	44±10	15±3
	1000		128±9†	27±5†	33±7†	45±7†	21±3†
陽性対照	2NF	5				1444±261	
	NaN ₃	2	757±10	735±71			
	AAC	50					242±18
	NQO	2			925±37		
	AAN	5	1871±31	220±4			428±41
	AAN	10			38±5		
	B[a]P	10				300±19	

*: $p \leq 0.01$ (Dunnett検定)

†析出

- 溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド
 陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン
 NaN₃ : アジ化ナトリウム
 AAC : 9-アミノアクリジン
 NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド
 AAN : 2-アミノアントラセン
 B[a]P : ベンゾピレン

(1) 細菌を用いた復帰変異性試験-4

(資料No. 原体-24)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2001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* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解した。

陽性対照として、2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (NaN_3)、9-アミノアクリジン (AAC)、4-ニトロキノリン 1-オキシド (NQO)、2-アミノアントラセン (AAN) およびベンゾピレン (B[a]P) を用いた。

試験は2回実施し、下記濃度で実施した試験1で1000 μg /プレート以上で検体の析出を認めたため、試験2では最高濃度1000 μg /プレートで実施した。

また、試験2では、S-9 Mix+においてプレインキュベーションを行った。

試験1

全株 (S-9 Mix +/-)

溶媒対照、1.6、8、40、200、1000および5000 μg /プレート

試験2

全株 (S-9 Mix +/-)

溶媒対照、31.25、62.5、125、250、500および1000 μg /プレート

変異原性の陽性判定基準

- 1) 有意水準1%のDunnett検定で、有意 ($P \leq 0.01$) かつ用量相関性を示した場合。
- 2) 1) で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

試験結果: 結果は次頁の表に示した。

いずれの試験も、検体はS-9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方陽性対照では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復帰変異誘発性は陰性と考えられた。

試験 1

(3反復の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	100 μl		112±8	26±5	23±5	34±11	18±4
検体	1.6	-	108±1	28±4	25±3	37±11	16±6
	8		101±8	24±1	22±2	38±3	15±4
	40		116±8	34±11	24±5	31±3	20±7
	200		92±15	30±7	21±5	35±7	16±6
	1000		97±12†	25±4†	25±2†	39±7†	19±4†
	5000		89±19†	20±3†	21±4†	27±5†	9±1†
溶媒対照	100 μl		128±18	25±7	24±5	39±5	21±5
検体	1.6	+	136±21	19±4	19±4	39±3	13±2
	8		135±6	21±2	24±1	47±11	18±3
	40		131±14	26±7	24±6	37±8	13±9
	200		134±7	27±3	24±1	37±10	18±6
	1000		135±6†	28±2†	29±4†	44±7†	12±3†
	5000		108±8†	23±2†	23±5†	48±4†	13±5†
陽性 対照	2NF	5				1032±19	
	NaN ₃	2	654±32	613±81			
	AAC	50					159±29
	NQO	2			616±107		
	AAN	5	2652±19	278±12			398±16
	AAN	10			293±40		
	B[a]P	10				260±14	

(Dunnett検定)

†析出

- 溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド
 陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン
 NaN₃ : アジ化ナトリウム
 AAC : 9-アミノアクリジン
 NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド
 AAN : 2-アミノアントラセン
 B[a]P : ベンゾピレン

試験 2

(3反復の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	100 μl	-	138±11	25±7	17±5	31±10	16±3
検体	31.25		146±8	21±2	16±3	30±4	17±2
	62.5		151±29	22±3	16±3	33±4	14±3
	125		144±25	21±3	15±3	37±9	13±3
	250		140±19	25±4	19±2	41±6	13±6
	500		143±2	22±4	18±1	44±6	10±3
	1000		151±41†	15±2†	14±1†	36±3†	10±5†
溶媒対照	100 μl	+	116±6	23±4	25±3	32±8	14±3
検体	31.25		112±5	33±15	23±5	30±4	12±4
	62.5		112±3	23±6	19±1	39±5	16±6
	125		124±17	23±4	20±8	35±7	15±2
	250		123±18	22±4	27±5	35±10	13±1
	500		111±19	24±6	29±8	25±8	15±4
	1000		121±8†	25±3†	36±1†	32±5†	20±9†
陽性 対照	2NF	5				1445±278	
	NaN ₃	2	836±27	548±21			
	AAC	50					188±72
	NQO	2			522±56		
	AAN	5	1764±72	200±1			394±16
	AAN	10			41±9		
	B[a]P	10				301±9	

(Dunnett検定)

†析出

- 溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド
 陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン
 NaN₃ : アジ化ナトリウム
 AAC : 9-アミノアクリジン
 NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド
 AAN : 2-アミノアントラセン
 B[a]P : ベンゾピレン

(1) 細菌を用いた復帰変異性試験-5

(資料No. 原体-25)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2001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 (TA98、TA100、TA1535、TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 Escherichia coli (WP2 *uvrA*) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解した。

陽性対照として、2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (NaN_3)、9-アミノアクリジン (AAC)、4-ニトロキノリン 1-オキシド (NQO)、2-アミノアントラセン (AAN) およびベンゾピレン (B[a]P) を用いた。

試験は2回実施し、下記濃度で実施した試験1で1000 μg /プレート以上で検体の析出を認めたため、試験2では最高濃度1000 μg /プレートで実施した。

また、試験2では、S-9 Mix+においてプレインキュベーションを行った。

試験1

全株 (S-9 Mix +/-)

溶媒対照、1.6、8、40、200、1000および5000 μg /プレート

試験2

全株 (S-9 Mix +/-)

溶媒対照、31.25、62.5、125、250、500および1000 μg /プレート

変異原性の陽性判定基準

- 1) 有意水準1%のDunnett検定で、有意 ($P \leq 0.01$) かつ用量相関性を示した場合。
- 2) 1) で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

試験結果: 結果は次頁の表に示した。

いずれの試験も、検体はS-9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

試験2でS-9(-)TA98の最高用量でのみ生育阻害が認められた。

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復帰変異誘発性は陰性と考えられた。

試験 1

(3反復の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	100 μl	-	114±16	25±5	24±5	33±10	24±7
検体	1.6		108±12	28±1	16±4	33±6	17±9
	8		107±15	22±3	20±1	31±9	9±1
	40		100±2	33±8	19±4	32±2	16±4
	200		117±2	30±13	24±10	33±10	11±1
	1000		100±5†	24±3†	21±3†	34±7†	14±4†
5000	94±8†		16±5†	18±1†	28±9†	14±8†	
溶媒対照	100 μl	+	128±12	25±8	24±5	42±8	23±6
検体	1.6		129±4	28±2	26±2	38±5	21±5
	8		123±3	25±4	27±5	32±5	10±2
	40		130±10	22±5	28±9	31±5	14±3
	200		114±4	22±3	27±6	29±6	12±5
	1000		116±12†	21±10†	29±7†	33±3†	17±1†
5000	115±1†		17±4†	19±4†	43±9†	22±6†	
陽性 対照	2NF	5				1041±44	
	NaN ₃	2	660±27	615±62			
	AAC	50					152±29
	NQO	2			641±109		
	AAN	5	2532±19	280±8			396±9
	AAN	10			305±35		
	B[a]P	10				261±14	

(Dunnett検定)

†析出

- 溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド
 陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン
 NaN₃ : アジ化ナトリウム
 AAC : 9-アミノアクリジン
 NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド
 AAN : 2-アミノアントラセン
 B[a]P : ベンゾピレン

試験 2

(3反復の平均値±標準偏差)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	100 μl	-	128±9	28±4	15±3	31±10	13±2
検体	31.25		127±6	27±3	17±1	30±6	9±2
	62.5		134±3	30±7	19±3	34±2	18±2
	125		131±8	30±4	19±6	35±2	15±3
	250		156±4	23±8	17±6	28±9	12±3
	500		149±7†	26±4†	19±2†	26±5†	16±2†
	1000		151±26†	22±2†	15±5†	33±6†#	10±4†
溶媒対照	100 μl	+	128±4	21±4	21±4	35±10	16±2
検体	31.25		139±6	18±3	20±6	37±3	17±12
	62.5		127±13	24±6	21±4	43±6	14±5
	125		129±16	22±5	20±6	37±7	12±4
	250		143±28	17±4	18±2	34±4	13±2
	500		132±12†	22±7†	28±4†	41±7†	17±2†
	1000		142±16†	25±8†	24±4†	41±7†	15±5†
陽性対照	2NF	5				1520±424	
	NaN ₃	2	826±6	790±54			
	AAC	50					283±7
	NQO	2			997±27		
	AAN	5	2435±24	254±4			459±49
	AAN	10			51±8		
	B[a]P	10				325±37	

(Dunnett検定)

†析出

#わずかな生育阻害

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN₃ : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾピレン

(2) チャイニーズハムスターの肺 V79 細胞を用いた HPRT 座前進突然変異試験

(資料 No. 原体-26)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2000年

検体純度：

試験方法：

試験濃度：1回目試験；1.2、3.8、12.1、38.2、120.8、382.0、1208.0、3820.0 μ g/ml

2回目試験；0.4、0.8、1.6、3.2、6.3、12.5、25.0、50.0、75.0、100.0、120.0 μ g/ml

3回目試験；0.313、0.625、1.25、2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、
60.0 μ g/ml。

検体は DMSO に溶解して使用した。

濃度設定根拠：

陽性対照：EMS（エチルメタンサルホン酸塩、代謝非活性化条件で使用）1.0mg/ml

DMBA（9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン：代謝活性化条件で使用）7.7 μ g/ml

培養細胞：チャイニーズハムスター肺繊維芽細胞由来 V79 細胞株

処理： a) トリプシン処理した V79 培養細胞をマイクロタイタープレートに各穴あたり約 4500 細胞接種し、2 日目に代謝非活性化および活性化条件下、各濃度の検体に 4 時間暴露させた。3 日目にマイクロタイター上の細胞を固定、染色し、コロニー形成率を測定した。

b) トリプシン処理した V79 培養細胞 $6 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個を 30ml の培地を入れた 175cm² フラスコに接種した。各濃度あたり 1 フラスコを用いた。2 日目に代謝非活性化および活性化条件下、各濃度の検体に 4 時間暴露させた。5 から 6 日目に 175cm² フラスコで継体培養した。9 日目に、変異細胞選抜用として、6-チオグアニン含有培地をいれた 75cm² フラスコに約 300000 細胞/フラスコ接種し継体培養し、また、コロニー形成率測定用に各濃度あたり 2 つの 25cm² フラスコに約 400 細胞/フラスコ接種し継体培養した。いずれも 16 日目にコロニーを固定、染色し、コロニー数を測定した。

結果：結果を次頁以降の表に示す。

細胞生存率：処理直後の細胞生存率（コロニー形成率）についてマイクロタイター上で確認した結果、いずれの試験においても濃度の上昇にともない細胞の生存率が減少し、最高濃度区（1回目試験：3820 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2回目試験：120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3回目試験：60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）における溶媒対照区と比較した生存率は代謝非活性化条件下ではそれぞれ45.9%、74.4%および56.7%、代謝活性化条件下ではそれぞれ44.5%、57.4%および62.6%であった。9日間培養後の細胞生存率は処理直後の生存率よりも低下し1回目試験では120.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で著しく阻害され溶媒対照に比べ、代謝非活性化では2.9%、活性化で2.5%となった。このため、変異細胞選抜は38.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度のみ可能であった。2回目試験では代謝非活性化条件においては75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での細胞生存率が1.5%、活性化条件では50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での細胞生存率が4.3%となり、変異細胞の選抜はそれぞれ50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度でのみ可能であった。3回目試験では代謝非活性化条件においては60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での細胞生存率が1.6%、活性化条件では40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での細胞生存率が1.4%となり、変異細胞の選抜はそれぞれ50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度でのみ可能であった。

変異原性結果：いずれの試験においても、代謝非活性化および活性化のいずれの条件においても溶媒対照区に比較して検体処理による再現性があり有意な変異コロニー数の増加は認められなかった。1回目試験において代謝活性化条件の1.2および3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 区で溶媒対照区に比べ統計学的有意な増加がみられたが、他の濃度区および2回目以降の試験の同様の濃度区では再現性は認められず、本試験における溶媒対照区の値(11.2)が、同条件における背景対照値(17.6 \pm 12.3；平均 \pm 標準偏差)に比べ低値であったことによるものと考えられた。2回目試験の代謝非活性化条件の0.8および12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 区で溶媒対照区に比べ統計学的有意な変異コロニー数の増加が認められたが、濃度との関連性がなく、他の試験の同濃度での再現性がない、あるいは溶媒対照区の変異コロニー数の3倍を超える増加ではないことから、意義のある変化とは考えられなかった。

代謝非活性化および活性化条件における試験系の感受性はいずれも陽性対照物質で変異コロニー数の有意な増加が認められたことから確認された。

以上より、代謝活性化を含む本試験条件下で、検体の変異原性は認められなかった。

1 回目試験結果

薬剤	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S9	9 日間培養後 相対細胞生存率 ^a	平均 変異コロニー数	変異の頻度 ^b
無処理対照	0	-	100	2.0	6.5
溶媒対照	0		100	5.1	17.1
EMS	1000		90.9	180.6	742.6*
検体	1.2		99.6	4.8	13.5
	3.8		120.3	3.2	14.5
	12.1		144.0	3.6	15.7
	38.2		129.5	4.2	12.6
	120.8		2.9	--	--
	382.0		2.1	--	--
	1208.0		1.7	--	--
3820.0	2.5	--	--		
無処理対照	0	+	100	6.8	21.4
溶媒対照	0		100	3.0	11.2
DMBA	7.7		74.8	39.2	128.4*
検体	1.2		87.6	7.4	23.7*
	3.8		96.8	5.6	25.1*
	12.1		92.2	3.8	14.2
	38.2		106.4	3.8	12.8
	120.8		2.5	--	--
	382.0		14.2	--	--
	1208.0		1.8	--	--
3820.0	1.8	--	--		

a : 溶媒対照区に対する相対値(%)

b : 変異の頻度(106 細胞あたりの変異コロニー数)

* : $p < 0.05$ (Mann-Whitney-U-test)

2回目試験結果

薬剤	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S9	9日間培養後 相対細胞生存率 ^a	平均 変異コロニー数	変異の頻度 ^b
無処理対照	0	-	100.0	4.8	13.2
溶媒対照	0		100.0	4.0	13.3
EMS	1000		70.0	219.8	1025.2*
検体	0.4		115.0	4.4	17.2
	0.8		98.9	12.4	55.9*
	1.6		98.5	3.0	9.7
	3.2		113.1	6.0	21.2
	6.3		104.9	5.0	19.8
	12.5		106.7	5.4	26.2*
	25.0		121.7	3.2	11.1
	50.0		108.2	2.8	11.4
	75.0		1.5	--	--
100.0	1.5		--	--	
120.0	2.2		--	--	
無処理対照	0	+	100.0	3.8	18.1
溶媒対照	0		100.0	5.2	27.7
DMBA	7.7		86.0	45.2	169.2*
検体	0.4		163.3	3.8	23.8
	0.8		157.0	3.2	20.4
	1.6		108.7	4.8	12.3
	3.2		121.3	3.0	20.5
	6.3		155.1	5.8	24.3
	12.5		143.5	3.4	12.8
	25.0		118.4	7.0	31.6
	50.0		4.3	--	--
	75.0		1.9	--	--
	100.0		1.9	--	--
	120.0		2.4	--	--

a: 溶媒対照区に対する相対値(%)

b: 変異の頻度(106細胞あたりの変異コロニー数)

*: $p < 0.05$ (Mann-Whitney-U-test)

3回目試験結果

薬剤	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S9	9日間培養後 相対細胞生存率 ^a	平均 変異コロニー数	変異の頻度 ^b
無処理対照	0	-	100.0	3.2	12.1
溶媒対照	0		100.0	4.2	17.0
EMS	1000		113.7	178.2	889.1*
検体	0.313		134.8	7.2	31.6
	0.625		141.9	1.6	7.0
	1.25		89.1	6.2	30.8
	2.50		112.4	4.4	18.9
	5.00		113.7	2.6	11.8
	10.0		102.5	2.4	9.0
	20.0		146.0	6.0	22.7
	30.0		112.1	3.6	14.9
40.0	108.1		6.0	25.1	
50.0	65.5		6.4	19.0	
60.0	1.6		--	--	
無処理対照	0	+	100.0	3.2	12.0
溶媒対照	0		100.0	5.1	20.3
DMBA	7.7		96.7	20.0	93.3*
検体	0.313		95.5	3.8	15.4
	0.625		112.8	2.4	10.9
	1.25		108.4	5.2	27.6
	2.50		105.3	4.8	27.5
	5.00		111.7	2.8	10.0
	10.0		99.7	5.2	20.4
	20.0		106.4	6.0	27.0
	30.0		104.2	4.4	17.7
	40.0		1.4	--	--
	50.0		0.8	--	--
60.0	0.8		--	--	

a: 溶媒対照区に対する相対値(%)

b: 変異の頻度(106細胞あたりの変異コロニー数)

*: $p < 0.05$ (Mann-Whitney-U-test)

(3) ヒトリンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験

(資料No. 原体-27)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 2001年

検体の純度:

試験方法: in vitro で S-9mix の存在下及び非存在下におけるヒトリンパ球に対する染色体異常誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解した。

用量設定根拠:

1回目試験では S-9mix の存在下では 78.13、312.5、625 $\mu\text{g/ml}$ 、
非存在下では 19.53、78.13、156.25 $\mu\text{g/ml}$ 。

2回目試験では S-9mix の存在下では 39.06、156.25、312.5 $\mu\text{g/ml}$ 、
非存在下では 1.22、9.77、19.53 $\mu\text{g/ml}$ 。

試験結果: 結果を次表に示す。

2回の試験の結果、S-9mix の存在下及び非存在下でいずれの用量においても、溶媒対照と比較して染色体異常を有する細胞数に統計学的に有意な増加は認められなかった。

陽性対照では有意な増加が認められた。

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た。

試験結果：

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	処理 + 回復 時間	観察 細胞 数	S-9 mix	染色体異常を有する細胞数						平均異常細胞 (%)		分裂 指数 (%)		
					染色体分体型			染色体型		その他	キ・ャツ 除く	キ・ャツ 含む			
					キ・ャツ	切断	交換	キ・ャツ	切断					交換	
溶媒対照 (DMSO)	—	3時間	100	—	1	1						0.5	1.0	100	
検体	19.53	18 時間	100		1							0.0	1.5	96	
			100		2										
	78.13		100		3	2			1				1.5	2.5	71
			100		1										
156.25	100		2	1			1				2.5	3.0	53		
	100				2			1							
陽性対照 (マイタイン)	0.1	3時間	100		5	7	1	1	1		1	***	***	—	
			100		6	7		4	1			8.5	15.0		
溶媒対照 (DMSO)	—	3時間	100	+	2	3		3				3.0	5.5	100	
検体	78.13	18 時間	100		1	4									
			100		2	3		1	3		1	4.5	7.0	92	
	312.5		100		1	4		2	1						
			100		1	2		1	1		1	5.0	5.5	63	
625	100				6			1							
	100		1	9		1	4			6.5	8.0	32			
陽性対照 (シクロホスファミド)	6	3時間	100		4	16	7	8	23			***	***	—	
			100		1	11		4	9			18.5	22.0		
溶媒対照 (DMSO)	—	21 時間	100	—	1							0.0	1.0	100	
検体	1.22	3時間	100		1										
			100		2	1						0.5	1.5	100	
	9.77		100		1	1							1.0	2.0	69
			100		1	1									
19.53	100		1	1							0.5	2.0	48		
	100		2												
陽性対照 (マイタイン)	0.1	3時間	100		5	14	3	3	4			***	***	—	
溶媒対照 (DMSO)	—	3時間	100	+	3	1				2		1.0	2.0	100	
			100												
検体	39.06	18 時間	100			2						1.5	1.5	90	
			100			1									
	156.25		100		1			1		1		1.0	1.5	70	
			100												
312.5	100				1		1			1	1.5	2.0	50		
	100				1										
陽性対照 (シクロホスファミド)	6	3時間	100		4	9	2	3		11	1	***	***	—	
			100		5	9	3	2		5	1	17.0	18.5		

*** : $P < 0.001$ (Fisher検定)

その他 : (8個以上異常をもつ細胞数、細胞断片化、染色体断片化を示す)

(4) チャイニーズハムスターV79細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No. 原体-28)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：

試験方法：*in vitro* で S-9mix の存在下及び非存在下におけるチャイニーズハムスター肺線維芽細胞由来培養細胞 (V79) に対する染色体異常誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解した。

用量設定根拠：

標本の作成：フラスコに牛胎児血清を含む培地を 30mL 入れ、そこに $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個の V79 細胞を播種した。これを一定時間炭酸ガス恒温器内で培養した。その後培養液を捨て、S-9 Mix 非存在下では 1% の検体液を含む 30mL の新鮮な培地と、存在下では 1% の検体液及び S-9 Mix 2% を含む 30mL の新鮮な培地を加えて 3 時間炭酸ガス恒温器内で処理した。その後新鮮な培地と交換し一定時間培養した。

別途 S-9 Mix 非存在下で 20 時間処理した試験を同様に実施した。

いずれの試験も、暴露開始後 18 時間後にコルセミドを添加した。2 時間後の標本作成時点で細胞を低張液 (0.075mMKCl) で低張処理した後に、細胞をメタノール/氷酢酸混液 (3:1) で固定し、オルセイン液で染色した。1 培養当たり 2 枚のスライド標本作製した。

陽性対照も標本を同様に作製した。

陽性対照物質は S-9 Mix 非存在下ではエチルメタンスルホナート (EMS、3 時間処理では 1500 μ g/mL、20 時間処理では 400 μ g/mL)、S-9 Mix 存在下ではシクロホスファミド (CP、2.5 μ g/mL) を用いた。EMS 及び CP は培地に溶解させ、試験に用いた。

中期分裂細胞の検査：各培養につき 200 個の中期分裂細胞を鏡検し、染色体及び染色分体についてギャップ、切断、断片、欠失、交換、重複異常などの構造異常を検査した。

試験結果：結果を次表に示す。

検体は S-9 Mix の存在下及び非存在下で、溶媒対照と比較して分裂指数が用量に関連して低下した。また、染色体異常を示す分裂中期細胞数が溶媒対照と比較して用量に関連して増加した。

陽性対照では染色体異常を示す細胞が有意に増加した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性を有するものと判断された。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間	標本作製時間	観察細胞数	S9 Mix の有無	異常の分類											異常中期細胞 (%)			分裂指数(%)			
						染色分体型				染色体型							含キヤン	除キヤン	交換				
						キヤン	切断	欠失	交換	キヤン	切断	欠失	交換	環形成	二動原体	無動原体					(重複)微小染色体	粉碎	
溶媒対照	-	3	20	200	-	1	1				1						0	1.5	1.0	0	100		
検体	25.0			200	-	1	1												1.0	0.5	0	110.3	
検体	50.0			200	-	3													1.5	0	0	81.3	
検体	75.0			200	-	4	1												2.5	0.5	0	76.6	
検体	100			200	-	7	12			1		1			3	2	0		10.5*	8.0*	0.5	38.3	
陽性対照 ^A	1500			100	-	4	5		4				15				0		22.0*	20.0*	17.0	92.5	
溶媒対照	-			+	20	200	-	2	2							1		0	2.5	1.5	0	100	
検体	25.0					200	-	1				1		1			1	1	1	2.5	2.5	0.5	106.4
検体	50.0					200	-	4												2.0	0	0	114.1
検体	75.0					200	-	7	3		1		1	1					0	6.5	3.0	0.5	43.6
検体	100					200	-	7	8		1	1	1	1			1	1	1	10.5*	7.0*	1.0	48.7
陽性対照 ^B	2.5					100	-	7	8		3	1			6			1	3	26.0*	19.0*	8.0	123.1
溶媒対照	-	20	20	200	-	3											1.0	0	0	100			
検体	1.6			200	-	1												0.5	0	0	105.2		
検体	3.2			200	-	17	7		1			3		1	2			13.5*	6.5*	2.0	63.8		
検体	6.3			200	-	8	21			1	5					1		17.0*	12.5*	0	22.4		
陽性対照 ^A	400			200	-	2	4		4		1		9	2			2		11.0*	10.0*	7.5	72.4	

* : $p \leq 0.05$

A : エチルメタンサルホナート

B : シクロホスファミド

(5) マウスを用いた小核試験-1

(資料No. 原体-29)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2000年

検体の純度：

試験動物：NMRIマウス、7週齢、1群雌雄各5匹、陽性対照群雌雄各5匹、
体重雄30～36g、雌23～30g

試験方法：検体を1%メチルセルロース溶液に懸濁した。

用量設定根拠：

検体200、600及び2000mg/kgの用量を24時間間隔で2回強制経口投与した。
2回目投与後24時間目に動物を屠殺し、大腿骨より骨髄の塗抹標本を作製した。

陽性対照群にはシクロホスファミド50mg/kgを、陰性対照群には1%メチルセルロース溶液を投与した。陽性対照群は投与後24時間に屠殺した。

塗抹標本はメタノール固定後、ギムザ染色し、以下の項目を鏡検した。

- (i) 各動物につき、2000個の多染性赤血球(PCE)における小核を有する多染性赤血球(MNPCE)出現頻度
- (ii) 各動物につき、200個の赤血球中の多染性赤血球の割合

評価は、小核を有する多染性赤血球数が統計学的に有意に増加した場合を陽性と判定した。

試験結果：結果を次表に示した。

死亡例は認められず、毒性徴候及び肉眼的異常所見は認められなかった。

検体投与群では、対照群と比べ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。

陽性対照群のシクロホスファミドでは小核を有する多染性赤血球の有意な増加が認められた。

以上の結果、本試験条件下において、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と判断された。

試験結果

処理 時間	薬 物	投 与 量 (mg/kg)	性	動 物 数	MNPCE出現頻度/ 2000細胞		PCE/NCE/200細胞	
24	陰性対照 (1%メチルセルロース)	—	雄	5	1.0	1.30	0.48	0.48
			雌	5	1.6		0.47	
	検 体	200	雄	5	1.8	1.80	0.44	0.48
			雌	5	1.8		0.53	
		600	雄	5	1.6	1.80	0.45	0.46
			雌	5	2.0		0.46	
		2000	雄	5	1.6	1.30	0.47	0.48
			雌	5	1.0		0.48	
	陽性対照 (シクロホスファミド)	50	雄	5	72.2	64.0*	0.46	0.50
			雌	5	55.8		0.55	

* : P<0.05 (Wilcoxon検定)

(5) マウスを用いた小核試験-2

(資料No. 原体-30)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2003年

検体純度:

試験動物: CD-1 Cr1:CD-1TM(ICR)BR マウス、6週齢、1群雄6匹、体重 雄 25~32 g

試験方法: 検体を1% (w/v) メチルセルロース水溶液に懸濁し、2000mg/kgの用量でマウスに1日1回、2日間強制経口投与した。

2回目の投与後24時間に屠殺し、大腿骨を摘出して骨髓細胞の塗抹標本を作製した。

溶媒対照として1% (w/v) メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

陽性対照としてシクロホスファミド(CPA)を40mg/kgの用量で1回のみ同様に投与し、24時間後に屠殺した。

塗抹標本はギムザを用いて染色し、以下の検査をした。

1000個の赤血球を観察し、多染性赤血球(PCE)と正染性赤血球(NCE)の相対比を調べた。

2000個の多染性赤血球(PCE)のうち小核を有する多染性赤血球(MNPCE)を計数し、多染性赤血球(PCE)1000個当たりの小核を有するPCE(MNPCE)の頻度を求めた。

陽性判定基準

- 1) 少なくとも1用量で小核を有するPCE頻度が統計学的に有意に増加し、
- 2) その時点での小核を有するPCE頻度が溶媒対照の背景値を超える場合。

用量設定根拠:

試験結果: 骨髓標本の観察結果を表に示した。

溶媒対照群では1匹の小核を有する多染性赤血球数(MNPCE)が背景対照値の範囲外であったが残り5匹では背景対照値の範囲内であったことから、この溶媒対照群の結果は有効と考えられた。

死亡および毒性症状は認められなかった。

検体投与群の小核を有する多染性赤血球数(MNPCE)の発現頻度は溶媒対照群の約2倍であったが、統計学的に有意な増加ではないことから、陽性判定基準には該当しなかった。しかしながら、溶媒対照群で1匹、検体投与群で数匹に多染性赤血球数(MNPCE)の発現頻度の増加が認められていることから、これらの結果の生物学的な有意性は不明であった。陽性対照群では小核を有する多染性赤血球数(MNPCE)の出現頻度に統計学的に有意な増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において、検体投与により対照群と比較して小核を有する多染性赤血球数は増加したが、統計学的に有意でないことから、染色体異常誘発性を有するかどうかは疑わしいと判断した。

申請者注

報告書では試験責任者は安全サイドから結果を明瞭に結論付けていない。しかし、本試験での細胞1000個中MNPCE頻度は溶媒対照群で0.25~2.25、検体投与群で0.50~2.75の範囲にあり、きわめて近似している。また、統計学的にも溶媒対照及び検体投与群の間に有意差のないことから、本染色体異常誘発性試験の結果は陰性と考えた。

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	性	動物数	MNPCE 頻度 /1000細胞	PCE/NCE 比
24	溶媒対照	-	雄	6	0.88±0.70	1.00
	検体	2000	雄	6	1.50±0.84	1.05
	陽性対照 CPA	40	雄	6	18.96±4.77***	1.02

溶媒対照：1.0%メチルセルロース水溶液

陽性対照：CPA：シクロホスファミド

***: $P \leq 0.001$ χ^2 検定

(5) マウスを用いた小核試験-3

(資料 No. 原体-31)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年： 2003 年

検体純度：

供試動物： Hsd/Win: NMRI系マウス、(試験開始時： 6~12週齢、体重 雄 37~42g)、

1 群雄各5匹

投与方法： 検体を0.5%クレモホア水溶液に懸濁し、0、150、300および600mg/kgで腹腔内に投与した。シクロホスファミドは脱イオン水に溶解し、20mg/kgの投与レベルで腹腔内に投与した。陰性対照には0.5% Cremophor水溶液を同一の方法で投与した。検体投与群、陰性対照群についての投与回数は24時間間隔で2回行い、シクロホスファミドについては1回とした。投与用量はいずれの場合も10mL/kg体重とした。最終投与24時間後に動物を屠殺し、各動物の大腿骨から骨髓を採取してSchmidの方法を用いて検査用の塗抹標本作製した。標本を染色後、光学顕微鏡を用いて評価した。各動物につき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数を計測した。同時に正染性赤血球数も計測した。

用量設定の根拠：

試験結果：

1) 一般症状

全ての用量で屠殺時まで次のような検体に関連した症状が認められた：無気力、粗毛、体重減少、痙攣、伸張性痙攣、呼吸困難。死亡は認められなかった。対照群では何の症状も認められなかった。

2) 突然変異誘発性

骨髓標本の観察結果を表に示した。

小核を有する多染性赤血球の発現頻度に関して、陰性対照群と検体腹腔内投与群の間に生物学的に重要あるいは統計学的に有意な差は認められなかった。

陽性対照であるシクロホスファミドは、小核を有する多染性赤血球数を溶媒対照群に比べ統計学的に有意に増加させた。

尚、多染性赤血球に対する正染性赤血球数の割合は、対照群に比較して検体投与に関連して変化した。シクロホスファミドはこの割合に変化がなかった。

投与群	評価した多染性赤血球総数	2000個の多染性赤血球あたりの正染性赤血球数	小核を有する細胞数	
			2000個の正染性赤血球あたり	2000個の多染性赤血球あたり
陰性対照 0.5%クレオール水溶液	10000	2356 ± 929	4.2 ± 2.4	2.8 ± 1.1
検体 150mg/kg × 2回	10000	2085 ± 1217	2.9 ± 3.1	1.8 ± 0.8
検体 300mg/kg × 2回	10000	3523 ± 1189	0.9 ± 0.3	3.8 ± 1.3
検体 600mg/kg × 2回	10000	4948* ± 1782	2.1 ± 1.8	5.0 ± 2.9
陽性対照 シクロホスファミド	10000	1815 ± 614	3.4 ± 2.0	14.4** ± 5.2

Wilcoxonの順位和検定で有意差あり (*: p<0.05, **: p<0.01)

平均 ± SD

結論：

以上の結果から、検体の腹腔内投与により、骨髓多染性赤血球に用量に依存した小核増加は認められなかったことから、検体の染色体異常誘発性は陰性と判断される。

(6) ラット肝細胞を用いた不定期DNA合成試験

(資料No. 原体-32)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 2000年

検体の純度:

試験動物: SDラット、雄6週齢、体重140~160g、1群各4匹 (予備として1~2匹追加)
陽性対照各2匹 (予備として1~2匹追加)

試験方法:

本試験の投与量を600及び2000mg/kgと設定した。

溶媒として1%メチルセルロース水溶液、陽性対照としてジメチルニトロソアミン (DMN) 4mg/kg を2時間目の発現用に、2-アセチルアミノフルオレン (2AAF) 50mg/kgを14時間目の発現用に投与した。

検体を1群各4匹に、陽性対照を1群各2匹に1回強制経口投与した。各動物には10ml/kgの容量を投与した。投与後2及び14時間に、肝細胞を酵素分離法で分離採取した。分離した肝細胞をカバーグラスに付着させ、 $10\mu\text{Ci/ml}$ のメチル ^3H チミジンで4時間培養した。その後非標識チミジンで24時間追処理し、固定し、オートラジオグラフを作成、D19で現像しヘマトキシリン染色をした。

1動物当たり3培養を検査した。

本試験法の原理は、変異原性物質によるDNA損傷部位が除去されて新たに合成されたDNAで置換される除去修復の過程を細胞の核のDNAに取り込まれた ^3H チミジンの量を核上の粒子数を測定することによって定量することである。すなわち、1培養当たり50個の核上の粒子と対応する各細胞の細胞質内の粒子を計数し、核上の総粒子数から細胞質内を含む総粒子数を差し引き、これを正味核粒子数とし、対照群、投与群のそれぞれについて比較、評価を行った。

試験結果: 結果を次頁に示す。

2時間及び14時間暴露後の検体の各投与群の正味核粒子数は溶媒対照群と同様で増加は認められなかった。

陽性対照群では、総核粒子数の増加を伴う正味核粒子数の有意な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において検体はラット肝細胞において不定期DNA合成を誘発せず、陰性と判断された。

結果

暴露時間	薬物	投与量 (mg/kg)	総核上粒子数 [A]	細胞質粒子数 [B]	正味核粒子数 [A]-[B]
2	溶媒対照 1%メチルセルロース溶液	—	14.9	23.6	-8.7
	検体	600	13.1ns	20.5	-7.4ns
		2000	12.8ns	20.6	-7.8ns
	陽性対照 ジメチルニトロソアミン	4	45.7***	13.7	32.0***
14	溶媒対照 1%メチルセルロース溶液	—	16.2	24.8	-8.6
	検体	600	13.4ns	23.4	-10.0ns
		2000	16.7ns	27.1	-10.4ns
	陽性対照 2-アセチルアミノフルオレン	50	41.9***	13.4	28.6***

・ 数値は3反復の平均値

・ 一部に数値の丸めによる最大で0.1の誤差がある。

*** : P<0.001、ns : P>0.01 有意差なし (Studentのt検定及び分散分析)

14. 生体機能への影響に関する試験
フルオピコリドにおける薬理試験

(資料No. 原体-33)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 2004年

検体の純度:

用量設定根拠:

1. 中枢神経系に対する作用

1) ラットにおける一般状態

試験動物: SD系ラット、雄、約7週齢、体重223~238g、1群各5匹

方法: 検体を1%メチルセルロース水溶液中に懸濁し200、600、2000mg/kgの用量を経口投与し、投与前、15、30、60、120、180分後及び24時間後に一般症状をIrwinの多次元観察法により観察した。対照群のラットには溶媒のみを投与した。

結果: 対照群及び投与群ともいずれの観察項目にも異常は認められなかった。200mg/kg群で排尿数の増加が投与後120分にみられたが、用量に関連性のない変化であり、投与の影響とは考えなかった。

2) マウスにおける自発運動量に及ぼす影響

試験動物: ICRマウス、雄、約7週齢、体重26.8~31.6g、1群各5匹

方法: 検体を1%メチルセルロース水溶液中に懸濁し、200、600、2000mg/kgの用量を経口投与し、投与前30分及び投与直後から投与後180分まで継続して自発運動量を自発運動量測定装置で測定した。30分毎に自発運動量を集計した。

結果: いずれの集計時間においても対照群との差は認められなかった。

3) マウスにおける痙攣誘発作用

試験動物：ICRマウス、雄、約7週齢、体重28.5～31.5g、1群各5匹

方法：検体を1%メチルセルロース水溶液中に懸濁し、200、600、2000mg/kgの用量を経口投与し、投与後60分に両耳介より小型動物用電撃刺激装置を用いて10mAを0.8秒間通電した。

電撃刺激後に発現する後肢の痙攣及び死亡の有無を観察した。

結果：

投与群(mg/kg)	0	200	600	2000
間代性痙攣	5	5	5	5
強直性屈曲痙攣	3	4	1	3
強直性伸展痙攣	2	2	1	3
死亡	0	0	0	0

いずれの観察項目においても対照群と差は認められなかった。

4) ラットを用いた正常体温に及ぼす影響

試験動物：SDラット、雄、約7週齢、体重203～231g、1群各5匹

方法：検体を1%メチルセルロース水溶液中に懸濁し、200、600、2000mg/kgの用量を経口投与し、投与前、投与後30、60、120、180分にデジタル温度計で直腸温を測定した。

結果：対照群の体温は投与前の $37.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ から投与後180分までに $37.3 \pm 0.1 \sim 38.4 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ で、いずれの測定時間においても投与群は対照群と差は認められなかった。

2. 呼吸・循環器系に対する作用

1) 麻酔ウサギの呼吸数、血圧、心拍数及び心電図の測定

試験動物：New Zealand Whiteウサギ、雄、約16週齢、体重2.7～3.1kg、1群各4匹

方法：検体を1%メチルセルロース水溶液中に懸濁し、200、600、2000mg/kgの用量を経口投与した。投与前、投与後15、30、60、120、180分に各パラメーターを測定記録した。

結果：呼吸数、血圧、心電図の各測定において、いずれの投与群でも実測値、変化値に差は認められず投与の影響は認められなかった。心拍数が2000mg/kgで、投与後180分の実測値に有意な減少が認められたが、変化値に差は認められず投与の影響とは考えなかった。

3. ラットを用いた腎機能に対する作用

1) 尿量、尿中電解質及び尿浸透圧の測定

試験動物：SDラット、雄、約7週齢、体重190～229g、1群各5匹

方法：生理食塩液を体重100g当たり2.5mlの割合で経口投与し、その後検体を1%メチルセルロース水溶液中に懸濁し、200、600、2000mg/kgの用量を経口投与した。投与後6時間まで採尿し、尿量、尿浸透圧、ナトリウム、カリウム、塩素について検査した。

結果：

投与群(mg/kg)	0	200	600	2000
尿量 (ml/6h)	4.1	2.7	2.8*	2.4
ナトリウム (mmol/6h)	0.39	0.24	0.29	0.28
カリウム (mmol/6h)	0.13	0.08	0.13	0.10
塩素 (mmol/6h)	0.44	0.40	0.31	0.32
尿浸透圧 (mOsm/kg)	550	464	770*	744

*：P≤0.05 Fisherの直接確率検定

600mg/kg群で尿量の減少及び浸透圧の増加が認められた。2000mg/kg群では統計学的有意差は認められなかったものの尿量の減少傾向、尿浸透圧の増加傾向がみられ、600mg/kg群以上では機序は不明であるが投与の影響と考えられた。

4. ラットを用いた自律神経系に対する作用

1) 瞳孔径の測定

試験動物：SDラット、雄、約7週齢、体重202～222g、1群各5匹

方法：検体を1%メチルセルロース水溶液中に懸濁し、200、600、2000mg/kgの用量を経口投与し、投与前、投与後30、60、120、180分にデジタルノギスで瞳孔径を測定した。

結果：いずれの投与群でも投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、検体は投与後、症状、中枢神経系、呼吸・循環器系及び自律神経系に影響を及ぼさないことが明らかになった。腎機能に対しては、600mg/kg群以上で尿量の減少及び尿浸透圧の増加が認められ、機序は不明であるが投与の影響と考えられた。

フルオピコリドの生体の機能に及ぼす影響に関する試験の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系に及ぼす影響						
一般状態 [Irwin法] ラット	経口	0 200 600 2000	雄5	2000	>2000	いずれの投与群にも影響は認められなかった。
自発運動量 マウス	経口	0 200 600 2000	雄5	2000	>2000	いずれの投与群にも影響は認められなかった。
痙攣誘発 (電撃痙攣) マウス	経口	0 200 600 2000	雄5	2000	>2000	いずれの投与群にも影響は認められなかった。
体温 (直腸温) ラット	経口	0 200 600 2000	雄5	2000	>2000	いずれの投与群にも影響は認められなかった。
呼吸・循環器系に及ぼす影響						
呼吸 血圧 心拍数 心電図 ウサギ (麻酔下)	経口	0 200 600 2000	雄4	2000	>2000	呼吸数、血圧、心電図は実測値、変化値とも投与の影響は認められなかった。 心拍数が2000mg/kgで、投与後180分の実測値に有意な減少が認められたが、変化値に差は認められず投与の影響とは考えなかった。
腎機能に及ぼす影響						
尿量 電解質 ラット	経口	0 200 600 2000	雄5	200	>600	600mg/kg群以上で尿量の減少傾向及び尿浸透圧の増加傾向が認められた。
自律神経系に及ぼす影響						
瞳孔径 ラット	経口	0 200 600 2000	雄5	2000	>2000	いずれの投与群にも影響は認められなかった。

15. その他

(1)

(資料No. 原体-34)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2004年

検体純度：

試験動物：

試験期間：

試験方法：

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；

体重変化；

平均体重及び増加量を下表に示す。

性					
投与群 (ppm)					
検査時期 (日)					
平均体重 (g)					
(%)					
平均体重増加量 (g)					

↑ ↓ : P<0.05、||| : P<0.01 (F検定、t検定)

摂餌量；

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

検体摂取量： の平均検体摂取量は(mg/kg/日)は以下の通りであった。

投与群(ppm)

剖検/臓器重量；

群		
検査動物数		

↑ ↓ : P<0.05、|||| : P<0.01 (Mann-Whitney 検定)

病理組織学的検査；

群			
検査動物数			

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

** : $P < 0.01$ (Mann-Whitney 検定)

** : $P < 0.01$ (Mann-Whitney 検定)

申請者注 :

性									
投与群 (ppm)									
検査動物数									

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

* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$ (Mann-Whitney 検定)

(2)

(資料No. 原体-35)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2004年

検体純度：

試験動物：

試験期間：

試験方法：

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；

体重変化；投与日及び毎週測定した。

平均体重(g)及び累積増加量(g)を下表に示す。

	性	雄					雌				
	検査時期 (日)										
平均 体重(g) (%)											
累積増加 量(g)											

* : P<0.05、** : P<0.01 (F検定、t検定)、() は対照値に対するパーセント

平均体重(g)及び累積増加量(g)を下表に示す。

	性	雄					雌				
	検査時期 (日)										
平均 体重(g) (%)											
累積増加 量(g)	対照群										

* : P<0.05、** : P<0.01 (F検定、t検定)、() は対照値に対するパーセント

摂餌量；毎週測定した。

剖検/臓器重量；

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

群							
検査動物数							
性							
最終体重							

↑ ↓ : $P < 0.05$ 、|||| : $P < 0.01$ (F検定、t検定、Mann-Whitney 検定)

病理組織学的検査；

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

検査時期								
性								
投与群(mg/kg/日)								
検査動物数								

検査時期								
性								
投与群(mg/kg/日)								
検査動物数								

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

性							
検査動物数							
検査領域							
検査動物数							
検査領域							

* : $P \leq 0.05$ 、** : $P \leq 0.01$ (Mann-Whitney 検定)

検査動物数 :

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

	群					
雄						
雌						

* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$ (Mann-Whitney 検定)、() : 対照群に対する%

:
:
:
:

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

(3)

(資料No. 原体-36)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2006年

検体純度：

試験動物：

試験期間：

試験方法：

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；

体重変化；

摂餌量；

検体採取量；

検査時期								
性								
投与群 (mg/kg、ppm)								

↑ ↓ : P<0.05、|||| : P<0.01 (F検定、t検定)

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

;

* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$ (Mann-Whitney 検定)、 () : 対照群の値に対する%

⋮
⋮
⋮
⋮
⋮

2. 原体中代謝物を用いた試験成績

(1) 植物および土壌の主要代謝物M1のラットを用いた急性経口毒性試験-1

(資料No.混・代-1)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2003年

検体の純度：

試験動物：Wistarラット、雌雄各3匹、8～13週齢、体重 雄194～224g、雌165～186g

試験期間：14日間観察

試験方法：試験はOECDガイドライン423に準拠した。

検体を2% Cremophor ELに懸濁し、初めに300mg/kgの用量を雌雄各3匹に経口投与した。死亡例は認められないことから、2回目に別の雌雄各3匹に同投与量を投与した。死亡例は認められなかった。別の雌雄各3匹に2000mg/kgの用量を経口投与した。雄で2例死亡が認められたことから、雄3匹に2000mg/kgの用量を再度経口投与した。

観察項目：外観、行動および死亡の有無を毎日1回、14日間観察した。

体重を投与直前、投与8日目及び15日目に測定した。

死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂ ♀ 300、2000
LD50値 (mg/kg)	♂ 2000 ♀ 500
死亡開始時間 及び終了時間	♂ 2000mg/kg1回目試験 6日目 ♀ 2000mg/kg1回目試験 6時間目～3日目
症状発現及び 消失時間	10分 8日目

300 mg/kg投与では雌雄に運動性の低下、協調運動失調性歩行、眼瞼狭小が認められた。死亡例は認められなかった。

2000 mg/kg投与では雌雄に腹臥位、側臥位、運動性の低下、反射性低下、反応性低下、痙攣、協調運動失調性歩行、喘ぎ呼吸、頻呼吸、色素涙、流涙/流涙の増加、眼瞼閉鎖、眼瞼狭小、立毛が認められた。

雄では2匹、雌では全3匹が死亡した。

雄の2回目の2000mg/kg投与では、死亡は認められなかった。

300 mg/kg群では、体重及び体重増加量に毒性学的影響は認められなかった。

2000 mg/kg群では、体重及び体重増加量に減少が認められた。

死亡動物の肉眼的観察では肝臓及び脾臓に蒼白下化が認められた。

試験終了時に行った剖検では異常所見は認められなかった。

(1) 植物および土壌の主要代謝物M1のラットを用いた急性経口毒性試験-2

(資料No.混・代-2)

試験機関：

報告書作成年：1967年

検体の純度：

試験動物：Wistarラット、雌雄1群各5匹

試験期間：14日間観察

試験方法：検体を1%W/Vトラガカントゴム水溶液に懸濁し、投与容量10mL/kgで強制経口投与した。

観察項目：外観、行動および死亡の有無を毎日1回、14日間観察した。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂ ♀ 1000、2150、4640、10000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 1470 (951~2270) ♀ 2330 (1430~3780)
死亡開始時間 及び終了時間	3時間 3日
症状発現及び 消失時間	10分 24~28時間
死亡例の認められなかつた 最高投与量 (mg/kg)	♂ - ♀ 1000

雌雄の生存例では活動性低下、四肢弛緩、立直り反射消失（角膜反射は認める）、縮瞳、浅速呼吸が認められた。死亡例は1000、2150、4640及び10000mg/kgで雄では各1、4、5及び5例、雌では各0、3、4及び5例認められた。

(2) 植物および土壌の主要代謝物M1のラットを用いた混餌投与による90日間反復経口投与毒性試験

(資料No.混・代-3)

試験機関:

報告書作成年: 1967年

検体の純度:

試験動物: ウィスター系ラット、1群雌雄各10匹、

試験期間: 13週間

試験方法: 検体を飼料に50、180、600及び2300ppmの濃度で混入し、13週間にわたり自由摂取させた。対照群には無処理の飼料を与えた。

投与量設定根拠:

試験項目:

動物は毒性徴候について毎日観察した。体重及び摂餌量は毎週測定した。筋緊張への影響を試験期間中4つの間隔で測定した。血液及び尿の臨床検査は試験期間を通して定期的に実施した。試験終了時には肝でのbromosulphthaleinクリアランス (BSP検査) 及び血液凝固時間も測定した。臓器重量を測定し、肉眼的及び病理組織学的に検査した。また、肝のグリコーゲン量も測定した。

結果:

死亡及び一般症状:

検体投与に関連した死亡は認めなかった。臨床症状としては雌の600及び2300ppm群でのみ脱毛が認められた。

体重及び摂餌量:

摂餌量、体重増加量は雄2300ppm、雌600ppm以上で低下した。2300ppmの平均体重は2週から試験終了まで低かった。雌雄2300ppm及び雌600ppm群の体重増加量は試験期間を通して有意に低かった。

雄600ppm、雌雄180及び50ppmでは投与に関連した体重及び摂餌量の変化は認めなかった。

表. 平均体重増加量及び摂餌量

2-11週	投与量 (ppm)									
	雄					雌				
	0	50	180	600	2300	0	50	180	600	2300
平均体重増加量(g) (対照に対する%)	159	165	152	146	111 (70)	66	69	67	54 (82)	46 (70)
平均摂餌量(g) (対照に対する%)	1311	1344	1297	1255	1103 (84)	980	1010	1010	907 (93)	814 (83)

|| : P < 0.01 (Wilcoxon検定)

検体摂取量; 平均検体摂取量 (mg/kg/日) は以下の通りであった。

投与群 (ppm)	50	180	600	2300
雌雄	4	14	49	172

筋緊張；

雌雄2300ppm及び600ppmの骨格筋緊張が有意に低下した。

表. 試験中の平均筋弛緩スコア

日	投与量 (ppm)									
	雄					雌				
	0	50	180	600	2300	0	50	180	600	2300
4日	4	7	6	17*	27*	10	7	19	17	30*
21日	5	6	13	16	34*	10	7	8	13	13*
91日	6	11	11	10	34*	7	2	9	21*	25*
92日	7	11	11	16	36*	6	6	10	23	27*

*: P<0.05 (Wilcoxon検定)

血液学的検査；

血液凝固時間が雌雄2300ppmで有意に遅延した。その他、血液学的検査項目に投与に関連する変化を認めなかった。

表.血液凝固時間(統計学的に有意な項目)

日	投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	50	180	600	2300	50	180	600	2300
トロンボテスト時間 (秒)	66	-	-	52	56	-	-	49

|: P<0.05, ||: P<0.01 (Wilcoxon検定)

血液生化学的検査；

最終屠殺時の雌雄2300ppm投与群で総蛋白、コレステロール及び血液尿素窒素が有意(雌の総蛋白を除く)に高かった。また、雄600ppmでも血液尿素窒素が高かった。180及び50ppm投与では投与に関連した変化を認めなかった。

表.平均血液生化学的検査(最終屠殺時:統計学的に有意な項目)

日	投与量 (ppm)							
	雄				雌			
	50	180	600	2300	50	180	600	2300
総蛋白				111				(106)
コレステロール				135				140
血液尿素窒素			(128)	155				131

||: P<0.01 (Wilcoxon検定)

数値は対照を100とした場合の値

()内は参考として示した。(有意差なし)

尿検査；

投与に関連した変化を認めなかった。

臓器重量；

投与に関連した変化を認めなかった。

剖検及び病理組織学的検査；

投与に関連した変化を認めなかった。

以上、代謝物M1を雌雄のラットに13週間混飼投与した結果、600ppm以上の投与群で体重増加量及び摂餌量が減少し、筋緊張の低下が認められた。

従って、代謝物M1の無毒性量は雌雄180ppm（雌雄14mg/kg/日）と判断された。

(3) 植物および土壌の主要代謝物M1のラットを用いた混餌投与による2年間反復経口投与毒性試験

(資料No. 混・代-4)

試験機関:

報告書作成年: 1971年

検体純度:

供試動物: SD系ラット 1群雌雄各35匹

投与期間: 106週

投与方法: 検体を60、100、180及び500ppmの濃度で飼料に混合し、自由摂取させた。

検体を混合飼料は毎週調製した。対照群には無処理の飼料を与えた。

用量設定根拠:

観察・検査項目及び結果

一般状態及び死亡率; 一般状態及び生死を観察し記録した。

投与に関連した一般状態の変化及び死亡は認められなかった。

体重変化; 投与開始日、投与開始後毎週測定した。

最終体重が雌雄500ppmで有意に低く、平均体重増加量が対照群に比して雄で17%、雌で27%低かった(いずれも有意差なし)。180ppm以下の群では雌雄共に変化を認めなかった。下表に最終屠殺時の体重を示した。

性	雄					雌				
	0	60	100	180	500	0	60	100	180	500
投与群 (ppm)										
平均体重 (g)	792	759	740	766	↓ 686 (87)	616	580	572	533	489 (79)
平均体重増加量 (g)	601	566	549	576	501 (83)	459	422	414	376	335 (73)

↓: P<0.05、||: P<0.01、Student-t検定

()内の数値は対照群の値に対するパーセント

摂餌量; 毎週摂餌量を測定した。

500ppm群雌の摂餌量が対照群に比べてわずかに低かった(有意差なし)。

性	雄					雌				
	0	60	100	180	500	0	60	100	180	500
投与群 (ppm)										
平均摂餌量 (g)	175	174	179	169	169	170	180	163	178	146 (86)

Student-t検定

()内の数値は対照群の値に対するパーセント

検体摂取量; 投与期間中の平均検体摂取量 (mg/kg/日) は以下のとおりであった。

投与群 (ppm)		60	100	180	500
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	2.0	3.5	5.7	17.6
	雌	2.7	4.1	8.6	21.3

血液学的検査；投与後13、26、39、52及び103週目に対照群雌雄各10匹及び500ppm群雌雄各5匹について、眼窩後静脈叢から採血し、以下の項目を検査した。

また180ppm投与群について26及び103週に実施し、雄のみ39週にも実施した。

ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球数、白血球数、白血球百分率、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)。

最終屠殺500ppm群において雌雄でヘモグロビンのわずかな低値が認められ、雄では雌よりもその程度がやや強く、雄のみで統計学的に有意差がみられた。雄ではさらにヘマトクリット（有意差あり）及び赤血球数（有意差なし）のわずかな低値が認められた。180ppmでは雌雄共に投与に関連した有意な変化を認めなかった。

最終屠殺時の血液学的検査結果を下表に示す。

性	雄				雌			
	60	100	180	500	60	100	180	500
投与群 (ppm)	60	100	180	500	60	100	180	500
ヘモグロビン	-	-	-	↓91	-	-	-	(95)
ヘマトクリット	-	-	-	↓89	-	-	-	-
赤血球数	-	-	-	(94)	-	-	-	-

↓：P<0.05、Student-t検定（ ）内は参考値（有意差なし）

数値は対照を100とした場合の値

-未実施

血液生化学検査；投与後13、26、39、52及び103週目に対照群及び500ppm群の雌雄各5匹について、眼窩後静脈叢から採血し、以下の項目を検査した。

尿素、血糖、アルカリホスファターゼ(ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、ナトリウム、カリウム、総タンパク、A/G比。

投与に関連した変化は認めなかった。

尿検査；投与後13、26、52及び103週目に各群から雌雄各5匹について一晩採尿し、以下の項目を検査した。

pH、比重、蛋白、還元物質、糖、ケトン体、ビリルビン、胆汁酸塩、ウロビリ、尿沈渣。

投与に関連した変化を認めなかった。

眼科学的検査；投与0、13、26、52及び104週目に対照群及び500ppm群の全動物について眼科学的検査を実施した。

投与に関連のある変化は認められなかった。

臓器重量；投与終了時に全生存動物について剖検し、以下の臓器重量を測定した。また、対体重比も求めた。

副腎、下垂体、脳、脾臓、心臓、精巣、腎臓、甲状腺、肝臓、子宮、卵巣。

投与に関連のある変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；投与終了時の全生存動物について剖検を行なった。

投与に関連した変化は認められなかった。

病理組織学的検査；全動物から以下の臓器及び組織を採取し、4%緩衝ホルマリン液中に固定、パラフィン包埋し病理組織標本を作成した。（眼球はダビドソン固定液で固定）

肝臓及び腎臓については凍結切片を作製しオイルレッドOで染色した。

死亡例ならび最終屠殺例500ppm群全例、対照群（雄7例、雌8例）を病理組織学的検査した。また、中間投与群各10例の肝臓についても検査した。

副腎、心臓、膵臓、脾臓、下垂体、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、脳、腎臓、精巣、肝臓、唾液腺、胸腺、肺、甲状腺（上皮小体含む）、リンパ節、眼球、膀胱、卵巣、子宮、大動脈*、前立腺*、盲腸*、坐骨神経*、精囊*、舌*、食道*、骨格筋*、大腿骨*、皮膚*及び肉眼的異常組織。

* 臓器の固定保存のみ。

大腿骨髄の塗抹標本を作製し、メチルアルコールで固定した。

非腫瘍性病変

検体投与に関連する所見は500ppmの雌においてのみ認められ、肝細胞の空胞化や脂肪沈着、変性が認められた。

腫瘍性病変

500ppm群雌で肝癌の発生がわずかに多かった（統計学的有意差なし）。

対照群を含めて他にも病理組織学的所見が認められたが、その頻度は使用した動物の週齢及び系統で認められるもので投与に関連したものとは思われなかった。

最終屠殺時に肝臓に認めた主な非腫瘍性ならびに腫瘍性病変を表に示した。

性	雄					雌				
	0	60	100	180	500	0	60	100	180	500
投与群 (ppm)	0	60	100	180	500	0	60	100	180	500
肝臓の検査数	7	10	10	10	15	8	10	10	10	20
肝細胞 空胞化/脂肪沈着/変性	0	1	1	0	1	0	3	0	2	9
肝癌	1	0	1	0	1	0	0	0	0	4

肝臓の病理組織学的変化について、パラフィンブロックから再薄切した病理標本を元に再評価を実施した。

非腫瘍性病変（再評価）

雌雄において100、180及び500ppm群で好酸性細胞あるいは好塩基性肝細胞が巣状及び/または領域性に増加し、雌でより顕著であった。加えて、500ppm群の雌雄で小葉中心に肝細胞の空胞化が増加しており、何例かの動物では巣状/領域性の好酸性肝細胞と関連していた。

再検査した肝の主な非腫瘍性所見を表に示した。

再検査による肝の主な非腫瘍性所見

性	雄					雌				
	0	60	100	180	500	0	60	100	180	500
投与群 (ppm)	0	60	100	180	500	0	60	100	180	500
肝臓の検査数	26	28	32	25	34	25	28	28	32	35
好酸性細胞/巣状	6	12	17	11	21	5	4	7	↑16	23
好酸性細胞/領域	1	3	0	2	4	2	2	1	5	18
好塩基性細胞/巣状	7	11	5	6	9	9	10	6	14	↑23
肝細胞空胞化 (小葉中心)	5	7	10	5	↑16	5	7	5	8	11

↑ : P<0.05、|| : P<0.01、Fisherの直接確率検定

腫瘍性病変 (再評価)

雄では肝細胞腫瘍の増加は認めなかった。

雌500ppm群で肝細胞腺腫の発生が35例中5匹に認められ、対照群に比べてわずかに多かったが有意差は認められなかった。雌では肝細胞癌は対照群を含むいずれの投与群でも認められなかった。

再検査した肝の腫瘍性所見を表に示した。

再検査による肝の腫瘍性所見

性	雄					雌				
	0	60	100	180	500	0	60	100	180	500
投与群 (ppm)	0	60	100	180	500	0	60	100	180	500
肝臓の検査数	26	28	32	25	34	24	28	27	32	35
肝細胞腺腫	1	0	1	0	1	0	1	0	0	5
肝細胞癌	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0

Fisherの直接確率検定

以上、代謝物M1を雌雄のラットに2年間混餌投与した結果、500ppm群の雌雄で体重増加抑制、ヘモグロビン低下がみられ、雄ではさらにヘマトクリット、赤血球数の低値を認めた。500ppm群の雌雄では肝臓に組織学的変化が認められた。従って、無毒性量は雌雄とも180ppm (雄 5.7mg/kg/日、雌 8.6mg/kg/日) と判断された。最高濃度500ppmでも代謝物M1の発がん性は認められなかった。

(4) 植物および土壌の主要代謝物M1の細菌を用いた復帰変異性試験-1

(資料No.混・代-5)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 2003年

検体の純度:

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及びTA102) を用い、S-9mixの存在下及び非存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。
検体をDMSOに溶解し、16~5000 μ g/プレートの範囲の6濃度で実施した。
試験は3連制とし、2回行った。

用量設定根拠:

陽性対照としてS-9mixの非存在下では、アジ化ナトリウム(NaAz)、nitrofurantoin (NF)、4-Nitro-1,2-phenylene diamine(4-NPDA)、Mitomycin C(MMC)、Cumene hydroperoxide(Cumene) S-9mixの存在下では、2-aminoanthracene (2-AA) を用いた。

試験結果: 次頁に結果の表を示す。

検体はサルモネラ菌を用いて行った2回の試験ともS-9mixの有無にかかわらずいずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照ではいずれも顕著な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、検体は代謝活性化を含む本試験条件下でサルモネラ菌に対し、復帰変異誘発性は有さないものと判断された。

試験1.

(平均値：n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
溶媒対照(DMSO)		-	131	17	226	14	8	
検体	16	-	129	17	226	15	7	
	50		130	17	237	14	6	
	158		145	17	215	19	6	
	500		144	14	215	14	6	
	1581		158	18	186	14	7	
	5000		138	21	196	13	6	
陽性対照	NaAz	10		645				
	NF	0.2	331					
	4-NPDA	0.5			143			
	4-NPDA	10					85	
	MMC	0.2			531			
溶媒対照(DMSO)		+	136	10	267	24	9	
検体	16	+	153	11	262	31	9	
	50		153	9	241	26	10	
	158		149	8	277	31	8	
	500		153	9	261	28	10	
	1581		163	9	268	28	10	
	5000		165	9	277	31	11	
陽性対照	2-AA	3	+	1385	210	509	1080	379

- NaAz : アジ化ナトリウム
 NF : Nitrofurantoin
 4-NPDA : 4-Nitro-1,2-phenylene
 MMC : Mitomycin C
 Cumene : Cumene Hydroperoxide
 2-AA : 2-aminoanthracene

試験2.

(平均値 : n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
溶媒対照(DMSO)		-	161	11	253	18	8	
検体	16	-	153	13	256	26	6	
	50		154	12	263	21	6	
	158		144	14	245	22	9	
	500		147	12	248	25	4	
	1581		147	11	239	24	9	
	5000		130	14	214	19	5	
陽性対照	NaAz	10		674				
	NF	0.2	514					
	4-NPDA	0.5			147			
	4-NPDA	10					126	
	Cumene	50			526			
溶媒対照(DMSO)		+	187	9	278	34	12	
検体	16	+	182	9	248	30	8	
	50		184	7	291	37	10	
	158		179	8	275	35	10	
	500		197	9	299	32	10	
	1581		210	9	278	39	10	
	5000		195	9	259	42	13	
陽性対照	2-AA	3	+	1421	165	425	1164	291

- NaAz : アジ化ナトリウム
 NF : Nitrofurantoin
 4-NPDA : 4-Nitro-1,2-phenylene
 MMC : Mitomycin C
 Cumene : Cumene Hydroperoxide
 2-AA : 2-aminoanthracene

(4) 植物および土壌の主要代謝物M1の細菌を用いた復帰変異性試験-2

(資料No.混・代-6)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 1992年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98及びTA100) を用い、S-9mixの存在下及び非存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。(TA1538は1回目の試験で自然突然変異頻度が増加したので2回目試験では用いず、本報告に含めていない。) 検体をDMSOに溶解し、625、1250、2500及び5000 μ g/プレートの濃度で実施した。

試験は3連制とし、2回行った。

用量設定根拠:

陽性対照としてS-9mixの非存在下では、sodium azide、4-Nitro-o-phenylene diamine、S-9mixの存在下では、2-aminoanthracene (2-AA) を用いた。

試験結果: 次頁に結果の表を示す。

検体はサルモネラ菌を用いて行った2回の試験ともS-9mixの有無にかかわらずいずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照ではいずれも顕著な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、検体は代謝活性化を含む本試験条件下でサルモネラ菌に対し、復帰変異誘発性は有さないものと判断された。

試験1.

(平均値 : n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照(DMSO)		-	89	20	28	9
検体	625	-	88	21	31	7
	1250		90	17	26	9
	2500		107	17	29	12
	5000		106	26	23	7
陽性対照 NaAz 4-NPDA	5	-	544	431		
	100				608	223
溶媒対照(DMSO)		+	88	14	31	9
検体	625	+	83	15	28	12
	1250		106	14	30	7
	2500		94	10	29	11
	5000		85	12	27	12
陽性対照 2-AA	2	+	1159	68	974	91

NaAz : sodium azide

4-NPDA : 4-Nitro-o-phenylene diamine

2-AA : 2-aminoanthracene

試験2.

(平均値 : n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート			
			塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照(DMSO)		-	168	31	35	8
検体	625	-	142	27	33	7
	1250		142	22	21	8
	2500		161	35	41	6
	5000		146	26	37	6
陽性対照 NaAz 4-NPDA	5	-	518	501		
	100				408	161
溶媒対照(DMSO)		+	162	26	39	9
検体	625	+	200	26	32	5
	1250		217	20	41	6
	2500		177	21	37	6
	5000		157	23	29	9
陽性対照 2-AA	2	+	1072	102	673	107

NaAz : sodium azide

4-NPDA : 4-Nitro-o-phenylene diamine

2-AA : 2-aminoanthracene

(5) 植物および土壌の主要代謝物M1のV79細胞を用いたHPRT試験

(資料No.混・代-7)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 2003年

検体の純度:

試験方法: V79細胞(チャイニーズハムスター肺細胞)を用い、S-9mixの存在下及び非存在下でHPRT前進突然変異原性を検定した。

検体をDMSOに溶解し、125、250、500、1000、3000及び5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で実施した。試験は2回行った。

用量設定根拠:

陽性対照としてS-9mixの非存在下では、メタンスルホン酸エチル(EMS)を、S-9mixの存在下では、ジメチルベンゾアントラセン(DMBA)を用いた。

試験結果: 次頁に結果の表を示す。

代謝活性化条件の有無に係わらず、検体処理による変異コロニー出現頻度の上昇は認められなかった。

陰性対照における平均変異体出現頻度はいずれも正常な範囲内であった。

各試験の濃度3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で検体の沈殿が観察された。

陽性対照のEMS(代謝活性化無し)およびDMBA(代謝活性化有り)では、いずれも変異コロニーの顕著な増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で変異原性を示さないと考えられる。

試験1. (代謝活性化なし)

(平均値 : n=2)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S-9 mix	相対生存率 (%)	変異頻度 / 10^6 細胞
溶媒対照(DMSO)	0	—	100	0.50
無処理対照	0	—	87.4	1.70
検体	125	—	94.1	1.95
	250		109.6	0.85
	500		72.4	0.70
	1000		101.3	1.75
	3000P		81.2	0.65
	5000P		78.3	2.45
陽性対照 EMS	900	—	17.9	508.95
溶媒対照(DMSO)	0	—	100.0	1.70
無処理対照	0	—	95.3	2.85
検体	125	—	84.45	0.25
	250		100.9	0.75
	500		75.6	3.65
	1000		77.6	2.65
	3000P		93.2	1.85
	5000P		74.6	3.05
陽性対照 EMS	900	—	10.5	412.9

EMS : メタンスルホン酸エチル

P : 沈殿

試験2. (代謝活性化あり)

(平均値 : n=2)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S-9 mix	相対生存率 (%)	変異頻度 / 10^6 細胞
溶媒対照(DMSO)	0	+	100.0	0.80
無処理対照	0	+	120.5	0.80
検体	125	+	96.6	0.50
	250		133.1	0.25
	500		115.6	1.10
	1000		92.1	0.75
	3000P		110.1	0.35
	5000P		115.7	0.55
陽性対照 DMBA	20	+	30.9	32.65
溶媒対照(DMSO)	0	+	100.0	2.85
無処理対照	0	+	132.8	1.10
検体	125	+	107.7	0.00
	250		116.5	4.80
	500		110.5	4.90
	1000		83.7	1.45
	3000P		77.5	2.10
	5000P		78.8	9.30
陽性対照 DMBA	20	+	93.3	65.35

DMBA : ジメチルベンゾアントラセン

P : 沈殿

(6) 植物および土壌の主要代謝物M1のマウスを用いた小核試験

(資料No.混・代-8)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 1993年

検体の純度:

試験動物: OF-1 Swissマウス、約7週齢、1群雌雄各5匹、体重雄34~41g、雌23~29g

試験方法: 検体をコーンオイルに懸濁し、用量250mg/kg (投与容量10ml/kg) で単回経口投与した。溶媒対照にはコーンオイルのみを投与した。

陽性対照群にはシクロホスファミドを生理食塩水で調製し、用量50mg/kgで単回経口投与した。

検体投与群及び溶媒対照群は投与24、48及び72時間後、陽性対照群は投与48時間後に屠殺して採取した大腿骨より骨髓の塗抹標本を各動物につき2枚作製してライト染色し、鏡検して以下の項目をカウントした。

- 1) 多染性赤血球1000個中の小核を有する多染性赤血球数
- 2) 正染色性赤血球に対する多染性赤血球の割合

評価は、小核を有する多染性赤血球数が統計学的に有意に増加した場合を陽性と判定した。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次表に示した。

検体投与群では、対照群と比べ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。

陽性対照群のシクロホスファミドでは小核を有する多染性赤血球の有意な増加が認められた。

以上の結果、本試験条件下において、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と判断された。

試験結果 (平均値 n=5)

性	薬物	採取時間 (時間)	PCE/NCE比	MNPCE/PCE1000個	
雄	溶媒対照	24	1.01	0.4	
		48	0.96	0.8	
		72	0.97	1.0	
	代謝物M1	24	1.01	1.0	
		48	0.89	0.2	
		72	0.97	0.0	
	CP	48	0.32	16.8*	
	雌	溶媒対照	24	1.01	0.2
			48	1.03	0.4
72			1.05	0.2	
代謝物M1		24	1.00	0.6	
		48	1.04	0.4	
		72	0.96	0.2	
CP		48	0.60	8.8*	

*: P<0.05 (Wilcoxon検定)

CP:シクロホスファミド

PCE:多染性赤血球

NCE:正染性赤血球

MNPCE:小核を有する多染性赤血球

(7) 植物および土壌の主要代謝物M1のラット肝細胞を用いた不定期DNA合成試験

(資料No.混・代-9)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 1993年

検体の純度:

試験方法: 8~10週齢の雄Wistarラットから得た初代培養肝細胞を用いた。

溶媒としてDMSOを用いた。

スライド上に播種した培養細胞をトリチウム化チミジン ($^3\text{HTdR}$) ($10\mu\text{Ci}/\text{mL}$:比放射能 $18\text{-}30\text{Ci}/\text{mmol}$) を含む各濃度 (0, 3, 10, 33, 100, 333及び1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の検体に18時間暴露した。暴露後、ハンクス平衡食塩溶液 (HBSS) で洗い、メタノール3:1酢酸 (V/V) で固定し、カバーガラスで覆った。42°CのIlford K5D 乳剤に浸し、2時間室温で乾燥させた。写真乳剤に4°Cで7~14日暴露した。15°Cの現像液で4分現像し、Milli-R0水で洗い定着させた。流水で洗い、細胞をヘマトキシリン/エオジン染色した。

各スライド上の細胞50個の核上の粒子数をカウントし、隣接する細胞質上の粒子数と比較した。各濃度3連で2回試験した。

陽性対照には4-ニトロキノリン-N-オキシド (4-NQO:代謝活性化-) および7,12-ジメチルベンズアントラセン (DMBA:代謝活性化+) を用いた。

本試験法の原理は、変異原性物質によるDNA損傷部位が除去されて新たに合成されたDNAで置換される除去修復の過程を細胞の核のDNAに取り込まれた $^3\text{HTdR}$ の量を核上の粒子数を測定することによって定量することである。

すなわち、1培養当たり50個の核上の粒子と対応する各細胞の細胞質内の粒子を計数し、核上の総粒子数から細胞質内を含む総粒子数を差し引き、これを正味核粒子数とし、対照群、投与群のそれぞれについて比較、評価を行った。

試験結果: 結果を次頁に示す。

いずれの濃度でも核粒子数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では核粒子数があきらかに増加した。

以上の結果から、本試験条件下において検体は不定期DNA合成を誘発せず、陰性と判断された。

結果 (試験1)

検体	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	平均生存細胞率 (%)	平均核粒子数*
代謝物M1	0	100	2
	3	89	1
	10	78	2
	33	88	1
	100	91	1
	333	57	1
	1000P	61	0
	4-NQO	10	75
DMBA	50	50	47

数値は3反復の平均値 * 細胞質粒子数から補正

P:沈殿

結果 (試験2)

検体	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	平均生存細胞率 (%)	平均核粒子数*
代謝物M1	0	100	-5
	3	83	-5
	10	93	-7
	33	82	-5
	100	98	-6
	333	87	-6
	1000P	80	-6
	4-NQO	10	97
DMBA	50	93	146

数値は3反復の平均値 * 細胞質粒子数から補正

P:沈殿

4-NQO : 4-ニトロキノリン-N-オキシド (陽性対照 -S9mix)

DMBA : 7,12-ジメチルベンズアントラセン (陽性対照 +S9mix)

(8) 植物の主要代謝物M2のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料No.混・代-10)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2000年

検体の純度：

試験動物：SDラット、雌雄各3匹、8～11週齢、体重 雄207～232g、雌202～221g

試験期間：14日間観察

試験方法：試験はOECDガイドライン423に準拠した。

この予備試験の結果を基に本試験を行った。初めに雌雄各3匹に検体500mg/kgを経口投与した。この結果に基づき、さらに雌雄各3匹に2000mg/kgを経口投与した。

観察項目：外観、行動および死亡の有無を毎日1回、14日間観察した。

体重を投与直前、投与8日目及び15日目に測定した。

死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂♀ 500、2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	♂♀ >2000 4000未満
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び 消失時間	投与後1日目 投与後2日目
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ 2000

死亡例は認められなかった。

500mg/kg群雌雄及び2000mg/kg群雄では投与後1日目に立毛が認められた。

2000mg/kg群雌では毒性症状は認められなかった。

体重は期間中順調な増加を示した。

剖検では異常は認められなかった。

(9) 植物の主要代謝物M2のラットを用いた混餌投与による28日間反復経口投与毒性試験
(資料No.混・代-11)

試験機関：
報告書作成年：2001年

検体の純度：

試験動物：SD (Cr1: CD(SD)1GS) 系ラット、6~7週齢、1群雌雄各5匹、

試験期間：28日間

試験方法：検体を飼料に20、200、2000及び20000ppmの濃度で混入し、28日間にわたり自由摂取させた。対照群には無処理の飼料を与えた。

投与量設定根拠：

試験項目：

動物は毒性徴候について毎日観察した。体重及び摂餌量は毎週測定した。検査期間中は全ての動物について、また3週には対照及び20000ppm群について眼科学的検査を行った。試験終了時に血液学的検査、生化学的検査及び尿検査を実施した。全ての動物について剖検して予め定めた臓器重量を測定し、一連の臓器を採取して固定し、病理組織学的検査を実施した。

結果：

死亡及び一般症状：

検体投与に関連した死亡ならびに一般症状は認めなかった。

体重及び摂餌量：

体重、摂餌量は雌雄いずれの投与群においても毒性学的に意義のある影響は認めなかった。

検体摂取量；平均検体摂取量 (mg/kg/日) は以下の通りであった。

投与群 (ppm)	20	200	2000	20000
雄	1.50	15.0	149	1574
雌	1.63	15.9	162	1581

眼科学的検査：

異常は認められなかった。

血液学的検査：

毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

血液生化学的検査：

雄20000ppm投与群で無機リンが有意に低い傾向を認めたが毒性影響とは考えられなかった。

尿検査：

毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

最終体重及び臓器重量；

投与に関連した変化は認められなかった。

剖検及び病理組織学的検査；

投与に関連した変化は認められなかった。

以上、代謝物M2を雌雄のラットに28日間混飼投与した結果、最高用量20000ppmでも雌雄のいずれにも毒性影響を認めなかった。

従って、代謝物M2の無毒性量は雌雄共に20000ppm（雄：1574mg/kg/日、雌：1581mg/kg/日）と判断された。

(10) 植物の主要代謝物M2の細菌を用いた復帰変異性試験

(資料No.混・代-12)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2000年

検体の純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98及びTA100) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2uvrA/pKM101 (CM891)) を用い、S-9mixの存在下及び非存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。
検体をDMSOに溶解し、5~5000 μ g/プレートの範囲の7濃度で実施した。
試験は3連制とし、2回行った。

用量設定根拠：

陽性対照としてS-9mixの非存在下では、アジ化ナトリウム(NaAz)、9-aminoacridine(9AC)、2-nitrofluorene (NF)、2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide(AF-2)、S-9mixの存在下ではBenzo[a]pyrene(B[a]p)、2-aminoanthracene (AA) を用いた。

試験結果：次頁に結果の表を示す。

検体はサルモネラ菌及び大腸菌を用いて行った2回の試験ともS-9mixの有無にかかわらずいずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照ではいずれも顕著な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、検体は代謝活性化を含む本試験条件下でサルモネラ菌及び大腸菌に対し、復帰変異誘発性は有さないものと判断された。

試験1.

(平均値 : n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA (CM891)	TA98	TA1537
溶媒対照(DMSO)		-	105	11	197	21	11
検体	5	-	114	13	187	27	11
	15		113	13	198	26	10
	50		95	13	200	27	11
	150		98	16	184	22	11
	500		97	13	197	25	11
	1500		121	17	184	25	9
	5000		107	15	200	23	7
陽性対照	NF	-				400	
	NaAz		0.5	558	197		
	9AC		30				117
	AF-2		0.05			2134	
溶媒対照(DMSO)		+	107	15	192	26	13
検体	5	+	112	16	202	27	9
	15		105	13	203	23	11
	50		108	14	185	27	10
	150		123	16	200	24	11
	500		113	16	179	25	12
	1500		111	14	192	26	12
	5000		120	13	182	26	8
陽性対照	AA	+		133			
			10		1866		
	B[a]p		5	804		257	72

NF : 2-nitrofluorene

NaAz : アジ化ナトリウム

9AC : 9-aminoacridine

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

AA : 2-aminoanthracene

B[a]p : Benzo[a]pyrene

試験2.

(平均値 : n=3)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA (CM891)	TA98	TA1537
溶媒対照(DMSO)		-	111	14	204	24	9
検体	50	-	111	8	197	24	8
	150		98	12	201	21	12
	500		113	14	213	23	11
	1500		98	10	225	23	8
	5000		105	14	183	22	8
陽性対照	NF	1				166	
	NaAz	0.5	502	168			
	9AC	30					110
	AF-2	0.05			2295		
溶媒対照(DMSO)		+	98	15	196	28	12
検体	50	+	115	12	203	26	10
	150		94	16	218	23	13
	500		97	15	218	24	13
	1500		104	11	213	28	12
	5000		94	13	198	23	7
陽性対照	AA	2		140			
		10	+		1939		
	B[a]p	5		630		250	85

NF : 2-nitrofluorene

NaAz : アジ化ナトリウム

9AC : 9-aminoacridine

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

AA : 2-aminoanthracene

B[a]p : Benzo[a]pyrene

(11) 植物の主要代謝物M2のチャイニーズハムスターV79細胞を用いた
HPRT前進突然変異試験

(資料No. 混・代-13)

試験機関:

[GLP]

報告書作成年: 2003年

検体の純度:

試験方法: 指数関数的に増殖しているチャイニーズハムスターV79細胞保存培養をフラスコ中の20mLの培地に播種 (4×10^6 細胞、各濃度あたり1反復) した。16~24時間培養後、S9mix非存在下あるいは存在下で各濃度 (DMSOで調製) の検体を含む培地に置き換え、5時間処理した。単層細胞をリン酸緩衝液で洗浄後、トリプシン処理し、各3つのシャーレの5mLの培地に細胞数200個を播種して6~8日間培養した。その後、細胞コロニーを95%メタノールで固定、ギムザ染色して計数し、溶媒対照と比較 (相対的コロニー形成率) した。

指数関数的に増殖しているチャイニーズハムスターV79細胞保存培養をフラスコ中の20mLの培地に播種 (4×10^6 細胞、各濃度あたり2反復) した。16~24時間培養後、S9mix非存在下あるいは存在下で血清濃度を減じた培地に置き換え、5時間暴露した。単層細胞をリン酸緩衝液で洗浄後、トリプシン処理し、20mLの培地を入れたフラスコに 1.5×10^6 細胞を播種した。また、各3つのシャーレの5mLの培地に細胞数200個を播種し、シャーレは6日間培養してコロニー形成を調べた (生存率)。播種したフラスコは培養し、3日後 (計数1) に20mLの培地に再播種 (1.5×10^6) し更に3日後 (計数2、合計6日後)、6-TGを含んだ培地20mLを入れたシャーレ (培養あたり8個) に 3×10^5 細胞を再播種した (突然変異測定)。加えて、培養当たり3つのシャーレの培地 (5mL) に細胞数200個を播種した (絶対コロニー形成率)。6~8日間培養し、各培養のコロニーを固定、ギムザ染色して計数した。試験は2回実施した。

なお、陽性対照物質は非代謝活性化条件ではメタンスルホン酸エチル (EMS) を、代謝活性化条件ではジメチルベンズアントラセン (DMBA) を用いた。

用量設定根拠:

各時点の細胞数やコロニー数から以下のパラメータを計算した。

([#] : 結果表に示したパラメータ)

$$\# \cdot \text{生存率} = \frac{\text{平均コロニー数 (処理培養)} \times 100}{\text{平均コロニー数 (溶媒対照培養)}}$$

$$\# \cdot \text{変異係数} = \frac{\text{変異コロニー総数} \times 100}{\text{評価したシャーレ数} \times 3 \times 10^5 \times \text{C. E.}}$$

$$\text{絶対細胞増殖} = \text{計数1の細胞数} \times \text{計数2の細胞数}$$

$$\text{相対細胞増殖} = \frac{\text{処理した培養の絶対細胞増殖} \times 100}{\text{対応する溶媒対照培養の絶対細胞増殖}}$$

$$\text{絶対コロニー形成率} = \frac{\text{シャーレ当りの平均コロニー数} \times 100}{200}$$

試験結果：結果を次表に示す。

代謝活性化条件の有無に係わらず、検体処理による変異コロニー出現頻度の統計学的あるいは生物学的に有意な上昇は認められなかった。陰性対照、溶媒対照における平均変異体出現頻度はいずれも正常な範囲内であった。

濃度4000 $\mu\text{g/mL}$ 以上で検体の沈殿が観察された。

陽性対照のEMS（代謝活性化無し）およびDMBA（代謝活性化有り）では、いずれも変異コロニーの顕著な増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で変異原性を示さないと考えられる。

表 試験結果（代謝活性化なし）

（数値は2反復の平均）

薬剤	濃度(μg/mL)	S9 mix	生存率 ^a (%)	変異係数
試験 I				
溶媒対照 (DMSO)	0	-	100.0	0.65
陰性対照 (無処理)	0		77.9	0.85
検体	16		137.2	1.10
	50		95.1	1.75
	160		139.8	0.60
	500		158.5	2.25
	1600		164.9	1.70
	5000 P		-	-
陽性対照 (EMS)	900		43.9	601.25
試験 II				
溶媒対照 (DMSO)	0	-	100.0	1.15
陰性対照 (無処理)	0		96.2	2.05
検体	16		86.2	1.30
	50		85.8	1.35
	160		88.3	2.35
	500		61.4	1.80
	1000		74.6	2.40
	2000		130.4	2.50
	4000 P		122.5	1.00
陽性対照 (EMS)	900		14.8	329.2

P : 沈殿

EMS : メタンスルホン酸エチル

表 試験結果 (代謝活性化あり)

(数値は2反復の平均)

薬剤	濃度 (µg/mL)	S9 mix	生存率 ^a (%)	変異係数
試験 I				
溶媒対照 (DMSO)	0	+	100.0	0.90
陰性対照 (無処理)	0		103.4	1.40
検体	16		83.5	1.75
	50		84.65	1.85
	160		99.1	1.80
	500		103.1	0.70
	1600		107.2	0.60
	5000 P		1.0	-
陽性対照 (DMBA)	20	63.3	80.75	
試験 II				
溶媒対照 (DMSO)	0	+	100.0	3.40
陰性対照 (無処理)	0		115.6	0.70
検体	16		96.35	3.35
	50		112.3	2.75
	160		93.5	2.15
	500		90.3	2.65
	1000		95.1	1.65
	2000		129.65	1.65
	4000	128.85	1.15	
陽性対照 (DMBA)	20	47.6	71.00	

P : 沈殿

DMBA : ジメチルベンズアントラセン

(12) 植物の主要代謝物M2のヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料No. 混・代-14)

試験機関：

[GLP]

報告書作成年：2003年

検体の純度：

試験方法：*in vitro*でS-9mixの存在下及び非存在下におけるヒトリンパ球に対する染色体異常誘発性を検定した。試験は2回実施し、検体はDMSOに溶解して試験用量はS-9mixの存在下及び非存在下で1回目試験は50.80~2256 $\mu\text{g/mL}$ 、2回目試験では272.8~2256 $\mu\text{g/mL}$ とした。1回目試験はS-9mixの有無にかかわらず3時間処理後17時間培養した。2回目試験ではS-9mix存在下では3時間処理後17時間培養、非存在下では連続して20時間処理とした。各培養は2反復で行った。3時間処理培養後は細胞を分離・洗浄して新鮮な培地に再懸濁させ17時間培養した。各培養終了2時間前にコルヒチンを添加し細胞分裂を停止させた。2時間培養後、遠心して上清を除き、低張KClに再懸濁させメタノール/氷酢酸で固定、スライド標本としギムザ染色して中期分裂像を各培養につき100個（各用量とも計200個）鏡検した。

評価濃度；培養ヒトリンパ球の分裂指数を溶媒対照と比較し、各条件下での分裂阻害率が20~47%みられた濃度を最高濃度とし、以下の評価濃度とした。

1回目試験；S-9mixの存在下では378.5、924.1、2256 $\mu\text{g/mL}$ 、
非存在下では739.2、1444、2256 $\mu\text{g/mL}$ 。

2回目試験；S-9mixの存在下では1001、1385、2256 $\mu\text{g/mL}$ 、
非存在下では320.9、377.5、723.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

試験結果；結果を次表に示す。

S-9mixの存在下及び非存在下でいずれの用量においても、溶媒対照と比較して染色体異常を有する細胞数に統計学的に有意な増加は認められなかった。陽性対照では有意な増加が認められた。

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た。

試験結果：

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 + 回復 時間	観察 細胞 数	S-9 mix	染色体異常を有する細胞数					異常細胞数*		平均 分裂 指数 (%)		
					キ+77	染色分体型		染色体型		その他	キ+77 除く		キ+77 含む	
						切断	交換	切断	交換					
溶媒対照 (DMSO)	—	3時間 + 17 時間	200	-	0	1	0	1	0	0	2	2	11.4	
検体	739.2		200		0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.5
	1444		200		2	0	0	0	1	0	1	3	8.5	
	2256		200		1	0	0	1	0	0	1	2	7.5	
陽性対照 (NQO)	5		200		12	13	9	7	3	2	*** 19	27	-	
溶媒対照 (DMSO)	—	3時間 + 17 時間	200	+	1	1	0	0	0	0	1	2	14.8	
検体	378.5		200		0	1	0	0	0	0	1	1	12.4	
	924.1		200		0	0	0	0	0	0	0	0	11.1	
	2256		200		1	1	0	1	0	0	2	3	9.3	
陽性対照 (CPA)	6.25		200		39	47	5	15	0	0	*** 45	61	-	
溶媒対照 (DMSO)	—	20 時間 + 0 時間	200	-	0	1	0	0	0	0	1	1	7.5	
検体	320.9		200		0	0	0	0	0	0	0	0	7.6	
	377.5		200		1	0	0	1	0	0	1	2	4.8	
	723.2		200		1	0	0	1	0	0	1	2	4.0	
陽性対照 (NQO)	2.50		200		8	24	16	11	1	2	*** 34	36	-	
溶媒対照 (DMSO)	—	3時間 + 17 時間	200	+	0	0	0	0	0	0	0	0	10.4	
検体	1001		200		3	0	0	0	0	0	0	3	12.4	
	1385		200		0	4	0	0	0	0	3	3	9.4	
	2256		200		1	1	0	1	0	0	2	3	8.3	
陽性対照 (CPA)	3.125		200		10	24	5	14	0	0	*** 36	41	-	

*** : $P < 0.001$ (Fisher検定)

NQO : 4-Nitroquinoline 1-oxide

CPA : Cyclophosphamide

その他 : (7個以上の異常をもつ細胞、細胞断片化など)

*複数の異常を持つ細胞は一つとしてカウント