

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。

ウサギを用いた催奇形性試験

(資料 No. 原体-22)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

検体純度：

試験動物：ニュージーランドホワイトウサギ、1 群交尾雌各 23 匹(妊娠 1 または 2 日の動物を搬入)。体重 妊娠 3 日：3.04～3.86 kg、18±1 週齢

投与期間：妊娠 6～28 日(実験期間 2011 年 1 月 3 日～2011 年 11 月 7 日)

投与方法：検体を 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、動物に 4 mL/kg の容量で、0 (対照群)、7.5、15 および 40 mg/kg/日の投与量を、妊娠 6 日目から 28 日目までの 23 日間毎日 1 回経口投与した。

交配および妊娠 0 日：

無処理の雌 1 匹を雄 1 匹と交配させた。交配日を妊娠 0 日とした。

投与用量設定の根拠：

観察・検査項目：

[親動物]

一般症状及び死亡率；一般状態を毎日、生死を少なくとも 1 日 2 回(週末と休日は 1 回)観察した。

体重；妊娠 3、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 および 29 日に測定した。妊娠期間中における母動物の体重増加量から子宮重量を差し引いて、補正体重変化量を計算した。

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

摂餌量；妊娠 3～4、4～5、5～6、6～8、8～10、10～12、12～14、14～16、16～18、18～20、20～22、22～24、24～26、26～28 および 28～29 日に測定した。

剖検および子宮内検査；妊娠 29 日の帝王切開時に剖検を実施し、妊娠動物については肝重量を測定した。その後、子宮重量、黄体数、着床痕数、早期吸収胚（残留胎児と胎盤物質の肉眼による識別が困難）および後期吸収胚（胎児と胎盤遺残を肉眼で明確に識別することが可能）数、生存胎児および死亡胎児（前肢および後肢の指が明確な死亡受胎産物）数、生存胎児の性別および個体別体重について調べた。

[生存胎児]

全生存胎児の外表検査を行った後、各同腹児群の約 1/2 の胎児については頭部をブアン液に浸漬、固定後内部構造を検査した。全ての個体について内臓を検査し、性別を確認した後、無水エタノールで固定後 Staples and Schnell の変法を用いて染色して骨格検査を行った。

試験結果：概要を表 1 および表 2 に示した。

[親動物に対する影響]

死亡および流産：投与群では試験期間中に死亡は認められなかった。対照群では 1 匹が妊娠 25 日に流産した。

一般症状：いずれの投与群においても投与に関連する一般状態の変化は認められなかった。

体重：40mg/kg 群の体重増加量において、妊娠 6～8 日に対照群の 0.02kg 増加に対して 0.01kg 減少した。また、妊娠 6～10 日では対照群と比較して統計学的に有意に低下した。妊娠 6～29 日では対照群と比較してほぼ同等であったが、補正体重は統計学的有意差がないものの対照群と比較して 12%減少した。

[申請者追記]40 mg/kg 群の妊娠 6～8 日の体重増加量 (-0.01kg) は背景データの範囲内であったことから、投与初期の体重への影響はほとんどないものと考えられた。

15 および 7.5mg/kg 群では、投与による変化は認められなかった。両群において、妊娠 10～14 日に統計学的に有意に増加したが、一時点のみの変化であり用量関連性がないことから、偶発的な変化と考えられた。

摂餌量：40mg/kg 群において、対照群と比較して妊娠 6～8 日、8～10 日に減少が認められ、妊娠 6～8 日では統計学的に有意であった。

15 および 7.5mg/kg 群では、妊娠 14～18 日に対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められたが、一時点のみの変化で用量関連性がないことから偶発的な変化と考えられた。

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

剖検および臓器重量：剖検および肝重量ともに投与に関連する変化は認められなかった。

[子宮内発育に対する影響]

いずれの投与群においても着床所見に投与による変化は認められなかった。

[外表に関する所見]

外表の異常について、いずれの投与群においても投与に関連した所見は認められなかった。  
40mg/kg 群において、眼部隆起の突出の発生率が対照群と比較して統計学的に有意に高かった。  
しかしながら、この所見は1腹にのみ観察され、内臓および骨格所見に対応する所見が認められないことから、偶発的なものと考えられた。

[内臓に関する所見]

内臓の異常について、いずれの投与群においても投与に関連した所見は認められなかった。

[骨格に関する所見]

骨格の異常について、いずれの投与群においても投与に関連した骨格所見は認められなかった。

以上の結果から、40mg/kg 群において、母動物に対する影響として摂餌量および体重増加量の低下が認められた。したがって、母動物に対する無毒性量は15mg/kg/日、胎児に関する無毒性量は40mg/kg/日と判断した。なお、本検体の催奇形性作用は認められなかった。

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

表 1 結果の概要 (親動物)

投与用量 (mg/kg/日)		0	7.5	15	40
親動物	交配動物数	23	23	23	23
	妊娠動物数	23	22	23	22
	死亡動物数	0	0	0	0
	流産	1	0	0	0
	全吸収胚動物数	0	0	0	0
	一般症状	投与による影響は認められなかった。			
	体重増	妊娠 6~8 日	—	—	(-0.01kg)
	加量 <sup>a</sup>	妊娠 6~10 日	—	—	↓33
		妊娠 10~14 日	—	↑300	↑233
	補正体重増加量 (kg) <sup>a</sup>	-0.25	-0.24	-0.25	-0.28
摂餌量 <sup>a</sup>	妊娠 6~8 日	—	—	↓80	
	妊娠 8~10 日	—	—	89	
	妊娠 14~18 日	—	↑127	↑122	
肝臓重量	—	—	—	—	
剖検所見	投与による影響は認められなかった。				
着床所見 (腹あたり)	黄体数 <sup>a</sup>	11.5	12.7	11.5	12.9
	着床数 <sup>a</sup>	10.5	10.9	10.2	11.5
	着床前死胚率(%) <sup>a</sup>	9.2	14.5	11.0	10.9
	着床後死胚率(%) <sup>a</sup>	8.7	6.1	7.4	9.7
	早期吸収胚 <sup>a</sup>	0.3	0.4	0.4	0.6
	後期吸収胚 <sup>a</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1
	生存胎児数	9.7	10.1	9.4	10.4
	雄の割合 <sup>b</sup> (%)	48.4	52.4	50.0	47.4
	生存胎児体重雌雄(g) <sup>a</sup>	37.23	38.07	39.14	37.89
生存胎児体重雄(g) <sup>a</sup>	37.31	38.66	39.48	38.04	
生存胎児体重雌(g) <sup>a</sup>	36.52	37.60	38.81	37.75	

<sup>a</sup> : Dunnett test または Dunn test    ↓ ↑ : p<0.05、↓↑ : p<0.01

<sup>b</sup> :  $\chi^2$ 検定

— : 投与による変化なし

体重増加量および摂餌量は変動の目安として対照群を 100 としたときの数値、ただし、()内は 実測値。

表 2 結果の概要 (胎児動物)

投与用量 (mg/kg/日)		0	7.5	15	40		
胎児動物	外表検査	検査胎児数	213(22)	223(22)	216(23)	228(22)	
		奇形	臍帯ヘルニア、前肢:異常回転肢	1			
			短鼻、腹部腫大、短尾	1			
			前肢・後肢:異常回転肢、前肢:過屈曲、後肢:過伸長		1		
			短鼻、眼瞼開存、臍帯ヘルニア、腹部腫大、前肢/後肢:過屈曲、異常回転肢、浮腫		1		
			短鼻、頸部:浮腫、トーマ状頭部		1		
	変異	眼部隆起				8** (1)	
	内臓検査	検査胎児数	213[101] (22)	223[106] (22)	216[101] (23)	228[109] (22)	
		奇形	脳室拡張、脳:位置異常、鼻中隔:小			1	
			食道背方大動脈弓				1
			上行大動脈、大動脈弓、肺動脈幹:拡張、心室中隔欠損	1			
			上行大動脈、大動脈弓:拡張、肺動脈幹:狭窄、肺動脈弁:欠損、左心室:拡張、右心室:小、心中隔欠損		1		
			上行大動脈、大動脈弓:拡張、肺動脈幹:閉鎖、肺動脈弁:欠損		1	1	
			上行大動脈、大動脈弓:拡張、肺動脈幹:閉鎖、肺動脈弁:欠損、右心房:拡張、心臓:形態異常、心中隔欠損				1
			眼球コロボーマ	1			
			眼球コロボーマ、網膜:皺壁、大動脈後尿管				1
			右心室:小、胸腺痕跡	1			
			右心房/左心房:拡張、肺動脈幹:閉鎖、肺動脈弁:欠損、胃:拡張			1	
			精巣:位置異常/形態異常	1	1		
精巣:位置異常/形態異常、腕頭動脈:短小						1	

° : Fisher 直接確率検定 (一部申請者が実施)    \* : p<0.05    \*\* : p<0.01

[] 数字 : 頭部検査動物数    () 数字 : 母動物数    空欄は所見認められず。

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

投与用量 (mg/kg/日)		0	7.5	15	40		
胎児動物	内臓検査	奇形	腎臓:形態異常	1			
			肝臓:腫大	1			
			横隔膜ヘルニア、全肺葉:小			1	
			胸腺:小、横隔膜ヘルニア、心中隔欠損、全肺葉:小、腎臓位置異常		1		
		変異	網膜:皺壁	8(6)	11(8)	8(5)	7(4)
			胸腺:痕跡	13(9)	27(15)	26(13)	16(10)
	検査胎児数		213[112] (22)	223[117] (22)	216[115] (23)	228[119] (22)	
	骨格検査	奇形	第13肋骨、第9胸椎体反椎体、第9胸椎弓:小型化、第10胸椎体:形態異常、第9胸椎体半椎体と第10胸椎体:癒合	1			
			第5/第6胸骨分節:不完全骨化、第13肋骨、第9/第10肋骨:癒合、第9/第10胸椎:位置異常	1			
			鼻骨:小型化、胸骨分節:分岐、癒合、胸骨:短小、第14尾椎:位置異常		1		
			第9/13胸椎:位置異常、第12胸椎体半椎体、第12肋骨:欠損、第11肋骨:分岐、第10胸椎弓:小型			1	
			第8/9胸椎体:癒合、第13肋骨			1	
			椎骨過剰、頸肋骨:短小、第2/6胸骨分節:未骨化				1
			鼻骨:分離、前頭骨/頭頂骨:癒合、頭頂骨孔				1
変異	第2仙椎上の腰帯の結合部位	85(21)	87(22)	85(19)	95(17)		
骨化遅延	舌骨核不完全骨化	20(9)	13(10)	16(11)	23(12)		
	第5、6胸骨分節不完全骨化	18(8)	11(8)	10(7)	19(10)		
	恥骨不完全骨化	2(1)	2(2)	0(0)	5(3)		

° : Fisher 直接確率検定 \* : p<0.05 \*\* : p<0.01

[] 数字 : 頭部検査動物数 () 数字 : 母動物数 空欄は所見認められず。

(13)変異原性

1)復帰突然変異試験

細菌を用いる復帰突然変異試験 ①

(資料 No. 原体-23)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2009 年

検体の純度:

試験系: 細菌 (サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102))

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 5 株を用い、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、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、16~5000 $\mu$ g/プレートの範囲の 6 濃度で実施した。試験は各菌株あたり 3 プレートとし、2 回行った (初回; プレートインコーポレーション法、2 回目; プレインキュベーション法)。陽性対照としてアジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、ニトロフラントイン (NF)、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン (4-NPDA)、マイトマイシン C (MMC)、クメンヒドロペルオキシド (Cumene)、2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

なお、用量設定試験は行わなかった。

結果及び考察

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。すべての菌株で 1581  $\mu$ g/プレートまでの濃度では、生育阻害は認められなかった。なお、5000  $\mu$ g/プレートで弱い細胞毒性が認められたが、5000  $\mu$ g/プレートまでを評価の対象とした。

一方、陽性対照として用いた非代謝活性化条件下での  $\text{NaN}_3$ 、NF、4-NPDA、MMC および Cumene では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化条件下での 2-AA は、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 1. 1 回目試験(プレート インコーポレーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/プレート	S-9Mix 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		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
対照(DMSO)		—	124	8	212	25	7	
検体	16	—	128	8	216	26	6	
	50	—	121	7	218	27	6	
	158	—	145	7	207	24	5	
	500	—	135	7	212	24	6	
	1581	—	131	8	220	28	5	
	5000	—	116	7	223	24	9	
対照(DMSO)		+	198	12	294	31	10	
検体	16	+	182	13	297	38	8	
	50	+	190	10	314	25	10	
	158	+	177	10	335	35	8	
	500	+	213	11	314	29	8	
	1581	+	202	8	288	26	7	
	5000	+	188	7	214**	35	7	
陽 性 対 照	NaN <sub>3</sub>	10	—		805			
		20			835			
	NF	0.2	—	341				
		0.4		406				
	4-NPDA*	10/0.5	—				68	35
		20/1					117	52
	MMC	0.2	—			657		
		0.4				742		
	2-AA	3	+	1719	90	613	2031	304
		6		1881	59	1183	2221	135

\*: TA1537 : 10, 20µg/プレート, TA98 : 0.5, 1.0µg/プレート

\*\* : 細菌毒性の影響

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム      NF : ニトロフラントイン      4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン  
MMC : マイトマイシンC      2-AA : 2-アミノアントラセン



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。

表 2. 2 回目試験(プレインキュベーション法)

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/プレート	S-9Mix 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		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
対照(DMSO)		-	128	8	220	17	7	
検体	16	-	113	9	197	19	7	
	50	-	112	8	215	17	6	
	158	-	126	8	227	19	7	
	500	-	131	7	199	19	7	
	1581	-	116	9	197	18	6	
	5000	-	107	8	173	18	7	
対照(DMSO)		+	176	10	263	35	10	
検体	16	+	164	11	224	31	8	
	50	+	150	9	248	33	10	
	158	+	190	9	268	32	7	
	500	+	183	10	311	33	9	
	1581	+	165	9	245	22	8	
	5000	+	116**	8	244	28	9	
陽 性 対 照	NaN <sub>3</sub>	10	-		629			
		20			746			
	NF	0.2	-	412				
		0.4		638				
	4-NPDA*	10/0.5	-				73	32
		20/1.0					154	71
	Cumene	50	-			418		
		75				448		
	2-AA	3	+	1405	82	553	917	309
		6		1914	60	1191	1065	239

\* : TA1537 : 10、20 µg/プレート, TA98 : 0.5、1.0 µg/プレート

\*\* : 細菌毒性の影響

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム    NF : ニトロフラントイン    4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン  
Cumene : クメンヒドロペルオキシド    2-AA : 2-アミノアントラセン

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。

細菌を用いる復帰突然変異試験②

(資料 No. 原体-24)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2011 年

検体の純度：

試験系：細菌 (サルモネラ菌 (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA102))

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の5株を用い、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、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、3~5000 $\mu$ g/プレートの範囲の6または8濃度で実施した。試験は各菌株あたり3プレートとし、2回行った(初回;プレートインコーポレーション法、2回目;プレインキュベーション法)。陽性対照としてアジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、4-ニトロ-o-フェニレン-ジアミン (4-NOPD)、メチルメタンサルホナート (MMS)、2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

用量設定試験；

#### 結果及び考察

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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。また、代謝活性化系の非存在下および存在下の試験群において、復帰変異体数の減少 (指標係数 0.5 以下) のような毒性影響は生じなかったが、本試験 I で菌株 TA 1537 の 5000  $\mu$ g/プレートのみ、復帰変異数のわずかな減少が観察された。

一方、陽性対照として用いた代謝活性化の非存在下および存在下での  $\text{NaN}_3$ 、4-NOPD、MMS および 2-AA では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 1. 本試験 I (プレート インコーポレーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/プレート	S-9Mix 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		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	0	—	139	16	491	29	13	
無処理	0	—	173	20	485	48	17	
検体	3	—	136	13	493	30	12	
	10	—	141	17	488	30	14	
	33	—	134	18	434	31	11	
	100	—	147	16	452	32	12	
	333	—	156	16	462	32	12	
	1000	—	140	18	455	28	8	
	2500	—	149	13	450	31	11	
	5000	—	132	14	390	35	4	
対照 (DMSO)	0	+	174	20	633	39	13	
無処理	0	+	162	17	540	37	24	
検体	3	+	175	19	610	40	16	
	10	+	152	19	611	36	13	
	33	+	159	21	612	40	14	
	100	+	163	21	649	39	15	
	333	+	164	20	622	38	15	
	1000	+	172	20	629	39	15	
	2500	+	153	19	636	44	14	
	5000	+	160	18	543	36	5	
陽性 対照	NaN <sub>3</sub>	10	—	2135	2100			
	4-NOPD	10	—			275		
		50					63	
	MMS	3.0	—			4489		
	2-AA	2.5	+	2911	407		2932	344
		10.0				2782		

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム      4-NOPD : 4-ニトロ-o-フェニレン-ジアミン      MMS : メチルメ  
 タンスルホナート      2-AA : 2-アミノアントラセン

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。

表 2. 本試験 II (プレインキュベーション法)

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/プレート	S-9Mix 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		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	0	—	120	12	383	29	18	
無処理	0	—	136	12	338	47	16	
検体	33	—	132	13	354	29	15	
	100	—	106	12	373	30	19	
	333	—	138	13	380	27	16	
	1000	—	96	15	330	24	18	
	2500	—	96	14	321	31	17	
	5000	—	89	15	283	26	19	
対照 (DMSO)	0	+	122	20	366	40	20	
無処理	0	+	157	15	356	42	18	
検体	33	+	115	24	433	42	18	
	100	+	122	20	385	37	20	
	333	+	122	20	449	47	22	
	1000	+	109	20	487	44	17	
	2500	+	118	18	411	34	15	
	5000	+	106	17	278	37	19	
陽 性 対 照	NaN <sub>3</sub>	10	—	1793	1837			
	4-NOPD	10	—			393		
		50					93	
	MMS	3.0	—			1084		
	2-AA	2.5	+	2218	264		1612	246
		10.0				1897		

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム      4-NOPD : 4-ニトロ-o-フェニレン-ジアミン      MMS : メチルメ  
 タンスルホナート      2-AA : 2-アミノアントラセン

2) 染色体異常試験

チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No. 原体-25)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2009 年

検体の純度：

試験系：チャイニーズハムスター由来 V79 細胞

試験方法：チャイニーズハムスターの継代培養した V79 細胞を用い、代謝活性化および非活性化によって染色体異常誘発性を検定した。検体は DMSO に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 200 個の分裂中期像について行った。

用量設定の根拠：

表 1

試験群	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	処理時間 (時間)	回収時期 (時間)
溶媒対照	0	-/+	4	18
検 体	500	-/+	4	18*
	1000	-/+	4	18*
	2000	-/+	4	18
	2500	-	4	18*
	3000	+	4	18*
溶媒対照	0	-/+	4	30
検 体	2000	-/+	4	30
	2500	-	4	30*
	3000	+	4	30*

試験群	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S9 mix	処理時間 (時間)	回収時期 (時間)
溶媒対照	0	-	18	18
検 体	100	-	18	18
	200	-	18	18*
	400	-	18	18*
	600	-	18	18
	800	-	18	18*

\* : 染色体異常を評価した。

試験結果 :

以上の濃度について、細胞生存率、有糸分裂指数および染色体異常を調べたところ、以下のとおりであった。なお、検体の沈殿はいずれの濃度にも認められなかった。

1) 細胞生存率

S9-Mix 非存在下

1000 $\mu\text{g/mL}$  以上(4 時間処理)、600 $\mu\text{g/mL}$  以上(18 時間処理)で、溶媒対照と比較して減少がみられた。

S9-Mix 存在下

2000 $\mu\text{g/mL}$  以上で、溶媒対照と比較して統計学的に有意な減少を示した。

2) 有糸分裂指数

S9-Mix 非存在下

2000 $\mu\text{g/mL}$  以上 (4 時間処理)、400 $\mu\text{g/mL}$  以上(18 時間処理)で、溶媒対照と比較して統計学的に有意に減少した。

S9-Mix 存在下

2000 $\mu\text{g/mL}$  以上で、溶媒対照と比較して統計学的に有意に減少した。

3) 染色体異常

細胞生存率および有糸分裂指数の結果をもとに、検体については以下の濃度について、染色体異常を検索した。

S9 mix- 処理 4 + 回収 18 時間 : 500、1000、2500  $\mu\text{g/mL}$

処理 4 + 回収 30 時間 : 2500  $\mu\text{g/mL}$

処理 18 + 回収 18 時間 : 200、400、800  $\mu\text{g/mL}$

S9 mix+ 処理 4 + 回収 18 時間 : 500、1000、3000  $\mu\text{g/mL}$

処理 4 + 回収 30 時間 : 3000  $\mu\text{g/mL}$

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。

染色体異常の結果を表 2 および表 3 に示した。

S9-Mix 非存在下

生物学的に有意で、統計学的に有意な異常を有する分裂中期像の増加は認められなかった。

S9-Mix 存在下

生物学的に有意で、統計学的に有意な異常を有する分裂中期像の増加は認められなかった。

一方、陽性対照区では S9-Mix 非存在下および存在下のいずれにおいても、異常を有する分裂中期像は生物学的かつ統計学的に有意に増加した。

以上の結果より、代謝活性化を含む本試験条件下でのチャイニーズハムスター由来 V79 細胞に対して、本検体による染色体異常誘発性は陰性と判断された。

表2 4時間処理

実験群 濃度 µg/mL	S9- Mix	回収 時間	観察 細胞 数	ギャップ		構造異常の分類									異常(%)		倍数 体	
				g	ig	染色分体型			染色体型			その他			ギャップ			
						b	f	d	ib	if	id	ex	maE	ma	cd	含む		除外
DMSO	-	18	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1.0	1.0	27
検 体 500			200	1	0	1	0	0	1	0	5	0	0	0	0	4.0	3.5	31
1000			200	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1.5	1.5	22
2500			200	0	0	1	0	0	3	0	1	5	1	0	1	4.0	4.0	29
MMC <sup>A</sup>			200	1	5	33	3	0	41	4	9	73	2	1	0	56.5	55.5**	16
DMSO	+	18	200	3	0	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	3.5	2.0	72
検 体 500			200	1	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	2.5	2.0	70
1000			200	3	0	2	0	0	0	1	0	2	0	0	0	3.0	1.5	74
3000			200	0	0	4	0	0	3	0	2	0	0	0	0	3.5	3.5	53
CP <sup>B</sup>			200	15	0	89	1	0	80	10	0	54	5	5	0	74.0	71.5**	34
DMSO	-	30	200	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1.5	1.0	18	
検 体 2500			200	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	2.0	2.0	25
DMSO			200	4	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	3.0	1.5	38
検 体 3000			200	1	0	1	0	1	0	2	0	2	2	0	0	3.0	3.0	35

\*\* : p ≤ 0.01 (χ<sup>2</sup>検定)

A : MMC/マイトマイシン C (0.1 µg/mL), B : CP/シクロホスファミド (2.0 µg/mL)

g ; 染色分体型ギャップ ig ; 染色体型ギャップ b ; 染色分体型切断 ib ; 染色体型切断  
f ; 染色分体型断片 if ; 染色体型断片 d ; 染色分体型欠失 id ; 染色体型欠失  
ex ; 交換, maE : 交換を含む重複異常 ma ; 重複異常, cd ; 染色体破損



表3 18時間処理

実験群 濃度 μg/mL	S9- Mix	回収 時間	観察 細胞 数	ギャップ		構造異常の分類									異常(%)		倍 数		
				g	ig	染色分体型			染色体型			その他			ギャップ				
						b	f	d	ib	if	id	ex	maE	ma	cd	含む		除外	
DMSO			200	0	0	1	0	0	2	3	3	0	0	0	0	3.0	3.0	11	
検 体	200	-	18	200	0	0	2	0	0	2	0	4	0	0	0	4.0	4.0	12	
				400	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	2.5	2.0	10
				800	0	0	2	0	0	1	0	4	0	0	0	0	3.5	3.5	17
MMC <sup>A</sup>			200	1	0	67	2	0	15	6	3	40	0	0	52.0	51.5**	9		

\* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$  ( $\chi^2$ 検定)

A: MMC/マイトマイシンC(0.03 μg/mL)

g ; 染色分体型ギャップ    ig ; 染色体型ギャップ    b ; 染色分体型切断    ib ; 染色体型切断  
 f ; 染色分体型断片        if ; 染色体型断片        d ; 染色分体型欠失    id ; 染色体型欠失  
 ex ; 交換,                    maE : 交換を含む重複異常    ma ; 重複異常,        cd ; 染色体破損

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) 前進突然変異

V79-HPRT (前進突然変異) 法による *in vitro* 変異原性誘発試験 (資料 No. 原体-26)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2009 年

検体の純度 :

試験系 : チャイニーズハムスター由来 V79 細胞

試験方法 : チャイニーズハムスターの継代培養した V79 細胞の HPRT 遺伝子座における変異原性を代謝活性化または非活性化条件下で検定した。

用量設定の根拠:

コロニー形成率と突然変異試験:

フラスコあたり  $4 \times 10^6$  細胞の V79 由来細胞を、各処理濃度あたり 2 個の  $75\text{cm}^2$  のフラスコの培養用培地に接種した。接着後 (16~24 時間後) に、細胞を低血清量 (2%) の培地を用い、非代謝活性化下及び代謝活性化下条件で 5 時間各濃度の検体に暴露させた。各対照群は同じ条件下で培養した。その後、単層細胞を PBS で洗浄してトリプシン処理した。これをフラスコ中の培地に約  $1.5 \times 10^6$  細胞の密度で、また 3 枚のシャーレそれぞれに 200 個の細胞を、再播種した。シャーレを 6 日間培養し、コロニー数を算定することにより細胞毒性を判定した。一方、フラスコに再播種した細胞は、細胞増殖と誘発変異株の発現のために培養した。3 日後、各処理群および対照群の培養を  $75\text{cm}^2$  のフラスコに、約  $1.5 \times 10^6$  個の細胞を再播種し、継代した。約 6 日間培養し、突然変異株細胞分離のために、

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。

10 $\mu$ g/mLの6-チオグアニン(6-TG)を添加したヒポキサンチン無含有培養液のシャーレ(合計8皿)に3 $\times$ 10<sup>5</sup>個の細胞を播種した。さらに、3枚のシャーレには各用量群のコロニー形成率を求めるために、シャーレあたり200個の細胞を播種した。約5%炭酸ガスを含んだ加湿された空気中で、37 $^{\circ}$ Cで6~8日間の培養後、コロニーを固定してギムザ液で染色した。突然変異株分離用のシャーレでは6-TG抵抗性コロニー数を、コロニー形成率測定用シャーレではコロニー数を測定した。

結果及び考察：

1. コロニー形成率

変異原性試験における溶媒対照群のコロニー形成率は、非活性化の条件下で75.9%と89.2%、活性化の条件下で73.1%と85.9%であった。試験におけるコロニー形成率は良好であった。

2. 非代謝活性化条件における突然変異原性試験

非活性化条件下で2試験を実施した。いずれの濃度区においても80~90%の細胞毒性は認められなかった。突然変異の頻度には増加は認められなかった。全体的な統計学的解析においても、処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。

陽性対照群のEMSは、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。したがって、検体は非活性化試験において非変異原性物質と判断された。

3. 代謝活性化条件における突然変異原性試験

活性化条件下で2試験が実施された。いずれの濃度区においても80~90%の細胞毒性は認められなかった。また、突然変異の頻度には増加は認められなかった。

陽性対照物質のDMBAは、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。したがって、検体は代謝活性化試験において非変異原性物質と判断された。

以上の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず、V79-HPRT 前進突然変異原性試験において非変異原性物質であると判断された。

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

表 1 非代謝活性化

群	濃度 μg/mL	1 回目試験					2 回目試験				
		相対生 存率 <sup>A</sup>	相対増 殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	コロニー 形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>	相対生 存率	相対 増殖 <sup>A</sup>	総変異 株数 <sup>B</sup>	コロニー 形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>
無処理 対照	—	112.4	129.7	2	78.7	1.1	99.1	62.2	4	83.2	2.0
		101.8	97.9	18	80.2	9.4	82.6	103.3	12	78.7	6.4
溶媒対照 (DMSO)	—	100.0	100.0	11	87.0	5.3	100.0	100.0	4	75.7	2.2
		100.0	100.0	22	91.3	10.0	100.0	100.0	9	76.0	4.9
陽性対照 EMS	900	104.7	46.8	988	65.5	628.5*	40.1	19.9	1228	75.2	680.7*
		79.5	33.9	1293	71.7	751.7*	43.9	37.0	942	79.2	495.8*
検体	46	119.0	128.4	0	75.3	0.0	91.8	58.7	11	76.7	6.0
		94.6	106.0	10	81.8	5.1	90.2	91.0	10	74.5	5.6
	92	125.9	112.2	25	73.3	14.2	90.3	55.3	3	74.3	1.7
		99.5	107.8	9	81.7	4.6	93.9	97.4	8	71.8	4.6
	184	112.1	120.8	11	74.3	6.2	93.8	54.5	17	81.2	8.7
		120.5	120.6	20	78.7	10.6	84.4	94.9	17	74.3	9.5
	368	94.5	80.6	2	82.5	1.0	82.6	54.9	8	74.5	4.5
		110.9	135.7	0	74.3	0.0	71.3	84.9	3	77.8	1.6
	736	122.3	119.8	12	87.2	5.7	96.1	56.2	3	82.5	1.5
		119.7	122.9	9	83.7	4.5	72.4	75.8	8	75.7	4.4
	1472	107.4	114.5	7	79.2	3.7	91.2	63.3	8	72.8	4.6
		128.2	144.4	7	80.0	3.6	77.6	87.8	7	75.2	3.9
	2944 P	106.9	101.8	9	73.2	5.1	90.6	75.0	3	64.3	1.9
		49.2	68.8	14	79.0	7.4	77.4	60.1	13	80.0	6.8

<sup>A</sup>: 溶媒対照に対する百分率    <sup>B</sup>: シャーレのコロニーの合計    <sup>C</sup>: 細胞200個あたりのコロニー形成率

EMS : エチルメタンサルホネート    統計学的処理 : Dunnett 検定 \* ; P ≤ 0.05

P: 検体の沈殿

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。

表2 代謝活性化

群	濃度 μg/mL	1回目試験					2回目試験				
		相対生存率	相対増殖 <sup>A</sup>	総変異株数 <sup>B</sup>	コロニー形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>	相対生存率	相対増殖 <sup>A</sup>	総変異株数 <sup>B</sup>	コロニー形成率 <sup>C</sup>	変異率 ×10 <sup>-6</sup>
陰性 対照	-	105.4	128.3	15	64.3	9.7	87.0	105.4	1	68.2	0.6
		80.8	130.0	1	69.7	0.6	88.8	78.1	1	83.5	0.5
溶媒対照 (DMSO)	-	100.0	100.0	2	68.8	1.2	100.0	100.0	2	93.8	0.9
		100.0	100.0	2	77.3	1.4	100.0	100.0	4	78.0	2.1
陽性対照 DMBA	20	101.0	57.1	309	79.7	161.6*	36.7	22.8	222	76.0	121.7*
		55.9	22.4	305	84.5	150.4*	18.6	12.6	267	79.5	139.9*
検体	46	97.9	106.1	3	70.3	1.8	94.6	114.3	4	83.3	2.0
		96.1	127.0	9	76.7	4.9	76.8	49.1	1	82.5	0.5
	92	82.5	89.4	3	78.3	1.6	99.4	94.4	4	82.0	2.0
		92.0	124.1	C	76.7	-	86.2	55.7	0	67.0	0.0
	184	89.6	103.4	4	72.5	2.3	92.4	114.0	5	80.8	2.6
		81.0	137.0	17	73.0	9.7	107.2	45.8	2	74.7	1.1
	368	104.8	127.7	6	81.0	3.1	99.2	99.3	1	78.5	0.5
		89.8	134.1	10	73.3	5.7	106.1	67.4	3	79.8	1.6
	736	106.9	111.7	16	71.2	9.4	105.0	85.8	1	-	-
		93.1	102.2	13	83.8	6.5	104.4	38.3	2	80.7	1.0
	1472	96.3	90.4	16	80.7	8.3	109.3	116.6	0	82.0	0.0
		99.1	137.5	16	80.8	8.2	100.0	33.6	2	93.5	0.9
	2944	90.8	98.3	5	76.7	2.7	94.0	82.4	5	76.0	2.7
	P	-	4.6	-	-	-	89.5	48.8	1	85.7	0.5

A: 溶媒対照に対する百分率 B: シャーレのコロニーの合計 C: 細胞200個あたりのコロニー形成率

DMBA : ジメチルベンゾアントラセン 統計学的処理 : Dunnett 検定 \*; P ≤ 0.05

P: 検体の沈殿 C: Contamination - : 生存細胞数欠如のため培養を途中で終了した。

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

#### 4) 小核試験

マウスにおける小核試験 ①

(資料 No. 原体-27)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2009 年

検体の純度 :

供試動物 : Cr1: NMRI BR 系マウス (試験開始時: 約 6~12 週齢、体重 雄 37~43g)

1 群雄各 5 匹。

投与方法 : 検体をコーンオイルに懸濁し、0、10、20 および 40mg/kg の投与濃度で腹腔内に投与した。シクロホスファミドは生理食塩水に溶解し、同一の方法で投与した。陰性対照にはコーンオイル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。投与容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

全投与群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: 無関心、粗毛、腹臥位、痙攣、周期的な体の伸長および呼吸困難。死亡は認められなかった。対照群では何の症状も死亡も認められなかった。

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

## 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。また、多染性赤血球と正染性赤血球の比に変化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陰性対照群に比べ統計学的に有意に増加させた。

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 コーンオイル	10000	3800±1176	1.5±0.6	3.4±2.7
検体 10 mg/kg × 2回	10000	3134±1213	1.0±0.5	1.4±1.5
検体 20 mg/kg × 2回	10000	3139±1543	1.9±1.4	3.0±1.2
検体 40 mg/kg × 2回	10000	3008±878	1.0±0.6	3.8±2.3
陽性対照 シクロホスファミド	10000	3308±1364	1.9±1.1	20.6**±8.6

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

以上の結果から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。

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。

4) マウスにおける小核試験 ②

(資料 No. 原体-28)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体の純度 :

供試動物 : NMRI 系マウス (試験開始時: 約 8~9 週齢、体重 雌 平均 28.6 g)

1 群雌 7 匹。

投与方法 : 検体を 10%DMSO/90%コーンオイルに懸濁し、0、12.5、25 および 50mg/kg の投与濃度で腹腔内に投与した。シクロホスファミドは滅菌水に溶解し、同一の方法で投与した。陰性対照には 10%DMSO/90%コーンオイル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。投与容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、骨髓細胞の塗抹標本作製した。標本を May-Grünwald/Giemsa を用いて染色後、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。同時に細胞毒性を調べるため正染性赤血球数も計測し、赤血球 2000 個あたりの多染性赤血球として示した。

用量設定の根拠:

試験結果:

1) 一般症状

50 および 25mg/kg 群で次のような検体に関連した症状が認められた: 自発運動の低下、粗毛、閉眼または腹臥位。死亡は認められなかった。12.5mg/kg 群および陰性対照群では何の症状も死亡も認められなかった。



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

## 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、陰性対照群と検体投与群の間に生物学的に有意な差は認められなかった。また、多染性赤血球数は陰性対照群と比較して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と比較して増加させた。

投与群	評価した多染性赤血球総数	赤血球2000個あたりの多染性赤血球数	小核を有する多染性赤血球数/多染性赤血球2000個 (%)
陰性対照 10%DMSO/90%コーン オイル	14000	1229	0.121
検体 12.5 mg/kg × 2回	14000	1250	0.114
検体 25 mg/kg × 2回	14000	1234	0.143
検体 50 mg/kg × 2回	14000	1177	0.093
陽性対照 シクロホスファミド	14000	1125	2.264

以上の結果から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。

(14) 生体機能への影響

生体機能への影響に関する試験

(資料 No. 原体-29)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2012 年

検体の純度:

用量設定の根拠:

1. 呼吸・循環器系に対する作用

1-1. 無麻酔ラットの血圧および心拍数の測定

供試動物: Cr1:CD(SD)雌ラット、141.1~172.2 g、一群各 5 匹

投与方法: 検体を乳鉢内で微粉碎後、0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して 0(0.5%MC)、

- 30、150 および 800 mg/kg を約 18 時間絶食させたラットに経口投与した。検体投与前、投与後 1、2、3 および 6 時間に収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧および心拍数を測定した。

結果: 収縮期血圧では、800 mg/kg 群で投与 6 時間後の測定値および投与前値からの変化値が対照群と比較して統計学的に有意に高値を示し、投与 3 時間後の測定値および投与前値からの変化値が高値傾向を示した。拡張期および平均血圧では、800 mg/kg 群の投与 6 時間後で、測定値および投与前値からの変化値が有意に高値を示し、投与 3 時間では測定値が有意に高値を示し、投与前値からの変化値が高値傾向を示した。

心拍数では、800 mg/kg 群の投与 3 時間後で測定値および投与前値からの変化値、投与 6 時間で投与前値からの変化値がいずれも有意な増加を、投与 1 および 2 時間の測定値および投与前値からの変化値、投与後 6 時間の測定値がいずれも増加傾向を示した。

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

なお、800 mg/kg 群では 2 例死亡した。

#### 1-2. 呼吸に及ぼす影響

供試動物：Cr1:CD(SD)雌ラット、139.9～164.8 g、一群各 5 匹

投与方法：血圧測定と同様に検体を調製し、18 時間絶食させたラットに同濃度で投与した。無給餌無給水の条件で呼吸測定装置に入れ、検体投与前 30 分間および投与直後から投与後 6 時間、継続して呼吸運動の信号を記録した。このデータから投与前、投与後 0.5、1、2、3 および 6 時間後の呼吸数および 1 回換気量を求めた。

結果：800 mg/kg 群では、投与後 0.5、2 および 3 時間の呼吸数、投与後 2 時間の呼吸数の投与前値からの変化値が有意に増加し、投与 0.5 時間の呼吸数の投与前値からの変化値、投与後 1 時間の呼吸数および投与前値からの変化値が増加傾向を示した。また、150 および 30 mg/kg 群においても投与後 2 時間の呼吸数が対照群と比較して有意に増加したが、それぞれの投与群内での変動を考慮するといずれも偶発的な変化と考えられた。

1 回の換気量については、投与群と対照群の間に統計学的に有意な変化は認められなかった。

なお、800mg/kg で 1 例死亡した。

#### 2. ラットの腎機能に対する作用/尿量、尿中電解質(ナトリウム、カリウム、塩素)および尿浸透圧の測定

供試動物：Cr1:CD(SD)雌ラット、148.0～180.9 g、一群各 5 匹

投与方法：検体は血圧測定と同様に調製した。約 18 時間絶食させたラットに生理食塩水を経口投与し、続いて検体投与液を投与した。無給餌、無給水条件下で検体投与後 6 時間まで尿を採取し、尿量、尿浸透圧、ナトリウム濃度、カリウム濃度、塩素濃度、ナトリウム総排泄量、カリウム総排泄量および塩素総排泄量を検査した。

結果：800 mg/kg 群では、ナトリウム、カリウムおよび塩素の総排出量および尿浸透圧が増加傾向を示した。150 mg/kg 群でナトリウムおよびカリウムの総排泄量が対照群と比較して有意な増加、塩素の排泄量が増加傾向を示した。

なお、800 mg/kg では 3 例死亡した。

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

以上の結果から、本検体により呼吸・循環器系に対して 800 mg/kg 群において血圧、心拍数および呼吸数の増加が、腎機能に対しては 150mg/kg 群以上において電解質の排泄量の増加、800 mg/kg 群において尿浸透圧の増加傾向が認められた。

フルピラジフロンの「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

項目	投与経路	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
呼吸・ 循環器系	経口	0, 30, 150, 800	♀:5	800	150	800 mg/kg 群で血圧、心拍数の増加または増加傾向 2/5 例死亡
	経口	0, 30, 150, 800	♀:5	800	150	800 mg/kg 群で呼吸数の増加または増加傾向 1/5 例死亡
腎機能	経口	0, 30, 150, 800	♀:5	150	30	800 mg/kg 群で尿浸透圧の増加傾向 3/5 例死亡 150 mg/kg 群以上で電解質の増加または増加傾向

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。

(15) その他

1) ラットを用いた飼料混入投与による 28 日間反復経口投与免疫毒性試験

(資料 No. 原体-30)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体純度:

供試動物: Rj: WI (IOPS HAN) 系 Wistar 雌ラット、1 群各 10 匹

投与開始時 約 7 週齢、体重 165~206g

投与方法: 検体を 0 (対照群)、125、600 および 3000 ppm の濃度で飼料に混入し 28 日間にわたり  
随時授食させた。

陽性対照群にはシクロホスファミドを滅菌水に溶解して 3.5mg/kg/日で 28 日間強制  
経口投与した。投与液量は 5mL/kg とした。

動物種、性、用量の選択根拠:

観察・検査項目及び結果:

一般症状及び死亡率; 全動物について毎日 2 回 (週末および休日は 1 回)、死亡および瀕死状態  
について確認し、一般状態については少なくとも毎日 1 回記録した。詳細な身体検査  
は少なくとも週 1 回実施した。

検体投与に起因した一般症状および死亡はいずれの群でも認められなかった。

600mg/kg 群 1 匹が自分の前肢を傷つけたため動物福祉の観点から屠殺した。

体重; 全動物の体重を、投与前、投与開始日、投与期間中週 1 回、および剖検前に測定した。

3000ppm 群では、試験 8~29 日目に平均体重が対照群を 6~11% 下回り、8 日目 ( $p \leq 0.01$ 、  
Dunn test) と 15 日目 ( $p \leq 0.05$ 、Dunn test) は統計学的に有意に低下した。600 お  
よび 125ppm 群並びにシクロホスファミド投与群では投与による体重への影響は認め  
られなかった。

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

摂餌量； 全動物の摂餌量を毎週測定した。

3000ppm 群において、試験 8 日目の摂餌量が対照群を約 34% ( $p \leq 0.01$ , Dunn test) 下回り、その後は 9~13% 下回ったが統計学的には有意ではなかった。600 および 125ppm 群並びにシクロホスファミド投与群では、投与による摂餌量への影響は認められなかった。

検体摂取量； 投与期間中における平均検体摂取量は以下のとおりであった。

表 1 検体摂取量

用量 (ppm)	125	600	3000
検体摂取量 (mg/kg/日)	10	50	230

免疫毒性； 投与 26 日後に、羊赤血球 (SRBC) の PBS 溶液 ( $5 \times 10^8$  細胞/mL) を 0.5mL/動物の用量で全動物に静注し、免疫性を付与した。SRBC 投与 4 日後 (検体投与 30 日後) に、全動物の眼窩後静脈叢から採血し、血清を得た。血清中の SRBC 特異的 IgM を ELISA 法により測定した。

各群における SRBC 特異的 IgM 濃度を下表に示す。

SRBC 特異的 IgM 濃度は、個体別の変動が対照群、検体処理群共に大きかったものの対照群の平均濃度は高く、試験動物の SRBC に対する感受性が確認された。

検体処理群では SRBC 特異的 IgM 濃度の意義のある変化は認められなかった。一方、シクロホスファミドは顕著に SRBC 特異的 IgM 濃度を低下させた。

表 2 平均 SRBC 特異的 IgM 濃度 (u/mL)

対照群	検体			シクロホスファミド 3.5mg/kg/日
	125 ppm	600 ppm	3000 ppm	
40516 ( $\pm 23875$ )	62920 ( $\pm 41649$ )	34286 ( $\pm 30710$ )	33354 ( $\pm 26016$ )	$\downarrow$ 2732 ( $\pm 1737$ )

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

剖検および臓器重量； 投与 30 日後に、全動物について剖検を行った。脾臓および胸腺重量を測定し、対体重比を算出した。

各群の最終体重および臓器重量の対照群に対する割合を次表に示す。

いずれの検体投与群においても、検体投与による脾臓および胸腺重量に対する影響は

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。

認められなかった。

一方、シクロホスファミドは脾臓および胸腺重量を有意に低下させた。

表 3 臓器重量

試験群	検体			シクロホスファミド 3.5mg/kg/日	
	125 ppm	600 ppm	3000 ppm		
最終体重	99	101	94	97	
脾臓	実重量	98	96	94	↓66
	対体重比	99	95	101	↓68
胸腺	実重量	93	109	96	↓72
	対体重比	94	107	102	↓73

↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01 (T-test)

表中の数値は対照群に対する割合 (%)

脾臓および胸腺で認められた肉眼的変化を次表に示す。

検体投与群において、投与に関連した変化は認められなかった。

一方、シクロホスファミド投与群では、脾臓および胸腺の萎縮/小型化が多くの動物で認められた。

表 4 脾臓および胸腺における肉眼的変化

試験群	対照群	検体			シクロホスファミド 3.5mg/kg/日	
		125 ppm	600 ppm	3000 ppm		
検査動物数	10	10	10	10	10	
脾臓	萎縮/小型化	0	0	1	0	6**
胸腺	萎縮/小型化	0	1	2	0	5*

\* : p<0.05 \*\* : p<0.01 (Fisher's exact test、申請者の計算による)

以上の結果から、3000ppm群において、体重増加抑制および摂餌量の減少が認められ、全身的な影響をすべて考慮した無毒性量は600ppm (50 mg/kg/日)と判断された。また、検体の免疫毒性は認められず、試験した免疫毒性検査項目に関する無毒性量は3000 ppm (230 mg/kg/日)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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

2) ラットを用いた発達神経毒性

(毒性資料 No. 原体-31)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 2012年

検体の純度:

試験動物 : Wistar Crl:WI(Han)系ラット, 1群雄雌 30匹

交配開始時; 雄 15週齢、雌 12週齢(平均体重 雌 176.2~225.6g)

投与期間 : 妊娠 6日~哺育 21日

妊娠 0日は臍垢塗抹標本で授精が確認された日とした。

【投与方法】

交配後、検体を 0(対照群)、120、500 及び 1200 ppm の濃度で飼料に混入し、妊娠雌親動物に妊娠 6日から児動物の哺育 21日まで投与した。児動物は離乳後、無添加の飼料を試験終了時の生後 75±5日まで与えた。雄親動物は交配後屠殺、雌親動物は哺育 21日に屠殺した。

投与用量設定の根拠:

試験項目および結果:

1. 繁殖成績

妊娠期間、受胎率、死産あるいは早産した動物数に検体投与の影響は認められなかった。



## 2. 親動物

### 2-1. 臨床観察

ケージサイド観察は少なくとも1日1回（休日および週末は1日1回）行った。詳細な身体的観察も1日に1回、妊娠6日より哺育21日まで行った。

試験期間を通じて全群で臨床症状は認められなかった。投与に関連する死亡も認められなかった。

### 2-2. 体重および摂餌量

妊娠期間（0、6、13および20日）および哺育期間（0、7、14および21日）を通じ、個体毎に体重および摂餌量の測定を行った。さらに哺育期間4日にも体重を測定した。

体重では、1200ppm群において妊娠20日目に対照群と比較し統計学的\*に有意に低下（-7%、 $p \leq 0.01$ ）し、妊娠期間中の増体重も有意に減少（-21%、 $p \leq 0.01$ ）した。哺育期間中は対照群と比較して0および4日目に有意に低下し（それぞれ-4%、 $p \leq 0.05$ 、-6%、 $p \leq 0.01$ ）、その後は哺育期間を通じて統計学的有意差は認められないものの対照群より低下した（-4~-6%）。そのほかの投与群では投与による影響は認められなかった。\*：Dunnett検定

摂餌量ではいずれの期間においても統計学的に有意な低下は認められなかった。

### 2-3. 検体摂取量

雌親動物における妊娠から哺育期間を通じた検体の平均1日摂取量を表1に示した。

表1. 検体摂取量

用量	120ppm	500ppm	1200ppm
検体摂取量 (mg/kg体重/日)	10.3	42.4	101.7

### 2-4. 雌親動物の詳細な症状観察

詳細な症状観察（ホームケージ内、ハンドリング時、オープンフィールド）を妊娠13および20日（雌親動物全例を対象）と哺育11および21日（各群10例）に実施した。観察は主として流涙、流涎、立毛、眼球突出、排尿、排便、瞳孔機能、眼瞼閉鎖、痙れん、振せん、異常動作/異常行動、姿勢、歩行異常について実施した。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を次表に示す。

表2. 詳細な症状観察

用量 (ppm)		0	120	500	1200
検査動物数		10	10	10	10
尿のプール数	哺育 11 日	0.6	2.0	3.7*	2.6*
脱毛が観察された動物数	哺育 11 日	0	0	0	3*
	哺育 21 日	0	0	0	3*

Dunnett検定 \* :  $p \leq 0.05$

哺育11日目において、1200および500ppm群の尿のプール数が対照群と比較して増加したが、用量関連性がなく1観察時点のみで認められたことから、投与による変化とは考えられなかった。哺育11および21日目に1200ppm群において脱毛の動物数が増加したが、他の観察時点で対照群も含めた全群に1~3匹認められていることから、偶発的な所見で投与に関連しないものと考えられた。

その他、検体投与に起因した変化はいずれの投与群にも認められなかった。

### 3. 児動物

#### 3-1. 児動物のデータ

各群の総産児数、同腹児数、死産児数、出生率、生存率を検査した。

これらの項目に投与に起因した変化は認められなかった。

#### 3-2. 臨床観察

児動物は出生後直ちに性別を判定し、体重を測定した。以降、哺育期間中は1日1回、死亡、瀕死状態、神経行動学的変化、一般症状についてケージサイドから少なくとも観察し、離乳後は1日2回（週末および休日は1日1回）死亡を観察した。詳細な身体的観察も離乳前は1日に1回、離乳後は週に1回行った。

児動物に検体投与に起因すると考えられる臨床的異常および死亡は認められなかった。

#### 3-3. 体重

児動物の体重を出生後0、4、11、17、21日、その後毎週1回測定した。また、臍開

口または包皮分離が最初に認められた時点でも体重を測定した。

離乳までの体重において、出生時体重では投与群と対照群との差は認められなかったが、生後 17 および 21 日では統計学的有意差は認められないものの、1200ppm 群雌雄で対照群と比較して低下し (-4~-5%)、投与による変化と考えられた。また、1200ppm 群雌雄においては哺育期間を通じて増体重抑制も認められた (最大-10%、 $p \leq 0.01$ 、雄、生後 11-17 日)。この他の投与群では投与による影響は認められなかった。

離乳後の飼育期間中では、いずれの投与群においても検体投与に起因すると考えられる体重変化は認められなかった。

#### 3-4. 発育の指標

一部の動物を対象に平面立ち直り反応について生後 4 日から検査し、認められた日齢を記録した。全動物を対象に瞳孔収縮については生後 21 日に、包皮分離は生後 38 日から、膈開口は生後 29 日から検査した。

これらの項目において検体投与群と対照群に差は認められなかった。

神経行動学的検査：

#### 3-5. 詳細な症状観察

各群雌雄約 20 匹 (各腹雄 1 匹および/または雌 1 匹、各群 20 腹以上) についてホームケージ外で雌親動物と同様の項目について、生後 4、11、21、35、45、60 日に観察した。ただし生後 4 および 11 日にはオープンフィールドでの観察は実施しなかった。いずれの投与群においても対照群に比して著変は観察されなかった。

#### 3-6. 運動能および移動運動能試験

各群雌雄 20 匹 (各腹雄 1 匹および/または雌 1 匹、各群 20 腹以上) について運動能、移動運動能を生後 13、17、21 および 60 日に 8 の字型迷路を用いて 10 分間のインターバルで 60 分間自動測定器を用いて測定した。

運動能と移動運動能ともに、いずれの投与群においても対照群と比較して統計学的有意差は認められなかった。しかしながら、生後 13 日の 1200ppm 群雌雄に認められた運動能および移動運動能の増加は、投与による変化と考えられた。

生後 17 日の 1200 および 120ppm 群雌雄で観察された運動能の増加は、用量関連性がな

く、雌では認められず、背景データの範囲内（ ）であったことから投与による変化とは考えられなかった。同じく生後 17 日に全投与群雄で認められた移動運動能の増加は、用量関連性がなく、雌では認められず、背景データの範囲内（ ）であったことから、投与による影響とは考えられなかった。さらに移動運動能において、生後 21 日の 120ppm 群雄、生後 60 日の 1200ppm 群雄でわずかな増加が認められたが、運動能ではこれらの動物と対照群はほぼ同等で、他の用量では同じような影響を受けず、そしてこの差は片性のみ認められていることから、投与による変化とは考えられなかった。

表3. 運動能 雄

用量	0	120ppm	500ppm	1200ppm
検査動物数	20	20	20	20
生後13日	55±55	66±82	63±66	114±130
生後17日	146±117	260±104	173±114	221±144
生後21日	307±119	367±132	331±149	367±123
生後60日	503±142	518±108	505±121	529±111

運動能 雌

用量	0	120ppm	500ppm	1200ppm
検査動物数	20	19	20	20
生後13日	74±141	88±81	68±60	62±40
生後17日	201±152	149±112	243±121	227±200
生後21日	303±88	333±140	308±132	322±119
生後60日	656±143	666±233	624±202	790±232

表4. 移動運動能 雄

用量	0	120ppm	500ppm	1200ppm
検査動物数	20	20	20	20
生後13日	5±8	9±11	7±17	20±39
生後17日	34±27	66±33	47±30	57±42
生後21日	87±28	113±28	93±39	99±35
生後60日	344±124	343±93	340±105	344±89

移動運動能 雌

用量	0	120ppm	500ppm	1200ppm
検査動物数	20	19	20	20
生後13日	6±11	8±12	12±21	7±5
生後17日	53±46	37±32	65±40	53±38
生後21日	103±34	91±40	93±36	99±37
生後60日	425±97	433±176	394±147	533±176

Dunnett検定

10分間のインターバルにおける行動の分析では、生後13日の1200ppm群雌で運動能および移動運動能ともに持続的に高いレベルを示した。上述した運動能の増加を説明するものであり投与による影響と考えられた。

3-7. 聴覚性驚愕反応

自動聴覚測定装置を用いて、各群雌雄20匹（各腹雄1匹および/または雌1匹、各群20腹以上）を対象に各段階の周波数音に対する反応を生後23および60日に測定した。

生後23日の児動物の反応強度に对照群と各用量群の差は認められなかった。

生後60日の検査では、反応強度が、1200ppm群雌で对照群と比較して統計学的に有意に増加し、各インターバルでは最初のインターバルを除き有意に増加し、投与による変化と考えられた。500および120ppm群でも对照群と比較して統計学的な有意差はないもののわずかに増加した。しかしながら、両濃度間で用量関連性がなく、背景データの範囲内（ ）であることから、投与による変化とは考えられなかった。同群雄では投与による影響は認められなかった。

また、いずれの投与群においても潜時および馴化に投与による影響は認められなかった。

对照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を次表に示す。

表5. 生後60日の反応強度 (g)

用量 (ppm)		0	120	500	1200
反応強度 (平均±S.D)	雄	211±115	249±145	181±127	230±153
	雌	78±57	104±65	110±68	156±102*

\* : ANOVA+Dunnett's Test p<0.05

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。

表 6. 各ブロック毎の反応強度(g) 雌

検査時期	用量 (ppm)	ブロック 1	ブロック 2	ブロック 3	ブロック 4	ブロック 5
生後 60 日	0	102±74	94±82	71±73	68±54	58±33
	120	133±75	121±94	108±86	84±58	74±46
	500	140±91	127±84	113±76	96±65	76±50
	1200	186±129	181±126*	160±116*	132±87*	122±83*

\*: 反復測定 ANOVA+Dunnett's Test p<0.05

### 3-8. 受動回避能

各群雌雄 16 匹 (各腹雄 1 匹および/または雌 1 匹、各群 20 腹以上) を用い、四肢への電気ショックに対する受動回避能について、その学習能と短時間記憶能力および長時間記憶能力を生後 23 および 30 日に測定した。

これらの能力獲得において対照群と用量群との間に差は認められなかった。

### 3-9. M 型水迷路試験

各群雌雄 16 匹 (各腹雄 1 匹および/または雌 1 匹、各群 20 腹以上) について水迷路を用いた学習能力および記憶能力を生後 60 日に測定した。またその 7 日後に再試験を行った。

学習能力および記憶能力獲得において対照群と用量群との間に差は認められなかった。

### 3-10. 眼科学的検査

各群雌雄最低 10 匹の灌流固定用の児動物について、生後 50~60 日に眼科学的検査を半暗室で実施した。ペンライトあるいは透光器を用いて瞳孔反射を検査し、ついで散瞳剤を各々の眼に点眼し瞳孔を散大させ、結膜および角膜をスリットランプ顕微鏡を用いて検査し、レンズ、硝子体液、網膜、脈絡膜および視神経円板については集光レンズ付きの間接検眼鏡を用い検査した。

観察された眼科学的所見には検体投与に関連するものは認められなかった。

## 4. 剖検

生後 21 日と試験終了時に各群雌雄それぞれ 10 匹 (20 腹) を対象に、ペントバルビ

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。

タール (50mg/kg) の腹腔内投与で深麻酔した後、左心室からリン酸緩衝液に溶解した亜硝酸ナトリウムで灌流後、4% (w/v) の EM 級ホルムアルデヒドのリン酸緩衝液からなる汎用固定液を用いて灌流固定した。生後 21 日の動物は脳のみ、試験終了時の動物は以下の組織も採取し、10%緩衝ホルマリン (眼は Davidson 固定液) で後固定した。脳は頭蓋骨から摘出後、ホルマリンによる後固定前に重量を測定し、脳体重比を算出し、大脳および小脳の長軸の長さを肉眼的に計測した。

脳、脊髄 (頸部、胸部、腰部)、両眼 (視神経付)、末梢神経 (坐骨神経、脛骨神経および腓腹神経)、ガッセル神経節、腓腹筋、両前肢、神経組織や骨格筋における肉眼的異常部位および個体標識部位。

また、生後 75 日の試験終了時には灌流固定しなかった動物についても各群雌雄それぞれ 10 匹 (20 腹) の脳重量 (新鮮) を測定し、全臓器 (脳を含む)、体腔、切断面、開口部および外表について剖検を行った。

#### 4-1. 生後 21 日の剖検

いずれの投与群においても投与に関連した肉眼的著変は認められなかった。

#### 4-2. 生後 75 日の剖検

灌流固定した動物について、いずれの投与群においても投与に関連した肉眼的著変は認められなかった。

灌流固定しなかった動物について、いずれの投与群においても投与に関連した肉眼的著変は認められなかった。

#### 4-3. 最終体重

生後 21 日の最終体重では、1200ppm 群の雌雄、500 および 120ppm 群の雌において、統計学的有意差が認められないものの、対照群と比較して低下し、投与による影響と考えられた。なお、剖検時の生後 21 日の最終体重では 10 匹を対象に、生存段階の 21 日の体重では全動物を対象として測定している。雌の 500 および 120ppm 群において、最終体重では上述のように影響が認められたが、同時期の生存段階では体重に影響は認められなかった。[申請者追記]したがって、最終体重 (剖検時に 10 匹のみを対象) で認められた 500 および 120ppm 群雌の体重低下は毒性学的に意味のない変化と考えられた。

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

生後 75 日の最終体重は、灌流した動物でもしなかった動物でも、いずれの投与群においても投与による影響は認められなかった。

#### 4-4. 脳重量

生後 21 日および 75 日の灌流動物ではいずれの投与群においても投与による影響は認められなかった。生後 75 日の灌流しなかった動物では、1200ppm 群雄で対照群と比較して統計学的に有意に減少した。しかしながら、最終体重が減少していることからこの影響は投与による直接の影響とは考えられなかった。

表 7. 最終体重および脳重量

検査日	性別		雄			雌		
	投与量 (ppm)		120	500	1200	120	500	1200
	検査動物数		10	10	10	10	10	10
21 日 (灌流)	最終体重				92	95	93	92
	脳	実重量						
		対体重比						
75 日	最終体重				95			
	脳	実重量			↓ 96			
		対体重比						

↓ : p<0.05 (ANOVA+Dunnett' s)

#### 4-5. 脳の肉眼的計測

生後 21 日および 75 日の計測で、いずれの投与群においても投与による変化は認められなかった。

#### 5. 病理組織学的検査

脳は 8 つの冠状断面にし、病理標本用と形態計測用の切片を作製した。

以下の組織はパラフィン包埋し、H.E 染色法で染色した。

脳の 8 部位、脊髄の 3 部位 (頸部、胸部および腰部)、馬尾、眼、視神経および腓腹筋

以下の組織はグリコールメタアクリレートで包埋し、Lee の変法で染色した。



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

後根および前根を含む脊髄神経節(頸膨大および腰膨大)、ガッサー神経節、末梢神経(頸骨神経、腓腹神経および坐骨神経)の縦断面または横断面

脳の形態計測用の切片は、ルクソール・ファストブルー/クリスタルバイオレットで染色し、以下の部位について形態計測した。

前頭葉皮質背部の厚さ(前脳)、海馬回の厚さ(中脳)、小脳高(小脳/橋)

高用量群および対照群について、病理組織学的検査および脳の鏡検的計測を実施した。

#### 5-1. 脳の鏡検的計測

生後21日および75日の計測で、1200ppm群と対照群との差は認められなかった。

#### 5-2. 病理組織学的検査

生後21日および75日のいずれにおいても、投与に関連した病理所見は認められなかった。

以上の結果、1200ppm雌親動物において妊娠期間中の増体重が抑制され、妊娠期間および哺育期間の体重が対照群と比較して低下した。児動物では、1200ppm群雌雄において哺育期間中の増体重が抑制され対照群と比較して体重が低下した。また、同群雌において生後60日に聴覚性驚愕反応強度が増加し、雄において生後13日の運動能および移動運動能が増加した。

これらの所見に基づいて、本試験における無毒性量(NOEL)は親動物、児動物とも500ppm(42.4mg/kg体重/日[親動物:妊娠期間および哺育期間])であると判断した。

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

## 2. 原体混在物および代謝物

(1) 動物・植物・土壌中代謝分解物 ( )

### 1) 急性毒性試験

ラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 No. 代-1)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2010 年

検体純度:

供試動物: Sprague-Dawley Rj: SD (IOPS Han)系ラット、約 8 週齢、  
体重 208±13 g、1 群雌 3 匹

観察期間: 14 日間

試験方法: OECD ガイドライン No. 423

投与方法: 検体を精製水で調製し、10mL/kg の投与容量で経口投与した。投与前に約 18 時間絶食した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重測定は、投与日、投与 8 日および 15 日に行った。全動物について肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	300、2000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	雌 300~2000
死亡開始および終了時間	投与 1 時間後開始および終了
症状発現および消失時間	投与約 25 分に発現 投与 10 日に消失
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	300

投与当日を投与 1 日とする。

中毒症状として運動の低下、鎮静、呼吸困難、側臥位、立毛、歩行失調等が認められた。300mg/kg 群では 1 匹に体重増加量の低下が認められたが、他の動物では投与による影響は認められなかった。2000mg/kg 群の生存動物では試験 8 日の測定で体重低下が認められたが、その後回復した。剖検では 2000mg/kg 群の生存動物および 300mg/kg 群の全動物に検体に起因する所見は認められなかった。

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

2)90日間反復経口投与毒性 ( )

ラットを用いた90日間反復経口投与毒性試験

(資料No.代-2)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年:2012年

検体純度:

試験動物:ウイスター(Rj:WI)系ラット、

1群雌雄各10匹

試験開始時:雄 約6~7週齢(体重194.6~196.3g)

雌 約6~7週齢(体重161.4~163.6g)

投与期間:90日間(2011年1月25日投与開始~2011年4月27~29日最終屠殺)

投与方法:検体を0、200、1000および6000ppmの用量で飼料中に混合し90日間投与した。

投与用量設定の根拠:

観察・検査項目及び結果:

一般症状及び死亡率;生死を少なくとも1日2回(週末と休日は1回)、一般状態の変化を1日1回観察した。個々の動物の詳細な観察を毎週1回実施した。

死亡例は認められなかった。また、投与に関連した一般状態の変化はいずれの投与群においても認められなかった。

神経学的検査;11週目に全生存動物を対象にして以下の神経学的検査を実施した。

自発運動量:個々の動物について自動フォトセル記録装置を用いて10分間隔で60分間記録した。

いずれの用量においても雌雄ともに投与に関連する運動量の変化は認められなかった。さらに投与群における自発運動量の経時的パターンは対照群と同様であった。

ホームケージでの観察；姿勢、立毛、不随意運動、歩行異常、異常発声またはその他の異常行動を記録した。

ハンドリング中の観察；ケージからの取り出しやすさ、ハンドリングに対する反応、筋緊張、眼瞼、流涙、流涎、鼻汁、汚れまたは脱毛、痩せ、触れた時の体温（冷感）などを記録した。

オープンフィールドでの観察；立毛、呼吸、覚醒、歩行異常、姿勢、不随意運動、常同行動、異常発声、立ち上がり回数ならびに排尿および排便の回数を記録した。

いずれの用量においても雌雄ともに投与に関連する行動の変化は認められなかった。

反射および生理学的観察；瞳孔サイズ、瞳孔反射、平面立ち直り反射、角膜反射、屈筋反射、聴覚性驚愕反応、尾挟縮反応、握力、着地開脚幅、体重および直腸温を記録した。

体重低下が、雄の 1000 ppm 群および雌の 6000 ppm 群に認められた。

1000 ppm 群雌に認められた前肢握力の統計学的に有意な低下は、用量関連性がなく、後肢握力に対する影響も認められなかったため、偶発的変化と考えられた。この他の項目においては、いずれの用量においても雌雄ともに投与に関連する変化は認められなかった。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を次表に示す。

表1 神経学的検査

性別	雄			
	0	200	1000	6000
体重			89**	95

性別	雌			
	0	200	1000	6000
体重				92**
前肢握力			78**	

\*\* :  $P < 0.01$  (Dunnett's test)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものを。

体重(図 1 a, 図 1 b)；投与開始前、投与期間中は毎週 1 回、剖検前に測定した。

6000ppm 群において、平均体重が対照群と比較して雄では最大 7%、雌では最大 9%の低値を示し、雌では試験 29 日以降に統計学的に有意であった。投与期間終了時の総体重増加量は雄が対照群を 11%、雌が 20%下回り、雌では統計学的に有意であった。

1000ppm 群では、平均体重が対照群と比較して雄では最大 13%、雌では最大 6%の低値を示し、雄では試験 15 日以降試験期間を通じて統計学的に有意であった。投与期間終了時の総体重増加量は雄が対照群を 20%、雌が 9% 下回り、雄では統計学的に有意であった。

200 ppm 群雌雄では投与による変化は認められなかった。

図 1 a 体重 雄

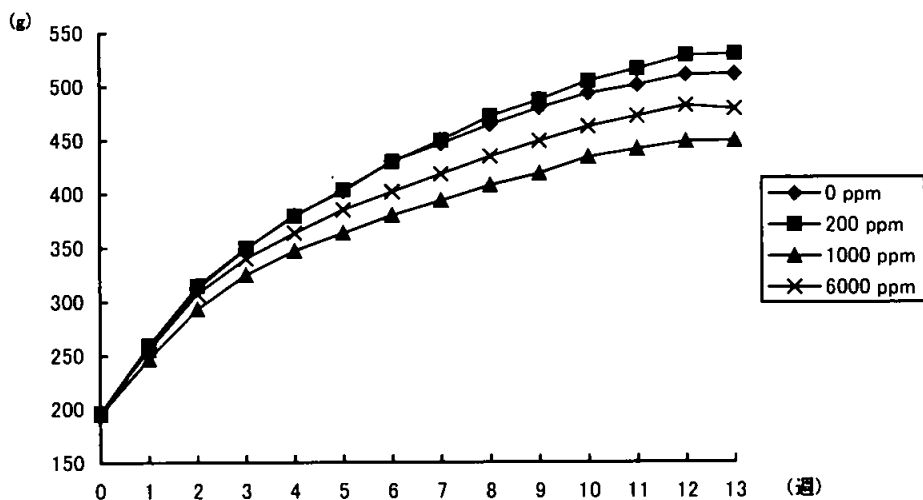
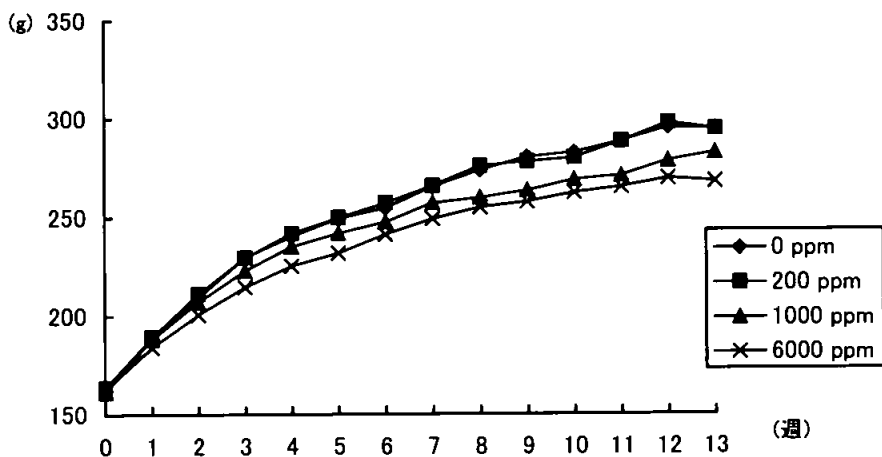


図 1 b 体重 雌



摂餌量；投与期間の最初の6週間は週に2回、その後の投与期間は週に1回測定した。

6000 ppm 群雌雄において、対照群と比較して雄で最大9%、雌で最大13%の摂餌量の低下が認められた。1000 ppm 群雌雄において、対照群と比較して雄で最大7%、雌で最大10%の摂餌量の低下が認められた。200 ppm 群では雌雄いずれも投与による摂餌量の変化は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

表2 検体摂取量(mg/kg 体重/日)

投与量(ppm)		200	1000	6000
検体摂取量	雄	12.7	66.2	380
	雌	15.6	78.7	472

血液学的検査；計画屠殺日（試験93、94または95日）に全生存動物を対象として、麻酔下で、一晚絶食させた動物の後眼窩静脈叢から血液を採取し、以下の項目について測定又は算定した。

赤血球数、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、白血球数、血小板数(PLT)、プロトロンビン時間、白血球分画、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積(MCV)、網状赤血球数。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

表3 血液学的検査

性別	雄			雌		
	200	1000	6000	200	1000	6000
HGB					↓91	↓92
MCV					↓94	↓95
MCH		↓96		↓97	↓92	↓93
HCT					↓93	↓94
PLT					↑117	

↑↓：p<0.05、↑↓：p<0.01 (Dunnett LSD Test / Dunn Rank Sum test)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

雌では6000および1000 ppm 群において、ヘモグロビン量、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の低下が認められた。これらの変化には

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。

明確な用量影響関係は認められなかった。200ppm 群雌で認められた平均赤血球ヘモグロビン量の統計学的に有意な低下は、低下の程度が小さいことから、生物学的に意味のない変化と考えられた。この他に認められた統計学的に有意な低下は、用量関連性がないことから偶発的な変化と考えられた。

血液生化学検査；血液学的検査で使用した血液から得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。血漿および血清の外観に有意な変化があれば記載した。

酵素/アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ。

電解質/塩素、カルシウム、無機リン(Phos)、カリウム、ナトリウム。

その他/アルブミン(Alb)、総ビリルビン(T. Bil)、総コレステロール、クレアチニン(Crea)、総蛋白、 トリグリセリド(Trig)、 尿素(Ure)、グルコース(Glu)。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次頁の表に示す。

表 4 血液生化学的検査

性別	雄			雌		
	200	1000	6000	200	1000	6000
投与量 (ppm)	200	1000	6000	200	1000	6000
Glu	↓71	↓55	↓55	↓73	↓51	↓47
T. Bil	↓73	↓48	↓44		↓63	↓53
Ure	↑115	↑126	↑118	↑114	↑123	112
Phos			↑114			↑114
Trig	↑129					
Alb			↑106			
A/G 比			↑111			
ALT						↑152
Crea						↓93

↑ ↓ : p<0.05、↑ ↓ : p<0.01 (Dunnett LSD Test)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

6000 ppm 群雌雄において、無機リンの増加が認められた。

全投与群においてグルコースの統計学的に有意な低下が認められた。また、6000 ppm および 1000 ppm 群雌雄ならびに 200 ppm 群雌において、総ビリルビンの統計学的に

有意な低下が認められた。しかしながら、これらの変化によって試験動物に機能障害が生じていないことから、投与による有害な影響とは考えられなかった。

全投与群において尿素の増加が認められた。しかしながら、用量関連性は認められず、また、クレアチニン濃度にも病理組織学的検査においてもこれに付随する変化が認められなかったため、この変化は有害な影響とは考えられなかった。

この他に認められた統計学的に有意な変化は、変化の程度が小さく、関連する所見も認められないことから、偶発的な変化で生物学的に意味のない変化と考えられた。

尿検査;試験 87 または 88 日に全生存動物を対象として、一晚採尿し、以下の項目を検査した。

外観、血液/赤血球、ビリルビン、グルコース、ケトン体、pH、蛋白、沈渣、ウロビリノーゲン、比重/浸透圧/屈折率、尿量。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を次表に示す。

表 5 尿検査 1 尿量、pH および屈折率

性別	雄				雌			
投与量 (ppm)	0	200	1000	6000	0	200	1000	6000
尿量 (mL)			340***	366***			205	255**
pH	6.60	6.70	6.40	6.10*	6.14	6.00	6.00	6.00
屈折率			99***	99***			99**	99*

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001 (Dunnett LSD Test / Dunn Rank Sum test)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの (ただし、pH は実測値)。

表 6 尿検査 2 蛋白

性別	雄				雌			
投与量 (ppm)	0	200	1000	6000	0	200	1000	6000
検査動物数	10	10	10	10	7	8	9	9
Grade 0	0	0	0	0	0	0	1	0
1	0	0	0	1	1	1	6	5
2	1	8	9	8	3	3	2	4
3	9	2	1	0	3	4	0	0
4	0	0	0	1	0	0	0	0



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。

表 7 尿検査 3 結晶量

性別	雄				雌			
	0	200	1000	6000	0	200	1000	6000
投与量 (ppm)	0	200	1000	6000	0	200	1000	6000
検査動物数	10	10	10	10	8	8	9	9
Grade 0	0	0	3	2	4	5	5	7
1	0	0	0	1	1	1	1	1
2	8	5	2	7	2	3	3	1
3	1	2	4	0	1	0	0	0
4	1	3	1	0	0	0	0	0

表 8 尿検査 4 ケトン体

性別	雄				雌			
	0	200	1000	6000	0	200	1000	6000
投与量 (ppm)	0	200	1000	6000	0	200	1000	6000
検査動物数	10	10	10	10	7	8	9	9
Grade 0	0	0	0	0	6	6	0	0
1	7	2	0	0	1	2	0	0
2	3	8	0	0	0	0	5	0
3	0	0	0	0	0	0	4	7
4	0	0	10	10	0	0	0	2

6000 および 1000 ppm 群雌雄において、尿量が増加し、その結果屈折率の低下が認められ、雄では通常観察される結晶量が低下し、雌では蛋白のレベルが低下した。さらに雌雄にケトン体レベルの増加が認められ、この変化は血清中のグルコース濃度の低下と関連していたと推測された。

6000 ppm 群雄の pH が統計学的に有意に低下したが、この結果は生物学的に意味のある変化とは考えられなかった。

眼科学的検査；全群の全動物を対象に順化期間中検査し、投与期間(12 週)は対照群および高用量群を対象に実施した。

投与による眼に対する影響は認められなかった。

臓器重量；投与終了時に全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比および対脳重比も算出した。

肝臓、心臓、脾臓、胸腺、精巣上部、前立腺、腎臓、卵巣、精巣、子宮、副腎、甲状腺、上皮小体、脳、脳下垂体。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次頁の表に示す。

表 9 臓器重量

性別		雄			雌		
投与量(ppm)		200	1000	6000	200	1000	6000
最終体重			↓85	↓91		↓93	↓90
肝臓	実重量		↓81				
	対体重比	↓91				↑107	↑107
	対脳重比		↓85				
心臓	実重量		↓92				
	対体重比		↑109	↑109			
	対脳重比						
腎臓	実重量						
	対体重比		↑113	↑119		↑111	↑111
	脳重比			↑111			
精巣 上部	実重量		↓86	↓91			
	対体重比						
	脳重比						
脳	実重量		↓95				
	対体重比		↑115			↑110	↑114
	脳重比						
下垂 体	実重量		↓87	↓85			
	対体重比						
	脳重比			↓87			

↑ ↓ : p<0.05、↑ ↓ : p<0.01 (Dunnett LSD Test / Dunn Rank Sum test)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものの。

散見された有意差は最終体重の低下に起因するか、または、用量関連性がないことから偶発的なもので、投与による影響とは考えられなかった。

肉眼的病理検査；投与終了時に全動物を、深麻酔（イソフルラン吸入）下で放血致死させ、外表、全開口部、主要臓器・組織および体腔の肉眼的病理検査を実施した。

主な所見を表に示した。

表 10 肉眼的病理検査

性別	雄				雌			
	0	200	1000	6000	0	200	1000	6000
投与量 (ppm)	0	200	1000	6000	0	200	1000	6000
検査動物数	10	10	10	10	7	8	9	9
胃 黒色病巣	0	0	1	3	1	0	2	2

6000 ppm および 1000 ppm 群雌雄において、胃腺部に少数の黒色病巣が認められた。投与による変化と考えられ、ほとんどは病理組織学的検査で観察された限局性腺びらん/壊死との関連があった。

病理組織学的検査；全動物から以下の臓器を採取して、10%緩衝ホルマリン液中に固定した。

眼、視神経、ハーダー腺、精巣上体および精巣は Davidson 液に固定した。

消化器系 盲腸、結腸、十二指腸、食道、回腸、空腸、肝臓、膵臓、直腸、唾液腺、胃、舌。

呼吸器系 喉頭\*、鼻腔\*、咽頭\*、肺、気管。

心臓血管/血液系 大動脈、骨髄/胸骨、心臓、顎下リンパ節、腸管膜リンパ節、脾臓、胸腺。

泌尿生殖器系 精巣上体、腎臓、乳腺、卵巣、前立腺、精囊、精巣、膀胱、子宮（子宮頸部含む）、膣。

腺 副腎、外涙腺\*、上皮小体、甲状腺、ハーダー腺。

神経系 脳、視神経、坐骨神経、脳下垂体、脊髄、眼。

その他 胸骨、関節面（大腿骨/頸骨）、骨格筋、皮膚、肉眼的病変部および腫瘍。

\*：保存のみで病理標本は作製しなかった。

対照群および高用量群については、全動物の全臓器および組織のサンプルからヘマトキシリン・エオジン（H&E）で染色した組織検査用切片を作製した。低および中用量群の全動物について肝臓、腎臓、肺、胃および甲状腺の組織検査用切片を作製した。また、大腿骨骨髄塗抹標本を作製したが検査はしなかった。

主な病理組織学的所見を表に示した。

表 11 主な病理組織学的所見

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	200	1000	6000	0	200	1000	6000
臓器	所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
胃 腺部	びらん/壊死 軽微	0	0	1	1	0	0	0	0
	軽度	0	0	0	1	0	0	0	1
	中等度	0	0	0	0	0	0	1	0
	合計	0	0	1	2	0	0	1	1

(Fisher 検定) 申請者が実施した。

6000 ppm および 1000 ppm 群雌雄の胃に限局性の腺部びらん/壊死が認められ、投与との関連性があると考えられた。

この他に認められた変化はすべて偶発的なもので投与による変化とは考えられなかった。

以上の結果、本試験における検体の影響として、6000ppm 群において、雌雄に体重低値または増加抑制、摂餌量の減少、雌にヘモグロビン、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の低下、雌雄に無機りん増加、尿量の増加、屈折率の低下、雌に蛋白の低下、雄に結晶量の低下、肉眼的病理所見として、雌雄の胃腺部に黒色の病巣がみられ、病理組織学的検査では限局性腺びらん/壊死が認められた。

1000 ppm 群においては、雌雄に体重増加抑制または体重低値、摂餌量の減少、雌にヘモグロビン、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の低下、雌雄に尿量の増加、屈折率の低下、雌に蛋白の低下、雄に結晶量の低下、肉眼的病理所見として、雌雄の胃腺部に黒色の病巣がみられ、病理組織学的検査では限局性腺びらん/壊死が認められた。

したがって、本試験における無毒性量は、雌雄とも 200 ppm (雄 12.7mg/kg 体重/日、雌 15.6mg/kg 体重/日) であると判断した。

[申請者追記]

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

### 3)変異原性 ( )

細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 No. 代-3)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2010 年

検体の純度:

試験系: 細菌 (サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102))

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 5 株を用い、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、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、3~5000µg/プレートの範囲の 6 または 8 濃度で実施した。試験は各菌株あたり 3 プレートとし、2 回行った (初回; プレートインコーポレーション法、2 回目; プレインキュベーション法)。陽性対照としてアジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、4-ニトロ-o-フェニレン-ジアミン (4-NOPD)、メチルメタンサルホナート (MMS)、2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

用量設定試験;

#### 結果及び考察

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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、陽性対照として用いた代謝活性化の非存在下および存在下での  $\text{NaN}_3$ 、4-NOPD、MMS および 2-AA では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 1. 本試験 I (プレート インコーポレーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9Mix 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		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
対照(DMSO)	0	-	120	13	388	25	11	
無処理	0	-	125	17	421	29	11	
検体	3	-	121	15	371	27	10	
	10	-	128	13	433	28	13	
	33	-	115	14	421	28	12	
	100	-	129	13	411	29	13	
	333	-	116	14	379	32	9	
	1000	-	115	13	408	34	12	
	2500	-	111	15	427	36	10	
	5000	-	123	18	418	25	7	
対照(DMSO)	0	+	138	18	587	42	18	
無処理	0	+	155	24	569	41	13	
検体	3	+	153	17	595	42	19	
	10	+	140	17	608	36	16	
	33	+	144	16	641	49	18	
	100	+	143	20	613	41	15	
	333	+	126	20	562	47	15	
	1000	+	142	23	592	38	15	
	2500	+	152	20	620	45	16	
	5000	+	147	20	578	48	15	
陽性 対照	NaN <sub>3</sub>	10	-	2188	1870			
	4-NOPD	10	-			320		
		50					77	
	MMS	3.0	-			3613		
	2-AA	2.5	+	3435	437		2861	429
		10.0				2457		

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム      4-NOPD : 4-ニトロ-o-フェニレン-ジアミン      MMS : メチルメ  
 タンスルホナート      2-AA : 2-アミノアントラセン

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。

表 2. 本試験Ⅱ (プレインキュベーション法)

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/プレート	S-9Mix 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		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	0	—	114	15	393	31	12	
無処理	0	—	147	18	401	38	9	
検体	33	—	122	17	396	31	10	
	100	—	106	17	415	33	15	
	333	—	126	19	371	25	12	
	1000	—	116	11	416	36	7	
	2500	—	115	14	429	35	13	
	5000	—	118	16	367	30	13	
対照 (DMSO)	0	+	138	17	484	37	12	
無処理	0	+	173	24	565	41	15	
検体	33	+	145	19	562	36	14	
	100	+	138	20	574	36	11	
	333	+	133	14	510	37	15	
	1000	+	126	25	521	40	12	
	2500	+	135	18	531	40	18	
	5000	+	141	28	482	41	15	
陽 性 対 照	NaN <sub>3</sub>	10	—	1684	1631			
	4-NOPD	10	—			408		
		50					79	
	MMS	3.0	—			1956		
	2-AA	2.5	+	2007	367		1730	230
		10.0				2739		

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム      4-NODD : 4-ニトロ-o-フェニレン-ジアミン      MMS : メチルメ  
 タンスルホナート      2-AA : 2-アミノアントラセン

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。

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. 代-4)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2010年

検体純度:

投与方法: チャイニーズハムスターV79細胞を用い、代謝活性化存在下 (+S9mix) および非存在下 (-S9mix) で染色体異常誘発性を検定した。

検体は DMSO (dimethyl sulfoxide) に溶解して用いた。

試験は独立して2回実施し、培養を2連、1濃度あたり100個の分裂中期像について観察した。陽性対照として (-S9mix) で EMS (Ethylmethane sulfonate) および (+S9mix) では CPA (Cyclophosphamide) を用いて、これ以外は1濃度あたり100個の分裂中期像を観察した。

用量設定根拠:

試験1および試験2の試験条件と用量は以下の通りである。

試験1; (-S9mix および+S9mix) 4時間処理、18時間回収

3.8、7.5、15.0、30.0、60.0、120.0、240.0、480.0

および 960.0  $\mu$ g/ml

試験2; (-S9mix) 18時間処理、18時間回収

3.8、7.5、15.0、30.0、60.0、120.0、240.0、480.0 および

960.0  $\mu$ g/ml で処理したが、許容基準を満たさなかったため、以下の濃度で再度実施した。

60.0、120.0、240.0、480.0 および 960.0  $\mu$ g/ml

(+S9mix) 4時間処理、18時間回収

60.0、120.0、240.0、480.0 および 960.0  $\mu$ g/ml



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。

評価に用いた試験濃度：

試験 1 および試験 2 の (-S9mix) および (+S9mix) 条件下で、以下の濃度の結果を染色体異常の評価に用いた。

240.0、480.0 および 960.0  $\mu$ g/ml

試験結果：結果を次頁の表に示した。

試験 1 および 2 においても、代謝活性化の有無にかかわらず、最高濃度まで、検体の沈殿は認められず、また、細胞毒性（溶媒対照の約 50% の細胞数の減少あるいは分裂指数の減少）も観察されなかった。

試験 1 でのみ、(-S9mix) 条件下 480.0  $\mu$ g/ml で、GAP を除外した異常を有する分裂中期細胞数が 4.5% で、背景データ (0.0~4.0%) をやや上回った。しかしながら、統計学的な有意差は認められず、また、最高濃度の 960  $\mu$ g/ml では増加していないことから、生物学的に意味のない変化と考えられた。これ以外ではいずれの試験においても代謝活性化の有無に関わらず、異常を有する分裂中期細胞数に統計学的、生物学的に有意な変化は認められなかった。

一方、陽性対照の EMS および CPA は染色体異常を持つ細胞数の明白な増加を示した。

以上の結果に基づき、検体は本試験条件においてチャイニーズハムスター V79 細胞に対して染色体異常誘発性を有しないものと判断される。

表 1 結果

薬物	濃度 ( $\mu$ g/ml)	S9 mix	処理時間	回収時間	観察細胞数	異常の分類											異常細胞(%)				
						染色分体型					染色体型					その他		ギャップ*		交換	
						g	b	f	d	ex	ig	ib	if	id	cx	ma	cd	含む	除外		
試験 1 :																					
溶媒対照	0				200	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3.0	3.0	1.5	
検体	240.0	-	4	18	400	1	10	2	0	4	0	1	1	0	0	0	0	3.8	3.5	0.8	
	480.0					3	9	1	0	7	0	4	1	0	0	0	0	0	4.8	4.5	1.5
	960.0					200	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	2.0
EMS	1000					100	4	20	1	0	28	0	1	0	0	0	0	0	0	0	39.0
溶媒対照	0					0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.5	3.5	0.0	
検体	240.0	+	4	18	200	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5	1.0	0.0	
	480.0					0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0	0.0
	960.0					0	6	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3.5	3.5	0.0
CPA	1.4					1	10	0	0	10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	9.0	8.5 <sup>s</sup>
試験 2 :																					
溶媒対照	0					1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2.5	2.0	0.0	
検体	240.0	-	18	18	200	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.5	0.0	
	480.0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
	960.0					0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5	1.5	0.0
EMS	600					1	23	2	0	12	0	3	0	0	0	1	0	0	17.5	17.0 <sup>s</sup>	6.0
溶媒対照	0					1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2.5	2.0	0.5		
検体	240.0	+	4	18	200	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2.0	2.0	0.5	
	480.0					0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	2.0	2.0	1.0	
	960.0					1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5	1.0	0.0	
CPA	1.4					10	12	1	0	8	0	1	4	0	0	1	0	0	15.0	12.0 <sup>s</sup>	4.0

\* : 交換を有する細胞も含む、<sup>s</sup> : p<0.05 (Fisher's exact test)

EMS : Ethylmethane sulfonate、 CPA : Cyclophosphamide

g : 染色分体型ギャップ

b : 染色分体型切断

f : 染色分体型断片

d : 染色分体型欠失

ig : 染色体型ギャップ

ib : 染色体型切断

if : 染色体型断片

id : 染色体型欠失

ex : 染色分体型交換

cx : 染色体型交換

ma : 重複異常

cd : 染色体破損

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。

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. 代-5)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2010 年

検体純度:

試験方法: 培養は2連とし、試験を2回実施した。2または3日間培養したチャイニーズハムスターV79細胞保存培養をEDTA含有塩類溶液で洗浄後、トリプシン処理して細胞懸濁液を調製した。1.5×10<sup>6</sup>細胞(突然変異測定用、単一培養)または5×10<sup>2</sup>細胞(生存率測定用、2検体)でFSC含有MEM培地に播種し、24時間後、DMSO(dimethyl sulfoxide)で調製した検体(濃度は用量設定根拠に記載)、溶媒対照および陽性対照物質を含む無血清培地(-S9mix、+S9mix)に置き換え、4時間処理した。処理後Saline Gで2回洗浄して完全培地で置き換えた。試験2の試験(-S9mix)では24時間検体処理した。生存率測定用の培養は7日後に固定し、コロニーを染色(メチレンブルー)した。突然変異測定用の培養は3日(試験1)または4日(試験2)後に継代し、7日間の発現期間の後、5個の6TG含有選択培地(変異コロニー数測定)に各3~5×10<sup>5</sup>個の細胞を播種し、また、2個の非選択培地(コロニー形成率)に各約500個の細胞を播種して8日間培養し、メチレンブルーを加えてコロニーを染色した。

なお、陽性対照物質は非対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次のパラメータを計算した。

(#: 結果表に示したパラメータ)

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。

$$\begin{aligned} \# \cdot \text{生存率 (相対値)} &= \frac{\text{処理直後の平均コロニー数}}{\text{処理直後の対照の平均コロニー数}} \times 100 \\ \# \cdot \text{コロニー形成率 (相対値)} &= \frac{\text{発現期間後のコロニー形成率の絶対値}}{\text{発現期間後の対照のコロニー形成率の絶対値}} \times 100 \\ \# \cdot \text{変異コロニー数 (細胞 } 10^6 \text{ 個当り)} &= \frac{\text{TG培地播種後平均変異コロニー数} \times 10^6}{\text{生存細胞数}} \\ \# \cdot \text{変異係数} &= \frac{\text{変異コロニー数 (細胞 } 10^6 \text{ 個当り)}}{\text{溶媒対照の変異コロニー数 (細胞 } 10^6 \text{ 個当り)}} \\ \cdot \text{生存率 (絶対値)} &= \frac{\text{処理直後の平均コロニー数}}{\text{播種細胞数}} \\ \cdot \text{細胞密度 (対照に対する割合)} &= \frac{\text{継代時の細胞密度}}{\text{対照の継代時細胞密度}} \times 100 \\ \cdot \text{コロニー形成率 (絶対値)} &= \frac{\text{発現期間後の平均コロニー数}}{\text{播種細胞数}} \\ \cdot \text{生存細胞数 (TG 培地播種後)} &= \text{播種細胞数} \times \text{コロニー形成率の絶対値} \end{aligned}$$

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。

試験1の培養1の(-S9mix)で、変異係数が全処理群で対応する溶媒対照の3倍を超えた。しかしながら、この影響は溶媒対照の変異コロニー数がかなり低かったことによるためと判断した。なお、培養2では変異係数は3未満であった。

さらに、いくつかの変異コロニー数(33.9~54.4/10<sup>6</sup>細胞)がそれぞれの溶媒対照の背景値を超えたが、もう一方の培養では溶媒対照値の範囲内であるか、あるいは、変異係数が溶媒対照の3倍を超えていないことから、生物学的に有意な影響とは考えられなかった。

溶媒対照における平均変異コロニー数(45.3/10<sup>6</sup>細胞(試験1,+S9,培養1)、38.4/10<sup>6</sup>細胞(試験2,-S9,培養1))が、背景対照値(3.0~33.2/10<sup>6</sup>細胞、3.9~31.5/10<sup>6</sup>細胞)をわずかに超えた。しかしながら、わずかな変化であること、もう一方の培養では背景対照値の範囲内にとどまることから、意味のない変化と判断した。

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。

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。

表 1 試験結果 (1回目)

薬剤	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S9 mix	生存率 <sup>a</sup> (%)	コロニー形成率 <sup>a</sup> (%)	変異コロニー数 (/10 <sup>6</sup> cells)	変異係数
溶媒対照 (DMSO)			100.0	100.0	5.8	1.0
			100.0	100.0	24.8	1.0
陽性対照 (EMS)	150.0		79.9	84.3	268.6	46.4
			75.4	77.1	168.9	6.8
検体	30.0	-	70.8	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。		
			60.7	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。		
	60.0		87.7	83.3	34.5	6.0
			89.4	90.1	22.8	0.9
	120.0		92.1	88.5	38.5	6.7
			77.1	93.8	35.5	1.4
	240.0		100.2	91.9	27.2	4.7
			92.0	89.5	17.1	0.7
	480.0		87.7	103.8	38.3	6.6
			98.8	76.3	16.4	0.7
	960.0		82.2	96.4	24.0	4.1
			95.9	64.1	22.1	0.9
溶媒対照 (DMSO)			100.0	100.0	45.3	1.0
			100.0	100.0	25.6	1.0
陽性対照 (DMBA)	1.1		33.6	82.8	1232.2	27.2
			38.1	96.8	1000.4	39.0
検体	30.0	+	108.8	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。		
			87.7	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。		
	60.0		97.2	87.8	18.4	0.4
			86.3	101.9	54.4	2.1
	120.0		98.5	102.8	8.6	0.2
			93.5	107.5	21.2	0.8
	240.0		104.9	90.8	20.9	0.5
			92.6	106.7	37.9	1.5
	480.0		105.4	97.5	34.5	0.8
			86.1	114.8	10.1	0.4
	960.0		110.1	87.1	41.1	0.9
			82.4	92.4	35.6	1.4

a : 対照群に対する割合 (%)

# : 分析可能な4つの濃度だけが最小限必要なことから、培養を継続しなかった。

EMS : メタンスルホン酸エチル

DMBA : ジメチルベンズアントラセン

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。

表 2 試験結果 (2回目)

薬剤	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S9 mix	生存率 <sup>a</sup> (%)	コロニー形成率 <sup>a</sup> (%)	変異コロニー数 (/10 <sup>6</sup> cells)	変異係数	
溶媒対照 (THF)			100.0	100.0	38.4	1.0	
			100.0	100.0	14.5	1.0	
陽性対照 (EMS)	150.0		90.2	81.7	534.4	13.9	
			102.6	91.5	410.3	28.3	
検体	30.0	-	84.3	106.4	28.8	0.8	
			91.2	95.5	13.7	0.9	
	60.0		101.2	111.2	22.7	0.6	
			104.2	95.7	23.4	1.6	
	120.0		95.2	101.7	22.3	0.6	
			85.6	89.7	11.8	0.8	
	240.0		94.9	95.7	25.3	0.7	
			97.0	96.7	28.2	1.9	
	480.0		86.4	培養を継続しなかった <sup>##</sup> 。			
			87.0	培養を継続しなかった <sup>##</sup> 。			
960.0	83.6	102.7	22.3	0.6			
	75.0	94.8	22.1	1.5			
溶媒対照 (THF)			100.0	100.0	24.5	1.0	
			100.0	100.0	27.0	1.0	
陽性対照 (DMBA)	1.1		27.0	70.3	1337.5	54.7	
			21.2	58.2	1185.9	43.9	
検体	30.0	+	99.0	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。			
			85.2	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。			
	60.0		105.4	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。			
			86.4	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。			
	120.0		110.4	105.2	23.1	0.9	
			87.0	100.3	24.1	0.9	
	240.0		102.8	100.3	26.5	1.1	
			94.8	99.3	37.1	1.4	
	480.0		112.0	101.7	52.8	2.2	
			87.6	95.0	27.0	1.0	
960.0	115.3	103.0	33.9	1.4			
	100.7	96.6	27.0	1.0			

a : 対照群に対する割合 (%)

# : 分析可能な4つの濃度だけが最小限必要なことから、培養を継続しなかった。

## : コンタミネーションのため培養を継続しなかった。

EMS : メタンスルホン酸エチル

DMBA : ジメチルベンズアントラセン

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。

(2) 動物・植物中代謝分解物 ( )

1) 急性経口毒性試験

ラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 No. 代-6)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体純度:

供試動物: Sprague-Dawley Rj: SD (IOPS Han)系ラット、約 8 週齢、

体重 211 (202~219) g、1 群雌 3 匹

観察期間: 14 日間

試験方法: OECD ガイドライン No. 423

投与方法: 検体を飲料水で調製し、10mL/kg の投与容量で経口投与した。投与前に一晩絶食した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重測定は、投与日、投与 8 日および 15 日に行った。全動物について肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	300、2000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	雌 >2000
死亡開始および終了時間	死亡は認められなかった。
症状発現および消失時間	投与 1 時間に発現 投与 2 日に消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	300
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000

投与当日を投与 1 日とする。

2000mg/kg 群において中毒症状として運動量の低下および立毛等が認められた。また、体重増加量の低下が初回試験では全期間で、確認試験では試験 1~8 日に認められた。

300mg/kg 群では中毒症状および体重への影響は認められなかった。

剖検ではいずれの投与群においても検体に起因する所見は認められなかった。

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

2) 28日間反復経口投与毒性 ( )

ラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験 (資料 No. 代-7)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2012 年

検体純度:

試験動物: ウィスター (Cr1:WI)系ラット、

1 群雌雄各 10 匹

試験開始時: 雄 約 7 週齢 (体重 243~287g)

雌 約 7 週齢 (体重 173~213g)

投与期間: 28 日間 (2011 年 11 月 3/4 日~2011 年 11 月 30 日/12 月 1 日)

投与方法: 検体を 0、200、800 及び 3000ppm の用量で飼料中に混合し 28 日間投与した。

投与用量設定の根拠:

観察・検査項目及び結果:

一般症状及び死亡率; 生死を少なくとも 1 日 2 回、一般状態の変化を 1 日 1 回観察した。個々の動物の詳細な観察を毎週 1 回実施した。

死亡例は認められなかった。また、投与に関連した一般状態の変化はいずれの投与群においても認められなかった。

神経学的検査; 26 日目に全動物を対象にして以下の神経学的検査を実施した。

刺激に対する感覚反応、握力および自発運動の評価を行い、動物の一般的な身体状態および行動を修正 Irwin 法に基づいて検査した。

いずれの投与群においても雌雄ともに投与に関連する行動の変化は認められなかった。



握力：握力計を用いて個々の動物の前肢および後肢の握力をそれぞれ3回測定した。いずれの投与群においても雌雄ともに投与に関連する握力の変化は認められなかった。3000 および 200 ppm 群雌において、後肢の握力が対照群と比較してわずかに増加したが、用量関連性がみられないことから投与による影響とは考えられなかった。

着地開脚幅：個々の動物の着地開脚幅を測定した。

いずれの投与群においても雌雄ともに投与に関連する着地開脚幅の変化は認められなかった。3000 および 800ppm 群雄において、前肢の着地開脚幅の減少が認められたが、用量、性別のいずれについても一貫した反応が認められないことから、これらの所見は偶発的なものと考えられた。

表 1 握力および着地開脚幅

性別	雄				雌			
	0	200	800	3000	0	200	800	3000
投与量 (ppm)								
着地開脚幅 前肢 (cm)	4.88	4.40	3.85*	3.81*	3.27	3.56	2.57	4.13
握力 後肢 (g)	285.61	292.35	295.59	291.76	211.20	218.34*	216.30	220.34**

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  (Duncan's Multiple Range test)

体重(図 1 a, 図 1b) ; 投与日 (投与開始前)、投与期間中は毎週 1 回 (投与 27 日を含む)、投与 28 日の剖検前に測定した。

いずれの投与群においても、体重に投与に関連した変化あるいは有害な影響を反映していると考えられる変化は認められなかった。3000ppm 群雌雄において対照群と比較してわずかに低値を示す傾向 (終了時に 5~6%低下) が認められたが、統計学的に有意ではなかった。試験第 1 週の体重増加量は、3000ppm 群雄 (-18%) および全投与群雌で対照群と比較して有意に減少したが、用量関連性は認められず (雌の 200ppm 群 : -37%、800ppm 群 : -26%、3000ppm 群 : -32%)、翌週には 3000ppm 群雄を除いた全群において、対照群を上回った。また、試験期間を通した体重増加量では統計学的な有意差は認められなかった。

図 1 a 体重(雄)

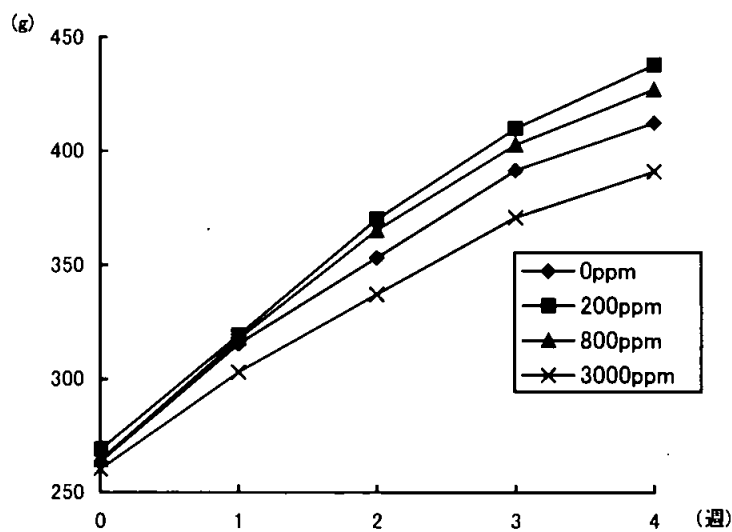
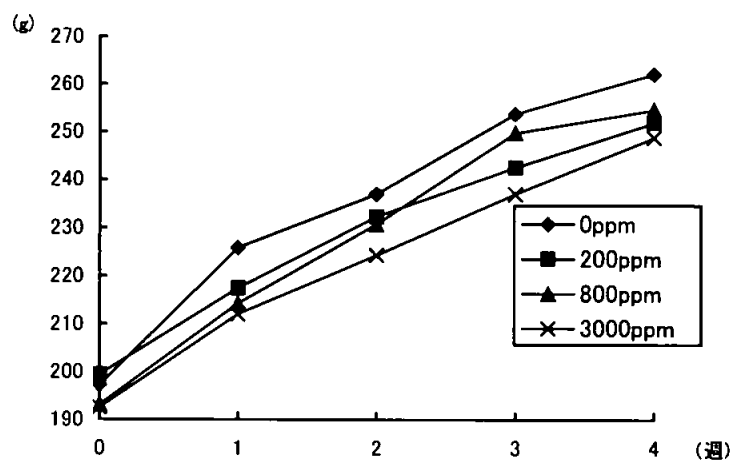


図 1 b 体重(雌)



摂餌量；投与期間中は週に1回測定した。

いずれの用量群においても投与による変化は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

表 2 検体摂取量(mg/kg 体重/日)

投与量 (ppm)		200	800	3000
検体摂取量	雄	17	67	244
	雌	19	76	273

血液学的検査；投与 28 日の計画屠殺日に全動物を対象として、麻酔下での心臓穿刺により一晩絶食させた動物から血液を採取し、以下の項目について測定又は算定した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、白血球数(WBC)、血小板数、プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、白血球分画、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)、平均血小板容積(MPV)、赤血球濃度分布幅、網状赤血球(Retic)。血液塗抹標本は作製したが検査は行わなかった。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

表 3 血液学的検査

性別	雄			雌		
	200	800	3000	200	800	3000
投与量(ppm)						
WBC	↑ 170	↑ 179			↑ 171	↑ 185
RBC	↑ 105	↑ 105	↑ 107			
Hb	↑ 104	↑ 106	↑ 108			
Ht		↑ 105	↑ 105			
MCHC			↑ 103			↑ 102
MCV						↓ 97
MPV	↓ 93	↑ 104			↑ 117	
PT		↑ 106	↑ 110			
APTT						↓ 90
好中球(%)					↓ 73	↓ 63
リンパ球(%)					↑ 112	↑ 115
単球(%)	↑ 154	↑ 154	↑ 157			
好酸球(%)				↓ 59	↓ 64	↓ 74

性別	雄			雌		
投与量(ppm)	200	800	3000	200	800	3000
大型非染色細胞(%)						↑217
Retic(%)					↑128	

↑ ↓ : p<0.05、↑ ↓ : p<0.01 (Duncan's Multiple Range test / Mann-Whitney U test)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

対照群と比較して統計学的に有意な差が散見されたが、用量または性による一貫した変化が認められない、あるいは関連する項目に変化が認められないことから、毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。

血液生化学検査；血液学的検査で使用した血液から得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

酵素/アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ。

電解質/塩素、カルシウム(Ca)、無機リン (Phos)、カリウム(K)、ナトリウム(Na)。

その他/アルブミン (Alb)、総ビリルビン、コレステロール、クレアチニン (Crea)、総蛋白 (TP)、トリグリセリド、尿素、グルコース、A/G比、胆汁酸。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を表に示す。

表4 血液生化学的検査

性別	雄			雌		
投与量(ppm)	200	800	3000	200	800	3000
AST			↓70			
TP			↓97		↓93	↓93
Alb			↓96		↓89	
Crea						↓89
Phos		↑110	↑110			↑116

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。

性別	雄			雌		
	200	800	3000	200	800	3000
投与量 (ppm)						
Na					↓ 95	↓ 98
K			↑ 113			↑ 116
Ca			↑ 105		↑ 103	↑ 109
Cl					↓ 95	↓ 97
胆汁酸		↑ 123				↑ 166

↑ ↓ : p<0.05、↑ ↓ : p<0.01 (Duncan's Multiple Range test / Mann-Whitney U test)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものの。

いくつかの項目において統計学的に有意な変動が認められた。しかしながら、これらの変化に用量または性別に関連する一貫した影響は認められず、また、変化の程度が軽微であることから、毒性学的に意味のある変化ではなく、偶発的な変化と考えられた。

尿検査 ; 試験 28 日に全動物を対象として 16 時間採尿し、以下の項目を検査した。

血液/赤血球、白血球、亜硝酸塩、ビリルビン、グルコース、ケトン体、pH、蛋白、沈渣、ウロビリノーゲン、比重、尿量。

対照群と比較して統計学的な有意差は認められず、毒性学的に意味のある影響も認められなかった。

眼科学的検査 ; 試験 26 日に対照群および 3000ppm 群を対象に実施した。

投与による眼に対する影響は認められなかった。

膣垢検査 ; 剖検に先立ち全群の全雌動物を対象に、膣垢を採取して塗抹標本を作製し発情周期の段階を調べた。

発情周期は正常な範囲内であった。

臓器重量 ; 投与終了時に全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比および対脳比も算出した。

肝臓、心臓、脾臓、胸腺、精巣上体、前立腺、精囊 (凝固腺含む)、腎臓、卵巣、精巣、子宮 (子宮頸管含む)、副腎、甲状腺、脳。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を表に示す。

表 5 臓器重量

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		200	800	3000	200	800	3000
最終体重				96			96
腎臓	実重量						
	対体重比			↑ 109			↑ 110
	対脳重比						
肝臓	実重量						
	対体重比						
	脳重比					↑ 112	
精巣	実重量						
	対体重比			↑ 110			
	対脳重比		↑ 109				
精嚢	実重量						
	対体重比			↑ 116			
	対脳重比						
胸腺	実重量						
	対体重比						↑ 127
	脳重比						

↑ ↓ : p<0.05 (Duncan's Multiple Range test)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

毒性学的に意味のある変化は認められなかった。

肉眼的病理検査 ; 投与終了時に全動物を、ペントバルビタール麻酔下で放血致死させ、  
外表、主要臓器・組織および体腔の肉眼的病理検査を実施した。

投与による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を採取して、10%緩衝ホルマリン液中に固定した。

眼および視神経は修正 Davidson 固定液、精巣上体および精巣は Bouin 液に固定した。

消化器系 盲腸、結腸、十二指腸、食道、回腸、空腸、肝臓、膵臓、直腸、唾液腺、胃、  
舌。

呼吸器系 肺、気管。

心臓血管/血液系 大動脈、骨髄/大腿骨、骨髄/胸骨、心臓、顎下リンパ節、腸管膜リン  
パ節、脾臓、胸腺。

泌尿生殖器系 精巣上体、腎臓、乳腺、卵巣、前立腺、精嚢、精巣、膀胱。

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。

子宮および子宮頸部、膣。

腺 副腎、外涙腺、上皮小体、甲状腺、ハーダー腺。

神経系 脳、視神経、坐骨神経、脳下垂体、脊髄、眼。

その他 骨格筋、皮膚、肉眼的病変部。

対照群、3000 ppm 群の全動物および肉眼で異常が認められた臓器または組織について、病理組織学的検査を行った。

投与による変化は認められなかった。

肝臓、腎臓および前立腺で認められた所見は偶発的なものと考えられた。脾臓で認められた所見は一般的な背景所見と考えられた。

主要な病理組織学的所見を表に示す。

表 6 主要な病理組織学的所見

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	200	800	3000	0	200	800	3000
臓器	所見/検査動物数	10	0	0	10	10	0	0	10
脾臓	髄外造血	8	0	0	10	6	0	0	8
肝臓	限局性壊死	0	0	0	2	0	0	0	0
腎臓	尿細管好塩基球増加	1	0	0	0	0	0	0	0
	腎盂拡張	0	1/1*	0	1	0	0	0	0
前立腺	細胞残屑	0	0	0	1	/	/	/	/
	好中球浸潤	0	0	0	1	/	/	/	/
	壊死性炎症	0	0	1/1*	0	/	/	/	/

\* : 所見動物数/検査動物数

(Fisher 検定、申請者が実施)

以上の結果、本試験における無毒性量は、雌雄とも 3000ppm (雄 244mg/kg 体重/日, 雌 273mg/kg 体重/日) であると判断した。

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

3) 変異原性 ( )

細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 No. 代-8)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体の純度:

試験系: 細菌 (サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102))

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 5 株を用い、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、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、3~5000 $\mu$ g/プレートの範囲の 6 または 8 濃度で実施した。試験は各菌株あたり 3 プレートとし、2 回行った (初回; プレートインコーポレーション法, 2 回目; プレインキュベーション法)。陽性対照としてアジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、4-ニトロ-o-フェニレン-ジアミン (4-NOPD)、メチルメタンサルホナート (MMS)、2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

用量設定試験:

結果及び考察

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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、陽性対照として用いた代謝活性化の非存在下および存在下での  $\text{NaN}_3$ 、4-NOPD、MMS および 2-AA では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さ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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 1. 本試験 I (プレート インコーポレーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/プレート	S-9Mix 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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	0	-	141	13	330	28	16
無処理	0	-	144	13	320	26	20
検体	3	-	127	13	307	30	15
	10	-	136	11	340	31	16
	33	-	137	14	360	30	19
	100	-	137	15	351	29	19
	333	-	124	13	313	26	17
	1000	-	135	12	328	29	16
	2500	-	131	14	326	28	15
5000	-	143	17	320	27	13	
対照 (DMSO)	0	+	138	18	357	42	24
無処理	0	+	155	24	324	51	25
検体	3	+	153	17	371	38	22
	10	+	140	17	390	41	24
	33	+	144	16	395	39	26
	100	+	143	20	393	41	25
	333	+	126	20	377	45	27
	1000	+	142	23	423	47	22
	2500	+	152	20	380	34	24
5000	+	147	20	386	41	30	
陽性 対照	NaN <sub>3</sub>	10	-	2167	1857		
	4-NOPD	10	-			408	
		50					65
	MMS	3.0	-			4464	
	2-AA	2.5	+	3435	301		2409
10.0					2533		

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム      4-NOPD : 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン

MMS : メチルメタンサルホナート      2-AA : 2-アミノアントラセン

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。

表 2. 本試験 II (プレインキュベーション法)

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/プレート	S-9Mix 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		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	0	—	156	16	432	26	19	
無処理	0	—	186	13	445	27	20	
検体	33	—	142	17	477	27	20	
	100	—	141	16	459	23	22	
	333	—	151	18	476	26	26	
	1000	—	158	17	427	30	20	
	2500	—	158	19	456	28	21	
	5000	—	152	16	473	28	20	
対照 (DMSO)	0	+	160	21	632	40	20	
無処理	0	+	216	22	650	38	26	
検体	33	+	166	19	595	40	24	
	100	+	173	20	641	40	18	
	333	+	196	22	670	41	21	
	1000	+	174	19	644	37	22	
	2500	+	169	20	648	40	25	
	5000	+	186	21	655	35	25	
陽 性 対 照	NaN <sub>3</sub>	10	—	2464	2237			
	4-NOPD	10	—			382		
		50					106	
	MMS	3.0	—			2091		
	2-AA	2.5	+	2402	403		2532	302
		10.0				4314		

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム      4-NOPD : 4-ニトロ-o-フェニレン-ジアミン

MMS : メチルメタンサルホナート      2-AA : 2-アミノアントラセン

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。

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. 代-9)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体純度:

投与方法: チャイニーズハムスターV79細胞を用い、代謝活性化存在下 (+S9mix) および非存在下 (-S9mix) で染色体異常誘発性を検定した。

検体は脱イオン水に溶解して用いた。

培養を2連、1濃度あたり100個の分裂中期像について観察した。陽性対照として (-S9mix) で EMS (Ethylmethane sulfonate) および (+S9mix) では CPA (Cyclophosphamide) を用いた。

用量設定根拠;

試験条件と用量は以下の通りである。

(-S9mix および+S9mix) 4時間処理、18時間回収

6.4、12.8、25.6、51.1、102.3、204.5、409.0、818.0

および 1636.0  $\mu$ g/ml

試験結果: 結果を次頁の表に示した。

代謝活性化の有無にかかわらず、最高濃度まで、検体の沈殿は認められず、また、細胞毒性(細胞数の減少あるいは分裂指数の減少)も観察されなかった。

(-S9mix)条件下では、全処理群において、統計学的に有意に異常を有する分裂細胞中期細胞数の増加が認められた。GAPを含めない異常細胞数の割合は、溶媒対照群の1.0%に対して、明らかな用量関連性は認められないものの4.0~

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。

8.5%であった。なお、背景データは                                  であった。また、交換を有する細胞数は溶媒対照群の0.5%と比較して2.0~5.0%と明らかに増加した。

(+S9mix)条件下では、異常数の割合は溶媒対照群を下回るか背景データの範囲内であった。

陽性対照のEMS およびCPA は染色体異常を持つ細胞数の明白な増加を示した。

以上の結果に基づき、検体は本試験条件下においてチャイニーズハムスターV79細胞に対して、代謝活性化の非存在下で染色体異常誘発性を有すると判断される。

表. 結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}$ /ml)	S9 mix	処理時間	回収時間	観察細胞数	異常の分類										異常細胞 (%)				
						染色分体型					染色体型					その他		ギャップ*		交換
						g	b	f	d	ex	ig	ib	if	id	cx	ma	cd	含む	除外	
溶媒対照	0					0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0	0.5
検体	6.4	-	4	18	200	0	3	0	0	5	0	0	0	0	0	1	0	4.0	4.0 <sup>s</sup>	2.0
	12.8					0	5	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0	4.5	4.5 <sup>s</sup>	2.0
	25.6					3	9	3	0	11	0	0	0	0	1	1	1	9.0	8.5 <sup>s</sup>	5.0
	51.1					1	11	2	0	4	0	1	1	0	1	1	0	8.5	8.0 <sup>s</sup>	2.0
	102.3					0	3	1	0	6	0	1	1	0	0	0	0	5.5	5.5 <sup>s</sup>	3.0
	204.5					1	3	1	0	5	0	1	0	0	0	0	0	4.5	4.0 <sup>s</sup>	2.5
	409.0					1	4	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	5.0	4.5 <sup>s</sup>	3.5
	818.0					1	11	0	0	9	0	1	0	0	0	0	0	7.5	7.5 <sup>s</sup>	4.5
	1636.0					1	5	0	0	9	0	2	0	0	0	2	0	8.0	7.5 <sup>s</sup>	4.0
EMS	1000.0					0	5	1	0	48	0	2	0	0	1	0	39.0	39.0 <sup>s</sup>	36.0	
溶媒対照	0					0	7	0	0	1	0	1	0	0	0	0	3.0	3.0	0.5	
検体	409.0	+	4	18	200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0
	818.0					1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5	1.0	0.0	
	1636.0					0	3	2	0	3	0	0	0	0	0	0	2.0	2.0	1.0	
CPA	1.4				100	1	16	2	0	5	0	2	1	0	0	1	0	12.5	12.0 <sup>s</sup>	2.5

\* : 交換を有する細胞も含む

<sup>s</sup> : p<0.05 (Fisher's exact test)

EMS : Ethylmethane sulfonate、

CPA : Cyclophosphamide

g : 染色分体型ギャップ

ig : 染色体型ギャップ

ex : 染色分体型交換

b : 染色分体型切断

ib : 染色体型切断

cx : 染色体型交換

f : 染色分体型断片

if : 染色体型断片

ma : 重複異常

d : 染色分体型欠失

id : 染色体型欠失

cd : 染色体破損

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。

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. 代-10)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体純度:

試験方法: 培養は2連とし、試験を2回実施した。3日間培養したチャイニーズハムスターV79細胞保存培養を EDTA 含有塩類溶液で洗浄後、トリプシン処理して細胞懸濁液を調製した。1.5×10<sup>6</sup>細胞(突然変異測定用、単一培養)または5×10<sup>2</sup>細胞(生存率測定用、2検体)で播種し、24時間後、脱イオン水で調製した検体(濃度は用量設定根拠に記載)、溶媒対照および陽性対照物質を含む無血清培地(-S9mix、+S9mix)に置き換え、4時間処理した。処理後 Saline G で2回洗浄して完全培地で置き換えた。試験2の(-S9mix)では24時間検体処理した。生存率測定用の培養は7日後に固定し、コロニーを染色(メチレンブルー)した。突然変異測定用の培養は3日(試験1)または4日(試験2)後に継代し、7日間の発現期間の後、5個の6TG含有選択培地(変異コロニー数測定)に各3~5×10<sup>5</sup>個の細胞を播種し、また、2個の非選択培地(コロニー形成率)に各約500個の細胞を播種して8日間培養し、メチレンブルーを加えてコロニーを染色した。

なお、陽性対照物質は非対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次のパラメータを計算した。

(#: 結果表に示したパラメータ)

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。

$$\begin{aligned} \# \cdot \text{生存率 (相対値)} &= \frac{\text{処理直後の平均コロニー数}}{\text{処理直後の対照の平均コロニー数}} \times 100 \\ \# \cdot \text{コロニー形成率 (相対値)} &= \frac{\text{発現期間後のコロニー形成率の絶対値}}{\text{発現期間後の対照のコロニー形成率の絶対値}} \times 100 \\ \# \cdot \text{変異コロニー数 (細胞 } 10^6 \text{ 個当り)} &= \frac{\text{TG培地播種後平均変異コロニー数} \times 10^6}{\text{生存細胞数}} \\ \# \cdot \text{変異係数} &= \frac{\text{変異コロニー数 (細胞 } 10^6 \text{ 個当り)}}{\text{溶媒対照の変異コロニー数 (細胞 } 10^6 \text{ 個当り)}} \\ \cdot \text{生存率 (絶対値)} &= \frac{\text{処理直後の平均コロニー数}}{\text{播種細胞数}} \\ \cdot \text{細胞密度 (対照に対する割合)} &= \frac{\text{継代時の細胞密度}}{\text{対照の継代時細胞密度}} \times 100 \\ \cdot \text{コロニー形成率 (絶対値)} &= \frac{\text{発現期間後の平均コロニー数}}{\text{播種細胞数}} \\ \cdot \text{生存細胞数 (TG 培地播種後)} &= \text{播種細胞数} \times \text{コロニー形成率の絶対値} \end{aligned}$$

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。

試験1の培養1の(-S9mix)で、変異係数が410 $\mu$ g/mLおよび820 $\mu$ g/mLで溶媒対照の3倍を超えた。しかしながら、それぞれの変異コロニー数は背景値の範囲内であったこと、培養2では変異係数は3未満であったことから、この影響は生物学的な意味はないと判断した。

試験2の培養1(-S9mix)および培養2(+S9mix)において、用量依存性の増加を評価するための線形回帰分析が有意(それぞれp=0.03496、p=0.02569)であった。しかしながら、個々の変異コロニー数は背景値の範囲内であったため、この統計学的な有意性は意味がない変化と判断した。

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。

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。

表 1 試験 1

薬剤	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S9 mix	生存率 <sup>a</sup> (%)	コロニー形成率 <sup>a</sup> (%)	変異コロニー数 (/10 <sup>6</sup> cells)	変異係数		
溶媒対照 (脱イオン水)			100.0	100.0	6.4	1.0		
			100.0	100.0	9.6	1.0		
陽性対照 (EMS)	150.0		51.2	95.1	100.4	15.8		
			50.1	117.4	68.7	7.1		
検体	51.3	-	98.3	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。				
			99.6					
	102.5		97.1	109.8	5.7	0.9		
			98.1	101.0	11.5	1.2		
	205.0		91.7	99.7	13.5	2.1		
			97.1	90.3	13.7	1.4		
	410.0		97.1	69.8	26.8	4.2		
			98.5	100.1	8.4	0.7		
	820.0		94.7	78.7	19.8	3.1		
			96.7	72.8	11.0	1.1		
	1640.0		100.4	75.5	15.2	2.4		
			96.2	92.0	16.4	1.7		
	溶媒対照 (DMSO)				100.0	100.0	7.4	1.0
					100.0	100.0	18.9	1.0
陽性対照 (DMBA)	1.1		36.7	81.4	752.9	102.2		
			46.3	103.1	640.2	33.9		
検体	51.3	+	94.6	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。				
			99.5					
	102.5		100.0	92.0	20.7	2.8		
			92.2	96.2	11.2	0.6		
	205.0		96.6	92.7	17.9	2.4		
			104.6	94.6	15.7	0.8		
	410.0		95.0	90.9	18.0	2.4		
			95.8	114.1	9.5	0.5		
	820.0		98.0	92.0	10.5	1.4		
			99.0	90.2	15.9	0.8		
	1640.0		97.2	87.3	14.1	1.9		
			101.5	130.5	8.1	0.4		

a : 対照群に対する割合 (%)

# : 分析可能な 4 つの濃度だけが最小限必要なことから、培養を継続しなかった。

EMS : メタンサルホン酸エチル

DMBA : ジメチルベンズアントラセン



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。

表 2 試験 2

薬剤	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S9 mix	生存率 <sup>a</sup> (%)	コロニー形成率 <sup>a</sup> (%)	変異コロニー数 (/10 <sup>6</sup> cells)	変異係数
溶媒対照 (脱イオン水)			100.0	100.0	17.5	1.0
			100.0	100.0	30.0	1.0
陽性対照 (EMS)	150.0		91.8	114.1	372.5	21.2
			82.6	81.7	381.8	12.7
検体	51.3	-	88.6	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。		
			97.8	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。		
	102.5		91.3	86.3	15.9	0.9
			94.2	83.7	21.1	0.7
	205.0		96.3	154.5	16.4	0.9
			91.0	84.8	21.5	0.7
	410.0		90.2	115.0	22.3	1.3
			93.0	91.3	16.9	0.6
	820.0		96.0	107.3	16.7	1.0
			91.0	85.2	16.7	0.6
1640.0	106.2	159.9	31.6	1.8		
	103.5	79.9	22.3	0.7		
溶媒対照 (THF)			100.0	100.0	24.2	1.0
			100.0	100.0	8.2	1.0
陽性対照 (DMBA)	1.1		48.5	65.9	773.8	32.0
			48.7	45.5	596.2	72.3
検体	51.3	+	107.9	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。		
			113.1	培養を継続しなかった <sup>#</sup> 。		
	102.5		100.9	93.7	14.3	0.6
			107.0	80.2	11.6	1.4
	205.0		99.9	95.2	31.9	1.3
			111.6	70.0	11.6	1.4
	410.0		103.2	93.1	33.2	1.4
			113.6	76.5	11.8	1.4
	820.0		95.3	85.1	21.8	0.9
			104.5	72.5	12.4	1.5
1640.0	97.0	92.8	27.4	1.1		
	114.7	73.5	15.0	1.8		

a : 対照群に対する割合 (%)

# : 分析可能な 4 つの濃度だけが最小限必要なことから、培養を継続しなかった。

EMS : メタンスルホン酸エチル

DMBA : ジメチルベンズアントラセン

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。

マウスにおける小核試験 ( ) (資料 No. 代-11)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体の純度 :

供試動物 : NMRI 系マウス (試験開始時: 約 9~10 週齢、体重 1 回目投与: 平均 37.6 g、  
2 回目投与: 平均 37.9 g)、1 群雄 7 匹。

投与方法 : 検体を滅菌水に懸濁し、0、125、250 および 500 mg/kg の投与濃度で腹腔内に投与した。シクロホスファミドは滅菌水に溶解し、同一の方法で投与した。陰性対照には滅菌水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。投与容量はいずれの場合も 10 mL/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、骨髓細胞の塗抹標本を作製した。標本を May-Grünwald/Giemsa を用いて染色後、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。同時に細胞毒性を調べるため正染性赤血球数も計測し、赤血球 2000 個あたりの多染性赤血球として示した。

用量設定の根拠:

試験結果:

1) 一般症状

500 および 250 mg/kg 群で次のような検体に関連した症状が認められた: 自発運動の低下、粗毛、閉眼または腹臥位。死亡は認められなかった。125 mg/kg 群および陰性対照群では何の症状も死亡も認められなかった。

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

## 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、陰性対照群と検体投与群の間に生物学的に有意な差は認められなかった。また、多染性赤血球数は陰性対照群と比較して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と比較して増加させた。

投与群	評価した多染性赤血球総数	赤血球2000個あたりの多染性赤血球数	小核を有する多染性赤血球数/多染性赤血球2000個 (%)
陰性対照	14000	1158	0.100
検体 125 mg/kg × 2回	14000	1120	0.086
検体 250 mg/kg × 2回	14000	1118	0.114
検体 500 mg/kg × 2回	14000	1046	0.164
陽性対照 シクロホスファミド	14000	1039	1.964

以上の結果から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。

ラットの肝細胞を用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成試験 ( ) (資料 No. 代-12)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2011 年

検体の純度:

供試動物: ウィスター系ラット (6 週齢、平均体重 181.7g)

1 群雄各 7 匹

試験方法: 検体を滅菌水に溶解し、1 群 7 匹の雄ラットに検体 1000 および 2000mg/kg を 10ml/kg 容量で強制経口投与した。試験群は次に示す通りで、各検体投与後 4 または 16 時間後に動物を屠殺し、肝細胞を調製した。

溶媒対照として、滅菌水を同様に投与し、同時間に屠殺した。

陽性対照として、DMSO/PEG400 (1:9) に懸濁した 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) を 100mg/kg の用量で投与し 16 時間後に屠殺、0.9%食塩水に溶解した N,N'-ジメチルヒドラジン(DMH)を 80mg/kg の用量で投与し 4 時間後に屠殺して、それぞれ肝細胞を調製した。

試験群	投与量 mg/kg	投与経路	屠殺時間
溶媒対照	0	経口	4 および 16
検体	1000	経口	4 および 16
検体	2000	経口	4 および 16
陽性対照 (2-AAF)	100	経口	16
陽性対照 (DMH)	80	経口	4

用量設定の根拠:

肝細胞の調製: 各動物を麻酔下で生体位灌流し、肝臓摘出後単離肝細胞を調製した。単離した肝細胞は、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン、インスリン、ヘパスおよびウシ胎児血清を添加した WilliamsE 培養液で、37°Cのインキュベーター内で 5%炭酸ガスを含む加湿空気下で 90 分間培養した。なお、生存細胞の検査は灌流後の細胞懸濁液を用いてトリパンブルー色素排除法により調べた。

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

UDS 標本の作製：その後各培養を培地で洗浄し、 $5\mu\text{Ci/mL}$  の  $^3\text{H}$ -チミジンを添加した培養液で 4 時間培養した。非標識チミジンを加えた培地で肝細胞を 2 回洗浄し、一晚培養した。その後、1%クエン酸ナトリウムで核の膨化处理、酢酸とメタノール混液で細胞を固定、96%エタノールで洗浄後に風乾した。

オートラジオグラフィー処理のためにスライドガラスを写真乳剤で処理し暗箱中  $4^\circ\text{C}$  で 14 日間の保持後、現像し、固定、風乾後、ヘマトキシリン・エオシンで染色した。

各群につき 4 匹の動物を、動物 1 匹あたり 2 枚のスライドを作製し、各 50 細胞、合計 100 細胞を観察した。

観察結果の表示：

正味粒子数(NNG) = 核内粒子数 - 核面積に相当する細胞質領域粒子数

修復中の細胞(5 個以上の粒子を有する核)(%) = 検査細胞数に対する 5 個以上の粒子を有する核(細胞)数の百分率

判定基準：検体投与群平均正味粒子数が +5 以上の場合、陽性と判定する。

検体投与群平均正味粒子数が 0 以下の場合、陰性と判定する。

正味粒子数が 0~5 の場合、それぞれのケースに応じて判定する。

試験結果：

1) 一般症状

全投与群に被毛粗剛および自発運動の低下が認められた。

2) UDS 試験

いずれの群においても、肝細胞の生存率に影響は認められなかった。

2000 および 1000mg/kg 群において、4 時間および 16 時間屠殺でも、正味粒子数(NNG)は 0 以下であった。また、修復中の細胞数の増加は観察されなかった。

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

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

試験結果

屠殺時間	投与群	投与量 (mg/kg)	正味粒子数	核上粒子数	細胞質粒子数	細胞修復率 (%)	生存細胞 (%)
16時間	溶媒対照	0	-12.04	14.96	27.00	1.00	84
	検体	1000	-9.84	25.64	35.48	3.25	81
	検体	2000	-14.05	15.61	29.67	0.50	92
	陽性対照 2-AAF	100	14.00	43.24	29.23	87.00	86
4時間	溶媒対照	0	-9.08	12.53	21.61	1.75	92
	検体	1000	-8.78	13.18	21.96	2.00	85
	検体	2000	-11.54	22.90	34.44	2.50	81
	陽性対照 DMH	80	36.74	56.88	20.13	97.75	93

溶媒対照：滅菌水

陽性対照 2-AAF：2-アセチルアミノフルオレン、DMH：N,N'-ジメチルヒドラジン