

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

5) マウス、ラットおよびヒト血漿と肝臓画分中での *in vitro* 代謝の検討 (資料 A-27)

試験機関：CIBA-GEYGY CORPORATION

報告書作成年：1994 年

検体及び純度：・フルチアセットメチル

- ・代謝物
- ・代謝物
- ・代謝物

試験生物試料：・若齢成熟雄性ラット (Tif:RAIf(SPF), 体重 230~275 g) から得られた血漿および肝臓ホモジネート

- ・雄性マウス (Tif:MAGf(SPF), 体重 21~24 g) から得られた血漿および肝臓ホモジネート
- ・ヒト血漿および肝臓ホモジネート

試験の目的：フルチアセットメチルのマウスおよびラットを用いた亜急性毒性試験 (資料 A-18、A-19) において、肝臓が主要な標的臓器であることが認められ、本化合物により惹起される肝障害は、マウスの方がラットよりも感受性が高かった。本化合物により、肝障害を受けやすいマウスにおいては、代謝の知見は得られていない。さらに、CIBA-GEYGY CORPORATION で実施された試験 (資料 A-26) より、本化合物及びラット代謝物の肝プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害作用には種差がみられ、マウスの酵素が最も影響を受けやすく、ラットがそれに次いで、ヒトの酵素は著しく阻害され難かった。

この様にフルチアセットメチルの血漿及び肝コンパートメントでの代謝における種特異性はプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (PO) に対する阻害能と直接的に関連している可能性が考えられる。ラットにおける主要な代謝経路として

が示されたが、本試験で

はフルチアセットメチルのマウス、ラット及びヒト血漿及び肝ホモジネート中での加水分解及び異性化速度を検討するために実施された。さらに、フルチアセットメチルの生体内加水分解に関わるエステラーゼのタイプについて明らかにするために、エステラーゼ阻害薬剤を用いて *in vitro* 阻害試験も実施した。

試験方法の概要：

1. フルチアセットメチルの *in vitro* 代謝

フルチアセットメチルの *in vitro* での代謝をマウス、ラットおよびヒトでの血漿及び肝ホモジネート (コファクターの補充はしなかった) を用いて検討した。希釈した血漿及び肝ホモジネート存在下の 37°C での各時間において、300 μ M のフルチアセットメチルをインキュベートした後、反応液をジエチルエーテルで抽出し、フルチアセットメチル及びその代謝物について抽出物を HPLC 及び UV 検出器で分析した。

2. フルチアセットメチルの *in vitro* エステラーゼ阻害試験

血清 A-エステラーゼ阻害剤であるフッ化ナトリウム (NaF)、コリンエステラーゼ阻害剤であるエゼリン及び血清 B-エステラーゼ阻害剤であるリン酸フッ化ジイソプロピル (DFP) のタイプの異なる三種のエステラーゼ阻害剤の各 100 μ M の濃度を用いて、フルチアセットメチル (300 μ M) の *in vitro* 代謝への影響を検討した。フルチアセットメチル及びその代謝物の抽出量は上記と同様に実施した。

試験結果：

1. フルチアセットメチルの *in vitro* 代謝

血漿および肝ホモジネート中とも、検討したインキュベーション時間の範囲内において、*in vitro* でのフルチアセットメチルの代謝は厳密に酵素源としてのタンパク含量に依存していた。フルチアセットメチルは、血漿あるいは肝ホモジネートの非存在下、もしくは加熱あるいは酸により変性したタンパクの存在下では代謝されなかった。

①マウス、ラット及びヒト血漿を用いたフルチアセットメチルの代謝

表 1 フルチアセットメチル (300 μ M) を 37°C 下 4 分間血漿中でインキュベーション後の代謝

種	血漿濃度 (%)	回収率 (%)	親化合物および代謝物 (nmol/ml)			
			フルチアセットメチル			
マウス	10	100	1	300	Nd	nd
ラット	10	94	nd	283	Nd	Nd
ヒト	10	97	272	<1	18	nd

nd : 不検出

マウス及びラット血漿では、フルチアセットメチルの

が主要代謝物であり、フルチアセットメチルは 10% 血漿中で 4 分間のインキュベーション後には完全に加水分解された。ヒト血漿中においてはフルチアセットメチルの代謝はかなり緩やかで、

が代謝物として認められたが、10% 以

下の生成であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

②マウス、ラット及びヒト肝臓ホモジネートを用いたフルチアセットメチルの代謝

表2 フルチアセットメチル (300 μ M) を 37 $^{\circ}$ C下 2.5%(w/v) 肝臓ホモジネート中でインキュベーション後の代謝

種	インキュベーション時間 (分)	回収率 (%)	親化合物および代謝物 (nmol/ml)			
			フルチアセットメチル			
マウス	0	100	293	6	2	nd
	0.5	94	2	14	25	241
	10	87	nd	nd	nd	260
	60	94	nd	nd	nd	281
ラット	0	101	301	4	nd	nd
	0.5	91	nd	16	53	203
	10	76	2	nd	nd	226
	60	83	nd	nd	nd	250
ヒト	0	100	293	6	2	nd
	0.5	104	90	189	7	7
	10	90	nd	135	nd	134
	60	85	nd	Nd	nd	256

nd : 不検出

マウス及びラット肝ホモジネート中では、フルチアセットメチルは M-6 に殆どが代謝された。

ヒト肝ホモジネート中でも同様な代謝物が認められたが、代謝速度はマウス、ラットに比較して遅かった。10分後にはフルチアセットメチルは検出されなくなり、同量の M-5 および M-6 が認められ、60分後には親化合物は定量的に M-6 へ代謝された。

2. フルチアセットメチルの *in vitro* エステラーゼ阻害試験

①ラット血漿(10%)を用いたフルチアセットメチルの代謝へのエステラーゼ阻害剤の影響

表3 阻害剤存在下フルチアセットメチルを 37 $^{\circ}$ C下 4分間血漿中でインキュベーション後の代謝

阻害剤	回収率 (%)	親化合物および代謝物 (nmol/ml)				
		フルチアセットメチル				
阻害剤無し	103	<1	308	nd	nd	—
DFP	114	174	80	3	nd	84
エゼリン	114	<1	343	nd	nd	—
NaF	110	nd	330	nd	nd	—

nd : 不検出

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

エゼリン及び NaF ではラット血漿中でのフルチアセットメチルの代謝は阻害されなかったが、DFP では十分に阻害された。よって、以降のマウス、ラット及びヒト生物試料を用いた阻害試験では DFP を用いた。

②マウス、ラット及びヒト血漿または肝臓ホモジネート中フルチアセットメチルの代謝へのエステラーゼ阻害剤 (DFP) の影響

表4 阻害剤存在下フルチアセットメチルを 37°C下 60 分間インキュベーション後の代謝

種	試料	DFP 濃度 (μ M)	回収率 (%)	親化合物および代謝物 (nmol/ml)			
				フルチアセットメチル	M-5	M-12	M-6
マウス	血漿	0	111	104	224	nd	5
		100	118	353	nd	nd	nd
	肝臓	0	112	nd	124	nd	212
		100	110	143	23	98	66
ラット	血漿	0	88	9	256	nd	3
		100	81	230	12	<1	nd
	肝臓	0	100	74	126	7	94
		100	93	218	17	31	12
ヒト	血漿	0	105	99	20	183	12
		100	102	209	15	75	6
	肝臓	0	103	1	195	nd	114
		100	101	252	39	5	8

マウス及びラット血漿中でのフルチアセットメチルの
 された。ヒト血漿でも、
 への異性化を部分的に阻害し
 た。肝ホモジネートについても、同様な結果が
 において示された。 は三
 種の動物の肝ホモジネート中のエステルの加水分解を抑制し、異性化についても僅
 かながら影響を示した。

考察：

マウス及びラット血漿中では、フルチアセットメチルは
 であった。げっ歯類の血漿とは対照的に、フルチア
 セットメチルのかなり緩徐な代謝がヒト血漿中で認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

肝ホモジネート中において、ヒトではげっ歯類と比較して代謝速度は幾分遅かったが、
3動物種とも親化合物は定量的に代謝された。

以上の結果より、マウス、ラットでは血漿および肝ホモジネート中におけるフルチア
セットメチルの代謝には差がほとんどないことが予想された。一方ヒト血漿中ではフル
チアセットメチルは代謝され難く、肝ホモジネート中では代謝速度に差はあったが、生
成代謝物については、げっ歯類と同様であり、

であることが推定された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

6) 原体のマウス肝および膵臓中の過酸化脂質およびポルフィリン類測定 (資料A-56)

試験機関：(財) 食品農医薬品安全性評価センター

報告書作成年：2001年

検体の純度：

試験期間：2001年2月21日～2001年8月26日

試験目的：本試験は、残留農薬安全性評価委員会からの指摘事項により実施した。

すなわち、ラット及びマウスの肝及び膵における活性酸素および過酸化脂質の発生について、試験的手法を用いて再考察するため、フルチアセットメチルを投与されたマウスの肝および膵臓中の脂質過酸化およびポルフィリン類の蓄積を調べるため実施した。

試験方法：CD-1系雄マウス（投与開始時7週齢、体重 29.9 ± 1.1 g、雄5匹）を使用し、検体を5000ppm含有した飼料を4または13週間にわたり自由摂取させた。検体濃度はマウス90日間亜急性毒性試験（資料A-18）の最高用量に設定した。投与終了後マウスを放血死させ、肝臓および膵臓を生理食塩液で環流後、それら臓器を摘出し液体窒素で凍結し、測定まで -80°C で保存した。

臓器中の過酸化脂質量はUchiyama and Miharaの方法に従い、チオバルビツール酸反応生成物(TBARS)量の値で示した。臓器中のポルフィリン類の測定はSanittrak et al.の方法に従い、下記の6種類のポルフィリン濃度を測定した。

1. Uroporphyrin ester (Uropor ; 8-COOCH₃)
2. Heptacarboxylate porphyrin ester (7-COOCH₃)
3. Haxacarboxylate porphyrin ester (6-COOCH₃)
4. Pentacarboxylate porphyrin ester (5-COOCH₃)
5. Coproporphyrin ester (Copro ; 4-COOCH₃)
6. Protoporphyrin IX ester (ProtoIX ; 2-COOCH₃)

結 果：

一般状態：投与期間中変化はなく、死亡もみられなかった。

体 重：平均体重および体重増加は対照群との間に有意な差はなかった。

摂餌量および検体摂取量：摂餌量は対照群との間に有意な差はなかった。平均検体摂取量は730 mg/kg/dayであった。

肝および膵臓中の過酸化脂質量：下記表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

4 週間投与後

用量 (ppm)	動物数	TBARS/肝臓 (nmol/mg protein)	TBARS/膵臓 (nmol/mg protein)
0	5	1.94±0.13	1.33±0.15
5000	5	3.77±0.23**	1.76±0.23**

Dunnett の多重比較検定または Steel の検定 ** : p<0.01

13 週間投与後

用量 (ppm)	動物数	TBARS/肝臓 (nmol/mg protein)	TBARS/膵臓 (nmol/mg protein)
0	5	2.08±0.27	2.04±0.13
5000	5	3.13±0.69*	2.18±0.28

Dunnett の多重比較検定または Steel の検定 * : p<0.05

投与 4 週において、肝臓中の TBARS 値は対照群と比較して 5000ppm 群では約 1.9 倍と有意に増加した。膵臓中の TBARS 値も 5000ppm 群では約 1.3 倍と有意な増加を示した。投与 13 週間では、肝臓中の TBARS 値は対照群と比較して 5000ppm 群では約 1.5 倍と有意に増加したが、膵臓中では有意差を認めなかった。

肝および膵臓中のポルフィリン量：下記表に示す。

肝臓中 4 週間投与

用量 (ppm)	動物数	2-COOCH ₃ (nmol/g)	4-COOCH ₃ (nmol/g)	5-COOCH ₃ (nmol/g)	6-COOCH ₃ (nmol/g)	7-COOCH ₃ (nmol/g)	8-COOCH ₃ (nmol/g)
0	5	0.122	0.028	0.000	0.000	0.012	0.076
5000	5	1.932**	0.228**	0.046**	0.028	0.175**	3.679**

肝臓中 13 週間投与

用量 (ppm)	動物数	2-COOCH ₃ (nmol/g)	4-COOCH ₃ (nmol/g)	5-COOCH ₃ (nmol/g)	6-COOCH ₃ (nmol/g)	7-COOCH ₃ (nmol/g)	8-COOCH ₃ (nmol/g)
0	5	0.008	0.003	0.000	0.000	0.003	0.021
5000	5	0.806**	0.097**	0.043	0.096	1.644**	5.555**

Dunnett の多重比較検定または Steel の検定 ** : p<0.01

膵臓中 4 週間投与

用量 (ppm)	動物数	2-COOCH ₃ (nmol/g)	4-COOCH ₃ (nmol/g)	5-COOCH ₃ (nmol/g)	6-COOCH ₃ (nmol/g)	7-COOCH ₃ (nmol/g)	8-COOCH ₃ (nmol/g)
0	5	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009
5000	5	0.032*	0.002	0.000	0.000	0.001	0.016**

膵臓中 13 週間投与

用量 (ppm)	動物数	2-COOCH ₃ (nmol/g)	4-COOCH ₃ (nmol/g)	5-COOCH ₃ (nmol/g)	6-COOCH ₃ (nmol/g)	7-COOCH ₃ (nmol/g)	8-COOCH ₃ (nmol/g)
0	5	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
5000	5	0.022*	0.001	0.000	0.000	0.004	0.020*

Dunnett の多重比較検定または Steel の検定 * : p<0.05, ** : p<0.01

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

投与 4 週において、肝臓中では Uroporphyrin, Protoporphyrin IX, Coproporphyrin および Heptacarboxylate porphyrin の蓄積が多く認められた。脾臓では蓄積量は少なかったが、Uroporphyrin および ProtoporphyrinIX が対照群と比較して有意に増加した。投与 13 週間では、肝および脾臓中とも投与 4 週間の結果とほぼ同様であった。

考察および結論：

過酸化脂質量は 4 週間投与において、肝臓および脾臓とも対照群と比較して投薬群では有意に増加し、13 週間投与では肝臓のみが有意に増加した。ポルフィリン量は肝臓では 4、13 週間投与とも大体のポルフィリン類が増加し、特に Uroporphyrin および ProtoporphyrinIX の蓄積が顕著であった。脾臓では肝臓ほどの蓄積はなかったが、Uroporphyrin および ProtoporphyrinIX が対照群と比較して有意に増加した。

ポルフィリン類は Porphobilinogen からヘム合成酵素により生合成され、Uroporphyrin, Coproporphyrin を経てヘムの前駆体である ProtoporphyrinIX に合成される。これらのポルフィリン類は、ヘム合成酵素の異常により蓄積すると組織障害を起こすことが知られている。これはポルフィリンが光により励起され、酸素ラジカルを生成するためと言われているが、遮光下でもポルフィリン類は酸素ラジカルを生成することが実証されている。

以上のことから、マウスにフルチアセットメチルを投与することにより、肝臓中に Uroporphyrin および ProtoporphyrinIX が大量に蓄積し、TBARS の上昇により脂質過酸化を確認した。また、脾臓においても肝臓ほど顕著ではないが同様に上記両ポルフィリン類と TBARS の上昇を認めた。フルチアセットメチルの長期投与により、肝臓および脾臓に脂質過酸化による組織障害が起こることが示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

7) 原体のラット肝および脾臓中の過酸化脂質およびポルフィリン類測定 (資料A-57)

試験機関：(財) 食品農医薬品安全性評価センター
報告書作成年：2001年

検体の純度：

試験期間：2001年2月21日～2001年8月26日

試験目的：本試験は、残留農薬安全性評価委員会より出された要望事項「⑥ラット及びマウスの肝及び脾臓における活性酸素および過酸化脂質の発生について、試験的手法を用いて再考察すること。」(12薬検第1630号、平成12年11月14日)の回答のため、フルチアセットメチルを投与されたラットの肝および脾臓中の脂質過酸化およびポルフィリン類の蓄積を調べる事を目的に実施された試験である。

試験方法：CD系雄ラット(投与開始時7週齢、体重 239 ± 6 g、雌5匹)を使用し、検体20000ppmを含む飼料を4または13週間にわたり自由摂取させた。検体濃度はラット90日間亜急性毒性試験(資料A-19)の最高用量に設定した。投与終了後ラットを放血死させ、肝臓および脾臓を生理食塩液で環流後、それら臓器を摘出し液体窒素で凍結し、測定まで -80°C で保存した。臓器中の過酸化脂質量はUchiyama and Miharaの方法に従い、チオバルビツール酸反応生成物(TBARS)量の値で示した。臓器中のポルフィリン類の測定はSanitrak et al.の方法に従い、下記の6種類のポルフィリン濃度を測定した。

1. Uroporphyrin ester (Uropor ; 8-COOCH₃)
2. Heptacarboxylate porphyrin ester (7-COOCH₃)
3. Haxacarboxylate porphyrin ester (6-COOCH₃)
4. Pentacarboxylate porphyrin ester (5-COOCH₃)
5. Coproporphyrin ester (Copro ; 4-COOCH₃)
6. Protoporphyrin IX ester (ProtoIX ; 2-COOCH₃)

結 果：

一般状態：投与期間中変化はなく、死亡もみられなかった。

体 重：平均体重は、投与4週から対照群と比較して有意に減少し、体重増加も抑制された。13週間における体重増加は対照群に比して71%であった。

摂餌量および検体摂取量：摂餌量は対照群との間に有意な差はなかった。平均検体摂取量は1300 mg/kg/dayであった。

肝臓および脾臓中の過酸化脂質量：下記表に示す。

4 週間投与後

用量 (ppm)	動物数	TBARS/肝臓 (nmol/mg protein)	TBARS/脾臓 (nmol/mg protein)
0	5	1.67±0.86	0.84±0.22
20000	5	1.96±0.44	1.07±0.15

Dunnett の多重比較検定または Steel の検定 ** : p<0.01

13 週間投与後

用量 (ppm)	動物数	TBARS/肝臓 (nmol/mg protein)	TBARS/脾臓 (nmol/mg protein)
0	5	1.46±0.19	0.96±0.24
20000	5	2.85±0.60**	1.04±0.24

Dunnett の多重比較検定または Steel の検定 * : p<0.05

投与 4 週において、肝臓および脾臓中の TBARS 値とも 20000 ppm 群では増加傾向がみられたが、有意差は認められなかった。投与 13 週では、肝臓中の TBARS 値は対照群と比較して 20000 ppm 群では約 2 倍となり、有意に増加したが、脾臓中では 4 週と同様に増加傾向がみられたが、有意差は認められなかった。

肝臓および脾臓中のポルフィリン量：下記表に示す。

肝臓中 4 週間投与

用量 (ppm)	動物数	2-COOCH ₃ (nmol/g)	4-COOCH ₃ (nmol/g)	5-COOCH ₃ (nmol/g)	6-COOCH ₃ (nmol/g)	7-COOCH ₃ (nmol/g)	8-COOCH ₃ (nmol/g)
0	5	0.065	0.016	0.003	0.003	0.007	0.036
20000	5	0.133*	0.049*	0.021**	0.007	0.041**	3.014**

肝臓中 13 週間投与

用量 (ppm)	動物数	2-COOCH ₃ (nmol/g)	4-COOCH ₃ (nmol/g)	5-COOCH ₃ (nmol/g)	6-COOCH ₃ (nmol/g)	7-COOCH ₃ (nmol/g)	8-COOCH ₃ (nmol/g)
0	5	0.004	0.002	0.001	0.000	0.001	0.003
20000	5	0.208**	0.038**	0.012**	0.009**	0.093**	2.898**

Dunnett の多重比較検定または Steel の検定 ** : p<0.01

脾臓中 4 週間投与

用量 (ppm)	動物数	2-COOCH ₃ (nmol/g)	4-COOCH ₃ (nmol/g)	5-COOCH ₃ (nmol/g)	6-COOCH ₃ (nmol/g)	7-COOCH ₃ (nmol/g)	8-COOCH ₃ (nmol/g)
0	5	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
20000	5	0.033	0.004	0.000	0.000	0.001	0.011

脾臓中 13 週間投与

用量 (ppm)	動物数	2-COOCH ₃ (nmol/g)	4-COOCH ₃ (nmol/g)	5-COOCH ₃ (nmol/g)	6-COOCH ₃ (nmol/g)	7-COOCH ₃ (nmol/g)	8-COOCH ₃ (nmol/g)
0	5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
20000	5	0.011**	0.000	0.000	0.000	0.002	0.009**

Dunnett の多重比較検定または Steel の検定 * : p<0.05, ** : p<0.01

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

投与4週において、肝臓中では Uroporphyrin および Protoporphyrin IXの蓄積量が多く認められた。脾臓では ProtoporphyrinIXが少し蓄積している程度であった。投与13週において、肝では4週と同様に Uroporphyrin および Protoporphyrin IXの蓄積量が多く認められ、脾臓中では量は少なかったが Uroporphyrin および Protoporphyrin IXが対照群と比較して有意に増加した。

考察および結論：

過酸化脂質量は、肝臓では対照群と比較して有意に増加したが、脾臓では増加する傾向はみられたものの有意差はなかった。ポルフィリン量は、肝臓では大体のポルフィリン量が対照群と比較して有意に増加し、特に Uroporphyrin および Protoporphyrin IXの蓄積量が多く認められた。

脾臓中では量は少なかったが、Uroporphyrin および ProtoporphyrinIXが対照群と比較して有意に増加した。

ポルフィリン類は Porphobilinogen からヘム合成酵素により生合成され、Uroporphyrin, Coproporphyrin を経てヘムの前駆体である ProtoporphyrinIXに合成される。これらのポルフィリン類は、ヘム合成酵素の異常により蓄積すると組織障害を起こすことが知られている。これはポルフィリンが光により励起され、酸素ラジカルを生成するためと言われているが、遮光下でもポルフィリン類は酸素ラジカルを生成することが実証されている。

以上の結果から、ラットにフルチアセットメチルを投与することにより、肝臓中に Uroporphyrin および ProtoporphyrinIXが大量に蓄積し、TBARSの上昇により脂質過酸化を確認した。また、脾臓においても脂質過酸化の増加傾向および肝臓ほど顕著ではないが上記両ポルフィリン類の増加を認めた。フルチアセットメチルの長期投与により、肝臓および脾臓に脂質過酸化による組織障害が起こることが示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

ラットおよびマウスの毒性影響に関するまとめ・考察：

フルチアセットメチルは、植物体内のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（以下 PO）を阻害することで、プロトポルフィリン IX の蓄積を誘発し、光存在下で脂質過酸化を引き超す除草剤である。この PO 阻害作用が、動物体内においては、ヘム合成経路を阻害しプロトポルフィリンIXを蓄積させて長期投与による毒性を引き起こす可能性があると思定される。これらの推測を確認すべく、各種試験が行われた。

以下にそれらの要約を記載する。

(資料A-23) ラット肝臓が有するプロトポルフィリノーゲン酸化作用への影響

ラット肝臓より抽出したミトコンドリアが持つプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ作用を、フルチアセットメチルは 10 μ M オーダーでほぼ 100%阻害した。

(資料A-24) マウスにおける肝臓内ポルフィリン蓄積性および尿中ポルフィリン排出試験

フルチアセットメチルを 4 週間投与したマウスの肝臓を摘出し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でポルフィリンの検出を試みた。同様に、フルチアセットメチルを投与したマウスの尿を採取し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でポルフィリンの検出を試みたところ、投与量に相関して肝臓及び尿中からポルフィリンの検出量が増加する傾向にあった。

(資料A-25) マウスおよびラットへの脂質過酸化反応

フルチアセットメチルをマウス及びラットに単回経口投与または 4 週間混餌投与し、肝臓の脂質が過酸化を引き起こすかどうかを調べた。単回経口投与では、マウス及びラットにおいても過酸化脂質は増加しなかったが、混餌投与試験では、マウスでは投与量と相関して過酸化脂質量及びプロトポルフィリンIX含有量が増加し、ラットでもマウスほど明確ではないが増加傾向にあった。

(資料A-26) PO 阻害作用の種差 (マウス、ラット、ヒト) 検討、及びヘム合成阻害作用の種差 (マウス、ラット) 検討

ラット、マウス及びヒトのミトコンドリア画分にフルチアセットメチル及び代謝物を処理し、PO 活性阻害に差があるかを検討した。また、マウス及びラットの肝細胞にフルチアセットメチル及び代謝物を処理し、 δ アミノレブリン酸合成酵素及び終点 ferrochelatase に対する作用を調べた。フルチアセットメチル及びその代謝物の PO 活性阻害作用は、マウスでもっとも強く、ヒトではほとんど感受性がなかった。また、マウス及びラットの肝細胞の δ アミノレブリン酸合成酵素及び ferrochelatase の活性は、フルチアセットメチル及びその代謝物では阻害されなかった。このことから、ヒトにおけるヘム合成が、フルチアセットメチル及びその代謝物では阻害される可能性はほとんど無いと考えられた。

(資料A-27) フルチアセットメチルの薬物代謝の種差 (マウス、ラット、ヒト) 検討、及びエステラーゼ阻害作用の種差 (マウス、ラット、ヒト) 検討

マウス、ラット及びヒトの血漿、マウス、ラット及びヒトの肝臓ホモジネート、それぞれにフルチアセットメチルを添加し、所定時間後検出される代謝物の差異を調査した。また、これらの試験を、血清 B エステラーゼ阻害剤 (リン酸フッ化ジイソプロピル) を添加した状態で別途同様に行った。

血漿における代謝では、マウス及びラットでは、フルチアセットメチルは速やかに代謝物 M-5 (加水分解) に変化したが、ヒトにおいては、フルチアセットメチルの代謝は緩やかであり、M-12 (異性化) への緩やかな変化が認められた。この違いは、血漿中のエステラーゼ含有量の違いと推測された。

肝ホモジネートにおける代謝では、マウス、ラット、ヒトいずれもフルチアセットメチルが M-6 (異性化し、加水分解) へ変化していくが、その速度はマウス≧ラット>ヒトの順であった。血清 B エステラーゼ活性阻害剤存在下では、上記変化が一様に阻害された。

以上から、マウス及びラットでは、血漿および肝ホモジネートにおけるフルチアセットメチルの代謝に差異は無く、ヒト肝においても、マウスとラットと同様の代謝物が生成するが、その速度は緩慢であると考えられた。

(資料 A-56) マウス肝及び脾臓中における過酸化脂質およびポルフィリン類への影響

フルチアセットメチルをマウスに 4 週間または 13 週間混餌投与し、臓器中の過酸化脂質及びポルフィリン類 (プロトポルフィリン IX が生合成されるまでの過程で生成される化合物) を測定した。

4 週間及び 13 週間投与後のマウス肝では、過酸化脂質が有意に増加しており、分析対象としたポルフィリン類のうち、プロトポルフィリン IX 及びウロポルフィリンが有意に増量していた。マウス脾臓においても、肝ほど顕著ではないが同様の傾向が見られた。

(資料 A-57) ラット肝及び脾臓中における過酸化脂質およびポルフィリン類への影響

フルチアセットメチルをラットに 4 週間または 13 週間混餌投与し、臓器中の過酸化脂質及びポルフィリン類 (プロトポルフィリン IX が生合成されるまでの過程で生成される化合物) を測定した。

4 週間及び 13 週間投与後のラット肝では、過酸化脂質が増加する傾向であり、分析対象としたポルフィリン類のうち、プロトポルフィリン IX 及びウロポルフィリンの増量が顕著であった。ラット脾臓においても、肝ほど顕著ではないが同様の傾向が見られた。

以上から、フルチアセットメチルはマウス及びラットに対して、体内にプロトポルフィリン及び過酸化脂質を蓄積させる作用があることが確認された。そのメカニズムとして、プロトポルフィリンノーゲンオキシダーゼ活性の阻害に代表されるヘム生合成経路の阻害によるものと考えられた。しかしながら、

- ・ヒトに対するこの阻害作用は、マウスやラットよりも非常に弱いこと。
- ・マウスやラットにおいて、ヘム生合成経路の始点 (δ アミノレブリン酸合成酵素) 及び終点 (ferrochelatase) への影響が見られないこと。

これらの結果から、ヒトに対する影響はマウスやラットに対して非常に弱いものと推測された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(13) 繁殖性に及ぼす影響および催奇形性

(資料A-28)

1) フルチアセトメチル原体のラットを用いた繁殖毒性試験

試験機関：CIBA-GEYGY CORPORATION(米国)

[GLP 対応]

報告書作成年：1994 年

検体の純度：

試験動物：Sprague-Dawley 系ラット [Hsd:Sprague-Dawley]、1 群雌雄各 28 匹
投与開始時雄 43 日齢、雌 42 日齢 (P 世代)、34~41 日齢 (F1 世代)

投与期間：P 世代；投与開始から F1 児離乳後の剖検までの 20 週間
F1 世代；34~41 日齢から F2 児離乳後の剖検までの 25 週間
(動物試験期間 1992 年 10 月 5 日から 1993 年 7 月 9 日まで)

投与方法：検体を 25, 500 および 5000 ppm の濃度で混合した飼料を自由に摂取させた。なお、対照群の動物には基礎飼料のみを同様に摂取させた。

投与量設定根拠；検体の投与量はラット 90 日間反復経口投与毒性試験 (ラット 90 日試験、資料 A-19) の結果を参考にした。ラット 90 日試験において、雄 3500 ppm 以上の群で統計学的に有意な体重減少と、雌雄 3500 ppm 以上の群で血清酵素活性の増加と病理組織学検査で肝臓の変化が認められた。従って、本試験の最高投与量は親動物への毒性が予測される 5000 ppm とし、以下 500、25 ppm とした。

交配・調整・選抜および観察・検査項目：概要を表 1 にまとめた。

一般状態および死亡率；試験期間中、全動物の一般状態および生死を 1 日 2 回観察した。

交配および妊娠の確認；70 日間の投与後、同投与群内の雌雄を 1:1 で最大 3 週間同居させた。毎朝、膣垢像を検査して性周期を確認し、交尾成立は膣垢中の精子の存在または膣栓により確認した。交尾を確認した日を妊娠 0 日とした。妊娠は分娩によって、または剖検時に着床痕を調べることによって確認した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

繁殖性に関する指標；育成、交配、妊娠および哺育の各期間と剖検時の観察に基づき、下記の指標を算出した。

雄の交尾率 (%) = (交尾成立雄動物数 / 交尾に使用した雄動物数) × 100

雌の交尾率 (%) = (交尾成立雌動物数 / 交尾に使用した雌動物数) × 100

雄の受胎率 (%) = (妊娠成立雄動物数 / 交尾に使用した雄動物数) × 100

雌の受胎率 (%) = (妊娠雌数 / 交尾に使用した雌動物数) × 100

雄の生殖率 (%) = (妊娠成立雄動物数 / 交尾成立雄動物数) × 100

雌の生殖率 (%) = (妊娠雌数 / 交尾成立雌動物数) × 100

出産率 (%) = (出産雌数 / 妊娠雌数) × 100

妊娠率 (%) = (生存児を出産した雌数 / 妊娠雌数) × 100

出生時生存率 (%) = (出産日における 1 腹あたりの生存児数 / 1 腹あたりの児動物数) × 100

総出産児生存率 (%) = (出産 4 日目における 1 腹あたりの生存児数 / 1 腹あたりの児動物数) × 100

哺育 4 日の生存率 (%) = (出産 4 日目における 1 腹あたりの生存児数 / 出産日における 1 腹あたりの生存児数) × 100

離乳率 (%) = (出産 21 日目の調整後児動物数 / 出産 4 日目の 1 腹あたりの調整後児動物数) × 100

離乳時生存児腹率 (%) = (投与群当たりの生存離乳児を持つ腹数 / 投与群当たりの出産日における生存児を持つ腹数) × 100

体重；雄については交尾前 10 週間および投与期間中週 1 回体重を測定した。雌については、投与期間中、妊娠期間、授乳期を除いて週 1 回、同居期間は交尾徴候の認められない雌については週 1 回測定し、妊娠期間は妊娠第 0、6、13、20 日に、授乳期は授乳第 0、4、7、14、21 日に測定した。児動物の体重についても授乳第 0、4、7、14、21 日に測定した。

体重増加量；雌雄の各試験期間中の毎週の体重増加量を求めた。雌動物の妊娠期間中は 0-6、6-13、13-20 日の期間で、授乳期間中は 0-4、4-7、7-14、14-21 日の期間について体重増加量を求めた。

摂餌量；雄については、交尾前 10 週間および投与期間中は同居期間を除いて週 1 回、1 週間分の摂餌量を測定した。雌については、投与前 10 週間および投与期間中、同居期間、妊娠期間、授乳期を除いて週 1 回、1 週間分の摂餌量を測定した。妊娠期間中は妊娠 0～6 日、6～13 日、13～20 日の各期間の摂餌量を測定した。授乳期間中は授乳 0～4 日、4～7 日、7～14 日、14～21 日の各期間の摂餌量を測定した。測定期間の摂餌量から 1 日当たりの平均摂餌量を算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

検体摂取量；体重、摂餌量および検体の飼料中設定濃度から投与期間中の1日あたり平均検体摂取量を算出した。

病理学的検査；

剖 検；P 雄は、投与 134～137 日目に、P 雌は、投与 141～144 日目に屠殺し、F1 雄は、175～178 日齢で、F1 雌は、182～185 日齢で屠殺し、外表および内臓・組織の肉眼による病理学的変化を記録した。死亡および切迫殺した親動物も同様に検査した。

病理組織学的検査；P および F1 親動物の計画殺動物から以下の組織を採取し、固定した。死亡および切迫殺動物も同様に検査した。屠殺児動物（選抜されなかった F1 児や離乳した F2 生存児）および死亡離乳前児動物(F1 および F2)または死産児について Stuchhardt and Poppe の方法により内部組織の検査を行い頭骨および脳についても検査した。死亡した離乳前児動物および死産児動物も同様に検査し、心臓内部の検査も実施した。

雄；下垂体、精巣および精巣上体、精囊、凝固腺、前立腺、肝臓、脾臓、肉眼的異常部位
雌；下垂体、卵巣および卵管、子宮（体および左右角）、子宮頸管、膈、肝臓、脾臓、肉眼的異常部位

以下の組織の病理組織学的検査を実施した。

- ・ 対照群および 5000 ppm 群動物の前記の全組織
 - ・ 25 ppm 群および 500 ppm 動物の肝臓と肉眼的異常部位
 - ・ 全用量群の不妊動物と死亡および切迫殺および死亡動物の下垂体および生殖器
 - ・ 対照群および 5000 ppm 群の選抜した動物の肝臓の acid-fast および Perl 染色
 - ・ P 世代 25 ppm 群および 5000 ppm 群各 1 匹の雌動物の胃の Warthin-Starry and Brown および Brenn 染色（胃内の微生物検査）

表 1. 試験の概要

世代	期 間	作 業 手 順	試 験 項 目
P	成育 (10週)		体重、摂餌量 (週1回)
	交配 (3週)	交配：雌雄1対1で交配 交尾確認：膣栓または膣垢中の精子の存在で確認 (妊娠0日)	交配状況確認
	妊娠 (3週)		体重：妊娠 0, 6, 13, 20日 摂餌量：妊娠0-6, 6-13, 13-20日の各期間
	出 産		出産状況の観察：生存および死亡児数、児性別、児体重
	哺育 (3週)	児数調整：生後4日に 同腹児数を雌雄各4匹 に調整	母動物： 体重；授乳第0, 4, 7, 14, 21日 摂餌量；授乳第0-4, 4-7, 7-14, 14-21日の各期間 児動物： 体重；授乳第0, 4, 7, 14, 21日
F1	離 乳	継代選抜：各腹より少なくとも雌雄1匹、計各群雌雄各28匹選抜	親動物 (P雌雄)：剖検、病理組織学検査 余剰児動物：剖検 (児数調整時、継代選抜時)
	成育 (10週)		(P世代に準ずる)
	交配 (3週)		(P世代に準ずる)
	妊娠 (3週)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	出 産		(P世代に準ずる)
F2	哺育 (3週)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	離 乳		親動物 (F1雌雄)：剖検、病理組織学検査 全児動物：剖検

結果：概要を表2に示す。

表2. 結果の概要

世代		親：P				親：F1				
投与量(ppm)		0	25	500	5000	0	25	500	5000	
動物数	雄	28	28	28	28	28	28	28	28	
	雌	28	28	28	28	28	28	28	28	
死亡数	雄	0	1	0	1*	0	0	0	0	
	雌	0	0	0	0	0	0	0	0	
一般状態	雄	検体投与に起因する異常は認められなかった。								
	雌	検体投与に起因する異常は認められなかった。								
体重 (数値は対照群に対する割合%)										
雄	投与 8 日	—	98	99	99	—	99	98	81▽	
	投与 36 日	—	97	99	88▽	—	99	97	83▽	
	投与 70 日 ^a	—	97	97	83▽	—	99	95↓	83▽	
	投与 106 日	—	97	97	84▽	—	98	95↓	83▽	
	投与 133 日	—	96	96	82▽	—	98	94↓	83▽	
雌	投与 7 日	—	99	98	98	—	101	99	87▽	
	投与 35 日	—	99	97	100	—	100	100	92▽	
	投与 70 日	—	98	97	98	—	100	100	95▽	
	投与 140 日	—	98	98	97	—	100	100	97▽	
体重増加量 (数値は累積体重増加量の対照群に対する割合%)										
雄	投与 8 日	—	92▽	95↓	95↓	—	95	96	82▽	
	投与 36 日	—	95	97	73▽	—	99	97	85▽	
	投与 70 日 ^a	—	95	93	69▽	—	98	93↓	85▽	
	投与 106 日	—	95	93↓	72▽	—	97	93↓	85▽	
	投与 133 日	—	94	93↓	70▽	—	98	92↓	84▽	
雌	投与 7 日	—	92	93	97	—	112	115	112	
	投与 35 日	—	98	95	102	—	103	106	108	
	投与 70 日 ^a	—	95	95	97	—	102	104	110△	
	投与 140 日	—	97	96	96	—	100	100	110△	
繁殖能力	雄	交尾率 (%)	96	96	96	96	100	96	93	100
		受胎率 (%)	86	89	79	79	100	82	96	93
		生殖率 (%)	89	92	81	81	100	85	100	93
	雌	交尾率 (%)	96	96	96	96	100	96	93	100
		受胎率 (%)	86	86	79	79	100	82	96	93
		生殖率 (%)	89	89	81	81	100	85	100	93
		出産率 (%)	96	100	95	100	96	100	100	100
妊娠率 (%)	96	100	95	100	96	96	100	100		
妊娠期間 (日)	21.9	22.0	21.8	21.7	21.9	21.9	21.8	21.9		
着床数	12.5	13.0	13.0	12.5	14.6	14.3	14.4	14.7		

* : 切迫殺

a : 育成期間終了

Dunnett の t-test : 体重、体重増加量 ↓ : p<0.05 ; △▽ : p<0.01

表 2. 結果の概要 (続き)

世代		親 : P				親 : F1				児 : F2			
投与量(ppm)		0	25	500	5000	0	25	500	5000	0	25	500	5000
剖検所見 :													
検査動物数		雄	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
		雌	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
肝臓	退色	雄	0	0	1	0	0	0	5	10			
		雌	0	0	0	7	0	0	0	1			
組織病理学的検査													
検査動物数		雄	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
		雌	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
肝臓	脂肪変性	雄	0	0	13△	24△	0	0	11△	26△			
		雌	0	0	0	24△	2	0	6	27△			
	胆管増生	雄	1	1	3	3	2	2	3	7			
		雌	0	0	0	4△	0	0	0	7△			
	クッパー細胞 内色素沈着	雄	0	0	16△	28△	0	0	11△	28△			
		雌	0	0	0	25△	0	0	0	27△			
	核肥大	雄	0	0	7△	22△	0	0	4	17△			
		雌	0	0	0	10△	0	0	3	16△			
摂餌量 (数値は対照群に対する割合%) (申請者が計算)													
親動物	雄	投与 0~8 日	—	96 ↓	98	100	—	100	100	82▽			
		投与 30~36 日	—	97	99	87▽	—	99	98	86▽			
		投与 64~70 日 ^a	—	98	99	84▽	—	101	99	91▽			
		投与 100~106 日	—	101	98	86▽	—	96	97	86▽			
		投与 127~133 日	—	98	97	86▽	—	97	95	86▽			
	雌	投与 0~7 日	—	99	97	99	—	103	99	86			
		投与 29~35 日	—	101	100	107	—	99	103	97			
		投与 64~70 日	—	97	98	102	—	98	98	99			
		投与 134~140 日	—	100	97	98	—	100	99	99			
	検体摂取量(mg/kg body weight/day)												
雄	投与第 0~8 日	—	2.28	46.1	473	—	2.56	51.9	515				
	投与第 65~70 日	—	1.25	25.0	284	—	1.33	27.2	288				
	生育期間 (10 週間) の平均	—	1.59	31.8	313	—	1.72	35.2	361.2				
	投与期間中の平均	—	1.41	28.2	279	—	1.51	31.1	317				
雌	投与第 0~7 日	—	2.46	48.5	494	—	2.51	49.1	494				
	投与第 65~70 日	—	1.40	28.8	293	—	1.48	29.6	314				
	生育期間 (10 週間) の平均	—	1.79	36.2	369	—	1.86	37.2	388				
	投与第 134~140 日	—	1.44	28.3	248	—	1.49	29.6	306				
	妊娠 3 週間の平均	—	1.61	32.1	324	—	1.64	33.6	338				
授乳 3 週間の平均	—	3.94	77.5	790	—	4.17	83.7	837					

Bonferroni 補正による Fisher の正確確率検定 : 組織病理学的検査 △ : p<0.01

Dunnett の t-test : 摂餌量 ↓ : p<0.05 ; ▽ : p<0.01

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表 2. 結果の概要 (続き)

世代		親 : P				親 : F1				
投与量(ppm)		0	25	500	5000	0	25	500	5000	
動物数	雄	28	27	28	28	28	28	28	28	
	雌	28	28	28	28	28	28	28	28	
一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった。								
一腹児動物数		12.13	12.50	13.48	12.82	13.78	13.35	14.22	13.50	
出生時生存率(%)		96.4	90.3	90.6	93.5	94.1	91.1	95.2	93.9	
総出産児生存率(%)		94.1	86.6	89.5	89.5	91.3	86.5	90.7	90.1	
哺育4日の生存率(%)		97.9	97.4	98.1	96.1	96.7	96.4	96.4	96.4	
離乳率(%)		99.5	97.9	98.8	96.4	98.6	94.3	99.5	97.6	
離乳時生存児腹率(%)		100	100	100	95.5	100	95.5	100	100	
授乳0日の雌児動物の割合		52	48	50	55	49	53	45	44	
体重 (対照群に対する割合%)										
児動物	両性	授乳0日	—	99	96	94↓	—	100	99	95▽
		授乳4日	—	102	94	92	—	102	100	98
		授乳7日	—	101	94	86▽	—	103	96	92
		授乳14日	—	101	98	87▽	—	102	98	90▽
		授乳21日	—	100	97	88▽	—	102	99	93↓
	雄	授乳0日	—	99	96	94↓	—	99	98	95▽
		授乳4日	—	103	94	93	—	103	100	99
		授乳7日	—	101	93	88↓	—	104	97	92
		授乳14日	—	101	98	89↓	—	103	99	90▽
		授乳21日	—	101	97	89▽	—	103	100	93↓
	雌	授乳0日	—	100	97	94↓	—	101	99	94▽
		授乳4日	—	103	97	94	—	101	100	97
		授乳7日	—	103	96	86▽	—	102	96	93
		授乳14日	—	101	99	90▽	—	101	98	90▽
		授乳21日	—	101	99	90▽	—	101	99	94
	体重増加量 (対照群に対する割合%)									
	両性	授乳0日	—	—	—	—	—	—	—	—
		授乳4日	—	106	88	89	—	108	106	105
		授乳21日	—	101	98	87▽	—	102	99	93▽
	雄	授乳0日	—	—	—	—	—	—	—	—
授乳4日		—	110	89	90	—	110	107	107	
授乳21日		—	101	97	89▽	—	103	100	93↓	
雌	授乳0日	—	—	—	—	—	—	—	—	
	授乳4日	—	108	96	93	—	106	106	103	
	授乳21日	—	101	99	89▽	—	101	99	94	

Dunnett の t-test : 体重、体重増加量 ↓ : p<0.05 ; ▽ : p<0.01

調製飼料分析の結果、飼料中での検体の濃度・均一性・安定性に問題はなかった。検体摂取量(mg/kg/day)は、雄の P 世代では 25、500、5000ppm 群の順で投与期間中の平均で 1.41、28.2、279 であり、F1 世代では 1.51、31.1、317 であった。両世代平均として 25、500、5000 ppm 群の順で 1.11、22.5 および 234 であった。雌の P 世代の成長期 10 週間の平均では、25、500、5000 ppm 群の順で 1.79、36.23、369 であり、F1 世代の成長期 10 週間の平均では、1.86、37.2、388 であった。妊娠期間 3 週間の平均検体摂取量は、P 世代で 1.61、32.1、324 であり、F1 世代で 1.64、33.6、338 であった。哺育期間 3 週間の平均検体摂取量は、P 世代で 3.94、77.5、790 であり F1 世代で 4.17、83.7、837 であった。

(P 世代)

親動物

一般状態；雌雄の親動物の一般状態観察では、いずれの世代においても検体投与に起因する異常は認められなかった。

死亡率；P0 世代で 25ppm 群雄 1 匹が試験第 16 日に死亡した。また、5000ppm 群雄 1 匹を試験第 100 日に切迫殺した。切迫殺した動物には髄膜肉腫が認められた。これらの死亡は、検体投与と関連はないと考えられた。

体重および体重増加量；P 世代 5000ppm 群雄の平均体重および体重増加量が成長期、交尾期および交尾後の期間を含むほとんどの試験期間中で対照群と比較して統計学的に有意に減少した。P 世代雌では、すべての投与群で妊娠期間と授乳期間を含む試験期間をとおして体重および体重増加量に検体投与の影響は認められなかった。

摂餌量；5000ppm 群雄の摂餌量が、成長期および交尾後の期間のほとんどをとおして減少し、統計学的有意差が認められた。雌ではすべての投与群で対照群と差は認められなかった。

繁殖能力；雄には投与による影響は認められなかった。雌においても検体投与による影響は認められず、0、25、500、5000ppm 群において妊娠率は各々 96%、100%、95%、100% であり、平均妊娠期間は各々 21.9 日、22.0 日、21.8 日、21.7 日であった。交尾率、受胎率、生殖率、出産率および着床数は、検体投与群と対照群と同様であった。

剖 検；500ppm 群雄 1 匹および 5000ppm 群雌 7 匹に肝臓の退色が認められ、P1 世代の 500 および 5000ppm 群でも認められたので検体投与と関係すると考えられた。その他の所見は散発的であり、検体投与と関係があるとは考えられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

病理組織学的検査；検体投与に関連した所見としては、500 および 5000ppm 群雄の肝臓で脂肪変性、クッパー細胞内色素沈着および核肥大が、5000ppm 群雌の肝臓で脂肪変性、胆管造生および核肥大が認められ、これらの所見の発生頻度は統計学的に有意に高かった。その他雌雄において散発的に所見が認められたが、検体投与とは関連しないものと考えられた。腫瘍性病変としては、切迫殺した 5000ppm 群雄 1 匹で髄膜および下垂体に肉腫が認められた。

児動物

死亡率；哺育 4 日まででは、全同腹児死亡が全群で認められたため、哺育 4 日の生存率は 0、25、500、5000ppm 群の順で 97.9、97.4、98.1、96.1%であったが、統計学的有意差は認められなかった。

体重；5000ppm 群の児動物体重が、授乳期間をとおして対照群の値を下回り、統計学的有意差が認められた。体重増加量は、雌雄の 5000ppm 群において授乳最終週で統計学的に有意に低かった。

一般状態；検体投与に起因する異常は認められなかった。

児動物剖検；死亡児動物および調整時廃棄した児動物において、単発的で投与に関連しないと思われる変化が認められた。

(F1 世代)

親動物

一般状態；雌雄の親動物の一般状態観察では、いずれの世代においても検体投与に起因する異常は認められなかった。

死亡率；すべての投与群の雌雄が計画殺時まで生存した。

体重および体重増加量；雄の体重および体重増加量が 500ppm 群で成長期終了時から計画殺時までと 5000ppm 群で試験期間をとおして対照群より低値を示し、統計学的有意差が認められた。5000ppm 群雌の体重は投与期間を通じて、また体重増加量は 21 日齢時から計画殺 2 週間前までほとんどの期間で体重減少が認められた。妊娠期間中は対照群と比較し統計学的有意差のある低値を示し、体重増加量は妊娠 13 日から 20 日まで統計学的有意差は認められなかったが減少した。

摂餌量；5000ppm 群雄では試験期間をとおして低値を示し、対照群と比較して統計学的有意差が認められた。雌では生育期の初期に統計学的有意差を示す低値が認められた。

繁殖能力；雄には投与による影響は認められなかった。雌においても検体投与による影響は認められず、0、25、500、5000ppm 群において妊娠率は各々96%、96%、100%、100%であり、平均妊娠期間は各々21.9日、21.9日、21.8日、21.9日であった。交尾率、受胎率、生殖率、出産率および着床数は、検体投与群と対照群と同様であった。

剖 検；雄において500ppm 群で5匹、5000ppm 群で10匹に肝臓の退色が認められ、雌では5000ppm 群1匹に肝臓の退色が認められた。その他の所見は散発的で、背景データの範囲内であり、検体投与と関係があるとは考えられなかった。

病理組織学的検査；雄における検体投与に関連した所見としては、500および5000ppm 群の肝臓における脂肪変性、クッパー細胞内色素沈着が認められ、これらの所見の発生頻度は統計学的に有意に高かった。核肥大は500ppm 群から認められ、5000ppm 群では統計学的有意差が認められた。また、統計学的有意差は認められなかったが、5000ppm 群では胆管増生の増加傾向が認められた。雌では5000ppm 群の肝臓における脂肪変性、胆管増生、クッパー細胞内色素沈着、核肥大が認められ、これらの所見の発生頻度は統計学的に有意に高かった。その他雌雄において散発的に所見が認められたが、検体投与とは関連しないものと考えられた。

腫瘍性病変としては、25および500ppm 群雄各1匹で下垂体腫瘍が認められ、雌では500ppm 群1匹で皮下血管肉腫が認められた。

児動物

死亡率；哺育4日まででは、全同腹児死亡が全群で認められたため、哺育4日の生存率は0、25、500、5000ppm 群の順で96.7、96.4、96.4、96.4%であったが、統計学的有意差は認められなかった。

体 重；5000ppm 群の児動物体重が、授乳期間をとおして対照群の値を下回り、F1 雄では授乳第0、7、14、21日に、雌では授乳第0、4、7、14日に統計学的に有意に低値であった。また、F2 雄では第0、14、21日に、雌では第0、14日に統計学的に有意に低値であった。体重増加量は、雄の5000ppm 群において授乳最終週で統計学的に有意に低かった。

一般状態；検体投与に起因する異常は認められなかった。

児動物剖検；死亡児動物および調整時廃棄した児動物において、単発的で投与に関連しないと思われる変化が認められた。

以上の結果から、ラットに本検体を 25、500 および 5000ppm の投与量で 2 世代にわたって混餌経口投与すると雄親動物には両世代にわたって、5000ppm 群で体重、体重増加量および摂餌量の減少が、また 500ppm 群雄で育成期間終了後に体重 (P 世代を除く)、体重増加量および摂餌量の減少が認められた。雌親動物では F1 世代で 5000ppm 群での体重量の減少が認められた。また、雄の 500 および 5000ppm 群と雌 5000ppm 群の P、F1 両世代において肝臓に投与と関連する病理組織学的所見が認められた。最高投与量の 5000ppm においても雌雄どちらの繁殖能力とも影響は認められなかった。児動物に対する影響も認められなかったが、5000ppm 群において F1 および F2 児動物の体重および体重増加量が減少した。

従って、本試験における本検体の雄親動物に対する無影響量は 500ppm 群で認められた肝臓の病理組織学的影響と体重増加量の減少に基づき 25ppm(～1.4 mg/kg/day)と判断された。雌親動物に対する無影響量は 5000ppm 群で認められた肝臓の病理組織学的影響と体重および体重増加量、摂餌量の減少に基づき 500ppm(～36 mg/kg/day)と判断された。児動物に対する無毒性量は、5000ppm 群の児動物に体重および体重増加量の減少に基づき 500ppm(～36 mg/kg/day)と判断された。本検体がラットの繁殖に及ぼす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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

申請者注：ラットを用いた繁殖毒性試験についての考察

本試験における検体の標的臓器である、親動物肝臓の病理所見について再度評価した。

P 雄：投与に関連した肝臓病変は 500 および 5000 ppm 群にみられ、それらは脂肪化、核の大小不同性およびクッパー細胞内色素沈着であり、5000ppm 群においてより頻度、程度とも増大していた。

P 雌：投与に関連した肝臓病変は 5000ppm 群にみられ、それらは脂肪化、核大小不同性、胆管の増生およびクッパー細胞内色素沈着であり、明らかに頻度、程度とも増大していた。

F1 雄：投与に関連した肝臓病変は 500 および 5000ppm 群にみられ、それらは脂肪化およびクッパー細胞内色素沈着であった。また、5000ppm 群では核大小不同性が明らかに頻度、程度とも増大していた。

F1 雌：投与に関連した肝臓病変は 5000ppm 群にみられ、それらは脂肪化、核大小不同性、胆管の増生およびクッパー細胞内色素沈着であり、明らかに頻度、程度とも増大していた。

再評価の結果、病理所見からみた親動物の無毒性量はオリジナルの報告書と変化なく、雄 25ppm、雌 500ppm と判断された。これは本試験における親動物の一般毒性に対する無毒性量とも一致していた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(資料 A-29)

2) フルチアセトメチル原体のラットにおける催奇形性試験

試験機関：CIBA-GEYGY CORPORATION (スイス国)

[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検体の純度：

試験動物：Sprague Dawley 系ラット [CrI:CD(SD)BR VAF/Plus]、1 群交尾成立雌 26 匹、交尾時 126～154 日齢、体重 166～267 g

試験期間：交配から帝王切開まで 21 日間 (1992 年 3 月 31 日～1992 年 5 月 1 日まで)

試験方法：検体は 3%コーンスターチ溶液中に懸濁し、0, 5, 300 および 1000 mg/kg/day の投与用量で妊娠 6 日から 15 日までの 10 日間毎日 1 回強制経口投与した。雌雄を同居させ、膣垢中の精子または膣栓の認められた日を妊娠 0 日とした。対照群の動物には、媒体の 3%コーンスターチ溶液のみを同様に投与した。

投与量設定根拠；投与量を設定するためにラットに妊娠 6 日から 15 日までの 10 日間、本検体を EPA、OECD および MAFF の限界用量である 1000 mg/kg/day の用量で毎日 1 回経口投与したところ、親動物および胎児に対する影響はみられなかった。
従って、本試験での高用量を限界用量とされている 1000 mg/kg/day とし、以下 300 および 5 mg/kg/day とした。

試験項目：

母動物；試験期間中、母動物の一般状態および生死を毎日観察した。体重は妊娠 0, 6, 7, 9, 12 及び 21 日に測定した。摂餌量は妊娠 0-6、6-9、9-12、12-16 および 16-21 日の各期間で測定した。妊娠第 21 日に二酸化炭素吸入で屠殺し、帝王切開を行った。剖検を行った後、卵巣および子宮の状態を観察した。卵巣については黄体数を、子宮については着床数、生存胎児数および死亡吸収胚数を検査した。

生存胎児；性別、体重測定および外表奇形の観察をおこなった。腹ごとに約半数の胎児について内臓検査し、残る半数については骨格検査を行った。

結 果：概要を次頁以下の表に示した。

結果の概要

母動物

投与量 (mg/kg/day)	0	5	300	1000	
1群当たり動物数	26	26	26	26	
死亡雌数	0	0	0	0	
途中屠殺雌動物数 (早産)	0	0	0	0	
一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった。				
体重	—	妊娠全期間をとおして有意差なし			
体重増加量	—	有意差なし	有意差なし	妊娠0-21日↑	
摂餌量(g/day)	—	妊娠全期間をとおして有意差なし			
剖検所見	検体投与に起因する異常は認められなかった。				
生殖管重量(g)	108	104.6	105.1	116.2	
補正体重(g) ^b	316.7	320.4	325.1	329.13	
着床所見	妊娠雌動物数	23	25	25	25
	完全吸収雌動物数	1	0	0	0
	流産雌動物数	0	0	0	0
	生存胎児を得た腹数(%)	22(96)	25(100)	25(100)	25(100)
	胚吸収の見られた腹数(%)	11(48)	16(64)	14(56)	10(40)
	黄体数 ^a	17.0	16.8	17.5	17.7
	着床数 ^a	15.7	15.8	16.1	17.2
	着床前喪失率 (%)	8.4	5.6	7.5	2.4
	着床後喪失率 (%)	8.6	5.9	7.8	3.7
	早期胚吸収数 ^a	0.6	0.8	0.7	0.4
	後期胚吸収数 ^a	0.1	0.2	0.3	0.2
	生存胎児数 ^a	15.0	14.9	15.0	16.6
	性比 (%雌) ^a	47.9	47.0	48.4	51.4
	胎児体重(g) ^a	雄	5.4	5.4	5.4
雌		5.1	5.1	5.1	5.1

^a : 平均値

Dunnett の多重比較 (↑ : p<0.05)

^b : 妊娠 21 日の体重 - (妊娠子宮重量 + 内容物)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

胎児

投与量 (mg/kg/day)		0	5	300	1000	
外表 異常	検査胎児(腹)数	344(22)	373(25)	375(25)	415(25)	
	外表奇形のある胎児(腹)数	8(6)	5(5)	9(9)	8(6)	
	奇形	内臓腹腔脱出	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
		矮小体	0(0)	3(3)	1(1)	2(2)
	変異	頭部血腫	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
		胴部血腫	7(5)	1(1)	7(7)	6(4)
四肢血腫		0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	
内臓 異常	検査胎児(腹)数	173(22)	186(25)	188(25)	207(25)	
	内臓異常のある胎児(腹)数	頭部	0(0)	3(2)	0(0)	6(2)
		胴部	52(16)	57(19)	58(22)	46(22)
	奇形	水頭症	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)
		第3脳室拡張(重度)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
		第4脳室拡張(重度)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
		側脳室拡張(中等度/軽度)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
		後脳嚢胞性拡張	0(0)	1(1)	0(0)	5(2)
		臭葉萎縮	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		腎盂拡張(重度/中等度)	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)
		尿路蛇行(重度)	3(3)	0(0)	4(3)	0(0)
	変異	尿路拡張(重度)	0(0)	0(0)	2(2)	0(0)
		腎盂拡張(軽度)	15(7)	7(5)	10(7)	7(2)
		無名動脈欠損	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
		胸腺赤色斑	0(0)	0(0)	3(2)	0(0)
		尿路蛇行(中等度/軽度)	40(14)	49(16)	41(18)	35(19)
		尿路拡張(中等度/軽度)	41(15)	33(16)	39(16)	34(21)
	骨格 異常	検査胎児(腹)数	171(22)	187(25)	187(25)	208(25)
		骨格異常のある胎児(腹)数	84(22)	81(24)	96(24)	87(23)
		奇形	肋骨欠損	1(1)	0(0)	0(0)
頸椎体狭窄			0(0)	3(1)	0(0)	5(1)
変異		頸椎体分離	11(8)	8(6)	5(4)	9(7)
		頸椎体未骨化	2(1)	0(0)	0(0)	0(0)
		頸椎肋	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
		前泉門拡張	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)
		前頭板化骨不全	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		舌骨化骨不全	26(14)	27(10)	27(12)	18(11)
		舌骨未骨化	0(0)	1(1)	1(1)	0(0)
		後部頭蓋骨拡張	2(2)	1(1)	0(0)	0(0)
		後頭骨化骨不全	2(2)	7(4)	2(2)	3(3)
		頭頂化骨不全	5(5)	6(4)	7(4)	6(4)
		頭頂骨間化骨不全	2(2)	5(3)	4(3)	2(2)
		肋骨肥厚	1(1)	1(1)	0(0)	2(1)
		肋骨化骨不全	2(1)	0(0)	1(1)	2(2)
		痕跡状肋骨	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)
		肋骨短小	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

胎児（続き）

投与量 (mg/kg/day)		0	5	300	1000	
骨格異常	検査胎児(腹)数	171(22)	187(25)	187(25)	208(25)	
	骨格異常のある胎児(腹)数	84(22)	81(24)	96(24)	87(23)	
	変異	波状肋骨	5(2)	0(0)	3(3)	4(4)
		肋骨形態異常	3(1)	1(1)	2(2)	9(5)
		過剰肋骨	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		痕跡状過剰肋骨	17(9)	14(8)	28(11)	14(9)
		短小過剰肋骨	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)
		胸骨分節癒合	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		胸骨分節化骨不全（第5分節）	19(11)	14(8)	15(9)	19(13)
		胸骨分節化骨不全（その他）	2(2)	3(3)	5(5)	2(2)
		胸骨分節不規則形	4(4)	3(3)	8(4)	8(6)
		胸骨分節分離	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
		胸骨分節未骨化（第5分節）	5(4)	3(3)	5(3)	7(5)
		胸骨分節未骨化（その他）	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
		側頭骨鱗部化骨不全	7(4)	8(4)	12(4)	5(4)
		胸椎体狭窄	5(3)	12(10)	4(4)	4(4)
		胸椎体分離	3(2)	1(1)	2(1)	1(1)
		胸椎体未骨化	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
仙椎前椎骨過剰		0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	
頰骨化骨不全	13(7)	8(5)	15(6)	12(8)		

母動物の一般状態に対する本検体投与の影響は、最高用量 1000 mg/kg/day においても認められなかった。また、体重、体重増加量、摂餌量にも影響は認められなかった。妊娠 21 日目の帝王切開時における卵巣および子宮の検査と剖検所見では、検体投与によると考えられる変化は認められなかった。

胎児に対する検体投与の影響は、いずれの投与群においても認められなかった。検体投与に関連すると考えられる外表、内臓および骨格における奇形および変異は、いずれの投与群においても認められなかった。化骨進行度についても対照群と各投与群の間で統計学的に有意な差は認められなかった。

以上の結果から、本検体を妊娠ラットに投与したときの母動物および胎児に対する無毒性量はともに 1000 mg/kg/day、また、最高用量 1000 mg/kg/day でも胎児に対して催奇形性を起こさないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(資料 A-30)

3) フルチアセトメチル原体のウサギにおける催奇形性試験

試験機関：CIBA-GEYGY CORPORATION (スイス国)

[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検体の純度：

試験動物： ニュージーランド白色系ウサギ [Hra (NZW) SPF] (6 カ月齢)、1 群交尾成立雌 18 匹、体重 3.02~4.02 kg

試験期間：交配から帝王切開まで 29 日間 (1992 年 1 月 6 日から 1992 年 2 月 14 日まで)

試験方法： 検体は 3%コーンスターチ溶液中に懸濁し、0, 5, 300 および 1000 mg/kg/day の投与用量で妊娠第 7 日から 19 日までの 13 日間毎日 1 回強制経口投与した。雌雄を同居させ、目視により交尾を確認し、交尾を確認した日を妊娠第 0 日とした。対照群の動物には 3%コーンスターチ溶液のみを同様に投与した。

投与量設定根拠；投与量を設定するために (株) ボゾリサーチセンターで実施したウサギの催奇形性予備試験の結果を参考にした。すなわち、ウサギに 100, 250, 500 および 1000 mg/kg/day の用量で妊娠 6 日から 18 日までの 13 日間毎日 1 回強制経口投与した結果、1000 mg/kg 群で親動物の摂餌量の低下および胎児体重の低値が認められた。従って、本試験では親動物への毒性が期待できる 1000 mg/kg/day を高用量とし、以下 300 および 5 mg/kg/day とした。

試験項目：

親動物；一般状態および生死を毎日観察し、体重を妊娠 0, 3, 7, 10, 13, 16, 20, 24 及び 29 日に測定した。摂餌量を妊娠 1-29 日の毎日測定した。妊娠 29 日にペントバルビタールを耳静脈内に注入し麻酔し、腋血管からの放血により屠殺した。屠殺後帝王切開し、剖検を行い、生殖管 (卵巣および頸管を含む子宮) および内容物を取り出し重量を測定した。卵巣および子宮の状態を観察して黄体数、着床数、生存胎児数および死亡吸収胚数を検査した。

生存胎児；性別、体重測定および外形異常の観察をおこなった。全胎児について内臓検査を実施後、骨格検査を行った。

結果：概要を次頁以下の表に示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結果の概要

母動物

投与量 (mg/kg/day)		0	5	300	1000	
1群当たり動物数		18	18	18	18	
母動物	死亡雌数	0	0	0	0	
	途中屠殺雌動物数 (早産)	0	0	0	0	
	一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった。				
	体重	—	妊娠全期間をとおして有意差なし			
	体重増加量	—	有意差なし	有意差なし	妊娠3-7日↑	
	摂餌量(g/day)	—	妊娠全期間をとおして有意差なし			
	剖検所見	検体投与に起因する異常は認められなかった。				
	生殖管重量(g)	468.3	481.4	539.7	478.5	
	補正体重(g) ^b	3360	3396	3389	3489	
	着床所見	妊娠雌動物数(%)*	14(78)	15(83)	17(94)	15(83)
		完全吸収・流産雌動物数	0	0	0	0
		生存胎児を得た腹数(%)	14(100)	15(100)	17(100)	15(100)
		胚吸収の見られた腹数(%)	2(14)	3(20)	6(35)	5(33)
		黄体数 ^a	8.2	8.6	9.6△	9.1
		着床数 ^a	7.8	8.1	9.0↑	8.3
着床前喪失率 (%)		5.2	7.0	5.6	9.5	
着床後喪失率 (%)		2.4	2.3	5.6	9.9	
早期胚吸収数 ^a		0.1	0.1	0.0	0.5	
後期胚吸収数 ^a		0.1	0.1	0.5	0.3	
生存胎児数 ^a	7.6	7.9	8.5	7.5		
性比 (%雌)	52.6	44.4	47.8	39.7		
胎児体重(g) ^a	43.7	44.1	44.0	45.8		

^a : 平均値

Dunnett の多重比較 (↑: p<0.05、△: p<0.01)

^b : 妊娠21日の体重-(妊娠子宮重量+内容物)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

胎児

		投与量 (mg/kg/day)	0	5	300	1000
外表異常	検査胎児(腹)数		107(14)	118(15)	144(17)	113(15)
	外表奇形のある胎児(腹)数		3(2)	1(1)	1(1)	0(0)
	奇形	無脳症	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
		内臓腹腔脱出	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
	変異	矮小体	2(2)	1(1)	1(1)	0(0)
		鼻孔形態異常	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
内臓異常	検査胎児(腹)数		107(14)	118(15)	144(17)	113(15)
	内臓異常のある胎児(腹)数		2(2)	4(3)	4(3)	3(3)
	奇形	無脳症	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
		尿路背面位置異常	0(0)	2(2)	1(1)	0(0)
		内臓腹腔脱出	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
		側脳室拡張、重度	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
	変異	胆嚢小型化	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
		心臓形態異常	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)
		心室拡張	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
		脾臓小型化	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
		尿路蛇行 (中等度/軽度)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		尿路拡張 (中等度/軽度)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		側脳室拡張、軽度	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
	骨格異常	検査胎児(腹)数		107(14)	118(15)	144(17)
骨格異常のある胎児(腹)数		86(14)	109(15)	110(17)	91(15)	
奇形		頸椎体位置異常	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		多発奇形	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
		頭頂骨間形態異常	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		肋骨分離	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
		胸椎体位置異常	0(0)	1(1)	1(1)	0(0)
		胸椎体位置癒合	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
変異		頸椎体化骨不全	1(1)	2(2)	1(1)	6(2)
		尾椎癒合	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
		尾椎化骨不全	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)
		尾椎配列不正	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		尾椎分離	1(1)	0(0)	0(0)	1(1)
		前泉門拡張	1(1)	6(4)	9(4)	3(3)
		舌骨湾曲	6(3)	3(3)	4(2)	2(1)
		舌骨化骨不全	0(0)	6(4)	9(5)	3(2)
		後部頭蓋骨拡張	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
		後頭化骨不全	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		後頭骨分離	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
		仙骨前椎骨過剰	9(2)	22(6)	23(8)	12(5)
		頸部過剰肋骨	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)
		肋骨過剰分離	4(4)	12(9)	10(6)	6(5)
		過剰肋骨	56(12)	59(15)	60(15)	45(14)
		痕跡状過剰肋骨	3(3)	16(10)	8(7)	8(7)
		短小過剰肋骨	22(11)	36(15)	25(15)	22(11)
		胸骨分節癒合	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)

胎児(続き)

投与量 (mg/kg/day)		0	5	300	1000
骨格異常	検査胎児(腹)数	107(14)	118(15)	144(17)	113(15)
	骨格異常のある胎児(腹)数	86(14)	109(15)	110(17)	91(15)
	胸骨分節不完全骨化(第5分節)	14(7)	14(7)	19(8)	14(7)
	胸骨分節不完全骨化(その他)	23(8)	26(13)	14(8)	17(8)
	胸骨分節形態異常	1(1)	7(5)	9(8)	13(8)
	胸骨分節配列異常	0(0)	2(2)	2(2)	2(2)
	胸骨分節過剰骨化	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
	胸骨分節分離	0(0)	2(2)	1(1)	1(1)
	胸骨分節未骨化(第5分節)	3(2)	8(6)	11(6)	8(3)
	胸骨分節未骨化(その他)	6(4)	7(4)	4(3)	2(2)
	距骨不完全骨化	0(0)	3(1)	2(2)	0(0)
	距骨未骨化	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)
	胸椎体狭窄/分葉化	0(0)	1(1)	1(1)	1(1)
	胸椎体不完全骨化	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
	胸椎体形態異常	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
	過剰胸椎体	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
	胸椎体半椎体	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
胸椎不完全骨化	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	

母動物；母動物の一般状態に対する本検体投与の影響は、最高用量の 1000 mg/kg/day 群においても認められなかった。また、体重、体重増加量、摂餌量にも影響は認められなかった。妊娠 3-7 日の体重増加量が統計学的有意差を示したが、投与前期間であり、検体に関連する変化ではなかった。妊娠 21 日目の帝王切開時における卵巣および子宮の検査と剖検所見では、検体投与によると考えられる変化は認められなかった。黄体数および着床数が 300 mg/kg/day 群で統計学的に有意な増加を示したが、用量に関連せず投与に関連するとは認められなかった。

胎児；胎児に対する検体投与の影響は、いずれの投与群においても認められなかった。検体投与に関連すると考えられる外表、内臓および骨格における奇形は認められなかった。統計学的な有意差は認められなかったが、痕跡状過剰肋骨が 5 mg/kg/day 群胎児においてわずかに増加した。しかし、300 および 1000 mg/kg/day 群においては増加しておらず、投与に関連するものとは考えられなかった。投与に係る影響として、1000 mg/kg/day 群胎児において統計学的な有意差は認められなかったが、胸骨分節形態異常の発生頻度のわずかな増加が認められた。この変化について、11 の実験室で実施された 75 の催奇形性試験の対照群の骨格異常頻度についての Woo and Hoar (1982) の報告によれば、モザイク状、形態異常および非直線状を含む胸骨分節の非対称性は、ニュージーランド白色ウサギに最も頻繁に観察される所見であり、11 の実験室での頻度範囲は 0 から 4.1%であった。Palmer (1968) は、約 8000 匹のニュージーランド白色ウサギ胎児について検証した結果、胸骨分節異常(非対称、癒合、二分性および過剰を含む)は対照胎児において 3.64%と報告した。本試験においては、対照胎児の平均 1 腹あたり胸骨分

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

節形態異常は 0.71%であった。妊娠第 7 から 19 日に検体の 5, 300 および 1000 mg/kg/day を投与された母獣からの胎児の平均 1 腹あたり胸骨分節形態異常は、それぞれ 6.38, 5.68 および 13.38%であった。5 及び 300 mg/kg/day 群の頻度は、対照群のそれよりは高かったが、他の実験室で報告されている範囲を大きく外れてはいない。1000 mg/kg/day 群で観察された頻度は、本報告書の背景データ (0~0.71%) および他の実験室で報告された対照胎児におけるそれを超えており、対照群と比較して統計学的には有意ではないが、検体処理による僅かな発生に対する反応を示していると考えられた。

以上の結果から、本検体を妊娠ウサギに投与したときの母動物および胎児における無毒性量はそれぞれ 1000 mg/kg/day および 300 mg/kg/day であると結論された。また、最高用量 1000 mg/kg/day でも、本検体は胎児に対して催奇形性を示さないと判断された。

[申請者注]

以下に米国 EPA における本試験についての評価を記す。

検体処理によるウサギ胎児の発生に対する反応は、以下の理由により確実なものではないと決定した。

- a : 胸骨分節形態異常の増加は対照群と比較して統計学的に有意ではない。
- b : この変異の増加は主として限界用量群(1000 mg/kg/day)でみられた。
- c : 本試験でみられた唯一の増加した変異である。
- d : 中用量と高用量群間では、本変異がみられた腹数は両方とも 8 匹であり、低用量群でも腹数は 5 匹と投薬群間における用量反応性は強いものではない。
- e : 胸骨分節不規則形の増加は、最小毒性量を設定するには適当と考えられるが、リスク評価には値しない。

上記の要素より、EPA はウサギ胎児の発生に対する反応は、本試験において増加していないと結論した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(14) 変異原性

(資料A-31)

1) フルチアセトメチル原体の細菌を用いたDNA修復試験 (Rec Assay)

試験機関 : Life Science Research Ltd. (英国)

[GLP対応]

報告書作成年 : 1990年

検体の純度 :

方法 : 大腸菌 *Escherichia coli* のDNA修復機構保持株 (WP2) と欠損株 (WP67, CM871) を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下におけるDNAの損傷誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

[用量設定根拠]

予備試験の結果、抗菌作用がみられなかったので10000 μ g/mlを本試験の最高用量として選択し、以下3160, 1000, 316および100 μ g/mlを処理用量とした。

各菌株の懸濁液に5濃度の被検物質溶液およびS-9Mixまたはリン酸緩衝液を加え2または18時間培養後、菌培養液の一部を採りニュートリント寒天平板培地上に播種した。平板培地上で1日培養し、生じたコロニー数を用いて生存率を算出した。全ての菌培養液は2系列調製し、各培養液について1検体濃度あたり3枚のプレートを作製した。

各菌株について得られた生存率を用い下記の式から生存係数 (C_s) を算出した。

$$C_s = \frac{\text{処理を行った修復機構欠損株の平均生存率 (\%)}}{\text{処理を行った修復機構保有株の平均生存率 (\%)}}$$

C_s 値が0.1未満の場合、修復機構欠損株への選択的毒性が発現したものとして陽性とした。

陽性対照物質としてS-9Mix非存在下ではMitomycinC、S-9Mix存在下および非存在下では2-aminoanthracene、陰性対照物質としてAmpicillinを用いた。溶媒対照区も設定した。

結果 : 次頁の表に示す。

検体はS-9Mix非存在下および存在下において、2および18時間暴露後にいずれの菌株に対しても有意な致死作用を示さなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

陰性対照物質では修復機構欠損株への選択的毒性が観察されなかった。陽性対照物質では、S-9Mix非存在下において両暴露時間とも修復機構欠損株への選択的毒性が認められ、S-9Mix存在下においては18時間暴露で修復機構欠損株CM871に対し選択的毒性が認められた。

以上の結果より、検体はDNA損傷誘発性がないものと判断された。

DNA損傷試験の結果

薬 剤	用量 μg/ml	S-9 Mix	生存係数(Cs)*				
			WP67		CM871		
			2時間暴露	18時間暴露	2時間暴露	18時間暴露	
溶媒対照(DMSO)			1.10	1.00	1.23	0.99	
検 体	100	-	1.21	0.92	1.48	1.05	
	316	-	1.22	0.85	1.41	1.02	
	1000	-	1.11	0.93	1.39	1.15	
	3160	-	1.14	0.78	1.33	0.83	
	10000	-	1.45	0.92	1.69	1.18	
溶媒対照(DMSO)			0.85	0.91	0.93	1.24	
検 体	100	+	0.82	0.96	1.01	1.28	
	316	+	0.78	0.98	1.00	1.34	
	1000	+	0.83	1.01	0.96	1.28	
	3160	+	0.80	0.89	1.02	1.10	
	10000	+	0.74	1.02	1.02	0.74	
対 照 物 質	ampicillin	25	-	1.42	1.83	3.06	3.40
	mitomycinC	0.05	-	8.1×10^{-4}	3.6×10^{-6}	9.9×10^{-5}	1.4×10^{-5}
	2-aminoanthracene	5	-	1.19	0.68	1.33	0.76
	2-aminoanthracene	5	+	0.70	0.52	2.3×10^{-4}	2.3×10^{-4}

対照物質中ampicillinは陰性対照、その他は陽性対照

$$*C_s = \frac{\text{処理を行った修復機構欠損株の平均生存率 (\%)}}{\text{処理を行った修復機構保有株の平均生存率 (\%)}}$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(資料A-32)

2) フルチアセトメチル原体の細菌を用いた復帰突然変異試験

試験機関：Life Science Research Ltd. (英国)

[GLP対応]

報告書作成年：1990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, TA1535, TA1537, TA1538株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9Mix) の存在下および非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

試験は3連性で、TA98, TA100, TA1535, TA1537株については2回、TA1538, WP2uvrA株については1回行った。陽性対照物質および処理濃度は結果の表中に示した。

[用量設定根拠] TA98株および WP2 uvrA株を用いた予備試験の結果、5000 µg/plateでTA98株にのみわずかな細胞毒性が認められたためこれを最高用量とした。試験濃度は 50~5000 µg/plateの範囲で5用量とした。

試験結果：結果を次頁以降の表に示す。

検体処理群ではS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニーの有意な増加は認められなかった。一方、各陽性対照群では全ての試験菌株で復帰突然変異の有意な増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

1 回目

表中の数値は3プレートの平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2107A	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
溶媒対照 (DMSO)	—	—	24	12	108	6	30	35
検体	50	—	24	13	111	7	25	37
	158	—	25	13	112	7	27	37
	500	—	23	12	109	6	24	36
	1580	—	23	12	109	8	30	36
	5000	—	23	10	107	7	27	31
陽性 対照	2NF	1	—					302
	2NF	2	—				207	
	SA	0.5	—		445	572		
	9AA	80	—				297	
	ENNG	2	—	98				
	B[a]P	5	—			110	6	31
	2AA	2	—		13			
2AA	20	—	22					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	25	17	110	8	31	42
検体	50	+	25	13	111	7	28	38
	158	+	25	12	114	7	24	37
	500	+	25	12	112	7	27	38
	1580	+	27	14	111	7	29	39
	5000	+	24	11	114	7	29	37
陽性 対照	B[a]P	5	+			759	151	254
	2AA	2	+		413			
	2AA	20	+	327				

- 2NF : Nitrofluorene
 SA : Sodium azide
 9AA : 9-Aminoacridine
 ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 B[a]P : Benzo[a]pyrene
 2AA : 2-Aminoanthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

2 回目

表中の数値は3プレートの平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA1535	TA100	TA1537	TA98	
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	—	16	102	6	25	
検体	50	—	18	113	7	31	
	158	—	16	108	6	28	
	500	—	15	110	7	31	
	1580	—	14	108	5	22	
	5000	—	15	77	4	17	
陽性 対照	2NF	1	—			267	
	SA	0.5	—	587	472		
	9AA	80	—			370	
	B[a]P	5	—	96	7	32	
	2AA	2	—	17			
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	+	14	112	8	31	
検体	50	+	14	111	6	36	
	158	+	16	111	6	35	
	500	+	18	112	7	35	
	1580	+	16	112	5	30	
	5000	+	19	116	5	28	
陽性 対照	B[a]P	5	+		624	194	221
	2AA	2	+	632			

2NF : Nitrofluorene
 SA : Sodium azide
 9AA : 9-Aminoacridine
 B[a]P : Benzo[a]pyrene
 2AA : 2-Aminoanthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(資料A-33)

3) フルチアセトメチル原体のチャイニーズハムスターのCHO細胞を用いた*in vitro*染色体異常試験

試験機関：Life Science Research Ltd. (英国)

[GLP対応]

報告書作成年：1990年

検体の純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの継代培養した卵巣細胞（CHO-K1）を用い、代謝活性化法および非活性化法（直接法）によって染色体異常誘発性を検定した。検体をジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解した。

陰性、溶媒および陽性対照を含むすべての処理群で各濃度3つの培養を用いて行った。各培養あたり100個の中期分裂像を観察して染色体数および染色体の異常を評価した。試験は1回行った。

陽性対照として直接法ではMitomycin-C、代謝活性化法ではCyclophosphamideを用いた。

用量設定根拠；予備毒性試験を以下の要領で実施した。すなわち 2, 10, 50, 250, 1250 $\mu\text{g/mL}$ の用量を、3時間処理、21時間後標本作成の条件で細胞に処理したところ、直接法では250 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群で平均分裂指数の低下が認められ、それ以下では有糸分裂能の低下は認められなかった。また、代謝活性化法では250 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群で強い毒性のため中期分裂像が得られなかったが、それ以下では有糸分裂能の低下は認められなかった。

以上の結果から、下記の検体用量で本試験を行った。

方法	処理	標本作成	検定に使用した濃度
直接法	3時間	24時間	50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$
代謝活性化法	3時間	24時間	50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$

試験結果：次頁の表に結果を示した。

直接法では異常細胞出現頻度の用量相関性のある増加が認められた。代謝活性化法で200 $\mu\text{g/ml}$ でギャップを含めた場合にのみ軽度だが統計学的に有意な増加が認められた。陽性対照の Cyclophosphamide および Mitomycin-C では、異常細胞出現頻度の有意な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において、本検体は代謝活性化系の有無にかかわらず染色体異常誘発性を有するものと結論された。

試験結果

薬 剂	検体 用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処 理 時 間	標 本 作 製 時 間	観 察 細 胞 数	S9 Mix	倍 数 性 細 胞 数	染色体異常を有する細胞数						総 合		
							ギ ャ ッ プ	染色分体 型		染色体型		断 片 化			そ の 他
								切 断	交 換	切 断	交 換		-g	+g	
溶媒対照 (DSMO)		3	24	300	-	2	22	2	0	0	0	0	0	2	22
無処理						4	28	0	0	0	0	4	0	2	28
検 体	50					4	29	4	0	0	0	3	0	7	32
	100					6	40	7	1	1	0	4	4	11*	37*
	200					9	63	12	8	0	0	7	8	24***	71***
陽性対照 (MMC)	0.1					3	62	21	14	0	1	17	15	50***	97***
溶媒対照 (DSMO)		3	24	300	+	5	29	2	1	0	0	3	1	5	31
無処理						2	32	0	0	0	1	5	0	6	33
検 体	50					7	45	2	0	0	2	2	2	5	43
	100					8	40	1	0	0	1	4	10	7	40
	200					8	47	2	1	0	2	4	15	9	50*
陽性対照 (CP)	7.5					6	54	9	5	1	1	18	0	31***	73***

-g : ギャップを含まない異常を有する細胞数 +g : ギャップを含む異常を有する細胞数

* : $0.01 < p < 0.05$ 、*** : $p < 0.01$ (対溶媒対照、Fisher Exact Probability Test)

陽性対照 MMC : Mitomycin C、CP : Cyclophosphamide

4) フルチアセトメチル原体のヒトリンパ球細胞を用いた*in vitro*染色体異常試験

試験機関：CIBA-GEIGY LIMITED (スイス国)

[GLP対応]

報告書作成年：1993年

検体の純度：

試験方法： ヒトのリンパ球細胞を用いを用い、代謝活性化法および非活性化法（直接法）によって染色体異常誘発性を検定した。ヒトの血液を採血後、ヘパリンを添加しphytohemagglutininを含む培地で全血のまま72時間前培養した。

検体をジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して用いた。

全ての処理群について各濃度2つの培養を作製し、各培養あたり溶媒対照および検体処理群は100個、陽性対照処理群は25個の中期分裂像を観察し、染色体数および染色体の異常を評価した。

陽性対照として直接法ではBleomycin、代謝活性化法ではcyclophosphamide を用いた。

用量設定根拠；初回試験の600 µg/mLを最高用量とし、公比2で8用量を設定した直接法による20時間暴露における細胞毒性試験では150 µg/mLで有糸分裂は68.8%抑制され、直接法による3時間暴露における細胞毒性試験では600 µg/mLで有糸分裂は71.7%抑制された。確認試験1における300 µg/mLを最高用量とし、公比2で5用量を設定した直接法による20時間暴露による細胞毒性試験では300 µg/mLで有糸分裂は63.9%抑制され、確認試験2における600 µg/mLを最高用量とし、公比2で5用量を設定した直接法による3時間暴露による細胞毒性試験では300 µg/mLで有糸分裂は22.6%抑制された。さらに、確認試験3における300 µg/mLを最高用量とし、公比2で8用量を設定した直接法による42時間暴露による細胞毒性試験では150 µg/mLで有糸分裂は22.6%抑制され、確認試験4における600 µg/mLを最高用量とし、公比2で8用量を設定した直接法による42時間暴露による細胞毒性試験では300 µg/mLで有糸分裂は22.6%抑制された。また細胞周期は、代謝活性化系の非存在下で150 µg/mL以上で強く影響され75 µg/mLおよび37.5 µg/mLでは影響が認められなかった。代謝活性化系の存在下では、600 µg/mLでは大きな影響が、300 µg/mL弱い影響が認められ、150 µg/mL以下では影響が認められなかった。

以上の結果から、染色体異常試験の初回試験の用量を、代謝活性化系の非存在下で150、75、37.5 µg/mLとし、代謝活性化系の存在下20時間処理で600、300、150 µg/mLとし、42時間処理は150 µg/mLのみとした。また、染色体異常試験の確認試験の用量を、代謝活性化系の非存在下および存在下の3時間処理、17時間回復期試験では300、150、75 µg/mLとし、3時間処理、39時間回復期試験では300 µg/mLのみとした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

試験結果：次頁の表に結果を示した。

直接法では異常細胞出現頻度の増加は認められなかった。代謝活性化法では 600 μ g/mL でのみ統計学的に有意な増加が認められたが、これは強い細胞毒性のためであると判定した（有糸分裂率 28.95%）。代謝活性化法を用いたその他の群では異常細胞出現頻度の増加は認められなかった。陽性対照のBleomycin 及びCyclophosphamideでは、異常細胞出現頻度の有意な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において、本検体のヒトリンパ球細胞における染色体異常誘発性は、陰性であると結論された。

試験結果

	薬 剤	検体用量 (μ g/mL)	処理時間	標本作製時間	観察細胞数	S9 Mix	染色体異常を有する細胞数					数的異常を有する細胞数		#1異常細胞出現率 (%)			
							染色体分体型		染色体型		その他		end		倍数体		
							欠失	交換	欠失	交換	多数の異常	ギャップ					
初 回 試 験	溶媒対照 (DSMO)		20	20	200	-								0.0			
	検 体	37.5									2		1	0.5			
		75												0.5			
		150					1			0.0							
	陽性対照 (MMC)	4			50		15	1	1	1	11			32.0***			
	溶媒対照 (DSMO)		3	20	200	+	1						1	0.5			
	検 体	150													1	0.5	
300															0.5		
600										1		2	6	2	5	13***	
陽性対照 (CP)	8			50		7	3			6			20***				
確 認 試 験	溶媒対照 (DSMO)		20	20	200	-					1			0.0			
	検 体	75										1		2		1	0.5
		150									1			4			0.5
		300					1						0.5				
	陽性対照 (MMC)	4			50		14	1	2	1	1	10		32.0***			
	溶媒対照 (DSMO)		3	20	200	+	2					1		1.0			
	検 体	75												1			0.0
		150									1			4			0.5
		300												3			0.0
	陽性対照 (MMC)	8			50		8	3			6		20.0***				
溶媒対照 (DSMO)		42	42	200	-	2		2			4		2.0				
検 体	150												1		0.0		
溶媒対照 (DSMO)		3	42	200	+	1	1	2	1		3		2.0				
検 体	300												1		0.0		

chi-square test *** : $p < 0.001$

欠失 : 切断、断片化を含む 交換 : 三叉、四叉、中心重合および環状を含む

end : 動原体部重複染色体

陽性対照 Bleo : Bleomycin CP : Cyclophosphamide

#1 : ギャップおよび数的異常を除く

(資料A-35)

5) フルチアセットメチル原体のラット肝細胞を用いた小核試験

試験機関：CIBA-GEIGY LIMITED (スイス国)

[GLP対応]

報告書作成年：1993年

検体の純度：

試験動物：Sprague-Dawley系ラット[Tif:RAIf(SPF)]、1群雄4匹、若齢成獣 (体重 180~330 g)

試験方法：検体を0.5%CMC溶液中に懸濁させ、1250, 2500, 5000 mg/kg の投与量で、1回強制経口投与した (投与用量は10 mL/kg)。陽性対照としてdimethylnitrosoamine (第1回試験) およびcyclophosphamide (第2回試験)、陰性対照として溶媒のみを同様に投与した。第1回試験の動物には有糸分裂促進のためのアラキス油に溶解した4-acetylaminofluorene (4-AAF) を検体投与3日後に投与し、その3日後に屠殺した。第2回試験の動物には検体投与30時間前にアラキス油に溶解した4-AAF を投与し、検体投与の3日後に屠殺した。各投与群から3匹のラットの肝臓からコラゲナーゼ処理により単離細胞を調製し、固定後、Feulgen 染色およびLight Green染色し、鏡検により各動物1000細胞あたりの小核含有細胞数を計測した。第2回試験の5000 mg/kg群と陰性対照については、確認のためさらに1600~2000個の細胞を調査した。

[用量設定根拠]

ラットに 5000 mg/kg の用量で投与したところ、自発運動の低下及び下痢のみが観察されたためこれを最高用量とした。

試験結果：検体処理群において、上記統計学的検定では有意差はなかったが小核細胞出現率がやや増加した群も認められ、第2回試験および第2回試験追加調査においてはCochran-Armitage傾向検定で僅かな有意増加傾向 ($p < 0.05$) がみられた。しかし、試験機関における陰性対照群の背景データ (小核の肝細胞出現頻度) は最大1.2%であり、本試験高用量群にみられた値 (0.75~1.1%) の範囲内であったことから、高用量群でみられた高値は偶発的なものであり、検体投与には関連しないと考えられた。一方、陽性対照群では小核細胞の有意な増加が認められた。以上の結果より、本試験条件下において、検体のラット肝細胞に対する小核細胞誘発性は陰性と判定された。

観察結果を次頁の表に示す。

(申請者注)

背景データの小核細胞出現率の最高値 (1.2%) は、14の試験例のうち、1例のみの値であり、他の背景データの小核細胞出現率はいずれも1%未満であることから、この1例の背景データは偶発的に高値を示したものと考えられるので、本試験の結論は「擬陽性」とするのが適切と考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

観察結果

薬 剤	投与量 (mg/kg)	観 察 動物数	観 察 細 胞 数	小核細胞出現率 (%)		
				第1回試験	第2回試験	第2回試験 追加調査
陰性対照		3	1000	0.37	0.67	
			1600~2000			0.47
検 体	1250	3	1000	0.97	0.57	
	2500	3	1000	0.60	0.53	
	5000	3	1000	0.87	1.10	
			1600~2000			0.75
陽性対照	DMN	10	3	1000	11.23**	
	CPA	20	3	1000		6.23***

** : p<0.01、*** : p<0.001 Binominal distribution test

陽性対照物質 : DMN ; dimethylnitrosoamine CPA ; cyclophosphamide

(資料A-55)

6) フルチアセットメチル原体のラット骨髄を用いた小核試験

試験機関：(財) 食品農医薬品安全性評価センター
[GLP対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：

試験動物：Sprague Dawley系ラット[Crj:CD(SD)IGS[SPF]]、1群雄5匹、8週齢（投与時）
投与時体重 283～319g

試験方法：検体を0.5%CMCNaに懸濁し、500, 1000, 2000 mg/kgの用量で、1日1回、2日間強制経口投与した（投与容量は5mL/kg）。陰性対照物質として投与媒体を検体と同様に投与し、陽性対照物質としmytomycinCを1回尾静脈注射した。最終投与24時間後にラットを屠殺し、大腿骨より骨髄細胞を仔ウシ血清を用いて洗い出した。この細胞懸濁液を遠心分離により余剰血清を除去し、保管用の標本を作製した後、ダルベッコリン酸緩衝液を用いて2回遠心分離により洗浄し、10%中性緩衝ホルマリン液で細胞を固定した。固定液を3回、遠心分離により交換した後、細胞懸濁液を室温で保管した。細胞懸濁液を適量滴下したカバーガラスをアクリジンオレンジ塗布済みスライドガラスに載せて、鏡検により各動物の幼若赤血球2000個中の小核を有する幼若赤血球数および全赤血球500個中の幼若赤血球の割合について計数した。

[用量設定根拠]

ラット急性経口毒性試験の結果より、限界用量の2000 mg/kgを最高用量とし、以下公比2で1000, 500 mg/kgとした。

試験結果：骨髄と末標本の観察結果を次頁の表に示した。

標本作製時においては、各検体投与群とも一般状態の変化および明確な体重増加抑制は認められなかった。

検体投与群において、小核を有する幼若赤血球の出現頻度は陰性対照群と同等の値を示した。全赤血球に対する幼若赤血球の割合は2000 mg/kg群で陰性対照に対して統計学的に有意に減少したことより、骨髄細胞が検体に曝露されたものと考えられた。一方、陽性対照群では小核を有する幼若赤血球の出現頻度は陰性対照に対して統計学的に有意な増加を示し、幼若赤血球数も陰性対照に対して統計学的に有意な減少を示した。

以上の結果から、本試験条件下において、本検体のラット骨髄細胞における小核誘発性は陰性と判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

観察結果

薬 剤	投与量 (mg/kg)	検査 動物数	MNIE ^a (%) (平均値±SD)	MNIE/2000IE ^b (Min-Max)	IE (%) (平均値±SD)
陰性対照 (0.5% CMC)	0	5	0.17±0.06	2~5	52.4±4.7
検 体	500	5	0.13±0.08	2~5	45.4±3.3
	1000	5	0.15±0.07	2~5	50.6±6.3
	2000	5	0.13±0.08	2~5	43.2±3.7*
陽性対照 (MMC)	2	5	5.61±1.61**	2~5	42.2±5.0**

Dunnettのt 検定 * : p<0.05 ** : p<0.01

^a : 小核を有する幼若赤血球

$$\text{MNIE(\%)} = \text{小核を有する幼若赤血球の出現頻度} = \frac{\text{小核を有する幼若赤血球数}}{\text{観察した幼若赤血球数}} \times 100$$

$$\text{IE(\%)} = \text{幼若赤血球の出現頻度} = \frac{\text{幼若赤血球数}}{\text{観察した全赤血球数}} \times 100$$

CMC : Carboxymethylcellulose-Na

MMC : Mitomycin C

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(資料A-36)

7) フルチアセトメチル原体のチャイニーズハムスター培養細胞 (V79細胞) を用いた前進突然変異試験

試験機関 : CIBA-GEIGY LIMITED (スイス国)

[GLP対応]

報告書作成年 : 1992年

検体の純度 :

試験方法 : 継代培養したチャイニーズハムスター由来細胞 (V79細胞) を用い、ヒポキサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 遺伝子座での検体の突然変異性を検索した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。V79細胞を所定濃度の検体を含んだ培地で非代謝活性化法では21時間、代謝活性化法では5時間培養し、よく洗浄した。この時、検体処理細胞の一部を細胞毒性評価のため別に培養し、コロニー形成率を求めた (生存率 I)。残りの検体処理細胞を7~8日間培養し、6-チオグアニン (6-TG) を含む選択培地に移した。この時点でも、細胞の一部を細胞毒性評価のため別に培養し、コロニー形成率を求めた (生存率 II)。7~8日間培養後、6-TG耐性コロニー (前進突然変異コロニー) を計数した。試験は各濃度2つの標本を作製し2回実施した。

陽性対照として直接法では、ethylmethansulphonate (EMS)、代謝活性化法ではN-nitrosodimethylamine (DMN) を用いた。

[用量設定根拠]

V79細胞に、検体を857.0 µg/mL (培地への溶解限界) から0.42 µg/mLの濃度で本試験と同様の方法で処理し、培養した結果、培地への溶解限界または細胞生存率が50~90%減となる濃度を本試験の最高用量とし、下記の濃度で実施した。

非代謝活性化法	: 1回目	3.3, 10, 30, 90
	2回目	3.7, 11.1, 33.3, 100
代謝活性化法	: 1,2回目とも	31.7, 95.2, 285, 857

判定 ; 変異頻度及び変異係数を以下に基づいて算出し、変異係数が2.5より大きく用量相関があるか、いずれかの用量で3.0より大きく1フラスコ20以上の変異コロニーがある場合陽性とした。

変異頻度 : フラスコあたりの変異コロニー数を生存率 II で除して求めた生存率100%の場合の変異コロニー数。ただし、4未満は<4.00とした。

変異係数 : 処理群の変異頻度 / 溶媒対照群の変異頻度の平均値。ただし、1未満の場合は1.00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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結 果： 以下の表に結果を示す。

2回の試験の両方で、非代謝活性化法、代謝活性化法とも検体処理群における前進突然変異コロニーの有意な増加は認められなかった（1回目の代謝活性化法最高用量群での変異係数は3.22または2.52であったが、用量相関がなく、かつ1フラスコ20個未満の変異コロニーであったため陽性条件を満たさなかった）。

一方、陽性対照として用いたEMSおよびDMNでは明らかな前進突然変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において、検体のV79細胞に対する前進突然変異誘発性は陰性と判定された。

1回目

薬物	濃度 μg/ml	S-9 Mix の有無	生存率II	フラスコ あたりの 突然変異 コロニー数	変異頻度	変異係数
溶媒対照 (DMSO)	—	—	165.17 162.67	7.50 10.00	4.54 6.15	—
検 体	3.3	—	176.67 282.50	8.50 8.00	4.81 <4.00	1.00 1.00
	10	—	181.67 176.00	14.00 12.50	7.71 7.10	1.44 1.33
	30	—	178.33 172.67	13.50 15.00	7.57 8.69	1.42 1.63
	90	—	138.67 137.67	14.00 14.50	10.10 10.53	1.89 1.97
陽性対照 (EMS)	1	—	42.33 16.33	797.50 748.00	1883.86 4579.59	352.50 856.93
溶媒対照 (DMSO)	—	+	173.83 170.00	17.00 7.50	9.78 4.41	—
検 体	31.7	+	120.00 109.67	6.00 7.00	5.00 6.38	1.00 1.00
	95.2	+	122.50 153.00	6.00 14.00	4.90 9.15	1.00 1.29
	285	+	92.83 95.83	7.00 7.50	7.54 7.83	1.06 1.10
	857	+	50.33 50.33	11.50 9.00	22.85 17.88	3.22 2.52
陽性対照 (DMN)	0.3	+	8.17 61.50	#1 228.00	#1 370.73	#1 52.25

陽性対照： EMS ; ethylmethansulphonate DMN ; N-nitroso-dimethylamine

#1 細胞生存率が低く、データが得られなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

2回目

薬物	濃度 μg/ml	S-9 Mix の有無	生存率II	フラスコ あたりの 突然変異 コロニー数	変異頻度	変異係数
溶媒対照 (DMSO)	—	—	71.50 75.67	5.00 1.00	6.99 <4.00	—
検 体	3.7	—	72.00 74.17	3.00 3.00	4.17 4.00	1.00 1.00
	11.1	—	68.33 68.00	1.50 2.00	<4.00 <4.00	1.00 1.00
	33.3	—	66.67 68.50	1.50 4.50	<4.00 6.57	1.00 1.20
	100	—	58.67 57.17	1.50 1.50	<4.00 <4.00	1.00 1.00
陽性対照 (EMS)	1	—	31.33 33.00	826.00 921.50	2636.17 2792.42	479.61 508.04
溶媒対照 (DMSO)	—	+	95.67 101.83	5.50 3.50	5.75 <4.00	—
検 体	31.7	+	87.83 85.83	4.00 1.50	4.55 <4.00	1.00 1.00
	95.2	+	102.17 109.83	4.00 2.50	<4.00 <4.00	1.00 1.00
	285	+	76.33 73.67	0.50 5.50	<4.00 7.47	1.00 1.53
	857	+	208.83 80.83	4.50 1.50	<4.00 <4.00	1.00 1.00
陽性対照 (DMN)	0.3	+	47.17 39.50	289.00 270.00	612.72 683.54	125.70 140.23

陽性対照： EMS ; ethylmethansulphonate DMN ; N-nitroso-dimethylamine

#1 細胞生存率が低く、データが得られなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(資料A-37)

8) フルチアセットメチル原体のラットの初代培養肝細胞を用いた不定期DNA合成試験

試験機関：CIBA-GEIGY LIMITED (スイス国)

[GLP対応]

報告書作成年：1992年

検体の純度：

使用細胞：Sprague-Dawley系ラット [Tif:RAIf] (雄) の成獣 (体重181~346 g) の初代培養肝細胞

試験方法：コラゲナーゼ処理によりラットの肝から得た細胞の初代培養肝細胞を用い、本検体の不定期DNA合成誘発性を検定した。カバーガラス上に細胞の単層を形成させ、トリチウム標識チミジン ($^3\text{HTdr}$) および検体、陽性対照物質または陰性対照を含む培養液で、16~18時間培養した。その後細胞を固定し、オートラジオグラムを作成し、ヘマトキシリンエオジン染色した。各カバースガラスから50個の細胞について現像により現れた核内の粒子を計数した (総核粒子数)。さらに、核上に重なる粒子の存在を考慮して、総核粒子数から、隣接する細胞質内の粒子数を差し引いた値 (正味の核粒子数) を算出した。試験は各濃度3つの標本を作製し2回行った。溶媒対照群の核粒子数分布の90%を越える核粒子数を持つ核を修復中の核とした。判定は総核粒子数および正味の核粒子数と、それぞれから算出した修復中の核の出現率に基づいて行った。すなわち、総核粒子数及び正味の核粒子数の両方が溶媒対照に対して有意で、平均の正味の核粒子数が2より大であるかまたは、総粒子数および正味の粒子数に基づく修復中の核の出現率の両方で、いずれかの濃度で溶媒対照に対して有意に上回った場合陽性とした。検体は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。陽性対照物質として、2-Acetylaminofluorene (2-AAF) を用いた。

[用量設定根拠]

細胞毒性試験の結果、十分な数の単層形成細胞が得られた最高濃度は208.8 $\mu\text{g/mL}$ で、その一段階上の400 $\mu\text{g/mL}$ を最高濃度として選択した。また、DNA合成阻害試験では、400 $\mu\text{g/mL}$ では細胞毒性に由来するDNA合成阻害がみられたが、それ以下の濃度では影響はみられなかった。以上より、本試験では400, 200, 100, 33.3, 11.1, 3.7 $\mu\text{g/mL}$ を使用した。

試験結果：結果の詳細を次頁の表に示す。400 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で過度の細胞毒性が観察されたため、200 $\mu\text{g/mL}$ 以下の5用量について検査した。1回目の試験では3.7, 11.1, 33.3 $\mu\text{g/mL}$ で総核粒子数およびそれに基づく修復中の核の出現率が溶媒対照に対して有意に増加したが、正味の核粒子数およびそれに基づく修復中の核数では有意な増加はみられなかった。2回目の試験では3.7 $\mu\text{g/mL}$ で総核粒子数が溶媒対照に対して有意に増加したが、総核粒子数に基づく修復中の核数ならびに正味の核粒子数およびそれに基づく修復中の核の出現率では有意な増加はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

上記の有意な増加は、溶媒対照の値が小さく、偏差も少なかったことによると思われる、正味の核粒子数およびそれに基づく修復中の核の出現率では有意差が見られなかったことから生物学的意義はないと考えられた。一方、陽性対照として用いた2-AAFではいずれの試験に於いても明らかな不定期DNA合成の増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において、本検体はラットの初代培養肝細胞に対し、不定期DNA合成を誘起しないと判定された。

試験結果

反復	薬 剤	用量 μg/ml	総核粒子数	細胞質上粒数	正味の核粒子数	総核粒子数に基づく修復中の核出現率	正味核粒子数に基づく修復中の核出現率
1	溶媒対照(DMSO)		2.05	1.45	0.61	0.0400	0.0933
	検 体	3.7	2.83 ***	2.26	0.58	0.1400 ***	0.1267
		11.1	2.88 ***	1.87	1.01	0.1200 ***	0.1533
		33.3	2.65 ***	2.00	0.65	0.1067 ***	0.1467
		100	2.34	1.56	0.78	0.0733	0.1267
		200	2.41	1.34	1.07	0.0533	0.1533
	陽性対照(2-AAF)	45	10.08	2.92	7.16	-	-

反復	薬 剤	用量 μg/ml	総核粒子数	細胞質上粒数	正味の核粒子数	総核粒子数に基づく修復中の核出現率	正味核粒子数に基づく修復中の核出現率
2	溶媒対照(DMSO)		1.80	1.36	0.44	0.0667	0.2477
	検 体	3.7	2.36 ***	1.30	1.06	0.2000	0.4633
		11.1	2.11	1.26	0.85	0.1267	0.3503
		33.3	2.31	1.58	0.73	0.1667	0.4164
		100	2.26	1.40	0.86	0.1533	0.3990
		200	2.27	1.50	0.77	0.1600	0.4035
	陽性対照(2-AAF)	45	10.91	2.61	8.30	-	-

表中の値は3標本の平均値

*** : p<0.01 (Dunnett's one-tailed t test)

- : 算出しなかった

2-AAF ; 2-acetylaminofluorene

(15) 生体の機能に及ぼす影響

フルチアセットメチル原体の生体の機能に及ぼす影響

(資料 A-38)

試験機関：(財) 食品農医薬品安全性評価センター
報告書作成年：1998 年

検体の純度：

1) 中枢神経系に及ぼす影響

① マウスにおける一般状態

供試動物：ICR 系マウス [Slc:ICR(SPF)]、6 週齢、体重 26.5～31.5 g、1 群雄 5 匹

方 法：検体を 0.5% CMC-Na 溶液中に懸濁して、500, 1500 および 5000 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与し、投与後 0.25, 0.5, 1, 2 及び 3 時間に Irwin の多次元観察法に準じ一般状態を観察した。

結 果：マウスの一般状態に対して、いずれの投与群とも検体投与によると考えられる異常は認められなかった。

② マウスの自発運動量に及ぼす影響

供試動物：ICR 系マウス [Slc:ICR(SPF)]、6 週齢、体重 29.7～36.7 g、1 群雄 8 匹

方 法：検体を 0.5% CMC-Na 溶液中に懸濁して、500, 1500 および 5000 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与し、投与後 0.5, 1, 2 及び 3 時間に 各 3 分間の自発運動量をスーパーメックスで測定した。

結 果：いずれの投与群においても検体投与によると考えられる自発運動への影響は認められなかった。

2) 循環器系に対する作用

① 無麻酔ラットの血圧および心拍数に及ぼす影響

供試動物：SD 系ラット [Slc:SD(SPF)]、7 週齢、体重 201～257 g、1 群雄 6 匹

方 法：検体を 0.5% CMC-Na 溶液中に懸濁して、500, 1500 および 5000 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与し、投与前、投与後 1, 2 及び 3 時間に収縮期血圧および心拍数を非観血式自動血圧装置を用いて測定した。

結 果：いずれの投与群とも対照群と検体投与群との間に差は認められなかった。

3) 自律神経系に及ぼす影響

① 摘出モルモット回腸に及ぼす影響

供試動物：Hartley 系モルモット [Std:Hartley]、6 週齢、体重 380～550 g、1 群雄 5 例

方 法：モルモットを放血致死させた後回腸を摘出し、Tyrode 溶液を満たした 10ml のマグヌス槽中に 0.5 g の負荷をかけて懸垂した。検体を 1×10^{-5} 、 1×10^{-4} および 1×10^{-3} g/ml の濃度で添加し、5 分後に各収縮液を添加して収縮程度を記録した。収縮薬としてアセチルコリン (3×10^{-6} M)、ヒスタミン (3×10^{-5} M) 及び塩化バリウム (3×10^{-3} M) を用いた。検体添加前の各収縮液の収縮程度を対照とした。

結 果：各収縮薬による収縮反応に対し、いずれの検体濃度でも影響は認められなかった。

4) 消化器系に及ぼす影響

① マウス腸管輸送能に対する作用

供試動物：ICR系マウス [Slc:ICR(SPF)]、6週齢、体重 29.3～38.7 g、1群雄 10匹

方 法：検体を 0.5% CMC-Na 溶液中に懸濁して、500, 1500 および 5000 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与した。検体投与 1 時間後に 10%アラビアゴム溶液に懸濁させた 5%活性炭末液 0.1 ml を各マウスに経口投与した。炭末投与 30 分後に屠殺して幽門から回腸末端部までを摘出し、腸管全長に対する炭末最先端部の移行率 (%) を測定した。陽性対照としてアトロピン 300 mg/kg 群を設けた。

結 果：全検体投与群において炭末の移行率の統計学的に有意な影響は認められなかった。一方、陽性対照群では統計学的に有意な移行率の抑制を示した。

5) 骨格筋に及ぼす影響

① 懸垂動作試験

供試動物：ICR系マウス [Slc:ICR(SPF)]、6週齢、体重 26.5～31.7 g、1群雄 10匹

方 法：検体を 0.5% CMC-Na 溶液中に懸濁して、500, 1500 および 5000 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与し、投与後 0.5, 1, 2 及び 3 時間に 25 cm の高さに張った針金 (直径 2 mm) にマウスを両前肢で懸垂させ、10 秒以内に後肢を針金にかけられない場合を陽性とした。

結 果：いずれの検体投与群でも陽性例はみられず、全例陰性であった。

6) 血液に及ぼす影響

① 血液凝固に及ぼす影響

供試動物：SD系ラット [Slc:SD(SPF)]、6週齢、体重 194～239 g、1群雄 6匹

方 法：検体を 0.5% CMC-Na 溶液中に懸濁して、500, 1500 および 5000 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与し、投与 1 時間後に、エーテル麻酔下に腹部大動脈よりクエン酸ソーダを添加した注射筒で採血した。採血後遠心分離して血漿を得、この血漿につき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) およびフィブリノーゲン量を測定した。

結 果：対処群と比較して 500 mg/kg 群のプロトロンビン時間が低下を示したが、活性化部分トロンボプラスチン時間およびフィブリノーゲン量には、検体投与によると考えられる影響は認められなかった。

以上より、本検体は 5000 mg/kg の投与量あるいは 1×10^{-3} g/ml の処理量でも、試験した中枢神経系、自律神経系、循環器系、消化器系、骨格筋および血液系に対しては影響を及ぼさなかった。

次頁に試験結果の総括表を示す。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験対象 (試験動物)	検査項目	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 (マウス)	一般状態を Irwin 法に 準じ、観察	経口 (CMC-Na)	500 1500 5000	雄 5	—	5000	マウスの一般 状態に対して、 いずれの投与群 とも異常は認め られなかった。
中枢神経系 (マウス)	自発運動量 を測定	経口 (CMC-Na)	500 1500 5000	雄 8	—	5000	影響は認められ なかった。
循環器系 (ラット)	無麻酔動物の 血圧、心拍数測定	経口 (CMC-Na)	500 1500 5000	雄 6	—	5000	影響は認められ なかった。
自律神経系 (モルモット)	摘出回腸の 収縮薬に対する 反応に及ぼす影 響	浸漬 (Tyrode 溶液)	1×10^{-5} 1×10^{-4} 1×10^{-3} g/ml	雄 5	—	1×10^{-3} g/ml	影響は認められ なかった。
消化器系 (マウス)	腸管炭末 輸送能測定	経口 (CMC-Na)	500 1500 5000	雄 10	—	5000	影響は認められ なかった。 陽性対照：有意 な抑制を示し た。
骨格筋 (マウス)	懸垂動作に 及ぼす影響	経口 (CMC-Na)	500 1500 5000	雄 10	—	5000	陰性
血液 (ラット)	血液凝固への影 響 (プロトロンビン時 間, 活性化部分トロンボ プラスチン時間, フィブリノーゲン量)	経口 (CMC-Na)	500 1500 5000	雄 6	—	5000	500 mg/kg 群の プロトロンビン 時間が低下を示 した。APTT 及 びフィブリノー ゲン量では、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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

2. 代謝物及び原体中混在物

(1) 急性毒性試験

1) 代謝物

のラットにおける急性経口毒性試験

(資料A-39)

試験機関：(株) ポリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1998 年

検体の純度：

試験動物：Sprague-Dawley 系ラット[Crlj:CD(SD)]、7 週齢、体重;雄 226~245 g、雌 160~177 g、1 群
雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

試験方法：投与前 16 時間絶食させた動物に、3%コーンスターチ溶液に懸濁させた検体を 1 回強制経口投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。

体重は投与日、1, 2, 3, 7, 10, 14 日及び死亡時に測定した。

死亡動物及び試験終了時の全ての生存動物を剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果：

投与方法	経 口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	800, 2000, 5000	800, 2000, 5000
LD ₅₀ (mg/kg)	概略 3162~5000	3162
死亡開始時間及び終了時間	投与後翌日から開始 投与後 2 日に終了	投与後翌日から開始 投与後 3 日に終了
症状発現及び消失時間	投与直後から開始 投与後 2 日に消失	投与直後から開始 投与後 3 日に消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	<800	<800
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000	2000

中毒症状としては、雌雄に関係なく流涎、下痢、下腹部の被毛汚染、自発運動の減少、体温低下、腹臥、呼吸困難が観察された。体重は死亡動物では減少したまま死亡したが、その他は雌雄ともに増加した。

死亡動物では腺胃に暗赤色点の散在、胃に投与液と思われる黄白色液の貯留、肝臓及び脾臓の萎縮が認められた。生存動物の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

2) 代謝物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料A-40)

試験機関：(株) ポゾリサーチセンター
[GLP 対応]

報告書作成年：1998 年

検体の純度：

試験動物：Sprague-Dawley 系ラット [Crj:CD(SD)]、7 週齢、体重;雄 203~222 g、雌 149~165 g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

試験方法：投与前 16 時間絶食させた動物に、3%コーンスターチ溶液に懸濁させた検体を 1 回強制経口投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。

体重は投与日、1, 2, 3, 7, 10, 14 日及び死亡時に測定した。

死亡動物及び試験終了時の全ての生存動物を剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果：

投与方法	経 口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	800, 2000, 5000	800, 2000, 5000
LD ₅₀ (mg/kg)	3162	2633 (95%信頼限界 1838~3771)
死亡開始時間及び終了時間	投与後翌日から開始 投与後 3 日に終了	投与後翌日から開始 投与後 4 日に終了
症状発現及び消失時間	投与直後から開始 投与後 3 日に消失	投与直後から開始 投与後 3 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	<800	<800
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	800

中毒症状としては、雌雄に関係なく流涎、下痢、下腹部の被毛汚染、自発運動の減少、体温低下が観察された。

体重は死亡動物では減少したまま死亡した。雌 2000 mg/kg 投与群で投与 2 日後まで体重減少及び増加抑制が認められたが、その他は雌雄ともに増加した。

死亡動物では腺胃に暗赤色点の散在、胃に投与液と思われる黄白色液の貯留、肝臓及び脾臓の萎縮が認められた。生存動物の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

3) 代謝物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料A-41)

試験機関：(株) ポズリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1998 年

検体の純度：

試験動物：Sprague-Dawley 系ラット[Crj:CD(SD)]、7 週齢、体重;雄 213~227 g、雌 165~171 g、
1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

試験方法：投与前 16 時間絶食させた動物に、3%コーンスターチ溶液に懸濁させた検体を 1 回強制経口投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。

体重は投与日、1, 2, 3, 7, 10 日及び 14 日に測定した。

試験終了時に全ての生存動物を剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果：

投与方法 性別	経 口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	5000	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	>5000	>5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現及び消失時間	投与直後から開始 投与後 2 日に消失	投与直後から開始 投与後 3 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	<5000	<5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

中毒症状としては、雌雄に関係なく流涎、肛門周囲の汚れが、雄 1 例に下痢が観察された。体重は雄では期間中を通じて対照群に対して低値で推移した。雌では投与翌日に体重増加抑制が認められたが、その後は順調に増加した。試験終了時の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

4) 代謝物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 A-42)

試験機関：(株) ボゾリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1998 年

検体の純度：

試験動物：Sprague-Dawley 系ラット[Crj:CD(SD)]、7 週齢、体重;雄 224～248 g、雌 164～183 g、1 群
雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

試験方法：投与前 16 時間絶食させた動物に、オリーブ油に懸濁させた検体を 1 回強制経口投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。

体重は投与日、1, 2, 3, 7, 10 日及び 14 日に測定した。

試験終了時に全ての生存動物を剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果：

投与方法	経 口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	2500, 5000	2500, 5000
LD ₅₀ (mg/kg)	>5000	>5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現及び消失時間	投与直後から開始 投与後 3 日に消失	投与直後から開始 投与後 3 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	<2500	<2500
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

中毒症状として、雌雄に関係なく流涎、下痢、肛門周囲の汚れ、自発運動の減少が観察された。

体重は期間中を通じて順調に増加した。

試験終了時の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

5) 代謝物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料A-51)

試験機関：(株) ポズリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：

試験動物：Sprague-Dawley 系ラット [Crj:CD(SD)]、7 週齢、体重;雄 226～243 g、雌 171～189 g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

試験方法：投与前 16 時間絶食させた動物に、3%コーンスターチ水溶液に懸濁させた検体を 1 回強制経口投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。

体重は投与日、1, 2, 3, 7, 10 日及び 14 日に測定した。

試験終了時に全ての生存動物を剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果：

投与方法	経 口	
	雄	雌
性別	雄	雌
投与量 (mg/kg)	5000	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	>5000	>5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現及び消失時間	投与後 15 分から開始 投与後 30 分に消失	投与後 15 分から開始 投与後 30 分に消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	<5000	<5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

中毒症状としては、雌雄に関係なく流涎が観察された。

体重は期間中を通じて順調に増加した。

試験終了時の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

6) 代謝物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料A-52)

試験機関：(株) ポズリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1999 年

検体の純度：

試験動物：Sprague-Dawley 系ラット[Crj:CD(SD)]、7 週齢、体重;雄 216～230 g、雌 148～165 g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

試験方法：投与前 16 時間絶食させた動物に、3%コーンスターチ水溶液に懸濁させた検体を 1 回強制経口投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。

体重は投与日、1, 2, 3, 7, 10 及び 14 日に測定した。

試験終了時に全ての生存動物を剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果：

投与方法	経 口	
	雄	雌
性別	雄	雌
投与量 (mg/kg)	5000	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	>5000	>5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現及び消失時間	投与後 1 日から開始 投与後 3 日に消失	投与後 1 日から開始 投与後 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)	<5000	<5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

中毒症状としては、雌雄に関係なく下腹部被毛の汚染が観察された。

体重は雄で投与翌日に増加抑制が見られたが、3 日後以降は順調な増加を示した。雌では期間中を通じて順調に増加した。

試験終了時の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

7) 原体混在物 のラットにおける急性経口毒性試験 (資料A-43)

試験機関：(株) ポゾリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1998 年

検体の純度：

試験動物：Sprague-Dawley 系ラット[Crlj:CD(SD)]、7 週齢、体重;雄 217～227 g、雌 161～173 g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

試験方法：投与前 16 時間絶食させた動物に、3%コーンスターチ溶液に懸濁させた検体を 1 回強制経口投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。

体重は投与日、1, 2, 3, 7, 10 日及び 14 日に測定した。

試験終了時に全ての生存動物を剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果：

投与方法	経口	
	雄	雌
性別	雄	雌
投与量 (mg/kg)	5000	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	>5000	>5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現及び消失時間	異常なし	異常なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000	5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

試験期間を通じて中毒症状は観察されなかった。

体重は期間中を通じて順調に増加した。

試験終了時の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

8) 原体中混在物 のラットにおける急性経口毒性試験 (資料A-44)

試験機関: (株) ボゾリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年: 1998 年

検体の純度:

試験動物: Sprague-Dawley 系ラット[Crj:CD(SD)], 7 週齢、体重:雄 228~238g、雌 159~165g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間: 14 日間観察

試験方法: 投与前 16 時間絶食させた動物に、3%コーンスターチ溶液に懸濁させた検体を 1 回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。

体重は投与日、1, 2, 3, 7, 10 日及び 14 日に測定した。

試験終了時に全ての生存動物を剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果:

投与方法	経 口	
	雄	雌
性別	雄	雌
投与量 (mg/kg)	5000	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	>5000	>5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現及び消失時間	異常なし	異常なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000	5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

試験期間を通じて中毒症状は観察されなかった。

体重は期間中を通じて順調に増加した。

試験終了時の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(2) 復帰突然変異試験

1) 代謝物 . . . の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料A-45)

試験機関：(財) 食品農医薬品安全性評価センター
[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, TA1535, TA1537 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で Amesらの方法で変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

[用量設定根拠]

用量設定試験の結果、5000 μ g/plate でネズミチフス菌4株に生育阻害作用が認められたため、これを最高用量とした。

試験濃度は156~5000 μ g/plateの範囲で6用量とした。

試験は各濃度2枚のプレートを用いて行った。

試験結果：結果を次頁の表に示す。

検体処理群ではS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。なお、ネズミチフス菌株の直接法及び代謝活性化法の2500及び5000 μ g/plate群で生育阻害作用が見られた。

一方、各陽性対照群ではすべての試験菌株で復帰突然変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結 果 :

表中の数値は2プレートの平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照 (DMSO)	—	—	22	12	105	10	18
代謝物M-5 (混在物I-1)	156	—	19	8	99	8	22
	313	—	16	13	93	6	21
	625	—	19	8	87	10	25
	1250	—	18	13	86	9	21
	2500	—	16	7*	76*	6*	21
	5000	—	15	5*	60*	4*	11*
陽性 対 照	AF-2	0.01	149	349	436	508	633
	AF-2	0.1					
	SA	0.5					
	9-AA	80					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	17	11	110	14	29
代謝物M-5 (混在物I-1)	156	+	13	12	113	13	34
	313	+	16	8	108	9	30
	625	+	17	13	101	11	26
	1250	+	18	11	90	9	23
	2500	+	17	7*	74*	8*	24
	5000	+	19	4*	60*	3*	12*
陽性 対 照	2-AA	0.5	799	395	844	156	427
		1					
		2					
		10					

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

SA : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 生育阻害

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

2) 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料A-46)

試験機関：(財) 食品農医薬品安全性評価センター

[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, TA1535, TA1537 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

[用量設定根拠]

用量設定試験の結果、5000 μ g/plate でネズミチフス菌に生育阻害作用が認められたため、これを最高用量とした。

試験濃度は156~5000 μ g/plateの範囲で6用量とした。

試験は各濃度2枚のプレートを用いて行った。

試験結果：結果を次ページの表に示す。

検体処理群ではS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。なお、ネズミチフス菌の一部の菌株で直接法及び代謝活性化法で生育阻害作用が観察された。

一方、各陽性対照群ではすべての試験菌株で復帰突然変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結 果 :

表中の数値は2プレートの平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 <i>uvrA</i>	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照 (DMSO)	—	—	21	13	108	7	23
代謝物M-6	156	—	22	12	98	6	23
	313	—	20	13	100	7	21
	625	—	21	13	104	10	23
	1250	—	23	14	97	8	22
	2500	—	22	11	105	7	24
	5000	—	20	10*	104*	8*	22*
陽性 対照	AF-2	0.01	154	400	417	481	585
	AF-2	0.1					
	SA	0.5					
	9-AA	80					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	21	13	105	11	24
代謝物M-6	156	+	20	14	120	11	22
	313	+	23	12	101	11	27
	625	+	25	14	99	11	22
	1250	+	25	18	110	15	26
	2500	+	23	13	103	10	25
	5000	+	23	15*	103*	11	21
陽性 対照	2-AA	0.5	846	404	869	180	320
		1					
		2					
		10					

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

SA : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 生育阻害

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

3) 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料A-47)

試験機関：(財)食品農医薬品安全性評価センター

[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, TA1535, TA1537株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

[用量設定根拠]

用量設定試験の結果、最高用量でも直接法及び代謝活性化法とも試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。したがって、5000 μ g/plateを最高用量とした。

試験濃度は156~5000 μ g/plateの範囲で6用量とした。

試験は各濃度2枚のプレートを用いて行った。

試験結果：結果を次ページの表に示す。

検体処理群ではS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。

一方、各陽性対照群ではすべての試験菌株で復帰突然変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結 果 :

表中の数値は2プレートの平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 $uvrA$	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照 (DMSO)	—	—	22	12	106	8	19
代謝物M-8	156	—	18	13	107	7	15
	313	—	19	13	109	7	21
	625	—	18	10	109	6	18
	1250	—	16	13	118	7	22
	2500	—	17	11	109	10	18
	5000	—	23	8	104	7	16
陽性 対照	AF-2	0.01	163	364	412	388	774
	AF-2	0.1					
	SA	0.5					
	9-AA	80					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	22	10	119	13	25
代謝物M-8	156	+	24	9	106	13	24
	313	+	22	12	107	16	28
	625	+	23	12	112	13	27
	1250	+	20	12	106	11	23
	2500	+	23	10	113	14	28
	5000	+	24	14	106	16	30
陽性 対照	2-AA	0.5	720	342	740	158	345
		1					
		2					
		10					

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

SA : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

4) 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料A-48)

試験機関：(財)食品農医薬品安全性評価センター

[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, TA1535, TA1537 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

[用量設定根拠]

用量設定試験の結果、5000 μ g/plateですべての菌株に生育阻害作用が観察され、さらに、1250及び313 μ g/plate でもいくつかの菌株で生育阻害が認められた。

したがって、5000、1250または313 μ g/plateでそれぞれの試験菌株の増殖を抑制する用量を最高用量とした。

試験濃度は菌株により9.77~5000 μ g/plateの範囲でそれぞれ6用量とした。

試験は各濃度2枚のプレートを用いて行った。

試験結果：結果を次ページの表に示す。

検体処理群ではS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。なお、すべての菌株で直接法及び代謝活性化法とも生育阻害作用が観察された。

一方、各陽性対照群ではすべての試験菌株で復帰突然変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結 果 :

表中の数値は2プレートの平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 $uvrA$	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照 (DMSO)	—	—	21	12	108	6	13
代謝物M-9	9.77	—				9	20
	19.5	—				8	22
	39.1	—		9	95	6	17
	78.1	—		11	117	6	10
	156	—	21	9	102	6	14
	313	—	19	14	112	4*	14*
	625	—	21	14	88		
	1250	—	19	6*	64*		
	2500 P 5000 P	— —	16* 12*				
陽性 対照	AF-2	0.01	—	143		396	571
	AF-2	0.1	—				
	SA	0.5	—	295		347	
	9-AA	80	—				
溶媒対照 (DMSO)	—	+	20	12	102	14	27
代謝物M-9	39.1	+		15	110	10	
	78.1	+		9	112	12	
	156	+	26	13	113	9	21
	313	+	23	9	109	8	23
	625	+	28	9	114	14*	22
	1250	+	22	9*	106*	11*	26
	2500 5000 P	+ +	18* 21*				27* 24*
陽性 対照	2-AA	0.5	+			773	259
		1	+				
		2	+	746	386	170	
		10	+				

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

SA : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 生育阻害

P : 肉眼で識別可能な繊維状の検体の析出

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

5) 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料A-53)

試験機関：(財)食品農医薬品安全性評価センター

[GLP対応]

報告書作成年：1999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, TA1535, TA1537株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

[用量設定根拠]

用量設定試験の結果、800 μ g/plate 以上の用量で直接法のネズミチフス菌4株で生育阻害作用が観察された。したがって、本試験では、直接法のネズミチフス菌4株は1250 μ g/plate、大腸菌は5000 μ g/plate、代謝活性化法ではすべての菌株で5000 μ g/plateをそれぞれの最高用量とした。

試験濃度は、直接法のネズミチフス菌4株のみ39.1~1250 μ g/plate、そのほかはすべて156~5000 μ g/plateの範囲でそれぞれ6用量とした。

試験は各濃度2枚のプレートを用いて行った。

試験結果：結果を次ページの表に示す。

検体処理群ではS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。なお、直接法のネズミチフス菌4株では生育阻害作用が観察された。

一方、各陽性対照群ではすべての試験菌株で復帰突然変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結 果 :

表中の数値は2プレートの平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 <i>uvrA</i>	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照 (DMSO)	—	—	26	13	95	9	15
代謝物M-1	39.1	—		11	101	6	16
	78.1	—		10	93	8	20
	156	—	23	9	104	9	16
	313	—	18	12	104	9	15
	625	—	24	13*	80*	6	14
	1250	—	21	11*	76*	7*	21*
	2500	—	30				
5000 P	—	20					
陽性 対照	AF-2	0.01	—	129		404	
	AF-2	0.1	—				
	SA	0.5	—		379		649
	9-AA	80	—				
溶媒対照 (DMSO)	—	+	25	12	104	13	32
代謝物M-1	156	+	23	8	99	18	27
	313	+	18	11	114	16	26
	625	+	18	11	93	13	24
	1250	+	27	13	116	19	30
	2500	+	25	11	121	14	27
	5000 P	+	26	5	75	13	19
陽性 対照	2-AA	0.5	+			715	
		1	+				
		2	+		267		159
		10	+	652			

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

SA : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 生育阻害

P : 肉眼で識別可能な繊維状の検体の析出

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

6) 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料A-54)

試験機関：(財)食品農医薬品安全性評価センター

[GLP対応]

報告書作成年：1999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, TA1535, TA1537株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

[用量設定根拠]

最高用量を5000 μ g/plateとした用量設定試験の結果、直接法及び代謝活性化法ともいずれの菌株にも生育阻害作用は観察されなかった。

したがって、本試験では、直接法、代謝活性化法ともすべての菌株で5000 μ g/plateを最高用量とした。

試験濃度は156～5000 μ g/plateの6用量とした。

試験は各濃度2枚のプレートを用いて行った。

試験結果：結果を次ページの表に示す。

検体処理群ではS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。

一方、各陽性対照群ではすべての試験菌株で復帰突然変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結 果 :

表中の数値は2プレートの平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照 (DMSO)	—	—	16	10	93	7	18
代謝物M-24	156	—	18	13	92	4	21
	313	—	14	12	89	7	20
	625	—	17	13	93	5	25
	1250	—	19	10	88	6	21
	2500	—	12	12	99	6	22
	5000	—	23	8	84	6	24
陽性 対照	AF-2	0.01	107	418	478	300	557
	AF-2	0.1					
	SA	0.5					
	9-AA	80					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	26	13	98	16	32
代謝物M-24	156	+	23	8	95	17	19
	313	+	25	9	96	16	26
	625	+	21	9	89	16	28
	1250	+	28	10	92	19	29
	2500	+	22	13	91	12	21
	5000	+	24	11	91	19	23
陽性 対照	2-AA	0.5	757	359	722	178	363
		1					
		2					
		10					

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

SA : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

7) 原体混在物 の細菌を用いた復帰変異原性試験 (資料A-49)

試験機関：(財)食品農医薬品安全性評価センター

[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, TA1535, TA1537 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

[用量設定根拠]

用量設定試験の結果、大腸菌の代謝活性化法以外では5000 µg/plateで生育阻害作用が観察された。さらに、直接法のネズミチフス菌株で1250~78.1 µg/plateでも生育阻害がみられた。したがって、5000、2500または156 µg/plateでそれぞれの試験菌株の増殖を抑制する用量を最高用量とした。

試験濃度は4.88~5000µg/plateで6~7用量とした。

試験は各濃度2枚のプレートを用いて行った。

試験結果：結果を次ページの表に示す。

検体処理群ではS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。なお、大腸菌の代謝活性化法以外の試験群で、高用量群において生育阻害作用が見られた。

一方、各陽性対照群ではすべての試験菌株で復帰突然変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結 果 :

表中の数値は2プレートの平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 <i>uvrA</i>	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照 (DMSO)	—	—	22	12	107	6	23
原体混在物 I-16	4.88	—		10	112	6	20
	9.77	—		11	104	5	19
	19.5	—		13	117	5	19
	39.1	—		11	112	5	17
	78.1 P	—		10*	113*	6*	20*
	156 P	—	23	16*	141*	5*	18*
	313 P	—	15				
	625 P	—	15				
	1250 P	—	13				
	2500 P	—	15*				
5000 P	—	13*					
陽性 対照	AF-2	0.01	—	171		399	
	AF-2	0.1	—				608
	SA	0.5	—		412		
	9-AA	80	—			342	
溶媒対照 (DMSO)	—	+	25	13	118	12	29
原体混在物 I-16	39.1	+				10	
	78.1	+				12	
	156	+	26	15	129	10	34
	313	+	24	11	131	10	27
	625	+	18	12	135	9	27
	1250 P	+	22	13	124	8*	25
	2500 P	+	18	7	109	4*	19
	5000 P	+	17	9*	115*		18*
陽性 対照	2-AA	0.5	+				
		1	+			821	
		2	+		422		187
		10	+	736			

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

SA : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 生育阻害

P : 肉眼で識別可能な繊維状の検体の析出

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

8) 原体中混在物 の細菌を用いた復帰変異原性試験 (資料A-50)

試験機関：(財) 食品農医薬品安全性評価センター
[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, TA1535, TA1537 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

[用量設定根拠]

用量設定試験の結果、直接法の高用量群において生育阻害作用が観察された。したがって、代謝活性化法では5000 μ g/plateを、直接法では1250、625または 313 μ g/plateでそれぞれの試験菌株の増殖を抑制する用量を最高用量とした。

試験濃度は2.44~5000 μ g/plateで6~7用量とした。

試験は各濃度 2枚のプレートを用いて行った。

試験結果：検体処理群ではS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。なお、直接法のすべての菌株の高用量群で生育阻害作用がみられた。

一方、各陽性対照群ではすべての試験菌株で復帰突然変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

結 果 :

表中の数値は2プレートの平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 <i>uvrA</i>	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒対照 (DMSO)	—	—	22	11	98	9	18
原体中混在物 I-19	2.44	—					21
	4.88	—					18
	9.77	—				8	24
	19.5	—	19	11	99	7	21
	39.1	—	20	14	95	5	24
	78.1	—	24	11	97	7	20*
	156 P	—	17	8	82	4*	18*
	313 P	—	18	8*	82*	3*	
	625 P	—	11*	7*	91*		
1250 P	—	19*	6*	97*			
陽性 対照	AF-2	0.01	—	171		373	
	AF-2	0.1	—				611
	SA	0.5	—		445		
	9-AA	80	—			293	
溶媒対照 (DMSO)	—	+	25	11	112	15	23
原体中混在物 I-19	156	+	25	15	108	13	27
	313	+	21	12	116	14	24
	625	+	21	10	131	12	30
	1250	+	23	14	110	17	24
	2500 P	+	24	12	125	10	21
	5000 P	+	19	12	107	10	22
陽性 対照	2-AA	0.5	+			803	
		1	+				293
		2	+		425		173
		10	+	735			

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

SA : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 生育阻害

P : 肉眼で識別可能な繊維状の検体の析出