

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(12) 繁殖毒性及び催奇形性試験

1) ラットを用いた 2 世代繁殖毒性試験

(資料 No. T-20)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2001 年

検体の純度： %

供試動物：Wistar 系雌雄ラット、一群雌雄各 30 匹、開始時約 9～10 週齢

投与期間：P 世代；交配の 70 日前から F₁ 児離乳時まで、F₁ 世代；離乳時から F₂ 児離乳時まで
(1999 年 5 月 3 日～2000 年 2 月 7 日)

投与方法：検体を 0、100、1000 及び 10000 ppm 含有した飼料を自由に摂取させた。

用量設定根拠；

交配・調整・選抜及び観察・検査項目：概要を次頁の表にまとめた。

一般状態及び死亡；全ての親動物について、生死及び一般状態を平日は 1 日 2 回、週末と休日は少なくとも 1 回ケージの外から観察した。何らかの臨床症状が認められた場合は、動物をケージから取り出して詳細な評価を行なうこともあった。さらに、週 1 回の頻度で臨床症状の詳細な検査及び身体検査を行った。児動物については各腹の出生児数及び死産児数を記録した。F₁ 及び F₂ 児動物については、出生時から交配前期間の開始 (F₁ 児動物) まで及び出生時から離乳 (F₂ 児動物) までの期間、臨床症状を毎日観察した。児動物の体重測定日には、詳細な臨床観察及び身体検査を行った。次世代を得るために確保された F₁ 児動物については、前述の親動物と同様にして観察し、臍開口及び包皮分離の観察も行った。さらに、次世代用に確保された F₁ 世代の児動物において包皮分離に影響がみられたため、すべての F₂ 児動物について、哺育 0 日に肛門生殖突起間距離の測定を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

体重及び摂餌量；交配前期間中は全ての雌雄親動物について体重及び摂餌量を週1回測定した。交配期間中及び屠殺までの期間は雄親動物について体重を週1回測定したが、摂餌量は測定しなかった。また、母動物の体重及び摂餌量を妊娠0、6、13及び20日に測定した。哺育期間中は体重及び摂餌量を哺育0、4、7、14及び21日に測定した。児動物の体重は生後0、4、7、14、21日及び臍開口又は包皮分離が認められた日に個別別に測定した。

試験の概要

世代	期間 (週間)	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	生育 (10 週間)		一般状態の観察を毎日、詳細な観察を週 1 回 体重、摂餌量を週 1 回測定 交配 3 週間前から発情周期を検査 (全ての雌)
	交配 (最長 14 日間)	雌雄 1 対 1 で交配。膈垢中 の精子及び膈栓で交尾確 認 (妊娠 0 日) 雄動物の屠殺	雄動物の体重を週 1 回測定 授精までの日数を記録、交尾率を算出 雄動物の肉眼的病理検査、臓器重量測定、精子検 査 (精子細胞数、精子数、形態及び運動性)、病 理組織学的検査 妊娠 0、6、13 及び 20 日に体重測定
	妊娠 (3 週間)		
	出産		出産状況の観察 妊娠期間、産児数 (生存及び死亡) を記録、受胎 率、妊娠率、出産率を算出
	哺育 (3 週間)	哺育 4 日に各同腹児数を 雄 4 匹雌 4 匹に調整 (可能 ならば)	母動物 ; 哺育 0、4、7、14 及び 21 日に体重、摂 餌量を測定 児動物 ; 臨床徴候を毎日観察 生後 0、4、7、14 及び 21 日に体重測定、 詳細な臨床観察及び身体検査
F1	離乳	F ₁ 離乳児から継代用の各 群雄 30 匹雌 30 匹 (原則と して各腹雌雄各 1 匹) を無 作為に選抜 次世代親動物に選抜され なかった F ₁ 離乳児の屠殺 母動物の屠殺	次世代親動物に選抜されなかった F ₁ 離乳児の肉 眼的病理検査、臓器重量測定、各群雌雄 10 匹に ついて頭蓋冠検査 (骨格検査) 及び大腿骨のカル シウム及びリン含有量測定 母動物の最終解剖直前の発情周期、肉眼的病理検 査、臓器重量測定、病理組織学的検査 (P 世代に準ずる) 膈開口及び包皮分離の観察、膈開口及び包皮分離 の認められた日に体重測定 (P 世代に準ずる)
	生育 (10 週間)		
	交配 (最長 14 日間)	(P 世代に準ずる)	(P 世代に準ずる)
	妊娠 (3 週間)		(P 世代に準ずる)
	出産		(P 世代に準ずる) F ₂ 児動物 哺育 0 日に肛門生殖突起間距離の測 定
F2	哺育 (3 週)	(P 世代に準ずる)	(P 世代に準ずる)
	離乳	F ₂ 離乳児の屠殺 F ₁ 世代母動物の屠殺	F ₂ 離乳児の肉眼的病理検査 F ₁ 世代母動物の最終解剖直前の発情周期、肉眼 的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査

交配及び妊娠の確認 ; 雌を同群の雄と 1 対 1 で最長 14 日間同居させて交配を行った。膈垢中に精
子が確認されるか膈栓が認められた場合に交尾成立と判断し、妊娠 0 日とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

繁殖性に関する指標；交配、妊娠及び哺育の各期間に以下の指標について調べた。

性周期、授精までの日数、妊娠期間

交尾率 (%) = (交尾成立雌動物数 / 同居させた雌動物雌数) × 100

妊娠率 (%) = (妊娠雌数 / 交尾成立雌動物雌数) × 100

出産率 (%) = (生存児動物を出産した雌動物数 / 妊娠動物数) × 100

出生率 (%) = (生存産児数 / 産児総数) × 100

生存率 (%) = [生後 4 日 (間引き前) の 1 腹当たり生存児数 / 1 腹当たり生産児数] × 100

哺育率 (%) = (生後 21 日の生存児数 / 生後 4 日の調整後生存児数) × 100

病理学的検査；雄親動物は交配期間終了後、母動物は次世代児動物の離乳後、交尾不成立雌動物は交配期間終了後 24 日に、非妊娠雌動物は妊娠 24 日以降に屠殺し、肉眼病理検査を行った。

生後 4 日に屠殺した児動物は、肉眼異常を認めた動物について外表及び内臓を肉眼的に検査し、離乳時に屠殺した児動物は親動物と同様に肉眼病理検査を行った。

全ての親動物について以下の臓器重量を測定した。

精巣、精巣上体 (両側の総重量及び精子検査に供さない側の尾部の重量)、精嚢 (凝固腺及び内容液を含む)、卵巣、前立腺、子宮 (卵管及び頸部を含む)、脳、下垂体、胸腺、肝臓、腎臓、副腎及び脾臓

21 日に屠殺した児動物のうち、各腹の雌雄各 1 匹について以下の臓器重量を測定した。

脳、脾臓及び胸腺

全ての P 及び F₁ 世代の雄について、片側の精巣及び精巣上体から精子を採取し、それぞれホモジナイズレジスタンス精子細胞数及び精巣上体尾部精子数を計測した。

さらに、精管遠位 (尿道の最近傍) から採取した精子について、形態及び運動性の検査を行った。

F₁ 児動物の各群雌雄各 10 匹について、頭部の骨格発生の評価を行った。又、同じ児動物から大腿骨を摘出して重量を測定し、カルシウム及びリン含有量の測定を行った。

また、全親動物を対象として、以下の臓器の病理標本を作製し、検鏡した。

頸部、精巣上体 (頭部、体部、尾部)、肉眼異常部位、副腎、肝臓、卵巣、下垂体、前立腺、精巣、精嚢/凝固腺、子宮、卵管及び膈

無作為に選抜した各群 10 匹の F₁ 母動物について、原始卵胞の定量的評価を行った。

結果：概要を表 1 に示した。

親動物；両世代とも 10000 ppm の雌雄で検体暴露の影響が認められた。検体に関連した影響として、統計学的に有意な体重の低下が、交配前期間の両世代 10000 ppm の雌雄に認められた。雌にみられた体重低下は、両世代 (10000 ppm) の妊娠及び哺育期間まで継続し、対照群動

物と比較して多くの測定時点で統計学的有意差が認められた。P世代にみられた検体に関連した摂餌量への影響は、10000 ppmの雄の交配前期間における統計学的に有意な摂餌量の増加及び同群雌の哺育期間中の有意な摂餌量の減少であった。これに対してF₁世代では、10000 ppm雌雄の交配前期間の摂餌量の増加及び10000 ppm雌の哺育期間における摂餌量の変化が認められた。

10000 ppmでは、両世代の雌雄において、最終体重の低下及び肝臓重量の増加が認められた。肝臓以外の臓器においても統計学的に有意な変化が観察されたが、これらの変化はいずれも有意な体重増加抑制に関連する変化あるいは用量依存性のない偶発性変化であった。10000 ppm以外のいずれの用量群においても、P及びF₁世代とも、最終体重に影響はみられなかった。P世代の全ての用量群に、検体に関連した病理組織学的所見はみられなかった。両世代の親動物及び児動物に特記すべき剖検所見は観察されなかった。F₁世代の卵胞及び黄体分布の定量的評価においても影響はみられなかった。

全ての繁殖性パラメータに影響はなかった。

精子の形態及び計測数に関しては、まず対照群と高用量群について評価した。統計学的有意差が認められなかったため、他の用量群についての解析は行わなかった。精子の運動性（運動精子の百分率及び前進運動精子の百分率）に関しては、全用量群について評価した。いずれのパラメータにも検体投与に関連した影響は認められなかった。

児動物；児動物への影響が10000 ppmにおいて観察された。10000 ppmでは、両世代において哺育7日から離乳までの児動物の体重が低下し、脾臓、胸腺及び脳重量が低下した。第1世代（F₁児動物）において、10000 ppmの児動物に包皮分離の遅延がみられたが、これは児動物の発育低下（体重低下）に伴う二次的影響と考えられた。膈開口に関しては、いずれの用量群においても影響は認められなかった。F₂児動物では肛門生殖突起間距離の測定を行ったが、検体投与に関連した影響は認められなかった。21日齢の児動物の大腿骨で測定したカルシウム及びリン含有量及び頭蓋冠の骨化には、検体投与に関連した影響は認められなかった。

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、親動物における一般毒性として10000 ppmでP及びF₁世代親動物の体重増加抑制及び摂餌量の変化並びに肝臓重量の増加が認められた。児動物における一般毒性として10000 ppmでF₁及びF₂児動物の体重低下がみられた。また、10000 ppmでF₁児動物の包皮分離遅延、F₁及びF₂児動物の脾臓、胸腺及び脳重量の低下が認められた。繁殖性に対する影響は認められなかった。

したがって、無毒性量は親動物及び児動物に対して1000 ppm（P/F₁：雄73.7 mg/kg/日、雌86.7 mg/kg/体重g/日）、繁殖性については10000 ppm（P/F₁：雄763.6 mg/kg/日、雌806.5 mg/kg/日）*と判断された。

*：雄については交配前期間の暴露量から求めた。雌については交配前期間及び妊娠期間の暴露量の平均値（871.3 + 741.6/2 = 806.5）。

表 1 結果の概要

世代		親 : P 児 : F ₁				親 : F ₁ 児 : F ₂			
投与量 (ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30
死亡	雄	0	1	2	0	0	1	0	1
	雌	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態		検体投与に起因する異常なし				検体投与に起因する異常なし			
生育期 平均体重	雄	—		↑ : 14、 28~49、 63 日	↓ : 98 日	—			↓ : 0~105 日
	雌	—			↓ : 63、 70 日 ↓ : 56 日	—		↑ : 28~ 56、70 日 ↑ : 21、 63 日	↓ : 0~70 日
生育期 摂餌量 ^{a)}	雄	—			↑ : 63~ 70 日	—			↑ : 0~7、 21~28 日 ↑ : 7~21、 28~35、 42~70 日
	雌	—			↑ : 56~ 63 日	—	↑ : 28~42 日	↑ : 49~56 日	↑ : 0~42、 49~70 日
妊娠中 平均体重		—			↓ : 0、6、 13、20 日	—	↑ : 0 日	↑ : 0、6 日	↓ : 0、6、20 日
妊娠中 摂餌量 ^{a)}		—				—			
哺育期 平均体重		—			↓ : 0~21 日	—		↑ : 7~14 日 ↑ : 4、21 日	↓ : 7 日 ↓ : 0 日
哺育期 摂餌量 ^{a)}		—			↓ : 4~14 日	—			↑ : 0~4 日 ↓ : 7~14 日

— : 対照群、空欄 : 有意差なし

a) 体重 kg 当たりの相対摂餌量。

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

Dunnnett 検定 : 体重、摂餌量

表 1 結果の概要 (つづき)

世代		親 : P				親 : F ₁					
投与量 (ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000		
親動物	検体摂取量 ^{b)} (生育期)	雄	—	6.8	73.7	763.6					
		雌	—	8.1	86.7	871.3					
	(妊娠期間)	雌	—	7.0	75.3	741.6					
	(哺育期間)	雌	—	15.8	170.6	1624.6					
	最終体重 (g)	雄	432.2	439.3	452.5	410.8	424.2	434.5	445.0	↓370.0	
		雌	284.3	285.0	288.3	↓268.0	261.9	272.3	↑281.2	250.9	
	肝臓	絶対重量 (g)	雄	15.735	15.606	16.584	17.025	14.870	15.687	15.918	15.439
			雌	15.079	14.695	15.906	↑17.012	14.573	15.438	15.757	↑17.422
		対体重比 (%)	雄	3.630	3.546	3.667	↑4.145	3.510	3.611	3.579	↑4.171
			雌	5.286	5.137	5.500	↑6.335	5.567	5.663	5.561	↑6.883
	副腎	絶対重量 (g)	雄	0.056	0.058	0.058	0.057	0.061	0.061	↑0.067	0.061
		対体重比 (%)	雌	0.033	0.032	0.034	↑0.036	0.014	0.014	0.015	↑0.017
	脳	絶対重量 (g)	雄	2.100	2.106	2.111	2.067	2.063	2.081	2.074	↓1.959
			雌	1.953	1.943	1.942	1.911	1.928	1.926	1.921	↓1.857
		対体重比 (%)	雄	0.489	0.483	0.470	0.506	0.490	0.481	0.469	↑0.534
			雌	0.691	0.686	0.677	0.718	0.744	0.741	↓0.686	0.747
	腎臓	対体重比 (%)	雄	0.680	0.645	0.647	↑0.718	0.646	0.631	0.645	↑0.751
		雌	0.804	0.801	0.817	↑0.848	0.848	0.855	0.827	0.862	
	脾臓	対体重比 (%)	雄	0.156	0.158	0.157	↑0.172	0.165	0.163	0.163	↑0.186
	精巣	対体重比 (%)	雄	0.888	0.877	0.851	0.952	0.871	0.870	0.857	↑0.984
精巣上体	絶対重量 (g)	雄	1.442	1.380	1.436	1.437	1.327	1.468	↑1.449	1.314	
卵巣	絶対重量 (g)	雌	0.110	0.109	0.105	↓0.084	0.108	0.115	0.121	0.100	
子宮	絶対重量 (g)	雌	0.533	0.517	0.544	↓0.350	0.483	↑0.558	0.547	↓0.444	
下垂体	絶対重量 (g)	雌	0.013	0.013	0.013	↓0.011	0.012	0.012	0.013	0.012	
胸腺	絶対重量 (g)	雄	0.423	0.422	0.444	0.381	0.504	0.508	0.496	↓0.401	
		雌	0.265	0.261	0.252	↓0.187	0.287	0.264	0.284	↓0.198	
肉眼的病理検査		検体投与に起因する異常なし				検体投与に起因する異常なし					
病理組織学的検査		検体投与に起因する異常なし				検体投与に起因する異常なし					

b) P 及び F₁ 世代の平均検体摂取量を平均して算出した。

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

Dunnett 検定/Mann-Whitney U 検定: 体重、臓器重量

Bonferroni 補正 Fisher 正確検定: 肉眼的病理検査、病理組織学的検査

—: 該当なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

世代		親 : P				親 : F ₁				親 : F ₁				児 : F ₂			
投与量 (ppm)		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000	0	100	1000	10000	0	100	1000	10000
親動物	同居動物数	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	交尾動物数	30	29	30	30	30	30	29	30	30	30	29	30	30	29	30	29
	出産母動物数	26	28	28	30	28	28	25	26	28	28	25	26	28	28	25	26
	交尾率 (%)	100.0	96.7	100.0	100.0	100.0	100.0	96.7	100.0	100.0	100.0	96.7	100.0	100.0	100.0	96.7	100.0
	妊娠率 (%)	86.7	96.6	93.3	100.0	93.3	93.3	89.7	89.7	93.3	93.3	89.7	89.7	93.3	93.3	89.7	89.7
	出産率 (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	96.2	100.0	100.0	100.0	96.2	100.0	100.0	100.0	96.2	100.0
	発情周期 (日)	4.4	4.5	4.2	4.7	5.1	4.3	4.2	4.7	5.1	4.3	4.2	4.7	5.1	4.3	4.2	4.7
	交尾成立までの日数	2.9	2.3	2.4	3.2	3.4	2.6	3.0	2.5	3.4	2.6	3.0	2.5	3.4	2.6	3.0	2.5
	妊娠期間 (日)	22.0	22.1	22.1	22.0	22.0	22.0	21.9	22.1	22.0	22.0	21.9	22.1	22.0	22.0	21.9	22.1
	平均着床痕数	11.7	11.5	12.2	11.0	11.0	11.0	10.9	10.5	11.0	11.0	10.9	10.5	11.0	11.0	10.9	10.5
	運動精子率 (%)	85.11	85.29	87.68	86.32	85.00	86.29	84.68	86.45	85.00	86.29	84.68	86.45	85.00	86.29	84.68	86.45
	前進精子率 (%)	55.63	56.32	61.11	58.36	51.17	53.36	54.46	55.76	51.17	53.36	54.46	55.76	51.17	53.36	54.46	55.76
	精巣上体尾部精子数	127.8	---	---	143.9	110.0	---	---	115.1	110.0	---	---	115.1	110.0	---	---	115.1
	精巣精子細胞数	98.5	---	---	107.9	121.3	---	---	117.8	121.3	---	---	117.8	121.3	---	---	117.8
	精子形態異常率	2.1	---	---	1.2	1.3	---	---	1.1	1.3	---	---	1.1	1.3	---	---	1.1
原始卵胞の定量的評価	---					検体投与に起因する影響なし											

b) P 及び F₁ 世代の平均検体摂取量を平均して算出した。

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

Dunn 検定 : 発情周期、交尾成立までの日数、妊娠期間、平均着床痕数

Bonferroni 補正 Fisher 正確検定 : 交尾率、妊娠率、出産率

傾向検定 : 運動精子率、前進精子率

Two sample t 検定 : 精巣上体尾部精子数、精巣精子細胞数、精子形態異常率、原始卵胞の定量的評価

--- : 測定せず

表1 結果の概要 (つづき)

世代			親 : P				親 : F ₁					
投与量 (ppm)			0	100	1000	10000	0	100	1000	10000		
児動物	平均生存産児数		11.2	10.8	11.3	9.9	10.0	10.6	10.6	9.7		
	平均死産児数		0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0		
	出生率 (%)		99.0	100.0	100.0	99.7	98.6	99.6	99.3	99.5		
	生存率 (%)		97.4	98.6	98.7	95.2	95.9	99.1	98.7	99.3		
	哺乳率 (%)		99.5	97.8	99.1	94.8	98.4	100.0	99.0	97.1		
	性比 ^{c)}		49.8	44.5	47.5	59.7	54.4	49.2	46.1	53.2		
	一般状態			検体投与に起因する異常なし				検体投与に起因する異常なし				
	体重 (g)	哺育0日	雄	6.1	6.1	6.2	6.1	6.0	6.0	6.0	6.3	
			雌	5.8	5.7	5.8	5.7	5.7	5.7	5.7	5.8	
		哺育4日 ^{d)}	雄	9.4	9.3	9.7	9.0	9.8	9.7	9.6	9.6	
			雌	9.1	8.8	9.2	8.7	9.3	9.3	9.3	8.9	
		哺育7日	雄	14.7	14.5	15.1	↓13.0	15.3	15.4	15.1	14.0	
			雌	14.2	13.8	14.4	↓12.5	14.7	14.7	14.7	↓13.1	
		哺育14日	雄	30.2	29.4	30.0	↓23.3	30.1	30.8	30.6	↓25.4	
			雌	29.3	28.4	28.9	↓22.6	29.1	30.0	30.1	↓23.7	
		哺育21日	雄	46.2	45.4	46.0	↓34.2	44.8	46.8	45.9	↓35.3	
			雌	44.3	43.1	44.0	↓33.1	43.3	45.0	44.5	↓33.2	
		平均包皮分離達成日			41.3	41.4	41.7	↑43.9	---			
		平均臆開口達成日			34.7	33.4	34.7	36.5	---			
	肛門生殖突起間距離		雄	---				4.39	4.32	4.35	4.37	
			雌	---				2.05	2.05	2.16	2.09	
カルシウム及びリン含有量			検体投与に起因する影響なし				---					
頭蓋冠検査			検体投与に起因する影響なし				---					
脳	絶対重量	雄	1.484	1.443	1.464	↓1.405	1.497	1.503	1.498	↓1.433		
		雌	1.443	1.410	1.421	↓1.363	1.444	1.458	1.450	1.393		
	対体重比	雄	3.211	3.245	3.236	↑4.080	3.419	3.171	3.362	↑4.199		
		雌	3.242	3.316	3.221	↑4.205	3.411	3.227	3.272	↑4.228		
胸腺	絶対重量	雄	0.206	0.201	0.192	↓0.134	0.203	0.194	0.183	↓0.122		
		雌	0.203	0.201	0.196	↓0.130	0.211	0.200	0.179	↓0.124		
	対体重比	雄	0.443	0.437	0.417	↓0.386	0.444	0.403	0.404	↓0.339		
		雌	0.455	0.461	0.440	↓0.396	0.480	0.437	↓0.402	↓0.361		
脾臓	絶対重量	雄	0.234	0.226	0.218	↓0.127	0.214	0.235	0.205	↓0.126		
		雌	0.225	0.210	0.217	↓0.121	0.205	0.217	0.213	↓0.127		
	対体重比	雄	0.503	0.493	0.472	↓0.366	0.470	0.487	0.453	↓0.350		
		雌	0.503	0.482	0.483	↓0.368	0.471	0.477	0.474	↓0.371		

c) 出産時の雄児動物%, d) 児動物数調整前

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

Bonferroni 補正 Fisher 正確検定: 平均生存産児数、平均死産児数、出生率、生存率、哺乳率、性比

Dunnnett 検定: 児動物体重、包皮分離、臆開口、カルシウム及びリン含有量、頭蓋冠検査、臓器重量

傾向検定: 肛門生殖突起間距離---: 測定せず

2) ラットにおける発生毒性試験

(資料 No.T-21)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1997 年

検体純度： %

供試動物：Wistar 系妊娠ラット (WIST Hanlbm : WIST)、一群 25 匹、開始時約 10 週齢、
開始時体重 173~237 g

投与期間：妊娠 6~20 日の 15 日間

投与方法：検体を 4%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し、0、100、300 及び 1000 mg/kg/日の投与レベルで妊娠後 6 日目^{*)} から 20 日目までの 15 日間、毎日 1 回強制経口投与した。対照群には 4%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を同様に投与した。なお、投与容量は 10 mL/kg とし、投与期間中の体重に基づき毎日投与容量を調整した。

^{*)} 膣垢中の精子又は膣栓が確認された日を妊娠 0 日として起算した。

用量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物；妊娠動物について、生死のチェック、投与に対する反応の徴候、健康状態及び早産の有無の観察を少なくとも 1 日 2 回実施した。体重は妊娠 0~21 日まで毎日測定し、妊娠 0~6、6~11、11~16 及び 16~21 日に摂餌量を測定した。妊娠 21 日に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下ですべての生存妊娠動物を屠殺し、肉眼的病理検査を行い、肝臓を摘出して重量を測定した。全内臓について肉眼的に観察した後、子宮を切開して胎児を摘出し、子宮内容物、子宮内での胎児の位置、各卵巣の黄体数を記録するとともに、胎盤重量を測定した。肉眼的に着床痕が認められなかった場合には、子宮を硫化アンモニウム水溶液に浸漬し検査した。子宮角内の着床数及び分布については、着床痕のみ、吸収胚、吸収胎児、死亡胎児、生存胎児に分類して記録した。

剖検に先立ち、各群 10 匹の動物の後眼窩静脈叢から非絶食下で血液を採取し、下記項目を測定した。

トリグリセリド、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルブミン、総蛋白

又、各群 10 匹の動物から剖検時に肝臓組織を採取し、チトクローム P450 (P450)、N-デメチラーゼ (N-DEM) 及び O-デメチラーゼ (O-DEM) を測定した。肝臓組織の残余は 4%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定した後、病理組織学的検査に供した。その他の動物の肝臓は重量測定後 4%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定して保存した。

生存胎児；性別判定、体重測定及び外表検査を行った。各同腹児の半数についてはエタノール水溶液で固定した後、アルシアン・ブルーを含む氷酢酸水溶液、アリザリン・レッド S を含む水酸化カリウム水溶液で処理して骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査した。残りの胎児についてはエタノール、ホルマリン及び酢酸混合液で固定した後、Wilson の粗大切片法により内臓及び脳の異常の有無を検査した。

結果：概要を以下の表に示した。

母動物；試験期間中、いずれの群の雌にも死亡、臨床徴候又は投与に対する反応は認められなかった。又、体重、体重増加量及び摂餌量にも検体投与に関連した影響は認められなかった。なお、1000 mg/kg 群の平均補正体重増加量がわずかに減少したが、腹当たりの胎児数がやや増加したことによるものであった。

妊娠 21 日の投与群の雌における臨床生化学的検査値は、血漿試料を用いて測定した臨床生化学的検査項目に影響が認められず、肝臓のチトクローム P450 量並びに N-及び O-デメチラーゼ活性には検体投与の影響が認められなかった^{申請者註1}。

臓器重量検査では、いずれの群の母動物の胎盤にも異常は認められなかったが、1000 mg/kg の平均肝重量及び対体重比に僅かな増加が認められた。

剖検所見には、対照群及び 1000 mg/kg では異常所見が認められなかったが、100 及び 300 mg/kg では肝臓の外側左葉の横隔膜ヘルニアが 1 例ずつ認められた。これらの所見は偶発的なものと考えられた。病理組織学的検査では、記録された所見の種類、出現頻度及び重篤度に、対照群と検体投与群間で差はみられず、検体投与に起因すると思われる所見はなかった。

繁殖データにおいて、300 及びあるいは 1000 mg/kg で、数項目（着床率、着床前損失率、着床後損失率、吸収胚及び吸収胎児発生率）に統計学的有意差が認められたが、いずれも毒性の発現を示唆するものではなく、偶発的な所見と考えられた。

生存胎児；同腹児数、同腹胎児の平均体重及び性比等は、全群で差がなかった。

胎児の外表及び内臓検査では、検体投与に関連した影響は認められなかった。なお、対照群では矮小児（小型胎児、体重 2.3 g）が 234 匹中 1 例、100 mg/kg でも矮小児（小型胎児、体重 1.8 g）が 261 匹中 1 例認められたが、300 及び 1000 mg/kg の胎児各 267 及び 259 匹には、異常所見はみられなかったことから偶発的な所見と考えられた。又、内

申請者註1

臓検査において、1000 mg/kg の胎児 124 匹中 1 例に、両側性の腎盂拡張が認められたが、他の群では異常所見が認められず、偶発的なものと考えられた。

対照群の胎児 119 匹中 1 例に第 3 及び第 4 胸骨分節の骨化異常が、300 mg/kg の胎児 143 匹中 1 例に第 4 及び第 5 胸骨分節の骨化異常が認められたが、100 及び 1000 mg/kg 群の胎児各 139 及び 135 匹には、異常所見はみられなかったことから偶発的な所見と考えられた。

対照、100、300 及び 1000 mg/kg の化骨進行度には、検体投与に関連すると思われる差は認められなかった。

胎児の個別別データでは、化骨進行度による統計学的な有意差が少数認められたが、多くの場合用量依存性は認められなかった。腹別データでは、300 mg/kg で 1 件、1000 mg/kg で 2 件において統計学的な有意差が認められたが、このうち 2 件で認められた差は、個別別データでは統計学的に有意ではなく、このうち一件では用量依存性も認められなかったことから、偶発的なものと考えられた。更に、1 件は化骨の進行によるものであったが、同一四肢の他の位置では化骨遅延がみられ、これらは検体投与に関連した影響を示すものではないと考えられた。

以上のように、検体を妊娠 6～20 日に経口投与したときの母動物には 1000 mg/kg で肝絶対重量及び相対重量の増加が認められたことから、母動物における無毒性量 (NOAEL) は 300 mg/kg/日と判断された。胚及び胎児における NOAEL は 1000 mg/kg/日と考えられた。又、最高投与量の 1000 mg/kg/日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た。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000
1 群当り動物数		25	25	25	25
妊娠動物数		22	24	23	24
途中死亡/切迫殺数		0	0	0	0
一般状態		検体投与に起因する一般状態の変化は認められなかった			
平均体重 ¹⁾ (g)	妊娠 6 日	219	224	224	222
	妊娠 11 日	238	243	244	242
	妊娠 16 日	263	270	270	268
	妊娠 21 日	317	323	326	330
平均体重 増加量 ¹⁾ (g)	妊娠 0~6 日	21	20	21	23
	妊娠 6~11 日	19	19	20	20
	妊娠 11~16 日	25	27	26	26
	妊娠 16~21 日	54	53	56	62
	妊娠 6~21 日	98	99	102	108
補正体重増加量 (g) ¹⁾		30.1	30.2	28.9	28.5
平均 摂餌量 ¹⁾ (g/動物/日)	妊娠 0~6 日	20.7	21.2	21.9	21.3
	妊娠 6~11 日	21.7	21.8	22.1	21.3
	妊娠 11~16 日	23.9	23.9	23.9	23.5
	妊娠 16~21 日	23.9	24.4	24.4	24.6
	妊娠 6~21 日	23.2	23.4	23.5	23.1
臨床生化学的 検査 ¹⁾	ALT (μkat/L)	1.00	0.94	0.94	0.88
	総蛋白 (g/L)	68.3	68.8	71.9	65.9
	P-450 (nmol/g)	16.48	15.60	14.80	15.58
	N-DEM (nmol/min/g)	89.02	85.96	↓58.63	70.45
	O-DEM (nmol/min/g)	4.24	3.83	4.36	4.20
肉眼的病理所見		検体投与に起因する異常は認められなかった			
最終体重 (g) ¹⁾		248.9	254.1	252.9	250.5
肝臓重量 ¹⁾	絶対重量 (g)	11.16	11.58	11.98	↑12.39
	対体重比 (%)	4.48	4.56	4.75	↑4.93

補正体重増加量 (g) = (妊娠 21 日後の体重 - 妊娠 6 日後の体重 - 子宮重量)

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

1) Dunnett 検定

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000		
1 群当り動物数		25	25	25	25		
妊娠動物数		22	24	23	24		
母動物	肝臓病理学的所見 ²⁾	所見/検査動物数	10	10	10	10	
		グリコーゲン貯留	8	7	6	5	
		リンパ性細胞巣	4	6	6	9	
		髄外造血	5	4	1	3	
	交尾率 (%)		100	100	100	100	
	受胎率 (%)		88	96	92	96	
	出産率 (%)		100	100	100	88	
	着床所見	検査母動物数		22	24	23	21
		平均黄体数 ¹⁾		12.9	13.2	13.0	13.6
		平均着床数 ¹⁾		11.9	12.3	12.5	12.9
		着床率 (%) ²⁾		92.6	93.7	↑96.6	95.1
		着床前損失率 (%) ²⁾		7.4	6.3	↓3.4	4.9
		着床後損失率 (%) ²⁾		10.7	11.8	7.3	↓4.4
		総胎児数		234	261	267	259
		平均生存胎児数 ¹⁾		10.6	10.9	11.6	12.3
		死亡胎児総数 ¹⁾		0	0	0	0
吸収胚		率 (%) ²⁾	8.0	9.5	5.9	↓4.1	
		平均数 ¹⁾	1.0	1.2	0.7	0.5	
吸収胎児		率 (%) ²⁾	2.7	2.4	1.4	↓0.4	
	平均数 ¹⁾	0.3	0.3	0.2	0.0		
妊娠子宮重量 (g) ³⁾		68.6	68.9	73.6	79.1		
胎児	平均胎児体重 ¹⁾ (g)	雄	4.9	4.8	4.9	4.9	
		雌	4.6	4.6	4.6	4.7	
	胎盤重量 (g) ³⁾		0.44	0.44	0.43	0.47	
	性比 (雄胎児%) ²⁾		47.9	51.3	49.8	40.9	
異常胎児数 (矮小児)		1	1	0	0		

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

1) Steel 検定、2) Fisher 正確検定、3) Dunnett 検定

交尾率 (%) = (受精した雌動物数 / 雄と同居させた雌動物数) × 100

受胎率 (%) = (妊娠雌動物数 / 受精した雌動物数) × 100

出産率 (%) = (生存児出産雌動物数 / 妊娠雌動物数) × 100

着床前損失率 (%) = [(黄体数 - 着床数) / 黄体数] × 100

着床後損失率 (%) = [(着床数 - 生存胎児数) / 着床数] × 100

結果の概要 (つづき)

		投与量 (mg/kg/日)	0	100	300	1000	
胎児動物	外表検査 ¹⁾	検査胎児 (腹) 数	234 (22)	261 (24)	267 (23)	259 (21)	
		奇形を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		変異	変異を有する胎児 (腹) 数	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
			矮小児	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	内臓検査 ¹⁾	検査胎児 (腹) 数	115 (22)	122 (24)	124 (23)	124 (21)	
		奇形を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		変異	変異を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
			腎盂拡張	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	骨格検査 ¹⁾	検査胎児 (腹) 数	119 (22)	139 (24)	143 (23)	135 (21)	
		奇形を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		変異	変異を有する胎児 (腹) 数	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
			第3胸骨分節異常骨化	1 ^a (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			第4胸骨分節異常骨化	1 ^a (1)	0 (0)	1 ^b (1)	0 (0)
			第5胸骨分節異常骨化	0 (0)	0 (0)	1 ^b (1)	0 (0)
		化骨進行度	化骨遅延を有する胎児 (腹) 数	110 (22)	112 (24)	119 (23)	118 (21)
			左前肢第2指骨末節骨不完全骨化	13 (7)	11 (7)	25 (16*)	25 (14*)
			左前肢第5指骨基節骨不完全骨化	69 (21)	57** (22)	63* (20)	65 (19)
			左前肢第5指骨末節骨不完全骨化	81 (21)	74* (22)	90 (23)	86 (21)
			右前肢第2指骨末節骨不完全骨化	14 (8)	13 (9)	24 (15)	25 (15*)
右前肢第5指骨基節骨不完全骨化	66 (21)		47** (22)	61* (20)	67 (19)		
右前肢第5指骨末節骨不完全骨化	83 (21)		72** (22)	88 (22)	88 (21)		
左後肢第4指骨基節骨不完全骨化	41 (16)	35 (16)	35 (16)	30* (16)			
右後肢第4指骨基節骨不完全骨化	41 (15)	34 (17)	36 (17)	31* (14)			
右後肢第5指骨基節骨不完全骨化	94 (22)	99 (24)	93** (23)	83** (21)			

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数を示す。a、b: 同一個体
対照群との有意差の検定 (* : p ≤ 0.05、** : p ≤ 0.01)

1) Fisher 正確検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3) ウサギにおける発生毒性試験

(資料 No.T-22)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1999 年

検体純度： %

供試動物：CHBB：HM 系ヒマラヤウサギ、一群雌 22 匹、開始時 130～259 日齢、
開始時体重 1949～3182 g

投与期間：妊娠 6～28 日の 23 日間（1998 年 9 月 24 日投与開始）

投与方法：検体を 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し、0、25、100 及び 400 mg/kg/日の投与レベルで妊娠後 6 日目^{*)} から 28 日目までの 23 日間、毎日 1 回強制経口投与した。対照群には 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を同様に投与した。なお、投与容量は 5 mL/kg とし、投与期間中の体重に基づき毎日投与容量を調整した。

^{*)} 交尾を認めた日を妊娠 0 日とした。

用量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物；妊娠 0～28 日の間、妊娠動物について、一般状態（外観及び行動）及び排泄物の観察を少なくとも 1 日 2 回（週末、休日及び妊娠 29 日には 1 日 1 回）実施した。体重は妊娠 0 日及び 6～29 日まで毎日測定し、補正体重増加量を妊娠 0～29 日間での体重増加量から妊娠 29 日の子宮重量を減じて算出した。又、妊娠 0～6、6～9、9～12、12～15、15～18、18～21、21～24、24～27 及び 27～29 日に摂餌量を測定した。飲水量を目視によ

り評価した。妊娠 29 日に、2 mL の T61[®] ad us. vet. (Hoechst AG) の静脈内投与によって屠殺して帝王切開を行った。用量群を伏せて肉眼的病理検査を行い、黄体数及び着床数（着床痕が肉眼的に認められない雌については、子宮を 10% 硫化アンモニウム水溶液で染色した後に観察）、子宮重量、胎盤重量及び外観、生存胎児数、早期吸収胚（着床痕のみが認められる）数、後期吸収胚（胎児又は胎盤遺残が認められる）数及び死亡胎児（生命の徴候はないが浸軟はみられない）数を記録した。

生存胎児；生存胎児の性別、生存胎児重量、胎児の外表面所見、胎児の腹腔内、骨盤腔内及び胸腔内臓器並びに脳の所見を記録した。各同腹児の半数については、STAPLES の変法に従って内臓を除去し、エタノール水溶液で固定した後、アルシアン・ブルーを含む氷酢酸水溶液、アリザリン・レッド S を含む水酸化カリウム水溶液で処理して骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。残りの胎児については、腹腔内、骨盤腔内及び胸腔内臓器の所見を記録した後、WILSON の変法に従って脳の横断切片を作成し、異常の有無を検査した。

結果：概要を以下の表に示した。

母動物；100 mg/kg 以下の投与群では、検体投与に関連した一般状態への影響は観察されなかった。臨床徴候としては、400 mg/kg の雌 3 例に 1 又は 2 日間にわたって耳介の低温が認められたが、死亡例はいずれの投与群においても認められなかった。なお、投与群で用量依存的に便の退色が認められたが、投与開始後に認められた数例の軟便／下痢の所見以外に消化不良の徴候が認められなかったため、本所見は白色の検体の排泄に起因するものと推測された。100 mg/kg 以上の投与量では、投与開始後（妊娠 6～9 日）に平均摂餌量が減少し、それに対応して排便量も減少した。100 及び 400 mg/kg の各 1 例では、その後（妊娠 15～21 日又は 18 日）も一過性の著しい摂餌量の減少が認められ、飲水量及び排尿量も減少した。400 mg/kg では、投与開始後（妊娠 6～9 日）の平均体重の減少が他の群よりも顕著であり、投与第 1 週において明らかな体重減少を示した動物数は、100 mg/kg では僅かに、400 mg/kg では明らかに増加した。100 及び 400 mg/kg で著しい摂餌量の減少がみられた雌 2 例では、投与開始後約 2 週間にわたって顕著な体重減少が認められた。雌の剖検では、投与に関連した所見は認められなかった。

繁殖パラメータ及び子宮内発育に関して、交尾率、受胎率、出産率、黄体数、着床率、胎盤の外観及び重量、着床後胚・胎児死亡及び対応する胎児数には、400 mg/kg 群まで投与による影響は認められなかった。

25 mg/kg 群では母体毒性は認められなかった。

<申請者注：

>

生存胎児；検体投与群の同腹児数、腹当たりの生存児数、性比及び胎児重量は、いずれの用量においても対照群と大差なく、検体投与の影響は認められなかった。奇形を有する胎児及び腹の頻度は、400 mg/kg までの投与量では検体投与による影響は認められなかった。しかし、400 mg/kg では、通常よくみられる肋軟骨の所見（頸肋又は胸骨の変異を伴う/伴わない癒合、二分）を有する胎児数が僅かに増加した。この頻度の増加は、主として1腹の胎児3例によるものであった。肋軟骨の所見は、用いた本系統のウサギによくみられる軽度の奇形であり、異常を認めた胎児数は通常の分散範囲を僅かに上回ったが、異常を認めた腹数は範囲内にあった。したがって、異常を認めた胎児の出現頻度の増加に統計学的な有意性はみられたものの、投与との関連性は疑問が残る。胎児の外表検査又は内臓異常（奇形以外の所見）の評価では、400 mg/kg で側脳室の軽度拡張が2例の胎児に認められた。この2例は同じ腹の胎児であり、この腹では著しい母体毒性がみられたため、検体投与との関連性を完全には否定できない。一方、胎児の骨格異常に関する評価では、化骨進行度にいくつか統計学的に有意な所見が認められたが、以下の理由で400 mg/kg までの用量で投与による影響は認められなかった。

- 1) 25 mg/kg 及び 400 mg/kg における第 15 尾椎体、100 mg/kg 及び 400 mg/kg における左右第 8 尾椎弓の僅かな骨化遅延は、統計学的に有意な所見であったが、用量依存性はみられず、腹別データについて解析した場合には統計学的に有意ではなく、その値は背景データの範囲内であったことから、偶発的なものと考えられた。
- 2) 400 mg/kg における第 16 尾椎体の不完全骨化の頻度は、対照群と比較して統計学的に有意であったが、背景データの範囲内であり、腹別データについて解析した場合には統計学的に有意ではなかったため、偶発的なものと考えられた。
- 3) 400 mg/kg における第 13 尾椎体の不完全骨化及び第 16 尾椎体存在の頻度は、それぞれ 5.7% 及び 0.7% であり、対照群と比較して統計学的に有意であったが、本試験と並行して実施された試験の対照群（5.4% 及び 3.6%）と比較して有意な差はみられなかったため、偶発的なものと考えられた。

以上のように、検体を妊娠 6～28 日に経口投与したとき、母動物に 100 mg/kg 以上の投与量で摂餌量の減少、飲水量減少、排尿量減少、排便量減少、体重増加量減少、400 mg/kg で耳介低温及び軟便/下痢が認められた。400 mg/kg までの投与量では、繁殖パラメータ及び子宮内発育に対して投与による影響は認められなかった。400 mg/kg では、顕著な母体毒性を示した雌の同腹児 2 例に脳の異常がみられたため、軽度の発生毒性を完全に否定できないと思われる。さらに、400 mg/kg では、よくみられる肋軟骨の異常所見を有する胎児の僅かな増加が認められたが、投与との関連性については疑わしい。したがって、本検体に特異的な発生毒性は認められないと判断した。

検体を妊娠 6～28 日に経口投与したときの母動物における無毒性量は 25 mg/kg/日及び子宮内発育における無毒性量は 100 mg/kg/日であった。又、最高投与量の 400 mg/kg/日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た。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	25	100	400	
1 群当り動物数		22	22	22	22	
途中死亡/切迫殺数		0	0	0	0	
一般状態 1), f	0~5 日	排尿量増加	3	5	2	1
		飲水量増加	1	5	2	2
	6~29 日	脱毛	1	3	5	4
		耳介低温	0	0	0	3
		排便量減少	5	4	8	9
		軟便	2	2	3	↑8
		便退色	1	↑7	↑9	↑16
		排尿量減少	11	14	12	↑18
		排尿量増加	11	10	5	10
		飲水量減少	7	11	12	↑14
		飲水量増加	10	11	8	13
		平均体重 ^d (g)	妊娠 6 日	2479.7	2423.6	2479.3
妊娠 9 日	2453.9		2412.6	2457.8	2375.6	
妊娠 12 日	2456.4		2411.9	2458.3	2374.0	
妊娠 29 日	2701.0		2670.9	2672.6	2619.9	
平均体重 増加量 ^d (g)	妊娠 6~9 日	-25.8	-11.0	-21.5	-43.9	
	妊娠 6~29 日	221.3	247.3	193.4	200.4	
	妊娠 0~29 日	234.6	254.7	196.6	219.7	
補正体重増加量 (g) ^d		-142.0	-107.1	-158.2	-132.5	
平均 摂餌量 ^d (g/動物/日)	妊娠 0~6 日	90.9	97.1	94.4	95.3	
	妊娠 6~9 日	82.3	81.7	↓69.9	↓53.7	
	妊娠 9~12 日	77.6	85.6	82.5	73.6	
	妊娠 21~24 日	81.7	87.1	82.1	85.6	
	妊娠 27~29 日	88.3	87.6	83.4	85.4	
肉眼的 病理所見	卵管嚢胞	6	7	4	6	
最終体重 (g) ^d		2701.0	2670.9	2672.6	2619.9	

1) 所見を示した動物数を示す。

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

d : Dunnett 検定、f : Fisher 検定 (一般状態のみ申請者実施)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	25	100	400		
1 群当り動物数		22	22	22	22		
母動物	交尾動物数	22	22	22	22		
	妊娠動物数	22	20	20	21		
	生存児出産動物数	22	20	20	21		
	交尾率 (%)	100	100	100	100		
	受胎率 (%)	100	90.9	90.9	95.5		
	出産率 (%)	100	100	100	100		
	着床所見	検査母動物数	22	20	20	21	
		平均黄体数 ^d	8.5	8.5	8.9	8.2	
		平均着床数 ^d	7.9	7.7	7.9	7.4	
		着床率 (%) ^f	93.5	90.6	89.8	90.1	
		着床前損失率 (%) ^f	6.5	9.4	10.2	9.9	
		着床後損失率 (%) ^f	7.5	9.1	13.2	9.0	
		総胎児数	161	140	138	141	
		平均生存胎児数 ^d	1.55	1.84	2.61	2.26	
		死亡胎児総数 ^k	0	0	0	0	
		早期吸収	平均数 ^k	0.0	0.0	0.0	0.0
		後期吸収	平均数 ^k	0.6	0.7	1.0	0.7
		妊娠子宮重量 (g) ^d		376.6	361.8	354.9	352.2
	胎児	平均胎児体重 ^d (g)	雄	37.12	36.60	36.63	37.93
雌			36.01	35.81	35.83	37.75	
平均胎盤重量 (g) ^d			3.86	4.08	3.90	4.09	
性比 (雄胎児%) ^f			46.4	51.1	52.9	51.7	

交尾率 (%) = (受精した雌動物数 / 雄と同居させた雌動物数) × 100

受胎率 (%) = (妊娠雌動物数 / 受精した雌動物数) × 100

出産率 (%) = (生存児出産雌動物数 / 妊娠雌動物数) × 100

着床前損失率 (%) = [(黄体数 - 着床数) / 黄体数] × 100

着床後損失率 (%) = [(着床数 - 生存胎児数) / 着床数] × 100

対照群との有意差の検定 (↓↑: p ≤ 0.05)

d: Dunnett 検定、f: Fisher 正確検定、k: Kruskal-Wallis 検定

結果の概要 (つづき)

		投与量 (mg/kg/日)	0	25	100	400	
胎児動物	外表検査 f	検査胎児 (腹) 数	161 (22)	140 (20)	138 (20)	141 (21)	
		奇形	奇形を有する胎児 (腹) 数	2 (2)	0 (0)	7 (4)	5 (5)
			有窓頭蓋	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
			ドーム頭	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
			前肢位置異常	2 (2)	0 (0)	6 (4)	4 (4)
		変異を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	内臓検査 f	検査胎児 (腹) 数	161 (22)	140 (20)	138 (20)	141 (21)	
		奇形	奇形を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	2 (2)	1 (1)
			外水頭症	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
			頭蓋変形及び脳髄膜ヘルニア合併所見	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
			心室中隔欠損	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		変異	変異を有する胎児 (腹) 数	1 (1)	1 (1)	0 (0)	5 (4)
			側脳室軽度拡張	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)
			上行大動脈拡張及び肺動脈小型化合併所見	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
			腹腔内赤色液貯留	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
			肝臓白色化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
			肝小葉明瞭化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	骨格検査 f	検査胎児 (腹) 数	161 (22)	140 (20)	138 (20)	141 (21)	
		奇形	奇形を有する胎児 (腹) 数	3 (2)	6 (5)	4 (3)	7 (5)
			左第 5 及び 6 肋骨癒合-合併所見	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
第 7 頸部脊椎骨の右頸肋骨、頸肋骨と右第 1 肋骨の癒合；左第 4 及び 5 肋骨癒合-合併所見			0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
第 7 頸部脊椎骨の両側の頸肋骨及び第 1 肋骨の両側二分-合併所見 (両側の第 1 肋骨の上部及び第 1 胸骨分節下部の二分した軟骨部、続く肋骨の軟骨部がひとつの胸骨分節によって尾部側に移動している)			0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数を示す。

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

f: Fisher 正確検定

ア～オ: それぞれ同一胎児あるいは腹に骨格奇形が認められた。

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		0	25	100	400	
胎児動物	骨格検査 奇形	検査胎児 (腹) 数	161 (22)	140 (20)	138 (20)	141 (21)
		奇形を有する胎児 (腹) 数	3 (2)	6 (5)	4 (3)	7 (5)
		第 7 頸部脊椎骨の両側の頸肋骨、頸肋骨と右第 1 肋骨の癒合-合併所見	0 (0)	1 (1 ^f)	0 (0)	0 (0)
		右第 4 肋骨分岐及び肋骨軟骨部二分 (二分した軟骨部の後部と第 5 肋骨の癒合) 合併所見-合併所見	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		右第 3 及び 4 肋骨の癒合-合併所見	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		腰部脊椎骨の一つが欠損、右第 1 仙骨脊椎骨欠損、右骨盤が尾側へ移動-合併所見	1 (1 ^f)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		第 2 腰椎体で左骨化中心のみ残存、第 1 及び 3 腰部脊椎骨の位置が非対称、右第 2 腰部脊椎骨弓欠損-合併所見	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		ドーム頭、眼窩欠損、上下小顎及び癒合、上顎上部開口、泉門拡張、鼻骨欠損、前頭骨癒合 (無縫合)、両側の頭頂骨、頭頂間骨、後頭骨、側頭骨、翼状骨及び蝶骨の変形、頬骨前方で癒合及び変形、両側の舌骨弓不完全骨化-合併所見	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1 ^f)

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数を示す。

対照群との有意差の検定 (↓↑: $p \leq 0.05$)

f: Fisher 正確検定

ア～オ: それぞれ同一胎児あるいは腹に骨格奇形が認められた。

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		0	25	100	400	
胎児動物	骨格検査	検査胎児 (腹) 数	161 (22)	140 (20)	138 (20)	141 (21)
		奇形を有する胎児 (腹) 数	3 (2)	6 (5)	4 (3)	7 (5)
		第 1 胸椎体で右骨化中心のみ残存及び第 2 胸椎体と癒合、第 7 頸部脊椎骨及び 3 腰部脊椎骨の位置が非対称、左第 2 肋骨の軟骨部と付属軟骨部が癒合-合併所見	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		左第 1 肋骨二分-合併所見	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1 ^ア)
		第 2 胸骨分節：左骨化中心のみ残存、第 7 頸部脊椎骨で両側の頸肋骨、右頸肋骨と右第 1 肋骨の癒合、左頸肋骨浮遊、肋骨：一つの胸骨分節により右第 2 肋骨及び左第 1 肋骨から後方へ移動-合併所見	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1 ^オ)
		左第 1 肋骨二分及び遠位端と癒合-合併所見	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 ^ウ (1 ^オ)
		第 1 胸骨分節上の 1 個過剰な骨化中心、右第 1 肋骨二分-合併所見	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 ^ウ (1 ^オ)
		腰部脊椎骨：1 本過剰	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		腰部脊椎骨：1 本欠損	2 (2 ^ア)	0 (0)	2 (1)	0 (0)
		尾椎体：癒合	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
	変異を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	化骨進行度	化骨進行度に異常を有する胎児 (腹) 数	161 (22)	140 (20)	138 (20)	141 (21)
		右第 5 中手指骨不完全骨化	7 (3)	10 (4)	3 (2)	4 (3)
		左第 5 中手指骨不完全骨化	7 (3)	10 (4)	3 (1)	4 (3)
		右第 1 中手骨不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		左第 1 中手骨不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		右第 5 中足指骨不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	左第 5 中足指骨不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数を示す。

対照群との有意差の検定 (↓↑: $p \leq 0.05$)

f: Fisher 正確検定

ア～オ: それぞれ同一胎児あるいは腹に骨格奇形が認められた。

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		0	25	100	400
胎児動物 骨格検査 化骨進行度	検査胎児 (腹) 数	161 (22)	140 (20)	138 (20)	141 (21)
	化骨進行度に異常を有する胎児 (腹) 数	161 (22)	140 (20)	138 (20)	141 (21)
	第 1 胸骨不完全骨化	1 (1)	1 (1)	2 (2)	3 (2)
	第 5 胸骨不完全骨化	103 (22)	85 (20)	90 (20)	86 (21)
	第 5 胸骨未骨化	38 (15)	44 (16)	34 (13)	22 (10)
	第 3 胸骨非対称	1 (1)	1 (1)	2 (2)	1 (1)
	第 4 胸骨非対称	1 (1)	1 (1)	2 (2)	1 (1)
	第 6 胸骨二分	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	胸骨過剰骨化中心	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	胸骨癒合	3 (3)	4 (2)	2 (2)	4 (4)
	第 2 胸骨骨化中心 1 個存在	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	右第 10 肋骨短小 (軽度)	2 (1)	0 (0)	0 (0)	2 (1)
	右第 12 肋骨短小 (軽度)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	1 (1)
	左第 10 肋骨短小 (軽度)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	左第 12 肋骨短小 (軽度)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	右第 6 肋骨肥厚 (軽度)	0 (0)	4 (1)	3 (3)	0 (0)
	右第 7 肋骨肥厚 (軽度)	3 (3)	5 (4)	3 (3)	2 (2)
	左第 6 肋骨肥厚 (軽度)	6 (5)	7 (4)	2 (1)	2 (2)
	左第 7 肋骨肥厚 (軽度)	5 (5)	5 (5)	7 (6)	10 (8)
	右第 12 肋骨湾曲 (軽度)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	左第 12 肋骨湾曲 (軽度)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	右第 7 頸肋骨存在	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	左第 7 頸肋骨存在	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	左第 13 肋骨点状	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	右第 13 肋骨コンマ型	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	右第 13 肋骨完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	左第 13 肋骨完全骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	両側第 13 肋骨完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第 1 頸椎体存在 (不完全骨化)	7 (5)	8 (5)	7 (4)	4 (4)
	第 6 胸椎体ダンベル型	1 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (2)
第 7 胸椎体ダンベル型	1 (1)	3 (2)	1 (1)	2 (2)	
左第 1 仙椎弓不完全骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数を示す。

対照群との有意差の検定 (↓↑: $p \leq 0.05$)

f: Fisher 正確検定

結果の概要 (つづき)

		投与量 (mg/kg/日)	0	25	100	400
胎児動物	骨格検査 f	検査胎児 (腹) 数	161 (22)	140 (20)	138 (20)	141 (21)
		化骨進行度に異常を有する胎児 (腹) 数	161 (22)	140 (20)	138 (20)	141 (21)
		右第 8 尾椎弓存在	100 (21)	72 (19)	↓64 (18)	↓67 (18)
		右第 9 尾椎弓存在	2 (2)	2 (2)	2 (2)	1 (1)
		左第 8 尾椎弓存在	100 (21)	72 (19)	↓64 (18)	↓67 (18)
		左第 9 尾椎弓存在	2 (2)	2 (2)	2 (2)	1 (1)
		第 14 尾椎体存在	156 (22)	136 (20)	138 (20)	135 (21)
		第 15 尾椎体存在	119 (22)	↓79 (20)	91 (20)	↓80 (20)
		第 16 尾椎体存在	16 (8)	6 (5)	20 (9)	↓1 (1)
		第 13 尾椎体不完全骨化	0 (0)	5 (3)	5 (5)	↑8 (6)
		第 14 尾椎体不完全骨化	29 (17)	36 (16)	31 (15)	37 (17)
		第 15 尾椎体不完全骨化	58 (21)	50 (19)	51 (18)	53 (20)
		第 16 尾椎体不完全骨化	14 (7)	5 (4)	17 (8)	↓1 (1)
		第 13 尾椎体非対称	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		両側恥骨不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		舌骨椎体不完全骨化	123 (22)	93 (19)	118 (20)	105 (21)
		泉門縫合骨	5 (3)	2 (2)	2 (2)	0 (0)
		右前頭骨不完全骨化	2 (2)	2 (2)	4 (4)	1 (1)
		左前頭骨不完全骨化	4 (4)	5 (4)	6 (5)	2 (2)
		両側前頭骨不完全骨化	8 (7)	5 (2)	4 (3)	3 (3)
		右頭頂骨不完全骨化	1 (1)	3 (3)	4 (4)	3 (3)
		左頭頂骨不完全骨化	6 (5)	5 (5)	6 (6)	3 (2)
		両側頭頂骨不完全骨化	7 (6)	9 (6)	3 (3)	4 (4)
		頭頂間骨不完全骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
後頭上骨不完全骨化	2 (2)	3 (3)	0 (0)	0 (0)		
側後頭骨不完全骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児 (腹) 数を示す。

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

f: Fisher 正確検定

背景データ

投与量 (mg/kg/日)			胎児	腹	
胎 児 動 物	奇形 (1993~1997)		0~8.33%	0~37.5%	
	内臓変異 (1993~1997)		0~11.64%	0~19.05%	
	骨 格 検 査	化 骨 進 行 度 *	右第8尾椎弓存在	15.1~82.8%	50.0~100.0%
			左第8尾椎弓存在	15.1~82.8%	50.0~100.0%
			第15尾椎体存在	58.9~84.9%	93.3~100.0%
			第16尾椎体存在	15.0~11.3%	6.7~43.8%
			第13尾椎体不完全骨化	6.1~12.2%	0~18.8%
第16尾椎体不完全骨化	0~9.4%	0~40.0%			

奇形及び変異の各所見の数値は異常が認められた胎児（腹）の出現率を示す。

* : 1993~1996

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(13) 変異原性

1) 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 No. T-23)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1996 年

検体の純度： %

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法に従いプレート法とプレインキュベーション法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、16~5000 µg/プレート (1 回目試験)、10~3162 µg/試験管 (2 回目試験) の範囲の 6 濃度で実施した。試験は 3 連制とした。

用量設定根拠：

結果：復帰変異コロニー数を次表に示す。

第1回試験 (プレート法)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	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	
			TA1535	TA100	TA102	TA1537	TA98
対照 (DMSO)	0	-	7	58	163	5	20
検体	16	-	7	62	190	5	17
	50	-	4	61	188	3	21
	158	-	5	56	181	5	17
	500	-	4	65	177	4	14
	1581	-	5	45	174	5	16
	5000	-	---	---	---	---	---
対照 (DMSO)	0	+	8	70	212	9	28
検体	16	+	7	58	221	8	28
	50	+	7	73	211	5	28
	158	+	8	64	201	6	24
	500	+	7	72	247	6	25
	1581	+	8	61	227	5	26
	5000	+	---	---	---	---	---
陽 性 対 照	アジ化ナトリウム	10	-	704			
	ニトロフラン	0.2	-		214		
	4-ニトロ-4,2-フェニレン ジアミン	10	-			117	
		0.5	-				111
	クマンヒドロペルオキシド	50	-			321	
	2-アミノアントラセン	3	+	52	828	1148	216

---: 観察不可能

空欄: 該当なし

第2回試験（プレインキュベーション法）

薬物	濃度 (μg /試験管)	S9 mix の有無	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	
			TA1535	TA100	TA102	TA1537	TA98
対照 (DMSO)	0	-	9	83	287	16	45
検体	10	-	8	81	298	13	49
	32	-	7	79	303	14	51
	100	-	8	79	281	10	47
	316	-	10	83	251	9	52
	1000	-	6	87	202	8	48
	3162	-	---	---	---	---	---
対照 (DMSO)	0	+	10	91	303	13	50
検体	10	+	12	80	305	7	63
	32	+	10	89	346	6	65
	100	+	10	92	351	6	52
	316	+	12	99	348	7	56
	1000	+	8	93	343	7	59
	3162	+	10	97	335	4	51
陽 性 対 照	アジ化ナトリウム	10	-	913			
	ニトロフラントイン	0.2	-		224		
	4-ニトロ-4,2-フェニレン ジアミン	10	-			155	
		0.5	-				215
	クメンヒドロペルオキシド	50	-			599	
	2-アミノアントラセン	3	+	136	1454	607	124

---: 観察不可能

空欄: 該当なし

2回の試験において検体はS9 mixの有無にかかわらず、菌株の生育阻害を起こさず、また、観察が可能な各最高用量（1581 μg /プレート及び1000あるいは3162 μg /試験管）においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加が認められなかった。一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、ニトロフラントイン、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン、クメンヒドロペルオキシド及び2-アミノアントラセンでは全ての菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果により、検体は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰突然変異誘発性は有しないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2) 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 No. T-24)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1998 年

検体の純度： %

試験方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法に従いプレート法とプレインキュベーション法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、16~5000 µg/プレート (1 回目試験)、16~5000 µg/試験管 (2 回目試験) の範囲の各 6 濃度で実施した。各試験は 3 連制とした。

用量設定根拠：

結果：復帰変異コロニー数を次表に示す。

第1回試験（プレート法）

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	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	
			TA1535	TA100	TA102	TA1537	TA98
対照 (DMSO)	0	-	12	70	191	8	16
検体	16	-	12	76	207	9	15
	50	-	11	81	221	8	16
	158	-	10	76	214	7	15
	500	-	13	83	176	6	13
	1581	-	7	83	205	5	13
	5000	-	---	69	---	---	---
対照 (DMSO)	0	+	14	94	316	13	28
検体	16	+	14	106	334	12	34
	50	+	12	93	331	12	24
	158	+	14	100	288	12	25
	500	+	12	100	317	9	31
	1581	+	10	103	304	7	28
	5000	+	---	95	---	---	---
陽 性 対 照	アジ化ナトリウム	10	-	812			
	ニトロフラン	0.2	-		206		
	4-ニトロ-1,2-フェニレン ジアミン	10	-			122	
		0.5	-				167
	クメンヒドロペルオキシド	50	-			324	
	2-アミノアントラセン	3	+	456	1481	401	249

---: 観察不可能

空欄: 該当なし

第2回試験（プレインキュベーション法）

薬物	濃度 (μg /試験管)	S9 mix の有無	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	
			TA1535	TA100	TA102	TA1537	TA98
対照 (DMSO)	0	-	7	113	391	8	16
検体	16	-	9	95	394	6	15
	50	-	8	104	381	8	19
	158	-	8	99	403	11	19
	500	-	9	115	333	9	20
	1581	-	9	108	407	7	16
	5000	-	8	93	---	---	---
対照 (DMSO)	0	+	11	138	373	9	30
検体	16	+	11	135	386	8	34
	50	+	13	132	401	11	24
	158	+	12	126	439	6	27
	500	+	12	136	346	5	26
	1581	+	11	138	366	8	32
	5000	+	8	108	---	---	---
陽性 対照	アジ化ナトリウム	10	-	803			
	ニトロフランリン	0.2	-		244		
	4-ニトロ-1,2-フェニレン ジアミン	10	-			107	
		0.5	-				215
	クメンヒドロペルオキシド	50	-			881	
	2-アミノアントラセン	3	+	184	977	761	138

---：観察不可能
空欄：該当なし

2回の試験において検体はS9 mixの有無にかかわらず、菌株の生育阻害を起さず観察が可能な各最高用量（1581 μg /プレート及び1581 μg /試験管あるいは5000 μg /プレート及び5000 μg /試験管）においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加が認められなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、ニトロフランリン、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン、クメンヒドロペルオキシド及び2-アミノアントラセンでは全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果により、検体は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3) チャイニーズハムスターの V79 細胞を用いた *in vitro* における
哺乳動物染色体異常誘発試験

(資料 No. T-25)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1996 年

検体の純度： %

試験方法：チャイニーズハムスターの V79 細胞を用い、代謝活性化及び非活性化による哺乳動物染色体異常誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して調製し、0、20、40、80、160 及び 320 µg/mL の濃度に、無処理を加えて 4 時間処理し、18 時間後に染色体標本作製した。同様に、陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC、S9 mix 非存在下) 及びシクロホスファミド (CP、S9 mix 存在下) を 4 時間処理し、18 時間後に染色体標本作製した (第 1 回回収)。又、第 2 回回収では、0、80、160 及び 320 µg/mL で 4 時間処理を行い、30 時間後に染色体標本作製した。なお、プレートは 1 濃度群当たり 2 枚を用いた。

用量設定根拠：

結果：染色体異常を有した細胞数を次頁の表に示す。

第1回回収

薬物	濃度 (μg /mL)	処理 時間	標 本作 製時 間	観 察 細 胞 数	S9 mix の 有 無	染色体異常を有する細胞数											
						ギャップ*		染色分体型			染色体型			その他			
						g	ig	b	f	d	ib	if	id	ex	maE	ma	cd
溶媒対照* (DMSO)	0	4	18	200	-	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
無処理	0	4	18	200	-	1	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	0
検体	20	4	18	200	-	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
	40	4	18	200	-	1	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	80	4	18	200	-	1	0	1	0	0	2	0	2	0	0	0	0
陽性対照 MMC*	0.1	4	18	200	-	5	0	37	2	1	44	12	4	21	1	0	0
溶媒対照 (DMSO)	0	4	18	200	+	1	0	4	0	0	0	1	0	2	0	1	0
無処理	0	4	18	200	+	3	0	2	0	0	1	0	1	5	0	0	0
検体	20	4	18	200	+	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	40	4	18	200	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	80	4	18	200	+	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
陽性対照 CP*	2	4	18	200	+	4	2	17	2	0	24	4	1	16	0	1	0

*DMSO : ジメチルスルホキシド、MMC : マイトマイシン C、CP : シクロホスファミド

g : ギャップ (染色分体型)、ig : 同位ギャップ、b : 切断、ib : 同位切断、f : 断片、if : 同位断片、

d : 欠失、id : 同位欠失、ex : 交換、maE : 交換を有する多発性異常、ma : 多発性異常、cd : 染色体崩壊

第2回回収

薬物	濃度 (μg /mL)	処理時間	標本作製時間	観察細胞数	S9 mix の有無	染色体異常を有する細胞数											
						ギャップ*		染色分体型			染色体型			その他			
						g	ig	b	f	d	ib	if	id	ex	maE	ma	cd
溶媒対照* (DMSO)	0	4	30	200	-	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0
検体	80	4	30	200	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
溶媒対照 (DMSO)	0	4	30	200	+	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
検体	80	4	30	200	+	1	0	3	0	0	0	2	2	0	0	0	0

*DMSO：ジメチルスルホキシド

g：ギャップ（染色分体型）、ig：同位ギャップ、b：切断、ib：同位切断、f：断片、if：同位断片、

d：欠失、id：同位欠失、ex：交換、maE：交換を有する多発性異常、ma：多発性異常、cd：染色体崩壊

S9 mix 非存在下では、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で検体の析出及び細胞生存率の低下が、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で用量相関性に分裂指数の低下が認められた。又 S9 mix 存在下では、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で検体の析出が、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で細胞生存率の低下が、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で分裂指数の低下が認められた。細胞生存率、分裂指数の結果及び中期像の質から、18 間後標本作製時には 20、40 及び 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、30 時間後標本作製では 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をのみを観察した。

検体は代謝活性化の有無にかかわらず、全ての処理群で染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた MMC 及び CP では染色体異常を示す分裂中期細胞数の明らかな増加を示した。

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

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

4) チャイニーズハムスター細胞 (V79) を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験 (資料 No.T-26)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1997 年

検体の純度: %
 %

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) の存在下及び非存在下で、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、S9 mix 存在下及び非存在下ともに培養液に 1v/v%以下で添加した。陰性対照に培養液、溶媒対照に DMSO を、陽性対照には S9 mix 存在下でジメチルベンズアントラセン (DMBA)、非存在下でエチルメタンスルホン酸 (EMS) を用いた。1 濃度当たり 2 個のフラスコ (250 mL) 中に 4×10^6 細胞を播種し、細胞が付着 (16~24 時間) した後、血清濃度を減じた (2%) 培養液中で検体、溶媒及び陽性対照を 5 時間暴露した。その後、細胞を剥離し、細胞毒性確認用に 3 枚のシャーレ (60 mm) に 200 細胞を再播種し 7 日間培養した後、形成されたコロニー数を計数した。

一方、突然変異試験用には、フラスコに 1.5×10^6 細胞を播種し培養を続け突然変異を発現させた。細胞は 4 及び 7 日目に継代した。発現期間 (7 日) 終了後、変異細胞選抜用に 6-チオグアニン (6-TG) を含有し、ヒポキサンチンを除去した培養液を入れたシャーレ 8 枚に 3×10^5 細胞を再播種した。さらに、各濃度のコロニー形成率測定用に 3 枚のシャーレの培養液に 200 細胞を播種した。6~7 日間培養後、細胞を固定し Giemsa 染色を施した後、突然変異試験用及びコロニー形成率測定用シャーレに形成された 50 細胞を超える細胞から成るコロニー数を計数した。試験は、S9 mix 存在下及び非存在下でそれぞれ 2 回行った。

用量相関性を伴って有意に増加が認められ、併行して実施した 2 試験で再現性が認められた場合に陽性と判定した。

用量設定根拠:

結果：細胞生存率、相対細胞増殖率及び突然変異誘発頻度を下表に示す。

	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix の有無	相対生存率 ^{a)} (%)	相対細胞増殖率 ^{b)} (%)	突然変異誘発頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
1 回目 試験	陰性対照 (培養液)	0	-	105.9 87.6	107.6 94.5	0.9 0.0
	溶媒対照 (DMSO*)	0	-	100.0 100.0	100.0 100.0	1.8 0.4
	検体	1	-	103.5 95.8	77.0 85.1	1.9 2.1
				5	-	98.2 74.7
		25	-	79.1 92.6	83.3 70.5	1.2 2.2
				50	-	77.8 85.0
		100	-	71.9 79.3	12.3 12.1	0.0 1.4
				200 P	-	103.2 71.4
	陽性対照 (EMS*)	900	-	76.6 74.4	35.6 25.2	608.5 473.9
	2 回目 試験	陰性対照 (培養液)	0	-	106.0 110.1	87.1 107.3
溶媒対照 (DMSO)		0	-	100.0 100.0	100.0 100.0	1.1 0.4
検体		1	-	98.1 106.2	86.8 156.9	0.4 0.4
				5	-	102.7 69.6
		25	-	67.8 86.0	71.7 97.1	0.5 0.5
				50	-	66.7 74.1
		100	-	68.9 72.9	25.4 23.4	0.5 0.5
				200 P	-	110.2 105.8
陽性対照 (EMS)		900	-	80.2 111.2	24.1 55.8	677.2 699.9

* DMSO：ジメチルスルホキシド、EMS：エチルメタンサルホン酸、\$：播種時細胞数が不足のため算出不能

N：細胞毒性によりコロニーを形成せず。 P：検体の析出が認められた。

a)：相対生存率 = (処理群のシャーレ当たりの平均コロニー数 / 溶媒対照のシャーレ当たりの平均コロニー数) $\times 100$ 、

b)：相対細胞増殖率 = (処理群の絶対細胞増殖率 / 溶媒対照群の絶対細胞増殖率) $\times 100$ 、

c)：突然変異誘発頻度 = [突然変異コロニー総数 / (接種細胞数 \times コロニー形成率)] $\times 100$ 、

但し、接種細胞数 = 8 (評価シャーレ数) $\times (3 \times 10^5)$

n.c.：算出不可

(つづき)

	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対生存率 ^{a)} (%)	相対細胞増殖率 ^{b)} (%)	突然変異誘発頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)	
1 回目 試験	陰性対照 (培養液)	0	+	89.2 93.9	93.2 79.6	0.5 0.4	
	溶媒対照 (DMSO*)	0	+	100.0 100.0	100.0 100.0	4.4 2.3	
	検体	1	+	93.7 84.1	123.7 71.6	1.8 0.4	
				5	82.0 97.4	126.0 71.5	0.8 1.3
				25	80.0 95.8	85.0 81.4	0.5 0.9
				50	84.2 85.8	46.8 75.8	0.5 0.4
				75	84.9 93.1	27.8 16.5	2.2 0.6
				100	76.0 93.4	12.7 14.6	3.9 1.4
	200 P	+	77.4 92.1	8.2 10.7	3.3 0.5		
	陽性対照 (DMBA*)	20	+	70.5 86.4	110.6 67.1	89.8 99.1	
2 回目 試験	陰性対照 (培養液)	0	+	90.6 101.3	91.4 108.0	1.2 5.1	
	溶媒対照 (DMSO)	0	+	100.0 100.0	100.0 100.0	0.8 5.1	
	検体	1	+	88.3 98.0	158.5 120.3	2.5 0.5	
				5	98.4 100.4	141.9 130.7	1.1 0.8
				25	88.7 101.4	145.7 110.3	4.0 1.9
				50	95.4 89.7	36.3 54.2	0.4 1.8
				75	97.9 95.7	\$ N	4.3 n.c.
				100	92.2 84.1	N N	n.c. n.c.
	200 P	+	86.2 81.0	7.9 10.2	0.8 4.1		
	陽性対照 (DMBA)	20	+	80.1 66.6	94.7 98.7	60.1 91.1	

* DMSO : ジメチルスルホキシド、DMBA : ジメチルベンズアントラセン、\$: 播種時細胞数が不足のため算出不能
N : 細胞毒性によりコロニーを形成せず。 P : 検体の析出が認められた。

a) : 相対生存率 = (処理群のシャーレ当たりの平均コロニー数 / 溶媒対照のシャーレ当たりの平均コロニー数) $\times 100$ 、

b) : 相対細胞増殖率 = (処理群の絶対細胞増殖率 / 溶媒対照群の絶対細胞増殖率) $\times 100$ 、

c) : 突然変異誘発頻度 = [突然変異コロニー総数 / (接種細胞数 \times コロニー形成率)] $\times 100$ 、

但し、接種細胞数 = 8 (評価シャーレ数) $\times (3 \times 10^5)$

n.c. ; 算出不可

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

S9 mix 非存在下及び存在下とも、検体処理群において相対細胞増殖率が用量相関性に減少したが、細胞生存率には変化は見られなかった。特に最高用量の 200 µg/mL では、顕著な細胞毒性が認められた。

検体処理群において、S9 mix の有無にかかわらず、有意な用量相関性又は再現性のある、突然変異誘発頻度の増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質である EMS 及び DMBA では明らかな変異原性作用が認められた。

以上の結果から、検体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。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

5) チャイニーズハムスター細胞 (V79) を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験 (資料 No.T-27)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

検体の純度： %
%

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) の存在下及び非存在下で、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、S9 mix 存在下及び非存在下ともに培養液に 1v/v% 以下で添加した。陰性対照に培養液を、溶媒対照に DMSO を、陽性対照には S9 mix 存在下でジメチルベンズアントラセン (DMBA)、非存在下でエチルメタンスルホン酸 (EMS) を用いた。1 濃度当たり 2 個のフラスコ (250 mL) 中に 4×10^6 細胞を播種し、細胞付着 (16~24 時間) 後、血清濃度を減じた (2%) 培養液中で検体、溶媒及び陽性対照を 5 時間暴露した。その後、細胞を剥離し、細胞毒性確認用に 3 枚のシャーレ (60 mm) に 200 細胞を再播種し通常 6 日間培養した後、形成されたコロニー数を計数した。

一方、突然変異試験用には、フラスコに 1.5×10^6 細胞を播種し培養を続け突然変異を発現させた。細胞は 3 及び 6 日目に継代した。発現期間 (6 日) 終了後、変異細胞選抜用に 6-チオグアニン (6-TG) を含有し、ヒポキサンチンを除去した培養液を入れたシャーレ 8 枚に 3×10^5 細胞を再播種した。さらに、各濃度のコロニー形成率測定用に 3 枚のシャーレの培養液に 200 細胞を播種した。6~8 日間培養後、細胞を固定し Giemsa 染色を施した後、突然変異試験用及びコロニー形成率測定用シャーレに形成されたコロニー数を計数した。試験は、S9 mix 存在下で 2 回及び非存在下で 3 回行った。

用量相関性を伴って有意に増加が認められ、併行して実施した 2~3 試験で再現性が認められた場合に陽性と判定した。

用量設定根拠：

結果：細胞生存率、相対細胞増殖率及び突然変異誘発頻度を下表に示す。

	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix の有無	相対生存率 ^{a)} (%)	相対細胞増殖率 ^{b)} (%)	突然変異誘発頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
1 回 目 試 験	陰性対照 (培養液)	0	-	82.1	63.3	0.7
				85.4	99.0	0.6
	溶媒対照 (DMSO*)	0	-	100.0	100.0	0.6
				100.0	100.0	0.7
	検体	20	-	70.8	56.4	1.6
				89.6	65.2	2.0
		30	-	65.8	24.2	1.2
				100.8	34.7	1.6
		40	-	96.8	10.4	2.0
				97.9	15.4	0.7
		60	-	73.6	n.a.	n.a.
				107.7	n.a.	n.a.
	80 P	-	83.3	n.a.n.a.	n.a.	
85.3			n.a.n.a.	n.a.		
120 P	-	69.2	n.a.n.a.	n.a.n.a.		
		97.9	n.a.n.a.	n.a.n.a.		
160 P	-	92.5	n.a.n.a.	n.a.n.a.		
		101.2	n.a.n.a.	n.a.n.a.		
陽性対照 (EMS*)	900	-	48.6	38.7	1042.4	
			91.9	54.3	828.0	

*DMSO：ジメチルスルホキシド、EMS：エチルメタンサルホン酸

P：検体の析出が認められた。

a)：相対生存率 = (処理群のシャーレ当たりの平均コロニー数 / 溶媒対照のシャーレ当たりの平均コロニー数) $\times 100$ 、

b)：相対細胞増殖率 = (処理群の絶対細胞増殖率 / 溶媒対照群の絶対細胞増殖率) $\times 100$ 、

c)：突然変異誘発頻度 = [突然変異コロニー総数 / (接種細胞数 \times コロニー形成率)] $\times 100$ 、

但し、接種細胞数 = 8 (評価シャーレ数) $\times (3 \times 10^5)$

n.a.：相対細胞増殖率の減少により評価に使用できず。

(つづき)

	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対生存率 ^{a)} (%)	相対細胞増殖率 ^{b)} (%)	突然変異誘発頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
2 回 目 試 験	陰性対照 (培養液)	0	-	83.8 120.0	134.1 92.1	5.9 6.4
	溶媒対照 (DMSO*)	0	-	100.0 100.0	100.0 100.0	6.8 9.0
	検体	8	-	135.9 117.9	104.9 91.6	10.8 13.7
				98.4 129.9	50.3 67.0	16.2 18.5
		24	-	160.6 101.9	89.7 65.1	6.6 12.9
				135.4 120.2	47.0 44.1	6.1 13.3
		40	-	154.0 139.2	15.7 12.3	6.0 13.8
				114.3 183.5	n.a. n.a.	n.a.n.a.
	56	-	147.2 111.8	n.a.n.a.	n.a.n.a.	
	陽性対照 (EMS*)	900	-	14.1 41.7	60.6 51.6	775.6 1276.8C
3 回 目 試 験	陰性対照 (培養液)	0	-	60.0 105.9	107.4 144.5	0.8 0.4
	溶媒対照 (DMSO)	0	-	100.0 100.0	100.0 100.0	0.5 1.3
	検体	8	-	127.2 133.2	69.4 66.4	1.8 0.4
				85.7 90.7	92.0 94.0	0.9 1.1
		24	-	50.7 47.2	39.2 50.3	0.6 1.7
				28.3 83.6	35.7 37.4	0.7 0.5
		40	-	47.7 63.3	48.2 28.8	1.1 0.7
				79.7 82.6	19.0 24.6	0.6 0.6
	陽性対照 (EMS)	900	-	28.7 58.7	26.1 30.8	1939.7 1180.7

*DMSO : ジメチルスルホキシド、EMS : エチルメタンサルホン酸

C : コンタミにより1プレート不足。

a) : 相対生存率 = (処理群のシャーレ当たりの平均コロニー数 / 溶媒対照のシャーレ当たりの平均コロニー数) $\times 100$ 、

b) : 相対細胞増殖率 = (処理群の絶対細胞増殖率 / 溶媒対照群の絶対細胞増殖率) $\times 100$ 、

c) : 突然変異誘発頻度 = [突然変異コロニー総数 / (接種細胞数 \times コロニー形成率)] $\times 100$ 、

但し、接種細胞数 = 8 (評価シャーレ数) $\times (3 \times 10^5)$

n.a. : 相対細胞増殖率の減少により評価に使用できず。

(つづき)

	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対生存率 ^{a)} (%)	相対細胞増殖率 ^{b)} (%)	突然変異誘発頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
1 回目 試験	陰性対照 (培養液)	0	+	158.6 116.1	82.1 68.3	0.6 1.6
	溶媒対照 (DMSO*)	0	+	100.0 100.0	100.0 100.0	0.8 1.5
	検体	20	+	110.0 139.2	118.7 118.2	0.8 1.2
				30	+	81.2 122.6
		40	+	129.1 111.7	79.4 98.6	0.6 1.2
		60	+	89.3 113.2	33.7 44.4	0.7 2.6
		80P	+	100.9 83.7	n.a. \$	n.a.1.6
		120 P	+	68.0 116.9	n.a.n.a.	n.a.n.a.
	160 P	+	144.5 151.4	n.a.n.a.	n.a.n.a.	
	陽性対照 (DMBA*)	20	+	78.4 86.7	70.3 58.6	148.6 151.7
2 回目 試験	陰性対照 (培養液)	0	+	76.8 59.6	127.9 148.1	1.3 2.4
	溶媒対照 (DMSO)	0	+	100.0 100.0	100.0 100.0	1.9 2.4
	検体	20	+	101.4 97.5	89.7 102.9	5.7 5.2
				30	+	93.4 75.4
		40	+	91.8 92.8	129.2 46.7	0.9 3.0
		50	+	140.2 90.3	45.9 43.8	1.0 6.6
		60	+	103.1 79.5	46.2 50.1	0.6 3.1
		70 P	+	115.4 89.4	N 5.0	n.c.2.9
		80 P	+	93.5 96.9	n.a.n.a.	n.a.n.a.
	陽性対照 (DMBA)	20	+	87.1 60.9	140.3 80.4	257.5 134.4

*DMSO : ジメチルスルホキシド、DMBA : ジメチルベンズアントラセン、\$: 播種時細胞数が不足のため算出不能
N : 細胞毒性によりコロニーを形成せず。 P : 検体の析出が認められた。

a) : 相対生存率 = (処理群のシャーレ当たりの平均コロニー数 / 溶媒対照のシャーレ当たりの平均コロニー数) $\times 100$ 、

b) : 相対細胞増殖率 = (処理群の絶対細胞増殖率 / 溶媒対照群の絶対細胞増殖率) $\times 100$ 、

c) : 突然変異誘発頻度 = [突然変異コロニー総数 / (接種細胞数 \times コロニー形成率)] $\times 100$ 、

但し、接種細胞数 = 8 (評価シャーレ数) $\times (3 \times 10^5)$

n.a. : 相対細胞増殖率の減少により評価に使用できず。

n.c. : 算出不可

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

S9 mix 存在下で、検体処理群において相対細胞増殖率が用量相関性に減少し、明らかな細胞毒性が認められた。

検体処理群において、S9 mix の有無にかかわらず、有意な用量相関性又は再現性のある、突然変異誘発頻度の増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質である EMS 及び DMBA では明らかな変異原性作用が認められた。

以上の結果から、検体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。

6) マウスを用いた小核試験

(資料 No.T-28)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1999 年

検体の純度： %

供試動物：Hsd/Win:NMRI 系マウス、一群雄各 5 匹、入荷時約 6~12 週齢、
入荷時体重 38~46 g (馴化期間最低 5 日間)

試験方法：検体を超音波処理後、2%水性クレモフォア乳化剤に懸濁し、75、150 及び 300 mg/kg の投与量で、攪拌をしながら 24 時間間隔で 2 回腹腔内投与した。陰性対照群には 2%水性クレモフォア乳化剤を同様に投与した。又、陽性対照にはシクロホスファミド (CP) 20 mg/kg (溶媒；脱イオン水) を単回腹腔内投与した。なお、投与容量は 10 mL/kg とした。

後述のように 150 mg/kg 群で 3 例が死亡したため、上記と同日に入荷した動物 3 匹に投与し、死亡例の代替とした。

最終投与 24 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髄を採取して、スライドグラス上に塗抹、乾燥後、Ames Hema-Tek Slide Stainer を使用して自動染色し、骨髄標本を作製した。

細胞毒性を調べるために、各個体について 2000 個の多染性赤血球を観察し、多染性赤血球当たりの正染性赤血球数を求め、又、各個体 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数した。

用量設定根拠：

結果：骨髄標本の観察結果を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

採取時間 (時間)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE % ^{a)} (平均値±SD)	NCE/2000 PCE ^{b)} (平均値±SD)
24	陰性対照 (2%水性 クレモフォア乳剤)	0	5	0.17±0.09	1527± 453
	検体	75	5	0.09±0.07	2419± 477
		150	5	0.13±0.05	3163± 1753
		300	5	0.10±0.04	3437± 895*
	陽性対照 (CP)	20	5	1.89±0.54*	1608± 659

Wilcoxon のノンパラメトリック順位和検定 (*: P<0.01)。

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数

a) 1 個体につき 2000 個の多染性赤血球を観察した。

b) 2000 個の多染性赤血球当たりの正染性赤血球数

検体投与群では、屠殺時まで、各用量で検体投与に関連した症状として、無関心、被毛粗剛、体重減少、はいずり姿勢、痙攣、身震い、呼吸困難及び眼瞼下垂が認められ、150 mg/kg では 3 例が死亡した。摂食行動は正常であった。対照群では一般状態の異常は認められず、死亡もなかった。

小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、陰性対照群と比較して、生物学的に重要又は統計学的に有意な増加は認められなかった。

多染性赤血球と正染性赤血球の比率に、検体投与群において変動が認められた。

一方、陽性対照である CP では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、陰性対照群と比較して明らかな増加が認められた。多染性赤血球と正染性赤血球の比率に変化は認められなかった。

以上の結果から本試験条件下において、検体はマウス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。

(14) 生態機能影響

生体機能に及ぼす影響

(資料 No.T-29)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2013 年

検体の純度： %

試験項目の選択：

① 状態観察

供試動物：Cri:CD (SD) 系ラット、投与時 7 週齢、投与時体重 201.1～219.1 g、一群雄 5 匹

投与方法：検体を 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロース溶液 (0.5 w/v % CMC) に懸濁し、0 (媒体対照)、200、600 及び 2000 mg/kg の用量で、約 18 時間絶食させたラットに強制経口投与 (容量：10 mL/kg) した。投与前、投与後 0.5、1、2、3、6 及び 24 時間に、Irwin の観察方法を参考にした方法で個別に行動及び症状を観察した。

用量設定根拠：

結果：0、200、600 及び 2000 mg/kg の用量で、軟便がそれぞれ 1、3、2 及び 3 例に認められ、投与後 6 時間まで散発的に発現した。しかし、認められた軟便は一過性の軽微な変化であったため、検体投与に関連した毒性影響ではないと判断した。

② 呼吸に及ぼす影響

供試動物：Cri:CD (SD) 系ラット、投与時 7 週齢、投与時体重 223.1～267.4 g、一群雄 5 匹

投与方法：検体を 0.5 w/v %カルボキシメチルセルロース溶液 (0.5 w/v % CMC) に懸濁し、0 (媒体対照)、200、600 及び 2000 mg/kg の用量で、約 18 時間絶食させたラットに強制経口投与 (容量：10 mL/kg) した。投与前、投与後 0.5、1、2、3 及び 6 時間に、呼吸数 (回/分) 及び 1 回換気量 (mL) を whole body plethysmography を用いて計測し、これらの投

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

与前値からの変化量も算出した。

用量設定根拠；

結果：呼吸数及び1回換気量に、検体の影響は認められなかった。

③ 血圧、心拍数に対する作用

供試動物：Cri:CD (SD) 系ラット、投与時7週齢、投与時体重 193.0～251.4 g、一群雄5匹

投与方法：検体を0.5w/v%カルボキシメチルセルローズ溶液(0.5w/v%CMC)に懸濁し、0(媒体対照)、200、600及び2000mg/kgの用量で、約18時間絶食させたラットに強制経口投与(容量：10mL/kg)した。投与前、投与1、2、3及び6時間後に非観血式自動血圧測定装置で血圧(収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧)及び心拍数を測定した。投与前値に対する各変化値についても集計した。

用量設定根拠；

結果：血圧及び心拍数に、検体の影響は認められなかった。

以上の試験結果より、検体は一般症状及び循環器系に対して影響を及ぼさないことが示された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

検体の「生体機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
・症状観察 (Irwin 変法)	ラット	経口 (0.5%カルボキシ メチルセルロース 水溶液)	200、600、 2000 mg/kg	雄 5 匹	>2000	>2000	影響なし
・呼吸器系 呼吸数、1 回換 気量 (Whole body plethysmography)	ラット	経口 (0.5%カルボキシ メチルセルロース 水溶液)	200、600、 2000 mg/kg	雄 5 匹	>2000	>2000	影響なし
・循環器系 血圧、心拍数 (Tail-cuff 法)	ラット	経口 (0.5%カルボキシ メチルセルロース 水溶液)	200、600、 2000 mg/kg	雄 5 匹	>2000	>2000	影響なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No. T-30)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料No. T-31)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No. T-32)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料No. T-33)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料No.T-34)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No. T-35)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-36)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-37)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-38)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。