

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

2) ラット次世代に及ぼす影響に関する試験

(資料 No. 13)

試験機関：

報告書作成年：1982 年

申請者注：この試験は、ラットを用いて催奇形性を含め生殖全般へのフルトラニル暴露の影響を検索した試験である。投与量は混餌濃度で 10000 及び 1000ppm と十分高く、摂餌量で一過性の低下はみられるものの、動物への十分な検体暴露が達成されたと推察される。また、結果としての確なデータが得られていると考えられるが、検体投与群が 2 群のみであり、また、無毒性量がやや不明確である。一方、その後 GLP 準拠のラット 2 世代繁殖毒性試験 (1991 年、資料 No. 32) 及びラット催奇形性試験 (1987 年、資料 No. 25) が実施されており、現状の毒性評価において、これらの試験成績のほうがより信頼性が高いと考える。

検体の純度：

供試動物：Wistar-Imamichi 系ラット、開始時 4 週齢、1 群雌雄各 25 匹

試験期間：

投与方法：検体を 0、1000 及び 10000 ppm 含有した固型飼料を F0 世代試験開始時から F2 世代試験終了時までの 2 世代摂食させた。

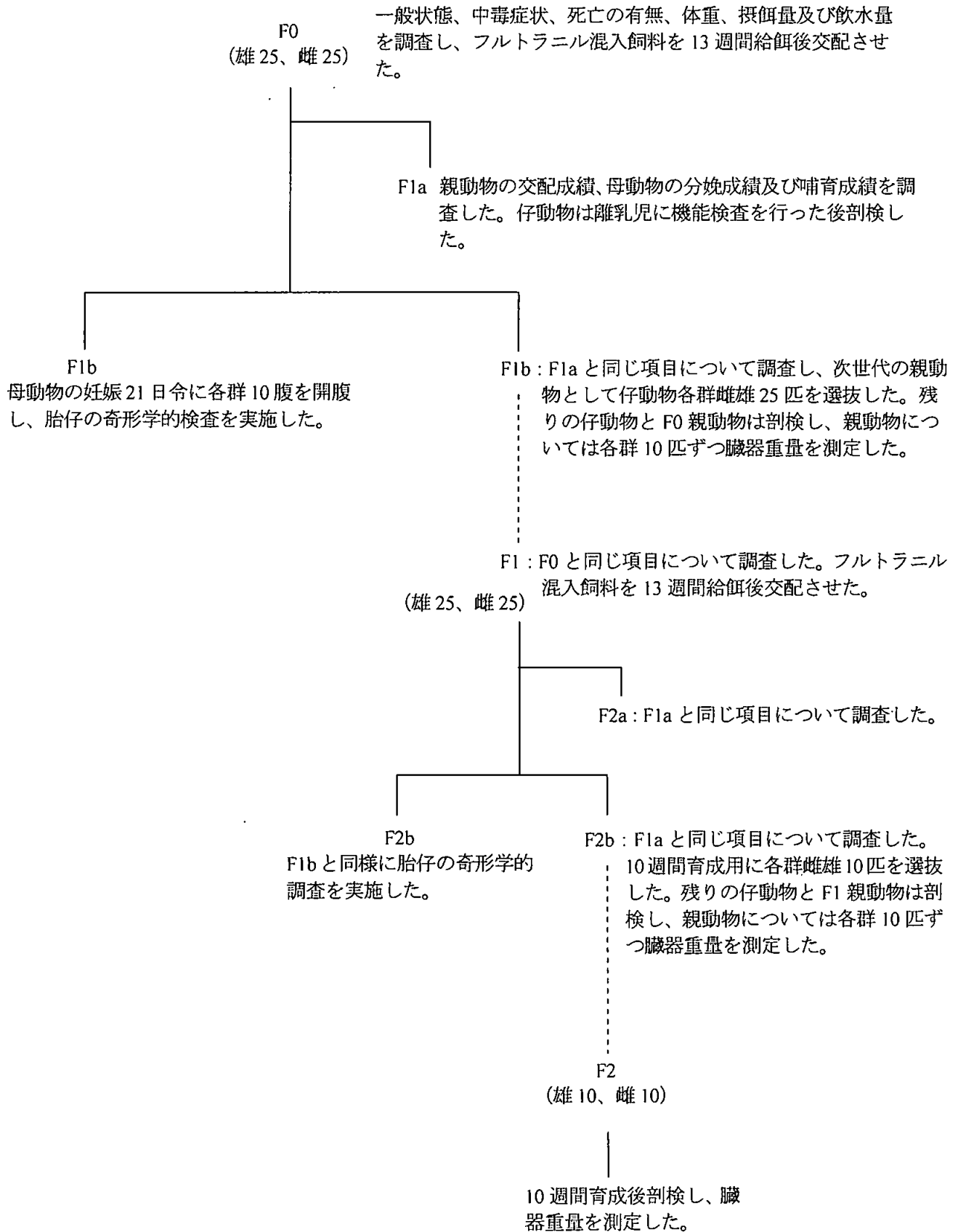
試験方法：次頁に試験の流れ及び観察・検査を示す。

また、得られたデータについて次の統計学的解析が行われた。

検査項目	統計法
体重、臓器重量、黄体数、着床数、生存胎児数、分娩児数、胎児化骨核数	Student の <i>t</i> 検定 (又は Aspin Welch)
雌雄の生殖能力に関する指標、妊娠期間、着床率、化骨不全を示す胎児の頻度	$\chi^2$ 検定
哺育児生存率、胎児死亡率、胎児奇形率、性比	順位和検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

[方法及び試験項目の概要]



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

試験結果：

世 代		親：F0 児：F1a F1b			親：F1 児：F2a F2b			親：F2			
投与量 (ppm)		0	1000	10000	0	1000	10000	0	1000	10000	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	10	10	10	
	雌	25	25	25	25	25	25	10	10	10	
繁 殖 動 物 性	中毒症状										
	死亡率	雄	0	0	1/25	0	0	0	0	0	0
		雌	0	0	1/25	2/25	0	1/25	0	0	0
	体重	雄			1~14 週 増加抑制 以後回復		0~15 週 増加抑制 以後回復	増加抑制		0~5 週増 加抑制以 後回復	0~7 週増 加抑制以 後回復
		雌			1~4 週増 加抑制以 後回復		0~10 週 増加抑制 以後回復	0~11 週 増加抑制 以後回復		0~3 週増 加抑制以 後回復	0~6 週増 加抑制以 後回復
	摂餌量	雄		一過性の 低下	一過性の 低下		一過性の 低下	一過性の 低下		一過性の 低下	一過性の 低下
		雌		一過性の 低下	一過性の 低下					一過性の 低下	一過性の 低下
	食餌効率	雄									
		雌									
	飲水量	雄									
	雌										
臓器重量	雄									肝；増加	
	雌									肝；増加	
肉眼的病理所見	雄										
	雌										
交配成績											
妊孕率		23/25	25/25	24/24	24/25	24/25	24/25				
妊娠率		24/25	25/25	23/24	24/25	25/25	25/25				
分娩成績											
妊娠期間 (日)											
1 産次		22.3	22.3	22.5	22.5	22.3	22.3				
2 産次		22.0	22.2	22.2	22.7	22.2	22.2				
分娩児数											
1 産次		12.7	12.0	12.8	11.7	11.9	11.7				
2 産次		15.1	14.9	13.2	13.6	12.8	12.8				
生産児数											
1 産次		12.6	11.7	12.8	11.7	11.5	11.5				
2 産次		15.0	14.7	13.2	13.5	12.8	12.8				
死産児数											
1 産次		0.13	0.22	0	0	0.39	0.17				
2 産次		0.08	0.13	0.08	0.08	0	0				

空欄は異常なし

妊孕率：妊孕能確認雄数／供試雄数

妊娠率：妊娠成立数／供試雌数

分娩成績：母獣当りの平均値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

世 代		親 : F0 児 : F1a F1b			親 : F1 児 : F2a F2b				
投与量 (ppm)		0	1000	10000	0	1000	10000		
動物数									
雄		25	25	25	25	25	25		
雌		25	25	25	25	25	25		
繁 殖 性	児	<新生児成績>							
		性比 (雌/雄)							
		第1産児	0.93	0.78	1.31	0.83	1.28	1.02	
		第2産児	1.01	0.71	0.94	0.86	1.21	1.39	
		体重							
	第1産児雄	6.1	5.8	5.9	6.5	6.2	6.2*		
	雌	5.7	5.6	5.7	6.0	5.9	5.9		
	第2産児雄	6.2	5.9*	6.1	6.8	6.3**	6.4		
	雌	5.8	5.5*	5.8	6.4	5.9**	6.1		
	動 物 性	動	<哺育成績>						
哺育4日生存率 (%)									
第1産児			95.2	86.3***	87.1***	94.8	98.1*	98.5*	
第2産児			97.4	97.3	94.7	100	97.4	100	
哺育21日生存率 (%)									
第1産児		99.4	100	100	100	100	100		
第2産児		100	100	100	100	100	100		
体重									
第1産児			増加抑制	増加抑制		増加抑制	増加抑制		
第2産児			増加抑制	増加抑制		増加抑制	増加抑制		
性	機能検査	第1産児							
		第2産児							
	外表奇形	第1産児							
		第2産児							
	肉眼的病理所見								
第2産児									
催 奇 形 性	着床所見	黄体数	18.2	16.8	16.3*	17.1	17.3	16.5	
		着床数	16.0	16.1	15.6	13.1	14.9	14.3	
		着床率 (%)	87.9	95.8*	95.7*	76.6	86.1*	86.7*	
		生存胎児数	14.8	15.5	14.1	12.1	13.8	12.7	
		胚 胎児死亡数	1.2	0.6	1.5	1.0	1.1	1.6	
		胚 胎児死亡率 (%)	7.5	3.7	9.6	7.6	7.4	11.2	
	胎児所見	性比 (雌/雄)		0.85	1.09	0.96	0.92	1.12	1.23
		生存胎児体重	雄	5.5	5.4	5.4	5.7	5.4*	5.4*
			雌	5.1	5.0	5.1	5.3	5.1	4.9**
		外形異常							
		骨格異常							
		骨格検査							
		化骨状態			中足骨化 骨数高値	中足骨化 骨数高値		中足骨化 骨数低値	中足骨化 骨数低値
内臓異常							第2胸骨 核化骨不全 高値  仙尾椎化 骨数低地  腎盂拡張		

空欄は異常なし

着床所見：母獣当りの平均値

着床率：(着床数/黄体数) × 100

新生児性比：雌生産児数/雄生産児数

哺育4日生存率：(生後4日生存児数/出生日生存児数) × 100

哺育21日生存率：(生後21日生存児数/生後4日調整児数) × 100

胚胎児死亡率：(胚胎児死亡数/着床数) × 100

胎児性比：雌生存胎児数/雄生存胎児数

\* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01, \*\*\* : p < 0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

#### 一般毒性：

親動物：F0 世代の 10000 ppm 群雌雄で投与開始後 1 週から一過性の摂餌量減少に伴うと思われる体重増加抑制がみられ、また、F1 及び F2 世代雌雄各投与群でも同様の傾向がみられた。しかし、これらはいずれも徐々に対照群レベルに回復する傾向を示し、投与経過日数あるいは世代の進行に伴う増強も認められなかった。

児動物：雌雄乳児の各世代各投与群で、哺育期間中の母動物における摂餌量の低下傾向を反映したと思われる軽度の体重増加抑制がみられた。しかし、これら乳児はいずれにおいても離乳後の発育及び機能等に異常は認められなかった。

#### 繁殖性

親動物の交配成績、分娩成績及び児動物の新生児成績、哺育成績（哺育 4 日及び 21 日生存率）とも検体投与によると思われる影響はみられなかった。

#### 催奇形性

F2b 胎児の化骨状態において、中足骨化骨数の低値が 1000 及び 10000 ppm 群に、第 2 胸骨核化骨不全の高値及び仙尾椎化骨数の低値が 10000 ppm 群にみられた。また、同 F2b 胎児の内臓検査では、腎盂拡張が対照群をはじめ各群にみられたが 10000 ppm 群で頻度が高かった。しかし、これら F2b 胎児にみられた変化は、いずれもバックグラウンドデータの変動範囲にあり、検体投与に起因するものとは考えられなかった。また、着床所見においても異常は認められなかった。

#### 検体摂取量

摂餌量及び検体の飼料中設定濃度から投与期間中の検体摂取量を算出した。

検体摂取量 (mg/kg/day)		1000ppm	10000ppm
雄	F0：投与 23 週間の平均値	63.7	674.0
	F1：投与 27 週間の平均値	64.6	661.8
	F2：10 週間の生育期間	96.7	1002.0
	総平均値*	75.0	779.3
雌	F0：交配前期間～妊娠～哺育期間の平均値	86.3	880.8
	F1：交配前期間～妊娠～哺育期間の平均値	86.3	906.7
	F2：10 週間の生育期間の平均値	90.1	982.5
	総平均値*	87.6	923.3

\*：総平均値は申請者が算出した。

以上の結果から、ラット次世代に及ぼす影響に関する試験において、10000 ppm の親動物で一過性の体重増加抑制がみられ、1000 及び 10000 ppm で乳児の軽度な体重増加抑制がみられた。しかし、繁殖性への影響は認められず、また、催奇形性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日本農薬㈱にある。

3) ラットにおける催奇形性試験

(資料 No. 25)

試験機関：

報告書作成年：1987年 [GLP 対応]

検体の純度：

供試動物：SD系ラット、開始時 約9～11週齢（体重 196～239 g）、1群交尾確認雌 22匹

投与期間：妊娠6日から15日までの10日間投与

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、0、40、200及び1000 mg/kg/dayの投与量で妊娠6日から15日までの10日間、毎日1回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。なお、臍垢中に精子が確認された日あるいは3個以上の臍栓が認められた日を妊娠0日とした。

投与量の設定根拠；

観察・検査項目：

親動物； 試験期間を通じて一般状態及び生死を毎日観察し、体重を妊娠0、3、6～16（毎日）、8及び20日に測定した。摂餌量は妊娠0～2、3～5、6～17（毎日）及び18～20日の各期間毎に、また、飲水量は妊娠期間中毎日測定した。妊娠20日に屠殺し、肉眼的病理検査を実施した。また、黄体数、着床数、生存および死亡胎児数、吸収胚数（初期及び後期）及び胎盤重量について検査した。

生存胎児； 全ての胎児体重を測定後、性別を判定し外表異常を観察した。各親動物の約半数の胎児について頸部、胸腔及び腹腔内の臓器を肉眼的に検査し、その後、骨格標本作製し、骨格異常を観察した。また、残りの胎児についてはWilsonの連続切片法により内臓検査を実施した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

親動物及び胎児の検査・観察に基づき、以下のパラメータを算出した。

妊娠率 (%) = 妊娠動物数 / 交尾確認雌動物数 × 100

着床率 (%) \* = 着床数 / 黄体数 × 100

着床前死亡率 (%) \* = (黄体数 - 着床数) / 黄体数 × 100

着床後死亡率 (%) \* = (着床数 - 生存胎児数) / 着床数 × 100

生存胎児率 (%) = 生存胎児数 / 着床数 × 100

性 比\* = 雄の生存胎児数 / 雌の生存胎児数

各異常所見の発生率 (%) \* = 各異常所見がみられた胎児数 / 検査胎児数 × 100

\* : 各群の各検査値の総数を用いて算出した

結果の概要

投与量 (mg/kg/day)		0	40	200	1000	
1群当たりの動物数		22	22	22	22	
親動物	一般症状	投与に起因すると思われる症状はみられなかった				
	死亡数	0/22	0/22	0/22	0/22	
	体重増加量 (g) a)	124	119	122	122	
	平均摂餌量 (g/匹/day)	21.9	24.2	24.5	24.4	
	平均飲水量 (mL/匹/day)	48	50	46	52	
	肉眼的病理検査	投与に起因すると思われる所見はみられなかった				
	妊娠動物数 (%)	22 (100)	22 (100)	22 (100)	22 (100)	
	不妊数	0	0	0	0	
	検査対象親動物数	22	22	22	22	
	動物 着床所見 (二親動物当り)	黄体数	16.7	16.2	16.3	16.1
着床数 (%)		15.4 (92.1)	14.9 (91.6)	14.4 (88.3)	15.1 (93.5)	
着床前死亡数 (%)		1.3 (6.5)	1.4 (8.4)	2.0 (12.4)	1.2 (7.3)	
着床後死亡数		初期死亡胚数	0.7	0.8	0.5	1.1
		後期死亡胚数	0.3	0.1	0.2	0.1
		合計 (%)	1.0 (6.5)	0.9 (6.1)	0.7 (5.0)	1.2 (8.1)
生存胎児数 (%)		14.4 (93.5)	14.0 (93.9)	13.7 (95.0)	13.9 (91.9)	
胎盤重量 (g)		0.51	0.50	0.51	0.53	
胎児動物	胎児体重 (g)	3.23	3.33	↑3.37	3.34	
	雄生存胎児数	7.9	↓6.1	6.8	7.5	
	雌生存胎児数	6.5	7.8	6.9	6.4	
	性 比	1.20	0.78	0.99	1.18	
	外表所見	検査対象胎児数	317	307	301	305
		小胎児 (%) c)	5.7	2.3	↓0.7	2.3
		大胎盤 (%) d)	1.6	0.7	1.3	2.6
	内臓所見 b)	検査対象胎児数	158	155	152	153
		水腎症 (%)	0.6	0.6	0.7	2.7
		水尿管症 (%)	0.6	3.2	2.6	3.9
		肝小型余剰葉 (%)	6.3	7.2	6.7	9.9
	肝の出血 (%)	1.9	5.9	8.7	7.2	
	骨格所見	検査対象胎児数	158	155	152	153
		第2胸骨化骨遅延 (%)	65.8	71.0	↑74.3	69.3
胸椎核化骨遅延 (%)		22.2	↑36.8	26.7	↑32.7	
中手骨/中足骨化骨数 4/4 (%)		10.1	19.4	19.7	↑22.9	

↑ : p<0.05, ♂ : p<0.01 (Mann-Whitney U検定)

a) 投与開始 (妊娠6日) から試験終了 (妊娠20日) までの増加量

b) 連続切片法による内臓検査 c) 2.7g未満の胎児 d) 0.7g以上の胎盤



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

親動物 ; いずれの群でも妊娠期間を通じて一般状態、体重増加量、摂餌量及び飲水量に投与による影響は認められず、死亡例もなかった。また、黄体数、着床数、生存胎児数、着床前及び着床後死亡率及び胎盤重量は対照群と同様であり、妊娠 20 日に実施した肉眼的病理検査では、いずれの群においても投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

胎児動物 ; 剖検時の観察、骨格検査及び連続切片法による検査で、いずれの群においてもいくつかの所見がみられたが、いずれも本系統のラットにみられる種類のものであり、またその頻度も背景データの範囲内であることから、検体投与によるものと思われる影響はみとめられなかった。同試験施設における胎児所見の背景データを以下に示す。

背景データ 対照群における出現頻度の最大%～最小%

外表所見	検査対象胎児数	36013
	小胎児 a)	0.0～16.9(%)
	大胎盤 b)	0.0～6.2(%)
内臓所見	検査対象胎児数	17907
	水腎症	0.0～15.2(%)
	水尿管症	0.0～32.1(%)
	肝小型余剰葉	0.0～8.1(%)
	肝の出血	0.0～27.7(%)
骨格所見	検査対象胎児数	17730
	第2胸骨化骨遅延	43.3～84.8(%)
	胸椎核化骨遅延	8.6～58.3(%)
	中手骨/中足骨化骨数 4/4	6.2～71.4(%)

a) 2.7g 未満の胎児 b) 0.7g 以上の胎盤

以上の結果より、ラット催奇形性試験において、最高投与量の 1000 mg/kg/day の投与量においても母動物及び胚・胎児に検体投与による影響は認められなかった。従って、親動物及び胎児に対する無毒性量はいずれも 1000mg/kg/日と判断された。また、催奇形性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日本農薬㈱にある。

4) ウサギにおける催奇形性試験

(資料No.44)

試験機関：

報告書作成年：2012年 [GLP対応]

実施理由：既提出である1987年に実施したウサギを用いた催奇形性試験(資料No.20)は最新のOECDテストガイドラインで定める1群動物数が24及び投与期間の点で差異があることをブラジル当局(ANVISA\*)によりデータギャップと判断されたため、新たに実施したものである。

検体の純度：

供試動物：ニュージーランドホワイト種妊娠ウサギ、24匹/群

交配時 22～24週齢、体重 3.05 ～3.50 kg

投与期間：妊娠期間22日間

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、0、100、300及び1000mg/kgの投与レベルで妊娠6日から27日までの22日間、毎日1回強制経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。妊娠母動物は雌雄を1：1で自然交配させて得た。交尾が確認された日を妊娠0日とした。

投与量設定根拠：

観察・検査項目：

親動物；一般状態及び生死を毎日2回観察した。体重は妊娠0及び3日目と、6～28日は毎日測定した。摂餌量は毎日測定した。妊娠28日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡胚・吸収胎児数を検査した。帝王切開時に着床痕が観察されない動物は不妊と判定し、剖検所見を除く全ての成績のまとめから除外した。

生存胎児；体重及び外表異常を検査した。外表異常胎児(臍ヘルニア)を含む全生存胎児について、開腹して性別を確認するとともに内部臓器の異常を肉眼的に観察した。脳及び心臓は摘出し、リン酸緩衝10%ホルマリン液で固定後、脳はWilsonの粗大切片法、心臓は西村の顕微解剖法を参照して内臓異常・変異の有無を全試験群について検索した。外表異常胎児(臍ヘルニア)を含む全胎児について、骨格標本作製し骨格異常・変異の有無並びに骨化進行状態として、頸椎、胸骨核、中手骨、中足骨、指端骨(基節骨、中節骨、末節骨)及び仙尾椎骨の各骨化数を検索した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

上記の観察項目に基づき、以下の指標を求めた。統計の標本単位は一腹平均値とした。

$$\text{着床率} = (\text{着床数} / \text{黄体数}) \times 100$$

$$\text{着床後死亡率} = [(\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数}] \times 100$$

$$\text{子宮内死亡率} = (\text{死亡胚又は死亡胎児数} / \text{着床数}) \times 100$$

$$\text{胎児の所見を有する頻度} = (\text{所見を有する胎児数} / \text{着床数}) \times 100$$

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		0	100	300	1000		
交尾動物数		24	24	24	24		
親動物	妊娠動物数	19	21	21	22		
	死亡数あるいは流産数	0	0	0	0		
	一般状態	検体に起因する毒性影響なし					
	摂餌量	検体に起因する毒性影響なし					
	帝切時補正体重 (kg)	3.43	3.32	3.37	3.31		
	肉眼的病理所見	検体に起因する毒性影響なし					
	着床所見	検査親動物数	19	21	21	22	
		黄体数 #	9.6	10.3	9.8	10.0	
		着床数(率) #	8.1 (83.5)	9.1 (88.0)	8.9 (90.9)	8.8 (86.9)	
		着床前死亡率#	16.5	12.0	9.1	13.1	
生存胎児数 #		7.8	8.8	8.1	8.0		
子宮内死亡率 (率) #		6(3.7)	6(3.1)	16(11.5)	19(12.5)		
後期吸収胚 総数 b		4	3	4	9		
胎児	検査胎児総数	148	185	170	175		
	体重 (g) #	雄	35.29	35.33	34.78	35.29	
		雌	33.54	35.03	33.90	34.64	
	性比 (雄/同腹胎児数) #	0.44	0.53	0.47	0.49		
	外表検査;異常を有する胎児数(%#)	0	0	1c (0.7)	0		
	内臓検査	異常を有する胎児数 (%#)	1(0.5) d	2(1.0) e	1(0.6) f	0	
		変異 gを有する胎児数(%#)	5(3.7)	4(2.7)	2(1.1)	5(2.9)	
	骨格検査	骨格異常	所見を有する胎児数(%#)	1(0.5)	4(1.5)	2(1.3)	1(0.6)
			肋骨分岐 (%#)	0	1(0.4)	0	0
			胸椎椎体癒合 (%#)	1(0.5)	3(1.1)	0	0
胸椎半椎 (%#)			1(0.5)	1(0.4)	1(0.6)	0	
胸骨核癒合 (%#)			0	1(0.4)	1(0.6)	1(0.6)	
変異hを有する胎児数(%#)		54(34.2)	55(30.7)	54(33.0)	60(34.2)		
化骨度; 胸骨数 #	5.74	5.72	5.68	5.66			

Dunnett 検定またはノンパラメトリック Dunnett 型検定で有意差なし。

# : 一腹毎の平均値

a : 着床痕、吸収胚、胎盤遺残の総数、b : 早期浸軟胎児、後期浸軟胎児、死亡胎児の総数

c : 臍ヘルニア、d : 動脈幹遺残、e : 左房室口小型化1例、冠状動脈癒1例、f : 右心室小型化

g : 肺副葉の無形成、鎖骨下動脈の起点の位置異常、大静脈後尿管(右)

h : 胸骨核の二分、腰椎弓核の二分、距骨未化骨、仙椎前椎骨数が25、仙椎前椎骨数が27

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

母動物の一般状態には対照群を含む全群に変化はみられず、死亡ならびに流産もみられなかった。体重及び摂餌量も対照群と投与群の間に差はみられなかった。妊娠28日目の母動物の剖検においても、異常はみられなかった。

胚・胎児死亡率は対照群及び100 mg/kg群はいずれも6匹であったが、300及び1000 mg/kg群ではそれぞれ16匹と19匹と僅かに高かった。しかし、この原因は当該群に生存胎児を有しない全同腹児死亡母体が各1例（300 mg/kg群、No. 3110；1000 mg/kg群、No. 4110）発現したことによる影響と考えられ、胚・胎児死亡は被験物質投与に起因するものではないと考えられた。これら全同腹児死亡母体を除いた胚・胎児死亡率は300 mg/kg/day投与群7.1%及び1000 mg/kg/day投与群8.3%であり、対照群と同程度であった。更に、300 mg/kg/day以上の投与群における胚・胎児死亡率（300 mg/kg/day：11.5%、1000 mg/kg/day：12.5%）はいずれも背景データの範囲内であり（下限値-上限値：2.0-14.8%、24試験）、全同腹児死亡母体数も同様な結果であった（下限数-上限数：0-1母体、24試験）。

内臓異常あるいは骨格異常・変異において、全投与群で影響は認められなかった。内臓変異において、1000 mg/kg/day投与群で観察された肺の分葉異常の内臓変異（2.3%）は僅かな発現数で背景データの範囲内に含まれ（下限値-上限値：0.0-8.7%、17試験）、その他の内臓変異においても被験物質投与による影響は認められなかった。

以上の結果より、ウサギの催奇形性試験において、最高投与量の1000mg/kg/dayにおいても母動物及び胚・胎児に検体投与による影響は認められなかった。従って、親動物及び胎児に対する無毒性量はいずれも1000mg/kg/dayと判断された。また、催奇形性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日本農薬㈱にある。

5) ウサギにおける催奇形性試験

(資料No.20)

試験機関：

報告書作成年：1986年 [GLP対応]

検体の純度：

供試動物：ニュージーランドホワイト種妊娠ウサギ、16匹/群

6ヶ月齢（交配時体重 2.5 ～3.7 kg）

投与期間：妊娠期間28日間

投与方法：検体を2%アラビアゴム水溶液に懸濁し、0、40、200及び1000mg/kg/dayの投与量で妊娠6日から18日までの13日間、1日1回強制経口投与した。対照群には2%アラビアゴム水溶液のみを同様に投与した。

妊娠動物は雌雄を1：1で自然交配させて作製した。交尾翌日を妊娠0日とした。

投与量設定根拠；

観察・検査項目：

親動物；一般状態及び生死を毎日観察し、体重を妊娠0、6、9、12、15、18、23及び28日に測定し、摂餌量を毎日測定した。妊娠28日に帝王切開し、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚（着床痕・残存胎盤）数、死亡胎児数（浸軟胎児を含む）、生存胎児の性別、生存胎児の体重、生存胎児の外表異常を検査した。帝王切開時に着床痕が観察されず、卵巣に黄体形成のない動物は不妊と判定し、剖検所見を除く全ての成績のまとめから除外した。

上記の観察項目に基づき、以下の指標を求めた。

$$\text{胎児死亡率} = (\text{死亡胚又は死亡胎児数} / \text{着床数}) \times 100$$

$$\text{着床率} = (\text{着床数} / \text{妊娠黄体数}) \times 100$$

$$\text{性 比} = \text{雄生存胎児数} / \text{雌生存胎児数}$$

生存胎児の雌雄別一腹平均体重

試験に用いた全動物について体表、体孔及び胸腔、腹腔、骨盤腔内の臓器を肉眼的に検査し、帝王切開した動物については肝臓、脾臓、副腎の重量を測定した。

生存胎児；生存胎児の性別、体重及び外表異常を検査した。全生存胎児について内臓検査を実施したのち、骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

結果の概要 :

投与量 (mg/kg/day)		0	40	200	1000	
交尾動物数		16	16	16	16	
親動物	妊娠動物数	15	16	13	13	
	死亡数	0	1 a	0	0	
	流産数	0	0	0	0	
	一般状態					
	体重 (kg、妊娠28日)	3.78	3.72	3.80	3.70	
	摂餌量					
	肉眼的病理所見					
	* 臓器重量	肝臓 (g)	118.5	124.3	119.0	118.9
		腎臓 (g)	18.8	19.1	18.3	19.1
		脾臓 (mg)	1442	1611	1351	1434
		副腎 (mg)	341	320	333	303
	# 着床所見	検査親動物数	14	15	13	13
		黄体数	8.5	7.4	8.4	8.5
		着床数 (%)	7.5 (88.2)	6.6 (89.2)	8.1 (96.3)	7.8 (91.9)
生存胎児数		7.4	6.6	7.8	7.3	
早期吸収胚率 (%)		1.0	0.0	2.9	4.9	
後期吸収胚率 (%)		0.0	0.0	1.0	2.0	
胎児	体重 (g) #	雄	43.4	44.6	45.3	45.7
		雌	42.9	45.0	43.8	42.5
	性比(雄/雌)	1.36	1.20	1.02	0.86	
	検査胎児数 (腹数)	104	99	101	95	
	異常を有する胎児数 (%) ※	0	0	2 (2.0)	1 (1.0)	
	外表奇形※:	無頭症 (%)	0	0	1 (1.0)	0
		複合奇形 (%)	0	0	0	1 (1.1) b
骨格異常※:	第2、3、4胸骨分節癒合 (%)	0	0	1 (1.0)	0	

統計処理 (t検定、 $\chi^2$  検定、順位和検定) を実施したが有意差なし。

空欄: 検体に起因する変化なし

\*: 帝王切開した動物の平均値、#: 腹平均値

※: 出現胎児数及び ( ) 内は胎児ベースの発生率 (%)

a: 誤投与により19日目に死亡

b: 頭臀長の短縮、水頭症、胃壁破裂、脊髄破裂

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

母動物の一般状態には、対照群及び各投与群とも異常はみられず、検体投与による動物の死亡ならびに流産もみられなかった。体重及び摂餌量では、多少の変動を示す個体が散見されたが、全期間を通じて対照群との間に有意差はなく、しかも用量相関性が認められないことから検体投与とは関連のない変化と考えられた。

妊娠28日目の母動物においても、臓器の肉眼的所見及び重量に検体投与に関連した変化はみられなかった。

胎児に関しては、胎児死亡率に変化はみられず、外表、骨格及び内臓検査においても、対照群と比較して有意な異常所見は観察されないことから胎児に対して催奇形性作用ならびに致死作用はないものと判断された。胎児体重及び化骨状態においても対照群と投与群で差がなく、胎児の発育に対しても影響を及ぼさないものと考えられた。

以上の結果より、ウサギの催奇形性試験において、最高投与量の1000mg/kg/dayにおいても母動物及び胚・胎児に検体投与による影響は認められなかった。従って、親動物及び胎児に対する無毒性量はいずれも1000mg/kg/日と判断された。また、催奇形性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日本農薬㈱にある。

(13) 変異原性

1) 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 No. 14)

試験機関：

報告書作成年：1981年

検体の純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *hcr* (*uvrA*) 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9Mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は DMSO に溶解し、10~25000  $\mu$ g/プレート の範囲の 8 濃度で実施した。試験は 2 連制とした。

試験結果：結果を次表 (次頁) に示す。

検体は、S-9 Mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても溶媒対照群と比べ復帰変異コロニー数を増加させなかった。一方、陽性対照として用いた AF-2、ENNG、9-AA 及び 2-NF ではすべての検定菌株であきらかな復帰コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、フルトラニル原体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を示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日本農薬㈱にある。

復帰突然変異試験の結果表

薬物	濃度 ( $\mu$ g/ プレート)	S9Mix の有無	復帰突然変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2 hcr	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)		-	129	6	12	38	6	12	
			117	12	24	49	12	11	
NNF-136	10	-	111	7	15	33	14	21	
			93	12	16	47	7	11	
	50	-	100	11	17	48	8	15	
			122	7	13	36	9	11	
	100	-	105	8	21	47	6	12	
			113	5	21	43	2	12	
	500	-	96	9	13	50	4	21	
			105	11	24	53	6	10	
	1000	-	105	7	18	52	4	12	
			77	10	21	41	6	14	
5000	-	98	8	16	39	6	13		
		92	13	26	38	4	15		
10000	-	84	6	8	22	12	8		
		74	5	13	21	6	11		
25000	-	90	5	14	28	8	8		
		93	6	13	19	7	13		
溶媒対照 (DMSO)		+	150	6	17	53	9	25	
			117	6	24	45	11	34	
NNF-136	10	+	113	4	19	55	6	29	
			127	10	17	41	5	28	
	50	+	123	7	30	49	13	24	
			99	8	25	34	10	21	
	100	+	131	10	23	41	14	44	
			127	11	14	56	12	31	
	500	+	102	2	21	37	9	32	
			117	10	24	46	11	29	
	1000	+	118	8	17	61	6	22	
			122	8	32	50	8	21	
5000	+	98	8	20	33	5	18		
		100	8	16	35	3	9		
10000	+	106	7	15	25	3	13		
		123	8	12	21	5	20		
25000	+	127	3	16	30	4	13		
		129	4	20	38	3	24		
陽性対照	S9 Mix を 必要としないもの	名称	AF-2	ENNG	AF-2	AF-2	9-AA	2-NF	
		$\mu$ g/プレート	0.01	10	0.04	0.1	80	2	
		コロニー数 /プレート	393	>2000	968	404	>2000	336	
			407	>2000	910	353	>2000	627	
	S9 Mix を 必要とするもの	S9 Mix の有無	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
			$\mu$ g/プレート	0.5	2	40	0.5	2	0.5
		+	コロニー数 /プレート	467	304	676	277	177	203
				492	239	656	255	134	138
		-	コロニー数 /プレート	109	15	23	42	12	11
				104	12	21	39	3	2

陽性対照物質 : AF-2, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
 ENNG, N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
 9-AA, 9-aminoacridine  
 2-NF, 2-nitrofluorene  
 2-AA, 2-amino-anthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

2) Rec-assay

(資料 No. 14)

試験機関：

報告書作成年：1981年

検体の純度：

試験方法：枯草菌の組換え修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、賀田らの Rec-assay 法で DNA の損傷の誘発性を検定した。

試験結果：結果を次表に示す。

検体では、最高濃度 (10000  $\mu$ g/disk) においても両株に生育阻止帯を誘起しなかった。一方、陰性対照として用いた Kanamycin では両株に同程度の生育阻止帯を示し、陽性対照として用いた Mitomycin C では両株の間に著名な生育阻止帯の差が生じた。

薬物	濃度 ( $\mu$ g/disk)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)		0	0	0
NNF-136	20	0	0	0
	50	0	0	0
	100	0	0	0
	200	0	0	0
	500	0	0	0
	1000	0	0	0
	2000	0	0	0
	5000	0	0	0
	10000	0	0	0
Kanamycin	10	8.5	6.5	2
Mitomycin C	0.1	9.5	1	8.5

以上の結果から、フルトラニル原体は本試験条件において DNA 損傷誘発性を示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日本農薬㈱にある。

3) ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験

(資料 No. 38)

試験機関：

報告書作成年：1990年 [GLP 対応]

検体の純度：

試験方法：適合性を確認した有志の血液提供者から末梢血液を採取し、試験に用いた。15%の牛胎児血清 (FCS) 及び抗生物質を添加した Eagle MEM 培養液を用い、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% の条件でリンパ球を培養した。ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下 (+S9 処理) 及び非存在下 (-S9 処理) で検体を処理した後、定法に従って染色体標本作製し、染色体異常誘発性を検討した。ジメチルスルホキシド (DMSO) に検体を溶解し、適切な濃度に希釈して使用した。培地中での DMSO の最終濃度は 1.0% とした。陰性対照は使用溶媒の DMSO で、陽性対照はシクロフォスファミド (CP : +S9 処理) 及びエチルメタンサルフォネート (EMS : -S9 処理) で処理した。

最高濃度を 1000  $\mu$ g/ml とし、以下、500、250、125  $\mu$ g/ml の 4 濃度を検体処理濃度に設定し、各試験系いずれも 2 容器を用いて処理を実施した。

その結果、最高濃度の 1000  $\mu$ g/ml では、強い結晶析出が生じていた。また、検体処理群では陰性対照に比較して有糸分裂指数の減少がみられたが、明確な濃度依存性は観察されなかった (次頁の表)。従って、1000、500、250、125  $\mu$ g/ml の 4 濃度を標本の評価に用いた。良く拡がった分裂中期像 100 細胞を、UKEMS の変異原性試験ガイドラインで推奨している Savage\* の簡易システムに従って観察し、ギャップ、切断、交換型異常の出現について記録した。染色体異常出現頻度は、Yate の補正  $\chi^2$  検定を用い有意差を検定した。

試験結果：結果の概要を次頁以降の表に示した。

検体処理群では、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) 及び存在下 (+S9 処理) のいずれにおいても、陰性対照群に比較して統計学的に有意な染色体異常出現頻度ならびに倍数性細胞出現頻度の上昇は認められなかった。一方、陽性対照の EMS 及び CP では顕著な染色体構造異常を誘発が認められ、代謝活性化系を含む試験系が適切であったことを示していた。

以上の結果より、本実験条件化においてフルトラニル原体は、ヒトリンパ球に対する染色体異常誘発性を示さないと結論された。

---

Savage, J.R.K. (1976) Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. J. Med. Genet., 13, 103-122.

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

有糸分裂指数(MI)

濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	-S9 処理			+S9 処理			総平均	
	MI	平均	相対%	MI	平均	相対%	平均	%
0	2.5 2.8	2.65	100	3.8 2.6	3.20	100	2.93	100
125	2.5 1.7	2.10	79	1.8 1.5	1.65	52	1.88	64
250	3.4 1.7	2.55	96	7.8 1.6	4.70	147	3.63	124
500	1.2 1.2	1.20	45	1.0 1.9	1.45	45	1.33	45
1000	1.9 1.2	1.55	58	2.8 2.0	2.40	75	1.98	68
EMS 2000	1.5 2.0	1.75	66	- -	-	-	1.75	60
CP 50	- -	-	-	1.5 1.3	1.40	44	1.40	48

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

染色体異常試験結果 (要約表) :

培養時間 : 24 時間、-S9 処理

処理群	観察細胞数	各染色体異常出現数(個)						総異常数		異常細胞数	
		Gap	染色分体型		染色体型		他	+Gap	-Gap	+Gap	-Gap
			切断	交換	切断	交換	X				
陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)
検体 125 μg/ml	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	1	1	0	0	2	2	2	2
	200	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	2 (1)	2 (1)	2 (1)
検体 250 μg/ml	100	0	2	0	1	1	0	4	4	4	4
	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	200	1 (0.5)	2 (1)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	5 (2.5)	4 (2)	5 (2.5)	4 (2)
検体 500 μg/ml	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	200	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	2 (1)	0 (0)
検体 1000 μg/ml	100	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)
陽性対照 (EMS) 2 mg/ml	50	7	5	4	3	0	0	19	12	12	10
	75	10	5	12	2	1	0	30	20	18	12
	125	17 (13.6)	10 (8)	16 (12.8)	5 (4.0)	1 (0.8)	0 (0)	49 (39.2)	32 (25.6)	30 (24.0)	22 (17.6)

X: 1細胞当り異常が10個以上(総異常数には含めない)

( ): 100細胞当たりの異常数

染色体異常試験結果 (要約表) :

培養時間 : 24 時間、+ S9 処理

処理群	観察細胞数	各染色体異常出現数(個)						総異常数		異常細胞数	
		Gap	染色分体型		染色体型		他	+Gap	-Gap	+Gap	-Gap
			切断	交換	切断	交換					
陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	2	0	0	2	2	2	2
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	2 (1)	2 (1)	2 (1)
検体 125 μg/ml	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	100	1	0	0	0	1	0	2	1	2	1
	200	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	3 (1.5)	1 (0.5)	3 (1.5)	1 (0.5)
検体 250 μg/ml	100	2	0	0	1	0	0	3	1	3	1
	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	200	3 (1.5)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	4 (2)	1 (0.5)	4 (2)	1 (0.5)
検体 500 μg/ml	100	0	0	0	1	1	0	2	2	2	2
	100	2	0	0	0	0	0	2	0	2	0
	200	2 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	4 (2)	2 (1)	4 (2)	2 (1)
検体 1000 μg/ml	100	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)
陽性対照 (CP) 50 μg/ml	50	14	11	4	0	4	1	33	19	20	14
	25	8	13	2	1	0	0	24	16	14	12
	75	22 (29.3)	24 (32.0)	6 (8.0)	1 (1.3)	4 (5.3)	1 (1.3)	57 (76.0)	35 (46.7)	34 (45.3)	26 (34.7)

X: 1細胞当り異常が10個以上(総異常数には含めない)

( ):100細胞当たりの異常数

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

4) チャイニーズハムスターの肺細胞 (CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料No.22)

試験機関:

報告書作成年: 1986 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肺細胞 (CHL) を用いて、代謝活性化及び非活性化によって染色体異常誘発性を検討した。検体は DMSO に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 100 個の分裂中期像について行い、試験は 2 連制とした。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次表 (次頁) に示す。

検体は代謝活性化系の存在下で、最高用量群の標本作製 12 時間でのみ、ギャップ及び切断を主とした染色体異常の増加 (5%で有意) がみられた。これは、異常をもつ細胞が生存できず、培養系から離脱してゆくためと考えられた。標本作製 24 時間では、陰性対照群との間に有意な差はみられなかった。

一方、陽性対照として用いた MMC (マイトマイシン) 及び DMN (ジメチルニトロソアミン) は、染色体異常を示す分裂中期細胞数の明らかな増加を示した。

以上の結果より、フルトラニル原体は本試験条件下において、代謝活性化系の存在下でのみ弱い染色体異常誘発性を示すと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

in vitro 染色体異常試験の結果表

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	処理 時間	標本 作製 時間	S-9 Mix の 有無	100 細胞中 の異常細胞 数		染色体異常										異常 合計	異常数/異 常細胞					
					合計	除 ギャ ップ	ギャップ		切断		交換			無動 原体 断片	二動 原体	環状			多 重 数 の 異 常	細粉 化			
							ctd	csm	ctd	csm	tri	quad	com										
溶媒対照 (DMSO)		6	12	-	4	2	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1.5		
検体	12.1				2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
	24.3				1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	48.3				4	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	1
陽性対照 (MMC)	0.2 $\mu\text{M}$				15*	11*	10	0	8	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	21	1.4
溶媒対照 (DMSO)					6	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1
検体	12.1			13	5*	9	0	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	15	1.2	
	24.3			10	3	11	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	1.5	
	48.3			15	8**	9	0	8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	18	1.2	
陽性対照 (DMN)	560 $\mu\text{M}$			57**	48**	31	0	32	1	15	6	1	1	0	1	10	0	0	0	98	1.7		
溶媒対照 (DMSO)				6	24	-	4	3	4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	1.8
検体	12.1						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24.3	2	1				1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	
	48.3	1	0				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
陽性対照 MMC	0.2*	34**	33*				1	2	11	1	4	1	1	6	6	1	9	0	0	0	43	1.3	
溶媒対照 (DMSO)		0	0				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
検体	12.1	2	0			2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	
	24.3	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	48.3	4	3			1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	1		
陽性対照 (DMN)	560 $\mu\text{M}$	34**	26**			16	0	12	1	5	2	0	1	0	0	4	3	0	0	44	1.3		

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

ctd: 染色体型、csm: 染色体型、tri: 三放射型、quad: 四放射型、com: 複雑型

MMC: Mitomycin、DMN: Dimethylnitrosoamine



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

5) マウスを用いた小核試験

(資料No.45)

試験機関：

報告書作成年：2012年[GLP対応]

実施理由：既提出である1984年に実施したマウスを用いた小核試験(資料No.29、GLP非対応)はGLP対応ではなかったこと、1標本あたりの観察赤血球数が最新のOECDテストガイドラインで定める2000ではなく1000であったことをブラジル当局(ANVISA\*)から合致する試験成績を要求されたため、新たに試験を実施した。

検体の純度：

供試動物：slc/ICR系マウス、1群雄各5匹、投与開始時8週齢

試験方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、500、1000及び2000mg/kgで、強制的に1日1回、2日間連続して経口投与した。投与容量は10mL/kg体重とした。陽性対照群の動物にはマイトマイシンCを投与量3mg/kgで1回腹腔内投与した。検体及び陽性対照群ともに投与容量は10mL/kg体重とした。最終投与24時間後に動物を屠殺し、大腿骨から骨髓を採取した。採取した骨髓細胞をスライドグラス上でメタノール固定後、0.04%アクリジンオレンジ水溶液で染色し、骨髓標本作製した。骨髓標本を観察し、多染性赤血球(PCE)2000個中における小核を有するもの(MNPCE)の出現頻度を求めた。また、骨髓毒性の指標として全赤血球(多染性赤血球PCE + 正染性赤血球NCE)2000個中に占める多染性赤血球の割合も求めた。

用量設定根拠：

試験結果：骨髓標本の観察結果を次頁の表に示す。

いずれの投与量においても溶媒対照に比べて統計学的に有意なMNPCE頻度の高値はみられなかった。一方、陽性対照物質であるマイトマイシンCは統計学的に有意で明らかなMNPCE頻度の高値がみられ、本試験系の妥当性が確認された。骨髓毒性の指標である全赤血球(多染性赤血球+正染性赤血球)中に占める多染性赤血球の割合は、検体の1000mg/kg群のみで有意に上昇がみられたが、2000mg/kg群では対照群と同等であり、検体による影響とは考えられず、偶発的な変化と判断した。

---

ANVISA\* : Agência Nacional de Vigilância Sanitária (衛生監督局)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

以上の結果から、本試験の条件下において、フルトラニル原体は骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断された。

観察結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg) × 投与回数	性別	観察動物数	MNPCE/PCE (%) 平均±SD	PCE/[PCE+NCE] (%) 平均±SD
24	陰性対照 (0.5%MC)	0×2	雄	5	0.09±0.08	51.0±4.6
	検体	500×2		5	0.10±0.06	51.7±3.6
		1000×2		5	0.04±0.07	58.0±0.7#
		2000×2		5	0.11±0.12	46.2±7.4
	マイトマイシンC	3.0×1		5	3.76±2.48*	43.5±4.0*

MC：メチルセルロース

MNPCE：小核を有する多染性赤血球、PCE：多染性赤血球、NCE：正染性赤血球

#：p<0.05 (Dunnett 型多重比較検定)

\*：p<0.05 (Wilcoxon 検定)

6) マウスを用いた小核試験

(資料No.29)

試験機関：

報告書作成年：1984年

検体の純度：

供試動物：BDF1系マウス、1群雌雄各6匹、投与開始時7週齢

試験方法：検体を2%Tween80水溶液に懸濁し、胃ゾンデを用いてマウスへ強制経口投与した。

1回投与法においては、投与量6400、8000または10000mg/kgで投与し、反復投与法においては投与量10000mg/kgで4日間にわたり24時間間隔で反復投与した。1回投与法の10000mg/kg群、反復投与法の各群においては投与12、24、48及び72時間後に動物を屠殺し、大腿骨から骨髓を採取した。1回投与法の6400及び8000mg/kg群では投与24時間後に屠殺し、大腿骨から骨髓を採取した。採取した骨髓細胞をスライドグラス上でメタノール固定後、ギムザ液で染色し、骨髓標本を作製した。陽性対照群の動物にはマイトマイシンCを投与量2.0mg/kgで1回腹腔内投与した。骨髓標本を観察し、多染性赤血球(PCE)1000個中における小核を有するもの(MNPCE)の出現頻度を求めた。また、骨髓毒性の指標として全赤血球(多染性赤血球PCE + 正染性赤血球NCE)1000個中に占める多染性赤血球の割合も求めた。

用量設定根拠：

試験結果：骨髓標本の観察結果を次頁の表に示す。

単回投与法及び反復投与法のいずれの投与条件においても、また、いずれの性、投与量ないし標本作製時間においても溶媒対照に比べて統計学的に有意なMNPCE頻度の高値はみられなかった。一方、陽性対照物質であるマイトマイシンCは統計学的に有意で明らかなるMNPCE頻度の高値がみられ、本試験系の妥当性が確認された。

骨髓毒性の指標である全赤血球(多染性赤血球+正染性赤血球)中に占める多染性赤血球の割合について、いずれの条件下でも特に変化はみられなかった。

以上の結果から、本試験の条件下において、フルトラニル原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。

小核試験の結果表

試験物質		投与量(mg/kg) × 投与回数	採取 時間 (hr)	性別	観察 動物 数	PCE/[PCE+NCE] 平均(%)	MNPCE/PCE 平均(%)
単 回 投 与	検体	対照 0×1	12	雄	6	58.5	0.05
		10000×1				65.6	0.13
		対照 0×1	24			64.8	0.13
		10000×1				63.9	0.15
	対照 0×1	48	56.5			0.13	
	10000×1		60.7			0.08	
	対照 0×1	72	57.2			0.03	
	10000×1		54.6			0.13	
	マイトマイシンC	2.0×1	24			49.7	4.48***
	検体	対照 0×1	12	雌	6	57.2	0.10
10000×1		63.2				0.02	
対照 0×1		24	55.9			0.05	
10000×1			65.8			0.05	
対照 0×1	48	54.0	0.03				
10000×1		64.9	0.10				
対照 0×1	72	54.5	0.05				
10000×1		55.9	0.13				
マイトマイシンC	2.0×1	24			52.2	3.92***	
検体	対照 0×1	24	雄	6	59.8	0.07	
	6400×1				56.1	0.05	
	8000×1				60.1	0.08	
	対照 0×1	24			雌	57.5	0.08
6400×1	61.2		0.10				
8000×1	62.9	0.12					
反 復 投 与	検体	対照 0×4	12	雄	6	61.4	0.12
		10000×4				59.1	0.17
		対照 0×4	24			60.9	0.03
		10000×4				65.1	0.07
	対照 0×4	48	63.3			0.15	
	10000×4		57.4			0.07	
	対照 0×4	72	67.4			0.13	
	10000×4		66.2			0.13	
	検体	対照 0×4	12	雌	6	65.9	0.13
		10000×4				63.8	0.10
対照 0×4		24	61.4			0.20	
10000×4			62.2			0.07	
対照 0×4	48	60.5	0.12				
10000×4		61.5	0.02				
対照 0×4	72	60.5	0.15				
10000×4		60.1	0.05				

MNPCE: 小核を有する多染性赤血球、PCE: 多染性赤血球、NCE: 正染性赤血球  
(Kastenbaum-Bowman の検定を実施したが有意差なし)

7) ラット初代肝細胞を用いる *in vitro* 不定期 DNA 合成試験

(資料 No. 39)

試験機関：

報告書作成年：1989年 [GLP 対応]

検体の純度：

試験方法：8～12週齢の Wistar CF HB 系雄ラット肝臓からコラゲナーゼ灌流法により単離肝細胞を得、Williams E 培養液を用い、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% の条件で培養した。アセトンに検体を溶解し、適切な濃度に希釈して使用した。溶媒対照はアセトンで、陽性対照は 2-アセチルアミノフルオレン (2AAF) で処理した。

予備試験において、肝細胞を播種した 6 ウェルプレートに CO<sub>2</sub> インキュベーターで約 1.5 時間培養して細胞を接着させた後、<sup>3</sup>H-TdR と共に各濃度の検体溶液を培養液に添加した。培養 18 時間後、各ウェルの細胞をクエン酸ナトリウム水溶液で低張処理し、メタノール：酢酸液で固定した。ニュートラルレッド取り込み法により細胞生存率を求めた。予備試験では 10 濃度設定し、各濃度とも 2 ウェルを用いた。最高濃度の 80.0 μg/ml で培養液中に検体の析出が認められた。しかし、いずれの濃度においても重度の細胞毒性作用は観察されなかった。従って、0.01～80.00 μg/ml の 10 濃度で細胞を処理し、2.67、8.00、26.67、53.33 及び 80.00 μg/ml の 5 濃度について UDS の評価を実施した。各濃度それぞれ 3 ウェルを使用した。

UDS 試験は、予備試験と同様の手法で実施した。処理が終了した標本を写真用乳剤でコーティングした後、4°C で 7 日間露光させた。次いで、標本を現像・固定した後、アセトオルセインで染色した。コード化したスライドを顕微鏡下で観察し、自動カウンターによりグレイン数を計数した。実験は独立して 2 回実施され、1 用量につき最低 2 スライド、1 スライドにつき 50 細胞を評価した。強度にラベルされた S 期細胞については計数から除外した。また、検体処理群の核及びネット核グレイン数が陰性対照群の範囲内であったことから、統計学的評価を実施しなかった。

試験結果：結果の概要を次頁以降の表に示した。

実験 I では、検体処理群における核グレイン数及びネット核グレイン数はそれぞれ 20.51～30.84、-4.46～6.30 の範囲内であった。実験 II では同様に 14.10～19.78、-1.11～1.28 の範囲内であり、陰性対照と同等であった。陽性対照 (2-AAF) では、明確で再現性のある核及びネット核グレイン数の増加を示し、試験系が適切であったことが確認された。

以上の結果より、フルトラニル原体のラット初代肝細胞を用いた不定期 DNA 合成誘発性は陰性であり、フルトラニル原体は DNA 損傷誘発性を示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日本農薬㈱にある。

細胞毒性試験の結果表

処理群	濃度 μg/ml	予備試験	実験 I	実験 II
		相対細胞生存率	相対細胞生存率	相対細胞生存率
溶媒対照	0	100	100	100
陽性対照 (2AAF)	0	-	32	13
検体	0.01	-	85	60
	0.03	-	85	105
	0.08	99	96	87
	0.27	118	85	90
	0.53	94	-	-
	0.80	121	82	102
	2.67	133	104	100
	5.33	125	-	-
	8.00	91	78	100
	26.67	75	99	93
	53.33	68	54	72
80.00	81	39	91	

-: 試験せず.

陽性対照 2AAF: 2-アセチルアミノフルオレン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

UDS 試験結果表 (実験 I)

処理群	濃度 μg/ml	グレイン数 (100細胞; 平均 ± 標準偏差)		
		核グレイン数	細胞質グレイン数	差し引き後核グレイン数
陰性対照 (培養液)	-	29.78 ± 8.58	26.73 ± 7.17	3.05 ± 7.48
溶媒対照 (アセトン)	0	22.70 ± 10.10	21.36 ± 9.57	1.34 ± 5.14
陽性対照 (2AAF)	2.23	69.39 ± 25.83	16.19 ± 7.22	53.20 ± 23.44
検体	2.67	23.49 ± 10.62	23.24 ± 8.65	0.25 ± 5.90
	8.00	30.84 ± 7.49	24.54 ± 6.57	6.30 ± 6.13
	26.67	21.11 ± 6.82	25.57 ± 8.03	-4.46 ± 7.06
	53.33	23.97 ± 8.29	22.95 ± 8.19	1.02 ± 5.97
	80.00	20.51 ± 6.92	21.12 ± 8.33	-0.61 ± 6.58

陽性対照 2AAF: 2-アセチルアミノフルオレン

UDS 試験結果表 (実験 II)

処理群	濃度 μg/ml	グレイン数 (100細胞; 平均 ± 標準偏差)		
		核グレイン数	細胞質グレイン数	差し引き後核グレイン数
陰性対照 (培養液)	-	13.26 ± 6.78	12.87 ± 6.65	0.39 ± 4.18
溶媒対照 (アセトン)	0	20.07 ± 7.05	19.39 ± 7.79	0.68 ± 4.86
陽性対照 (2AAF)	2.23	54.16 ± 25.20	7.61 ± 3.65	46.55 ± 23.61
検体	2.67	14.87 ± 4.30	15.98 ± 4.69	-1.11 ± 4.40
	8.00	19.78 ± 6.79	19.52 ± 7.75	0.26 ± 4.79
	26.67	15.04 ± 4.43	13.76 ± 4.45	1.28 ± 3.41
	53.33	14.10 ± 5.38	13.08 ± 4.71	1.02 ± 4.36
	80.00	16.20 ± 6.81	16.36 ± 6.02	-0.16 ± 4.90

陽性対照 2AAF: 2-アセチルアミノフルオレン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

8) マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いる細胞遺伝子変異試験

(資料 No. 37)

試験機関：

報告書作成年：1989 年 [GLP 対応]

検体の純度：

試験方法：自然発生変異体を減らすために、HAT-培地で L5178Y 細胞を 1 日培養した。10%の牛胎児血清 (FCS) を添加した RPMI 1640 培養液を用い、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 4.5% の条件でクリーニングを終えた細胞を培養した。ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下 (+S9 処理) 及び非存在下 (-S9 処理) で検体を処理した。アセトンに検体を溶解し、適切な濃度に希釈して使用した。培地中でのアセトンの最終濃度は 1.0% 以下とした。陰性対照は無処理、溶媒対照はアセトンで、陽性対照はエチルメタンサルフォネート (EMS：-S9 処理) 及び 3-メチルコラントレン (3-MC：+S9 処理) で処理した。

牛胎児血清 (FCS) を含まない RPMI 1640 培養液に細胞を浮遊させ、各濃度の検体を 4 時間暴露させた (1 濃度当り 1 フラスコ)。発現及び増殖のためにさらに 2 日間培養を続け、細胞濃度を処理後 24 及び 48 時間に計数し、各処理群の相対細胞増殖を算出した。発現期間終了後、細胞を軟寒天培地に播種し、CO<sub>2</sub> 濃度 4.5%、37°C の条件で 11 ~ 13 日間培養した。サイズの大小を区別せずに、寒天培地上のコロニーを計数した。

用量設定根拠：

試験結果：結果の概要を次頁以降の表に示す。

実験 I では、検体処理群で突然変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。実験 II において、-S9 処理の 60.0 及び 100.0  $\mu\text{g/ml}$ 、+S9 処理の 6.0、30.0、60.0 及び 100.0  $\mu\text{g/ml}$  で突然変異頻度が溶媒対照群の 2 倍以上に増加した。しかし、これらの増加は溶媒対照での自然発生突然変異頻度 (-S9 mix 処理で 4.4/10<sup>6</sup> 細胞、+S9 mix 処理で 0.0/10<sup>6</sup> 細胞) が極めて低かったことが原因であった。さらに、各検体濃度で処理した群の突然変異頻度は、当該試験での陰性対照の範囲内またはそれと同程度であり、背景データ (10<sup>6</sup> 細胞当たり 0.0 ~ 32.0 突然変異体) の範囲内でもあった。従って、これらの見かけ上の増加は、生物学的な妥当性があるとは考えられなかった。一方、陽性対照物質として用いたエチルメタンサルフォネート及び 3-メチルコラントレンでは明らかな突然変異頻度の増加が観察された。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

以上の結果より、フルトラニル原体は本実験条件下において L5178Y 細胞に対する遺伝子突然変異誘発性を示さないと判断された。

実験 I ; 細胞毒性試験

処理群	濃度 μg/ml	S9 Mix	24 時間処理後の 相対細胞増殖率 (%)	48 時間処理後の 相対細胞増殖率 (%)
陰性対照	0	-	100.0	100.0
溶媒対照 <sup>1)</sup>	0	-	100.0	100.0
陽性対照 (EMS)	800	-	145.8	101.0
検体	6	-	80.4	84.0
	15	-	69.2	83.1
	30	-	76.6	94.2
	60	-	51.4	55.1
	80	-	70.1	90.8
	100	-	56.1	70.8
陰性対照	0	+	100.0	100.0
溶媒対照 <sup>1)</sup>	0	+	100.0	100.0
溶媒対照 <sup>2)</sup>	0	+	100.0	100.0
陽性対照 (3-MC)	3	+	88.2	88.2
検体	6	+	132.1	99.8
	15	+	109.6	88.9
	30	+	84.2	68.2
	60	+	41.6	20.3
	80	+	40.7	20.7
	100	+	37.3	16.5

1): アセトン 2): DMSO (3-MC の溶媒)

実験 I ; 変異原性試験

処理群	濃度 μg/ml	S9 Mix	平均 細胞数 <sup>1)</sup>	プレート 効率 <sup>2)</sup>	突然変異数 平均±SD	10 <sup>6</sup> 細胞当たり の突然変異 コロニー数
陰性対照	0	-	117.0	0.59	0.30 ± 0.67	5.1
溶媒対照 <sup>3)</sup>	0	-	127.5	0.64	1.50 ± 1.08	23.4
陽性対照 (EMS)	800	-	20.0	0.10	5.20 ± 4.02	520.0
検体	6	-	138.0	0.69	0.70 ± 0.82	10.1
	15	-	140.5	0.70	1.10 ± 1.29	15.7
	30	-	139.5	0.70	0.60 ± 1.58	8.6
	60	-	152.5	0.76	0.00 ± 0.00	0.0
	80	-	148.5	0.74	0.70 ± 1.06	9.5
	100	-	143.5	0.72	0.10 ± 0.32	1.4
陰性対照	0	+	151.5	0.76	0.60 ± 0.84	7.9
溶媒対照 <sup>3)</sup>	0	+	142.5	0.71	1.00 ± 0.94	14.1
溶媒対照 <sup>4)</sup>	0	+	136.0	0.68	1.20 ± 0.79	17.6
陽性対照 (3-MC)	3	+	136.5	0.68	6.00 ± 4.35	88.2
検体	6	+	143.0	0.72	1.00 ± 0.94	13.9
	15	+	141.5	0.71	1.70 ± 2.00	23.9
	30	+	127.5	0.64	0.90 ± 0.57	14.1
	60	+	136.5	0.68	0.90 ± 1.20	13.2
	80	+	143.5	0.72	1.10 ± 0.99	15.3
	100	+	137.5	0.69	2.10 ± 1.60	30.4

1) : 播種した 200 細胞あたりの出現コロニー数

2) : 出現コロニー数 / 200 (播種細胞数)

3) : アセトン、4) : DMSO (3-MC の溶媒)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

実験Ⅱ； 細胞毒性試験

処理群	濃度 μg/ml	S9 Mix	24 時間処理後の 相対細胞増殖率 (%)	48 時間処理後の 相対細胞増殖率 (%)
陰性対照	0	-	100.0	100.0
溶媒対照 <sup>1)</sup>	0	-	100.0	100.0
陽性対照 (EMS)	800	-	112.1	58.8
検体	6	-	90.1	89.7
	30	-	84.7	77.3
	60	-	65.8	64.7
	100	-	92.6	75.9
陰性対照	0	+	100.0	100.0
溶媒対照 <sup>1)</sup>	0	+	100.0	100.0
溶媒対照 <sup>2)</sup>	0	+	100.0	100.0
陽性対照 (3-MC)	3	+	77.3	64.6
検体	6	+	100.2	101.2
	30	+	66.5	81.3
	60	+	33.8	39.4
	100	+	36.3	37.4

1): アセトン    2): DMSO(3-MCの溶媒)

実験Ⅱ； 変異原性試験

処理群	濃度 μg/ml	S9 Mix	平均 細胞数 <sup>1)</sup>	プレート 効率 <sup>2)</sup>	突然変異数 平均±SD	10 <sup>6</sup> 細胞当 りの突然変異 コロニー数
陰性対照	0	-	171.5	0.86	2.10 ± 1.20	24.4
溶媒対照 <sup>3)</sup>	0	-	181.0	0.91	0.40 ± 0.70	4.4
陽性対照 (EMS)	800	-	122.0	0.61	8.60 ± 3.84	141.0
検体	6	-	126.5	0.63	0.30 ± 0.48	4.8
	30	-	117.5	0.59	0.30 ± 0.48	5.1
	60	-	144.5	0.72	1.50 ± 2.64	20.8
	100	-	101.5	0.51	1.10 ± 1.85	21.6
陰性対照	0	+	178.0	0.89	1.90 ± 1.85	21.3
溶媒対照 <sup>3)</sup>	0	+	175.0	0.88	0.00 ± 0.00	0.0
溶媒対照 <sup>4)</sup>	0	+	184.5	0.92	2.00 ± 2.05	21.7
陽性対照 (3-MC)	3	+	115.5	0.58	9.00 ± 3.46	155.2
検体	6	+	167.5	0.84	0.80 ± 0.63	9.5
	30	+	145.5	0.73	2.20 ± 1.93	30.1
	60	+	175.0	0.88	2.50 ± 1.65	28.4
	100	+	143.5	0.72	0.20 ± 0.42	2.8

1) : 播種した 200 細胞あたりの出現コロニー数

2) : 出現コロニー数/200 (播種細胞数)

3) : アセトン      4) : DMSO(3-MC の溶媒)

9) フルトラニル原体の雄マウスを用いた優性致死試験

(資料 No. 46)

試験機関：

報告書作成年：2002年 [インド国 GLP 対応]

検体の純度：

供試動物：スイスアルビノマウス、雄 5 匹/群、雌 15 匹/交配週

体重 雄 23~30g、雌については記載なし

投与期間：5 日間

投与方法：検体を植物油に懸濁し、0、500、1000 または 2000mg/kg の投与量で雄マウスに 5 日間反復強制経口投与した。最終投与後 24 時間以内に雄 1 匹に対し未交配の雌 3 匹と同居させた。雌に膣栓あるいは精子が認められた場合、交尾が成立したと判断した。全群の雄は毎週、新しい未交配の雌 3 匹と同居させた。対照群及び検体投与群の雄は 8 週間連続して交配を行い、精原細胞からの精子形成の全段階を包含する期間とした。

陽性対照物質としてシクロホスファミドを 20mg/kg、同様に 5 日間連続して雄に腹腔内投与した。同様に雌と交配させた。陽性対照群の交配は 6 週間のみとした。

用量設定根拠：

試験方法：妊娠が確認された母動物は個別に飼育し、妊娠 14 日に頸部脱臼により屠殺して子宮内観察を行い、着床部位数及びその生死、卵巣の黄体数を計測した。

雌動物の検査に基づき、以下のパラメータを算出した。

妊娠率は、交配に用いた雌動物数に対する妊娠動物数から求めた。

$$\text{着床前胚死亡率(\%)} = \frac{\text{黄体数} - \text{着床数}}{\text{黄体数}} \times 100$$

$$\text{着床胚の生存率(\%)} = \frac{\text{生存着床胚数}}{\text{着床数}} \times 100$$

優性致死による胚死亡率(\%) =

$$1 - \frac{\text{投与群の妊娠母動物毎の生存着床胚数}}{\text{対照群の妊娠母動物毎の生存着床胚数}} \times 100$$

また、雄動物について、試験期間を通じて一般状態及び生死を毎日観察した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

試験結果 :

試験群	対照群 0mg/kg							
投与～交配までの期間(週)	1	2	3	4	5	6	7	8
妊娠率(%)	80.00	73.33	66.67	80.00	73.33	66.67	80.00	66.67
黄体数(母動物当り)	13.55	13.70	13.36	13.36	13.27	12.64	12.90	12.89
総着床数(母動物当り)	12.64	12.70	12.55	12.27	12.00	11.64	12.10	12.00
死亡胚率(%, 母動物当り)	1.00	1.30	1.18	1.27	1.09	1.27	1.30	1.56
生存着床胚数(母動物当り)	11.64	11.40	11.36	11.00	10.91	10.36	10.80	10.44
着床前胚死亡率(%)	6.71	7.30	6.12	8.16	9.59	7.91	6.20	6.90
着床胚の生存率(%)	92.09	89.76	90.58	89.63	90.91	89.06	89.26	87.04
試験群	検体 500mg/kg							
投与～交配までの期間(週)	1	2	3	4	5	6	7	8
妊娠率(%)	80.00	66.67	73.33	80.00	66.67	80.00	66.67	80.00
黄体数(母動物当り)	12.60	13.10	13.13	12.90	12.70	13.10	12.20	12.60
総着床数(母動物当り)	11.80	12.00	12.00	11.90	11.90	12.10	11.60	12.00
死亡胚率(%, 母動物当り)	1.40	1.50	1.38	1.30	1.30	1.60	1.30	1.30
生存着床胚数(母動物当り)	10.40	10.50	10.63	10.60	10.60	10.50	10.30	10.70
着床前胚死亡率(%)	6.35	8.40	8.57	7.75	6.30	7.63	4.92	4.76
着床胚の生存率(%)	88.14	87.50	88.54	89.08	89.08	86.78	88.79	89.17
優性致死率*	10.65	7.89	6.43	3.64	2.84	0.00	4.63	0.00
試験群	検体 1000mg/kg							
投与～交配までの期間(週)	1	2	3	4	5	6	7	8
妊娠率(%)	66.67	80.00	73.33	66.67	80.00	73.33	66.67	73.33
黄体数(母動物当り)	12.56	12.33	12.78	13.38	13.11	12.00	13.00	13.33
総着床数(母動物当り)	12.11	11.67	12.00	12.38	12.44	11.33	12.33	12.67
死亡胚率(%, 母動物当り)	1.00	1.56	1.33	0.88	1.22	1.78	1.44	0.89
生存着床胚数(母動物当り)	11.22	10.11	9.33	11.50	11.22	9.56	10.89	11.78
着床前胚死亡率(%)	3.54	5.41	6.09	7.48	5.08	5.56	5.13	5.00
着床胚の生存率(%)	92.66	86.67	77.78	92.93	90.18	84.31	88.29	92.98
優性致死率*	3.60	11.32	17.86	0.00	0.00	7.72	0.00	0.00
試験群	検体 2000mg/kg							
投与～交配までの期間(週)	1	2	3	4	5	6	7	8
妊娠率(%)	73.33	80.00	66.67	66.67	73.33	80.00	80.00	73.33
黄体数(母動物当り)	12.33	13.33	12.78	13.00	12.22	12.67	11.78	11.11
総着床数(母動物当り)	11.89	12.67	11.78	12.33	11.56	12.33	11.33	10.44
死亡胚率(%, 母動物当り)	1.56	1.00	1.11	1.00	1.33	1.22	1.56	1.22
生存着床胚数(母動物当り)	10.33	11.67	10.67	11.33	10.22	11.11	9.78	9.22
着床前胚死亡率(%)	3.60	5.00	7.83	5.13	5.45	2.63	3.77	6.00
着床胚の生存率(%)	86.92	92.11	90.57	91.89	88.46	90.09	86.27	88.30
優性致死率*	11.25	0.00	6.07	0.00	6.32	0.00	9.44	11.68

優性致死率\* : 優性致死による胚死亡率(%)  $\chi^2$ 検定で有意差なし。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

試験群	陽性対照群 20mg/kg					
	1	2	3	4	5	6
投与～交配までの期間						
妊娠率(%)	46.67	40.00	40.00	33.33	33.33	33.33
黄体数(母動物当り)	12.8	13.25	11.6	12.8	12.5	12.2
総着床数(母動物当り)	5.4	5.5	5.2	5.6	4.75	4.6
死亡胚率(%, 母動物当り)	1.6	1.25	1	1.2	1	1.4
生存胚数(母動物当り)	3.8	4.25	4.2	4.4	3.75	3.2
着床前卵消失(%)	57.81	58.49	55.17	56.25	62.00	62.30
生存率(%)	70.37	77.27	80.77	78.57	78.95	69.57
優性致死率*	67.35	62.72	63.03	60.00	65.63	69.40

優性致死率\*：優性致死による着床前及び着床後の死亡率(%)

観察期間を通じて雄に死亡はみられず、また一般状態の変化はみられなかった。

検体投与群の雌の妊娠率、母動物あたりの黄体数、総着床数及び着床胚の生存率は対照群と比較して統計学的有意差は認められなかった。また優性致死性による胚死亡率にも検体投与の影響は認められた。

陽性対照群では妊娠率及び着床数は対照群に比べ低下し、優性致死による胚死亡率は60.00-69.40%であった。

フルトラニル原体を雄マウスに2000mg/kg体重で5日間反復経口投与し8週間にわたり雌と交配させた結果、いずれの雌にも優性致死率の上昇はみられなかったことから、フルトラニル原体は優性致死性において変異原性は陰性と判断される。

(14) 生態機能影響

一般薬理試験

(資料 No. 18)

試験機関：

報告書作成年：1982年

検体の純度：

1) 中枢神経系に対する作用

①マウスの一般症状に及ぼす影響

供試動物：dd系雄性マウス(体重26~37g)1群5匹

投与方法：強制経口投与

投与量：0、300、1000、3000 mg/kg

試験方法：投与後168時間まで経時的に洗顔、発声、自発運動、反射等23の項目について観察した。

結果：いずれの用量群においても諸検査項目に影響は認められなかった。

②マウスのヘキソバルビタール睡眠時間に及ぼす影響

供試動物：dd系雄性マウス(体重26~37g)1群5匹

投与方法：強制経口投与

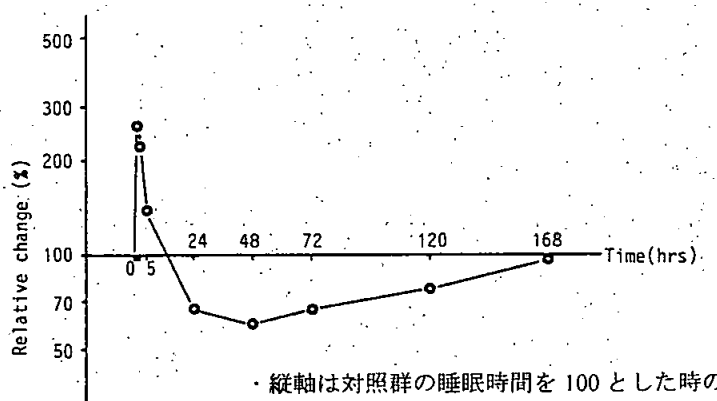
投与量：試験1(経時的検査) 0、1000 mg/kg

試験2(用量依存性検査) 1時間後 0、30、100、300、1000 mg/kg

48時間後 0、30、100、300、1000 mg/kg

検体投与後、各所定時間にヘキソバルビタール(100 mg/kg)を腹腔内に投与し、正向反射の消失を指標に睡眠時間を測定した。

結果：試験1の結果を次図に示す。検体投与1時間後をピークに睡眠時間は延長した。その後、検体投与24~48時間後をピークとする睡眠時間の短縮が観察された。



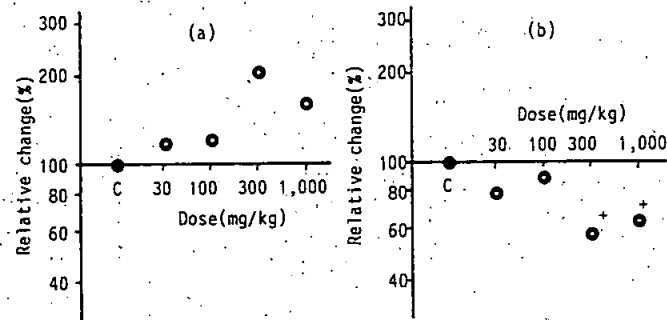
・縦軸は対照群の睡眠時間を100とした時の1000mg/kg群の睡眠時間の相対値を示す。  
・横軸は検体の単回経口投与後の経過時間を示す。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

試験 2 の結果を次図に示す。検体投与 1 時間後の睡眠時間の延長及び 48 時間後の短縮はともに 300 mg/kg 以上で認められた。

睡眠時間の変化は二相性であったことから、中枢神経系に対する作用ではなく肝薬物代謝酵素に対する影響と推察された。



- ・ 図(a)(b)ともに縦軸は対照群の睡眠時間を 100 とした時の各検体投与群の睡眠時間の相対値を示す。
- ・ 図(a)は、検体投与 1 時間後における各検体投与群の睡眠時間の相対値を示す。
- ・ 図(b)は、検体投与 48 時間後における各検体投与群の睡眠時間の相対値を示す。

### ③マウスの体温に及ぼす影響

供試動物 : dd 系雄性マウス (体重 26~37 g) 1 群 5 匹

投与方法 : 強制経口投与

投与量 : 0、300、1000、3000 mg/kg

試験方法 : 検体投与 3 時間前から投与 48 時間後まで経時的に可動電極を用いて直腸温を測定した。

結 果 : 検体投与によると考えられる変化は認められなかった。

## 2) 呼吸・循環器系に対する作用

ウサギの呼吸、血圧に及ぼす影響

供試動物 : 日本在来種白色雄性ウサギ (体重 2.2~3.5 kg) 1 群 3 匹

投与方法 : 耳介静脈内投与

投与量 : 0、1、3、10、30、100、200 mg/kg

試験方法 : ウレタン麻酔下にて観血的方法で呼吸及び頸動脈圧の変化をキモグラフオンに記録した。

結 果 : 100 mg/kg 以上の投与で呼吸抑制及び血圧の緩徐で軽度な低下を認めたが、その影響は一過性で暫時回復した。

### 3) 消化器系に対する作用

#### ①マウスの腸管内炭末輸送に及ぼす影響

- 供試動物 : dd系雄性マウス (体重 26~37 g) 1群 5匹  
投与方法 : 強制経口投与  
投与量 : 0、1000 mg/kg  
試験方法 : フルトラニル投与後、1、2、5及び24時間目に炭末を強制経口投与して20分間の炭末移動距離を測定した。  
結 果 : 時間依存性の明らかな変化は認められなかった。

#### ②ラットの胃液分泌に及ぼす影響

- 供試動物 : SD系雄性ラット (体重 210~270 g) 1群 5匹  
投与方法 : 尾静脈内投与  
投与量 : 0、10、30、100 mg/kg  
試験方法 : Shayの方法 (1945年) に準じ、幽門結紮法で胃液量、酸度及びペプシン活性を測定した。  
結 果 : フルトラニル投与に伴う変化は認められなかった。

### 4) 腎機能に及ぼす作用

#### ラットの尿排泄に及ぼす影響

- 供試動物 : SD系雄性ラット (体重 210~270 g) 1群 4~5匹  
投与方法 : 強制経口投与  
投与量 : 試験1 (経時的検査) 1000 mg/kg  
試験2 (用量依存性検査) 0、100、300、1000 mg/kg  
試験方法 : 試験1では検体投与の1、2、5及び24時間後に、また試験2では24時間後に生理食塩水を2.5 ml/100 gの割合で経口負荷し、代謝ケージ内で6時間の尿を集め、尿量、ウロビリノーゲン、潜血、ビリルビン、ケトン体、糖、蛋白及びpHを検査した。なお、生理食塩水負荷前18時間と試験中は絶食し、生理食塩水負荷前2時間と試験中は絶水した。  
結 果 : 1000 mg/kgの24時間前投与でのみ尿量が低下した。その他では変化は認められなかった。尿成分については、いずれも異常は認められなかった。

### 5) 血液に対する作用

#### 溶血性試験 (*in vitro*)

- 供試血液 : 日本在来種白色雄性ウサギ (体重 2.2~3.5 kg) の耳介静脈より採血  
試験方法 : ウサギの血液を生理食塩水で洗浄し、希釈して一定濃度の赤血球浮遊液

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

を作成した。これに所定濃度の検体を添加し（最終濃度、0、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  g/ml）38℃で2時間インキュベートし、上清の575 mμにおける吸光度を測定して溶血の程度を調べた。

結 果 : いずれの濃度においても溶血は認められなかった。

結 論 :

以上の成績よりフルトラニルの薬理作用は極めて軽微であると判断する。

「一般薬理試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要	
中枢神経系	一般症状	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 300, 1000, 3000	♂5	-	3000	作用なし
	ヘキソバルビ タル睡眠 時間	マウス		経時的検査: 0, 1000 用量依存性検査: 0, 30, 100, 300, 1000	♂5	300	100	≥300mg/kg: 睡眠時間の 延長又は短 縮あり
	直腸体温	マウス		0, 300, 1000, 3000	♂5	-	3000	作用なし
呼吸・循環器 呼吸血圧	ウサギ (麻醉下)	静脈内 (10%HCO-4 0含有生理 食塩水)	0, 1, 3, 10, 30, 100, 200	♂3	100	30	≥100mg/kg: 呼吸抑制及 び血圧低下	
消化器	腸管運動 炭粉輸 送能	マウス	経口 (オリーブ油)	0, 1000	♂5	-	1000	作用なし
	胃液分泌	ラット	静脈内 (10%HCO-4 0含有生理 食塩水)	0, 10, 30, 100	♂5	-	100	作用なし
腎機能	尿排泄	ラット	経口 (オリーブ油)	経時的検査: 0, 1000 用量依存性検査: 0, 30, 100, 300, 1000	♂4~5	1000	300	1000mg/kg: 尿量低下
血液	溶血 ( <i>in vitro</i> )	ウサギ	赤血球浮遊液にフルトラニルを添加し（最終濃度で $10^{-8}$ ~ $10^{-4}$ g/mL）、培養後に上清の吸光度を測定した。		-	10 <sup>-4</sup> g/mL まで溶血 なし	作用なし	

(15) その他

1) アンドロゲン受容体結合アッセイ

(資料 No. 47)

試験機関：

報告書作成年：2011年

実施目的と経緯：米国 EPA の Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) の Tier 1 Screening battery (October 2009) のスクリーニング対象物質として他の 67 農薬とともに Tier 1 Screening battery の試験が要求されたため本試験を実施した。尚、フルトラニルの選定にあたり本剤の毒性学的プロファイルは関連せず、生産量によるものであった。

本試験はアンドロゲン受容体へのアンドロゲンの結合に対する影響を検討するため、アンドロゲン受容体を用いた結合アッセイを実施した。以下のテストガイドラインに従った； U. S. EPA： Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines, OPPTS 890.1150: Androgen Receptor Binding (Rat Prostate Cytosol) (October 2009)

被験物質：フルトラニル

試験方法：受容体成分として、去勢ラットの前立腺抽出液を用いた。塩類溶液に溶解した受容体成分に、放射ラベルした合成アンドロゲン  $^3\text{H-R1881}$  および被験物質を混合、冷蔵庫で 20~24 時間インキュベート後、受容体成分を hidroキシアパタイト (HAP) により回収し、結合した放射エネルギーを測定した。

また、陽性対照物質としては強い競合剤としてジヒドロテストステロン (DHT)、弱い競合剤としてデキサメタゾンについても結合実験を行い、試験系の感受性を確認した。

結果：溶媒対照 (エタノール) の特異的結合放射エネルギーを 100%として、各種の被験物質添加時の特異的結合放射エネルギーの割合 (%) を次図に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

AR に対する  $[^3\text{H}]$ -R1881 の結合は、DHT およびデキサメタゾンにより明らかに阻害された。算出された DHT の  $\text{IC}_{50}$  値 (7.1 nM) は、他の試験施設のバリデーション試験で報告された  $\text{IC}_{50}$  値 (2.4 nM ; Errol Zeiger, Integrated Summary Report for the Validation of an Androgen Receptor Binding Assay As a Potential Screen in the Endocrine Disruptor Screening Program, U.S. Environmental Protection Agency, November 7, 2007) と同程度であり本試験の妥当性が確認できた。一方、1.0~30  $\mu\text{M}$  のフルトラニル存在下において、AR と  $[^3\text{H}]$ -R1881 との結合は影響を受けなかった。

フルトラニルは AR へのアンドロゲン結合に影響を与えないものと考えられた。

2) アンドロゲン受容体結合アッセイ

(資料 No. 48)

試験機関：

報告書作成年：2011年[GLP 対応]

実施目的と経緯：米国 EPA の Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) の Tier 1 Screening battery (October 2009) のスクリーニング対象物質として他の 67 農薬とともに Tier 1 Screening battery の試験が要求されたため本試験を実施した。尚、フルトラニルの選定にあたり本剤の毒性学的プロファイルは関連せず、生産量によるものであった。

本試験はアンドロゲン受容体へのアンドロゲンの結合に対する影響を検討するため実施した。以下のテストガイドラインに従った；

U.S. EPA： Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines, OPPTS 890.1150: Androgen Receptor Binding (Rat Prostate) (October 2009)

被験物質：フルトラニル

試験方法：受容体成分として、去勢ラットの前立腺抽出液を用いた。塩類溶液に溶解した受容体成分に、放射ラベルした合成アンドロゲン  $^3\text{H}$ -R1881 および被験物質を混合、2～8℃で 16～20 時間インキュベート後、受容体成分をハイドロキシアパタイト (HAP) により回収し、結合した放射エネルギーを測定した。

また、陽性対照物質としては強い競合剤として放射ラベルしていない合成アンドロゲン R1881、弱い競合剤としてデキサメタゾンについても結合実験を行い、試験系の感受性を確認した。

結果：溶媒対照 (エタノール) の特異的結合放射エネルギーを 100%として、各種の被験物質添加時の特異的結合放射エネルギーの割合 (%) を次図に示す。

AR に対する [ $^3\text{H}$ ]-R1881 の結合は、非放射標識 R1881 およびデキサメタゾンにより明らかに阻害された。一方、100  $\mu\text{M}$  までの濃度のフルトラニル存在下において、AR と [ $^3\text{H}$ ]-R1881 との結合は影響を受けなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

フルトラニルは AR へのアンドロゲン結合に影響を与えないものと考えられた。

3) アロマターゼ試験

(資料 No. 49)

試験機関：

報告書作成年：2011年[GLP 対応]

実施目的と経緯：米国 EPA の Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) の Tier 1 Screening battery (October 2009) のスクリーニング対象物質として他の 67 農薬とともに Tier 1 Screening battery の試験が要求されたため本試験を実施した。尚、フルトラニルの選定にあたり本剤の毒性学的プロファイルは関連せず、生産量によるものであった。

本試験はアロマターゼ阻害による内分泌系への影響を評価することを目的とした。本試験は以下のテストガイドラインに従った。

Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines, OPPTS 890.1200: Aromatase (Human Recombinant) (October 2009)

被験物質：フルトラニル、

試験方法：購入した Human CYP19 (Aromatase) + reductase 画分をマイクロソームとして、放射性標識した基質 ( $[1\beta\text{-}^3\text{H}(\text{N})\text{-Androst-4-ene-3,17-dione}$ 、 $[^3\text{H}]\text{-ASDN}$ ) をとして、マイクロソーム中のアロマターゼ活性の阻害をフルトラニルの存在下で測定した。マイクロソームはタンパク量が 0.008 mg/mL とし、37°C で 5 分間プレインキュベートした後、各反応系に 1 mL ずつ添加し、37 °C で 15 分間反応させた。反応は 2 mL のジクロロメタンを添加して停止させた。その後、氷冷し遠心分離 (200 × g、4° C、10 分) した。遠心分離後、ジクロロメタン層を除去するジクロロメタン抽出操作を 3 回実施した後、水層 0.5 mL を LSC にて 3H の放射能を測定した。試験は 3 回行ない、各 2 連で行った。

フルトラニルの  $10^{-10}$  ~  $10^{-4}$  の濃度範囲で試験した。また、陽性対照として 4-hydroxyandrostenedione (4-OH ASDN) を使用した。

得られた数値を以下の式にあてはめ、アロマターゼ活性及び対照区に対する相対活性を算出した。

$$Y = (A-B)/C/D/E$$

Y = アロマターゼ活性 (nmol/mg protein/min)

A = 反応後の水層中全放射能量 (dpm)

B = background activity control における水層中全放射能量 (dpm)

C = 添加した  $[^3\text{H}]\text{-ASDN}$  の比活性 (dpm/nmol)

D = タンパク量 (mg protein); 0.008 mg protein

E = 反応時間 (分); 15 分

$$P = F/G \times 100$$

P = コントロール活性に対する割合 (%)

F = 測定サンプルにおけるアロマターゼ活性 (nmol/mg protein/min)

G = full activity control におけるアロマターゼ活性 (nmol/mg protein/min)

結果 : flutolanil は最終濃度  $10^{-4}$  ~  $10^{-10}$  M の範囲において、アロマターゼ活性を阻害しなかった。一方、陽性対照物質である 4-OH ASDN はアロマターゼ活性を阻害し、



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

$\log (IC_{50})$ の平均値は-7.2であり、基準値 (-7.3~ -7.0)の範囲であって、  
本試験系の感受性が確認された。

よって、フルトラニルはアロマトラーゼ阻害作用は有しないと判断された。

4) エストロゲンレセプターバインディングアッセイ

(資料 No. 50)

試験機関：

報告書作成年：2011年[GLP対応]

実施目的と経緯：米国 EPA の Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) の Tier 1 Screening battery (October 2009) のスクリーニング対象物質として他の 67 農薬とともに Tier 1 Screening battery の試験が要求されたため本試験を実施した。尚、フルトラニルの選定にあたり本剤の毒性学的プロファイルは関連せず、生産量によるものであった。

本試験はフルトラニルのラット子宮由来エストロゲン受容体のリガンド結合に対する影響を評価する目的で実施した。以下のテストガイドラインに従った。

US EPA: Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines, OPPTS 890.1250: "Estrogen Receptor Binding Assay Using Rat Uterine Cytosol (ER-RUC)" (October 2009)

被験物質：フルトラニル、

試験方法：卵巣摘出した雌ラットから調製した子宮 Cytosol を用いて、エストロゲン受容体 (ER) に対して、放射性  $17\beta$ -エストラジオール ( $^3\text{H-E2}$ ) および被験物質を混合、冷蔵庫で約 20 時間インキュベート後、受容体成分をハイドロキシアパタイト (HAP) により回収し、結合した放射エネルギーを測定した。被験物質の溶解および希釈用の溶媒にはエタノールを用いた。また陽性対照物質としては強い競合剤として、非放射性  $17\beta$ -エストラジオール (E2)、弱い競合剤として 19-norethindrone、及び陰性対照物質として n-Octyltriethoxysilane ついても結合実験を行った。

結果：フルトラニルおよび対照物質の ER への結合競合阻害の結果を次頁以降に図示した。3 つの対照物質は全て被験物質とともに競合結合試験で再現性のある結果が得られた。フルトラニルは  $10^{-4}$  ~  $10^{-10}$  M の濃度で ER のリガンド結合に影響を与えなかった。

以上のことからフルトラニルはエストロゲンレセプターに対する親和性を有しないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

5) ヒト培養細胞を用いたエストロゲン受容体転写活性化レポータージーンアッセイ

(資料 No. 51)

試験機関：

報告書作成年：2011年[GLP 対応]

実施目的と経緯：米国 EPA の Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) の Tier 1 Screening battery (October 2009) のスクリーニング対象物質として他の 67 農薬とともに Tier 1 Screening battery の試験が要求されたため本試験を実施した。尚、フルトラニルの選定にあたり本剤の毒性学的プロファイルは関連せず、生産量によるものであった。

本試験はフルトラニルのエストロゲン受容体の転写活性に対する影響の有無を調べた。本試験は以下のテストガイドラインに従った。

USEPA OPPTS 890.1300 及び OECD Test 455

被験物質：原体、

試験方法：エストロゲン受容体および、この受容体のアゴニストに応答してルシフェラーゼを発現するように形質転換したヒト子宮頸癌細胞株 (hER $\alpha$ -HeLa-9903) を用いた。抗生物質および Fetal bovine serum 等を添加した Eagle 基本培地に懸濁した細胞を、96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells / 穴となるよう分注し、約 3 時間 37°C で静置培養した。これに、DMSO 中に所定濃度に希釈したフルトラニルを添加後 (培地中の DMSO の最終濃度は 0.1%)、約 23 時間 37°C で静置培養した。培地を除去し、細胞を溶解後、ルシフェリンと ATP を含む反応液を加え、ルミノメーターにて相対的発光強度を測定し、ルシフェラーゼ活性の指標とした。また、顕微鏡下で細胞形態観察により細胞毒性を調べた。

試験に用いる濃度は本検体の溶解度から 100  $\mu$ M を最高用量とし、以下 100pM まで、計 7 段階の濃度を設定した。また陽性対照物質としては、強力なエストロゲン (17 $\beta$ -エストラジオール、E2 と表記)、弱いエストロゲン (17 $\alpha$ -エストラジオール)、弱い作動性物質 (17 $\alpha$ -メチルテストステロン) 及び陰性物質 (コルチコステロン) の適切な濃度を用いて、各試験で評価された。試験は独立して 2 回行い、1 回の試験は 3 連で実施した。の各測定値から発現率を以下の計算から求めた。

[ (蛍光強度測定値 - 溶媒対照値平均) / (陽性対照 E2 1nM 時の平均値) ]  $\times$  100

結果：試験は 2 回、独立して実施された。フルトラニルの最高濃度 100  $\mu$ M でフルトラニルは軽度の細胞毒性を発現し、その生育性は第 1 回及び第 2 回の試験で、対照群の各々 77.36% 及び 79.55% と 80% 以下であった。

両方の試験ともに、フルトラニルは ER $\alpha$  活性化には陰性の反応を示した。4 種の参照対照物質、強力なエストロゲン (17 $\beta$ -エストラジオール)、弱いエストロゲン (17 $\alpha$ -エストラジオール)、弱い作動性物質 (17 $\alpha$ -メチルテストステロン) 及び陰性物質 (コルチコステロン) では、それぞれ予想された反応が示され、本試験系の感受性が確認された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

以上、形質転換したヒト子宮頸癌細胞株を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいて、フルトラニルは ER $\alpha$  転写活性化を起さないと考えられた。

6)フルトラニル原体のラットを用いた Hershberger 試験

(資料No. 52)

試験機関：

報告書作成年：2011年

実施目的と経緯：米国 EPA の Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) の Tier 1 Screening battery (October 2009) のスクリーニング対象物質として他の 67 農薬とともに Tier 1 Screening battery の試験が要求されたため本試験を実施した。尚、フルトラニルの選定にあたり本剤の毒性学的プロファイルは関連せず、生産量によるものであった。

本試験はフルトラニルのアンドロゲン作用及び抗アンドロゲン作用を検討した。本試験は以下のテストガイドラインに従った。

OPPTS 890.1400: Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines: Hershberger Bioassay, EPA 740-C-09-008 (2009年10月)

OECD Guideline for Testing of Chemicals 441, Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties (2009年9月7日採択)

被験物質：フルトラニル原体

供試動物：SD系雄ラット、1群6匹、約6週齢時に精巣摘出により去勢手術を実施し、手術15日後にアンドロゲン作用試験、あるいは抗アンドロゲン作用試験に動物を供した。投与開始時の週齢は8週齢で、体重範囲は以下の通りであった。

アンドロゲン作用試験 246.0-303.7g

抗アンドロゲン作用試験 257.6-296.7g

投与方法：被験物質及び抗アンドロゲン作用陽性対照物質の Flutamide は 0.5%メチルセルロース水溶液 (MC) に懸濁して 10 日間反復強制経口投与した。経口投与の投与容量は 10mL/kg 体重とした。アンドロゲン作用の陽性対照物質のプロピオン酸テストステロン (TP) はコーン油に溶解して 10 日間反復皮下投与した。皮下投与の投与容量は 0.5mL/kg 体重とした。

用量設定根拠；

①アンドロゲン作用試験

試験方法：去勢手術 15 日後の雄ラットに MC に懸濁したフルトラニルを、0、500 および 1000 mg/kg の投与量で毎日 1 回、胃管を用いて 10 日間強制経口投与した。同日陽性対照群と処理を同一にするため、コーン油を 0.5mL/kg を 10 日間反復皮下投与した。陽性対照群には、MC のみを 10 日間反復経口投与し、同じ日に TP を 0.4 mg/kg、コーン油に溶解し 10 日間反復して皮下投与を行った。

最終投与の翌日、以下のアンドロゲン作用の標的 5 臓器を採取し湿重量を測定した。また肝臓についても重量を測定した。

陰茎龟头、腹側前立腺、精囊及び凝固腺 (SVCG)、

肛門挙筋及び陰茎海綿体筋 (LABC)、カウパー腺

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

観察・検査項目および結果 :

一般症状、体重、摂餌量及び剖検； 死亡例はみられなかった。陽性対照群を含め全群に、一般症状、摂餌量及び剖検の異常は認められなかった。陽性対照群の体重は溶媒対照群に比べ軽度増加し(剖検時体重 104%、統計学的有意差なし)、アンドロゲン作用による同化作用によるものと考えられた。その他の群の体重に影響はみられなかった。

臓器重量 ; 結果を次表に示す。

表 1. アンドロゲン作用試験における臓器重量の変化

群	対照群	フルトラニル群		陽性対照群	
経口投与 mg/kg (溶媒 MC)	MC	500	1000	MC	
皮下投与 mg/kg (溶媒コーン油)	コーン油	コーン油	コーン油	TP 0.4	
検査動物数	6	6	6	6	
臓器重量	最終体重(g)	310 (100)	313 (101)	312 (101)	324 (104)
	陰茎龟头(mg)	45 (100)	45 (102)	48 (108)	↑85 (191)
	前立腺(mg)	12 (100)	11 (96)	12 (101)	↑160 (1379)
	精囊及び凝固腺 (SVCG) (mg)	43 (100)	50 (116)	47 (109)	↑516 (1192)
	カウパー腺(mg)	7 (100)	9 (126)	7 (95)	↑37 (500)
	肛門挙筋及び陰茎海綿体筋 (LABC) (mg)	153 (100)	165 (107)	155 (101)	↑579 (377)
	肝臓(g)	11 (100)	12 (111)	12 (110)	13 (114)

Dunnett の多重比較法 ↑ :  $P \leq 0.0001$

表中の数値は実測値。( ) 内の数値は、溶媒対照群を 100 とした時の値。

溶媒対照群と比べ、フルトラニル投与群では 500、1000mg/kg 投与群ともに検査したアンドロゲン作用の標的臓器のいずれについても重量に変化は認められなかった。これに対し TP 投与群では、アンドロゲン標的臓器で統計学的有意差を伴った明らかな重量増加がみられ、本試験系の感受性が確認された。肝臓重量には検体投与及び陽性対照群いずれも変化がみられなかった。

②抗アンドロゲン作用試験

試験方法 : 去勢手術 15 日後の雄ラットに MC に懸濁したフルトラニルを、0、500 および 1000 mg/kg の投与量で毎日 1 回、胃管を用いて 10 日間反復強制経口投与し、同じ日にアンドロゲンである TP を 0.4 mg/kg を 10 日間反復皮下投与した。陽性対照群には、フルタミドを 3mg/kg で同様に 10 日間反復経口投与し、検体投与群と同じく TP を 0.4 mg/kg を 10 日間反復皮下投与した。

最終投与の翌日、アンドロゲン試験と同じく以下のアンドロゲン作用の標的 5 臓器を採取し湿重量を測定した。また肝臓についても重量を測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

陰茎亀頭、腹側前立腺、精囊及び凝固腺(SVCG)、  
肛門挙筋及び陰茎海綿体筋(LABC)、カウパー腺

観察・検査項目および結果 :

一般症状、体重、摂餌量及び剖検 ; 死亡例はみられなかった。陽性対照群を含め、一般症状及び摂餌量全群に異常は認められなかった。陽性対照群の体重は溶媒対照群に比べ軽度低下し(剖検時体重 96%、統計学的有意差なし)、抗アンドロゲン作用によるアンドロゲン同化作用の阻害が起こっているものと考えられた。また同群の剖検において、アンドロゲン作用標的臓器の萎縮がみられた。その他の群では剖検時に異常はみられず体重に影響はみられなかった。

臓器重量 ; 結果を次表に示す。

表 2. 抗アンドロゲン作用試験における臓器重量の変化

群	対照群	フルトラニル群		陽性対照群
経口投与 mg/kg(溶媒 MC)	MC	500	1000	Flutamide 3
皮下投与 mg/kg(溶媒コーン油)	TP 0.4	TP 0.4	TP 0.4	TP 0.4
検査動物数	6	6	6	6
最終体重(g)	342 (100)	339 (99)	334 (98)	328 (96)
陰茎亀頭(mg)	89 (100)	84 (94)	87 (98)	↓64 (72)
前立腺(mg)	194 (100)	181 (93)	178 (92)	↓63 (33)
精囊及び凝固腺(SVCG) (mg)	600 (100)	523 (87)	600 (100)	↓133 (22)
カウパー腺(mg)	45 (100)	↓35 (77)	39 (85)	↓17 (37)
肛門挙筋及び陰茎海綿体筋(LABC)(mg)	644 (100)	573 (89)	615 (95)	↓285 (44)
肝臓(g)	14 (100)	↑15 (109)	14 (106)	13 (93)

Dunnett の多重比較法 ↑↓ :  $P \leq 0.05$ , ↓ :  $P \leq 0.0001$

表中の数値は実測値。( ) 内の数値は、溶媒対照群を 100 とした時の値。

フルトラニル 500mg/kg 投与群では溶媒対照群と比べ、カウパー腺の重量に統計学的に有意差な低下が認められたが、用量との関連性がなく、その他のアンドロゲン標的臓器に重量の変化はなかった。カウパー腺は抗アンドロゲン作用について特に感受性の高い臓器ではなく、この臓器のみに抗アンドロゲン作用を認めるような物質は認められていない。したがってこの変化はフルトラニルの抗アンドロゲン作用の根拠とは考えられない。これ以外の臓器については溶媒対照群と比べ、フルトラニル投与群では 500、1000mg/kg 投与群ともに重量に変化は認められなかった。これに対し Flutamide 投与群では、アンドロゲン標的臓器で統計学的有意差を伴った明らかな重量低下がみられ、本試験系の感受性が確認された。肝臓重量には検体投与及び陽性対照群いずれも変化がみられなかった。

以上、本 Hershberger 試験においてフルトラニルは 1000 mg/kg/day の最高用量においても、アンドロゲン作用及び抗アンドロゲン作用を示さなかった。



7) ラットにおける雌雄 pubertal 試験

(資料 No. 53)

試験機関：

報告書作成年：2012年

実施目的と経緯：米国 EPA の Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) の Tier 1 Screening battery (October 2009) のスクリーニング対象物質として他の 67 農薬とともに Tier 1 Screening battery の試験が要求されたため本試験を実施した。尚、フルトラニルの選定にあたり本剤の毒性学的プロファイルは関連せず、生産量によるものであった。

本試験は、フルトラニルのラットにおける甲状腺機能および性成熟に対するポテンシャルを調べるために実施した。以下のテストガイドラインに従った。

① Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1500: Pubertal Development and Thyroid Function in Intact Juvenile/ Peripubertal Male Rats, EPA 740-C-09-012 (October 2009)

② Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1450: Pubertal Development and Thyroid Function in Intact Juvenile/ Peripubertal Female Rats, EPA 740-C-09-009 (October 2009)

被験物質：フルトラニル原体

供試動物：Sprague-Dawley (Cr1:CD)系ラット、雌雄離乳児 1群雌雄 15匹

投与開始時 雄 23日齢、雌 22日齢

試験に供試する離乳児を得るために妊娠雌ラットを入手し、妊娠22日目に自然分娩させ、得られた雌雄児動物各45匹を試験に用いた。

試験方法：検体を500および1000 mg/kg/dayの用量で雄は生後23-53日、雌は生後22-42日まで、連日1日1回、ほぼ同時刻(8:00-10:00)に強制経口投与した。検体は0.5%(w/v)メチルセルロース(MC)溶液に懸濁し、投与容量は5mL/kg体重で投与した。投与液は毎週調製した。投与期間中、雌雄離乳児の性成熟を観察した。投与終了時に採血、剖検した。

投与量設定根拠；

観察・検査項目および結果；

臨床症状； 投与期間中、毎日動物の生死及び一般状態を観察した。

死亡は認められなかった。雄では以下の所見が認められた。

性別	雄		
	0	500	1000
投与量 (mg/kg/日)	0	500	1000
検査動物数	15	15	15
眼球の腫大(生後 34-35 日目)	0	1	1
皮膚に痂皮	3	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日本農薬㈱にある。

投与群では、生後 34-35 日目にのみ眼球の腫大を各群 1 匹ずつ認められたが、生後 36 日目には消失した。本検体を用いた他の試験では同様の所見は認められておらず、またこれら 2 匹の動物は同腹児であったことから先天性のものと考えられ、投与に関連しないものと判断された。痂皮は対照群でもみられることからフルトラニル投与との関連は考えられない。

体重； 投与期間中、毎日測定した。

投与の影響はみられなかった。

性成熟； 以下の項目について検査した。

### 1) 雄の包皮分離

雄動物は、生後 30 日以降解剖日まで、包皮分離を毎日観察し完全な分離を確認した日を記録した。

結果を以下に示す。包皮分離日および包皮分離日の体重のいずれの項目にも、明らかな影響は認められなかった。

性別	雄		
投与量 (mg/kg/日)	0	500	1000
検査動物数	15	15	15
包皮分離の完了日(day)	43.3	43.6	43.7
包皮分離の完了日の体重	248.98	252.64	253.06

### 2) 雌の膣開口

膣開口を、生後 22 日(すなわち投与開始日)以降観察した。膣開口日および膣開口日の体重のいずれの項目にも、明らかな影響は認められなかった。

性別	雌		
投与量 (mg/kg/日)	0	500	1000
検査動物数	15	15	15
膣開口日(day)	33.7	34.0	33.7
膣開口日の体重	135.66	138.77	135.70

### 3) 雌の性周期

膣開口日以降雌動物の膣垢を毎日採取した。膣垢は風乾後メタノールで固定し、Giemsa 染色してその日の性周期を調べ、発情前期 proestrus(P)、発情期 estrus(E)および休止期 diestrus(D)のいずれかに分類した。投与期間中の結果から性周期を以下のタイプのいずれかに分類し、性周期長(本試験では D から次の D までの日数と定義した)を計数した。

- ・完全周期かつ定型周期、下線部の日数(4 あるいは 5 日周期)をその性周期長とした；(E) DDPE (D)、(E) DDDPE (D)、(E) DDPEE (D)。
- ・完全周期ではあるが非定型周期、性周期長はいずれも 6 日と判定した；(E) DDDDPE (D)、(E) DDDPEE (D)、(E) DDDPEE (D)。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

上記以外のパターンは不完全周期とし、性周期長の測定からは除外した。

性周期及び性周期長の平均値を以下に示す。最初の発情日の日齢、性周期長、性周期を示す動物の割合、正常性周期をもつ動物の割合のいずれも、各群間で同等であり、投与の影響はみられなかった。

投与量 (mg/kg/日)	最初の性周期を 観察した日齢	平均 性周期長	完全周期を 有する%	定型周期を 有する%
0	34.7	5.1	93.3	86.7
500	35.3	4.9	86.7	73.3
1000	33.4	4.9	93.3	80.0

最終検査； 雄は生後 53 日目、雌は生後 42 日目に血液採取と剖検を実施した。雄動物は無麻酔下に、雌動物はジエチルエーテル麻酔下に、断頭・放血して安楽死させ剖検した。また、断頭の際に体から流出する血液を採取し、血液生化学的検査及び血清中ホルモン[T4、TSH 及びテストステロン雄のみ]の測定を行った。以下の臓器を採取し、重量測定した。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、腹側および背側の前立腺、肛門挙筋及び球海綿体筋、凝固腺、精囊腺、卵巣ならびに子宮（以上は固定前の湿重量）

凝固腺ならびに子宮（湿重量測定後内容液をふき取り重量も測定）

下垂体と甲状腺（ホルマリン中で各々2 及び 24 時間固定後重量測定）

また重量測定臓器について病理組織組織標本作製し、HE 染色後鏡検した。

#### 1) 剖検

各群にいくつかの肉眼的な所見が低頻度で認められた。

本系統のラットで自然発生が認められる腎盂の拡張が各群に低頻度で認められたが、用量相関性は認められなかった。精巣の大型/小型、精巣上体の白色点、腎腫大、腎の小のう胞が投与群のみに認められた。しかし、これらの所見は低頻度であり、本系統のラットで偶発的に認められる所見であることから投与に関連したものとは考えられない。1000mg/kg 群でみられた肝臓の尾状葉における変色領域も雄の一例のみの発生であり、投与との関連は考えられなかった。

肺の赤色点、皮膚の痂皮形成、胸腺の頸部残留、卵管の“のう胞”についてもいずれも 1 例のみで認められ、対照群でも認められたものであったことから、投与との関連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日本農薬㈱にある。

性別	雌			雌		
	0	500	1000	0	500	1000
投与量 (mg/kg/日)	0	500	1000	0	500	1000
検査動物数	15	15	15	15	15	15
腎臓；大型		1				
腎臓；微細な嚢胞			1			2
腎臓；腎盂拡張	1	4	2	1	2	
肝臓；退色領域			1			
肺；赤色斑点	1	1		1		
皮膚；痂皮	1	1				
胸腺遺留	1	1				
精巣；大型		2				
精巣；小型			1			
精巣上体；白色斑点		1				
卵管；嚢胞				1		

## 2) 臓器重量

肝臓についてのみ統計学的有意差の認められた。

性別	雌			雌		
	0	500	1000	0	500	1000
投与量 (mg/kg/日)	0	500	1000	0	500	1000
検査動物数	15	15	15	15	15	15
最終体重						
肝臓重量；実重量	16.59	17.71	↑ 18.28			
実重量補正值	16.58	17.69	↑ 18.31			
対体重比	4.825	↑ 5.123	↑ 5.284	4.975	↑ 5.258	↑ 5.275

↑ ↓ ; p < 0.05    ↑ ↓ ; p < 0.01    Dunnett test

傾向検定で有意       

## 3) 血液生化学的検査

以下の項目について検査した。

アスパルギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ-GPT)、グルコース (Glu)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、総コレステロール (TC)、尿素窒素 (UN)、クレアチニン (CRE)、総ビリルビン (T-Bil)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、塩素 (Cl)、無機リン (IP)

各項目は、雌雄ともに各群間で同等であり、フルトラニル投与の影響は認められなかった。雄の T-bil 濃度については、直線回帰のみ統計学的に有意であったが、他の統計検定では有意差は認められず、また相関係数は低く (R<sup>2</sup> 値 0.1194)、各群の平均値もきわめて同様であり毒性学的な意義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日本農薬㈱にある。

#### 4) 血清中ホルモン検査

以下の項目について検査した。

T4、TSH 及び雄のみでテストステロン濃度を、放射イムノアッセイまたは酵素イムノアッセにて測定した。

結果を以下に示す。検体投与に関連した変化は認められなかった。

性別	雌			雌		
	0	500	1000	0	500	1000
投与量 (mg/kg/日)	0	500	1000	0	500	1000
検査動物数	15	15	15	15	15	15
T4 ( $\mu$ g/dL)	4.919	4.923	4.645	3.487	3.394	3.787
TSH (ng/mL)	7.83	6.54	6.81	3.63	3.44	4.32
テストステロン (ng/mL)	1.597	1.673	1.259			

ANOVA 有意差なし。

#### 5) 病理組織学的検査結果

全動物を対象に、以下の臓器について病理組織学的検査を行った。

子宮、腎臓、精巣、精巣上部、甲状腺、卵巣および肉眼的病変部

甲状腺の濾胞上皮細胞の高さとコロイド領域については、EPA のガイドライン<sup>#1</sup>の基準による 5 段階評価(1~5)により評価した。甲状腺のコロイドの質、濾胞上皮細胞の高さの増加/減少、濾胞上皮細胞の形態に関しては、OECD guidance document No. 82(2007)に詳細な基準が記載されており、OCSPP Guideline 890.1500/890.1450 の標準評価法(SEP)で推奨されている 4 段階評価法(0~3)に基づいた。

精巣と精巣上部についての病理組織学的観察は、pubertal 試験の EPA のガイドライン(OPPTS 890.1500) および EPA の OPPTS 870.3800 に挙げられている精子の遊離阻害、胚細胞層の欠如、多核巨細胞、精子細胞の管腔内への脱落、精子肉芽、細胞浸潤、管腔内における異常細胞、精巣上部頭部の上皮層における明細胞の消失等の病変の有無をカバーできるよう詳細に行われた。

卵巣については、卵巣の最大直径部分からの切片を含め計 5 枚の卵巣切片を用い、一次卵胞の総数 (Pederson et al. <sup>#2</sup>)らの分類に基づき原始卵胞および一次卵胞を含む小型卵胞を計測した。

<sup>#1</sup> OECD, Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology, Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82, Paris, 2007

<sup>#2</sup> Pedersen, T. and Peters, H.: Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary., J. Reprod. Fertil., Vol. 17, p555-557, 1968

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

主な所見を以下に示す。

性別		雌			雌			
投与量 (mg/kg/日)		0	500	1000	0	500	1000	
臓器	所見\検査動物数	15	15	15	15	15	15	
精巣	精細管萎縮	0	2	1	/	/	/	
精巣	精子の消失	0	0	1	/	/	/	
上体	と精子肉芽腫	0	1	0	/	/	/	
卵巣	小型卵胞数(一次+原始卵胞)*	/	/	/	145	↓94	110	
腎臓	変性	0	1	0	0	0	0	
	再生性尿細管	1	2	3	0	0	1	
	間質の線維化	0	0	0	0	1	0	
	集合管の鈣質沈着	0	0	0	0	1	0	
	髓質組織と腎乳頭の低形成	0	3	0	1	1	0	
甲状腺	濾胞上皮細胞の高さ(1~5)	スコア1	6	4	7	11	9	6
		スコア2	7	8	6	4	6	9
		スコア3	1	3	2	0	0	0
		スコア4	1	0	0	0	0	0
		スコア5	0	0	0	0	0	0
	コロイド領域(1~5)	スコア1	0	0	0	0	0	0
		スコア2	0	0	0	0	0	0
		スコア3	1	1	0	0	0	0
		スコア4	3	4	3	0	0	0
		スコア5	11	10	12	15	15	15
	濾胞上皮細胞の高さの増加なし		15	15	15	15	15	15
	濾胞上皮細胞の高さの減少なし		15	15	15	15	15	15
	濾胞上皮細胞の形の異常なし		15	15	15	15	15	15

\*群平均値 ↓;p<0.05 Dunnett test

以上より、雌雄の離乳ラットに対するフルトラニルの1000及び500 mg/kg/day投与は、体重、臨床所見、血液生化学項目に影響は認められず、投与に関連した変化は、1000および500 mg/kg/dayの肝重量の増加のみであった。

今回の試験で性成熟(包皮分離、膣開口、および性周期)、生殖器系臓器および甲状腺の発育(臓器重量)と機能、病理組織学的所見および血清中の甲状腺関連ホルモン濃度に投与の影響は認められなかった。

8) ヒト培養細胞におけるステロイドホルモン産生に及ぼす影響試験 (資料 No. 54)

試験機関：

報告書作成年：2011年

実施目的と経緯：米国 EPA の Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) の Tier 1 Screening battery (October 2009) のスクリーニング対象物質として他の 67 農薬とともに Tier 1 Screening battery の試験が要求されたため本試験を実施した。尚、フルトラニルの選定にあたり本剤の毒性学的プロファイルは関連せず、生産量によるものであった。

本試験はフルトラニルのテストステロン及び $17\beta$ -エストラジオール産生に及ぼす影響について検討するために実施した。以下のテストガイドラインに従った。U. S. EPA: Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines, OPPTS 890.1550

“Steroidogenesis (Human Cell Line-H295R) (October 2009)

被験物質：フルトラニル

供試細胞種：NCI-H295R 細胞 (ヒト副腎皮質がん由来)

試験方法：

被験物質暴露；NCI-H295R 細胞に 0.0001~100 あるいは 0.001~10  $\mu$ M のフルトラニルを 37°C で 48 時間作用させた。試験は 3 回行った。また、ステロイドホルモン産生促進物質として Froskin、ステロイドホルモン産生阻害物質として Prochloraz を対照物質として検査した。ステロイドホルモンの定量；各培養後の培養液をサンプリングし、テストステロン及び $17\beta$ -エストラジオールともに特異的な抗体を用いた ELISA にて定量した。

結果：フルトラニルは供試最高濃度、3  $\mu$ M 以上の濃度で細胞毒性がみられた。しかしながら 1  $\mu$ M 以下の濃度ではテストステロン、 $17\beta$ -エストラジオール両方のステロイドホルモン産生に対し何ら影響を与えなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

以上、フルトラニルはヒト細胞におけるステロイドホルモン産生に影響を及ぼさなかった。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

9) フルトラニル原体の卵巣摘出ラットを用いた子宮肥大試験

(資料 No. 55)

試験機関：

報告書作成年：2011年

実施目的と経緯：米国 EPA の Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) の Tier 1 Screening battery (October 2009) のスクリーニング対象物質として他の 67 農薬とともに Tier 1 Screening battery の試験が要求されたため本試験を実施した。尚、フルトラニルの選定にあたり本剤の毒性学的プロファイルは関連せず、生産量によるものであった。本試験はフルトラニルのエストロゲン作用を検討するために実施した。以下のテストガイドラインに従った。

890.1600: Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines: Uterotrophic Assay, EPA 740-C-09-0010 (October 2009)

OECD Guideline for Testing of Chemicals 440, Uterotrophic Bioassay in Rodents:

A Short-term screening test for oestrogenic properties (2007 年 10 月 16 日採択)

被験物質：フルトラニル原体

供試動物：SD 系雌ラット、1 群 6 匹、体重 230.7~269.3 g

投与開始時 9 週齢 (6 週齢で卵巣摘出)

試験方法：米国 OPPTS ガイドライン及び OECD ガイドラインに準拠してフルトラニル原体の子宮肥大作用の有無について試験を実施した。検体を 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁し、500 および 1000 mg/kg/日の用量で卵巣摘出雌ラットに 1 日 1 回 3 日間反復強制経口投与した。最終投与の翌日に子宮を摘出して湿重量及び切開して内液を排出した重量を測定し溶媒対照群と比較した。また陽性対照群には 17 $\alpha$ -ethynyl estradiol (17 $\alpha$  EE) を 0.5  $\mu$ g/kg/日の投与量で 3 日間皮下投与し、同様に子宮重量を測定した。

投与量設定根拠 ；

観察・検査項目および結果 ；

最終投与の翌日の体重を測定した後、子宮を採取し、内容液を含む重量および内容液を排出後の重量を測定した。また、肝臓重量についても測定した。結果を次表に示す。

群 (投与化合物)	フルトラニル			17 $\alpha$ EE
投与量 (mg/kg/day)	0	500	1000	0.0005
雌動物数	6	6	6	6
最終体重	100	100	100	97
子宮重量 (内液有)	100	104	107	↑526
子宮重量 (内液無)	100	103	106	↑295
肝臓重量	100	103	109	92

Dunnett の多重比較法 ↑: p $\leq$ 0.001 数値は対照群を 100 とした場合の値を表したものを。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

陽性対照である  $17\alpha$ EE 投与群では、子宮重量は内液有り、内液排出後重量の両方とも統計学的に有意に対照群の約3倍以上に増加し、本実験系が十分な感度をもつこと確認された。これに対しフルトラニル投与群では 1000mg/kg 群においても子宮重量に対して影響を示さなかった。また、肝臓については毒性学的な意義のある変化はみられなかった。

以上より、フルトラニルは卵巣摘出ラット子宮肥大試験においてエストロゲン作用を示さないと判断された。

10) ラットを用いた4週間飼料混入投与によるT-細胞依存性抗体産生能に及ぼす影響試験

(資料 No. 56)

試験機関：

報告書作成年：2011年 [GLP 対応]

実施目的と経緯：米国EPAからデータギャップとして試験実施を要求されたため、試験を実施した。

供試動物：SD系ラット、1群雌雄各10匹（陽性対照群は雌雄各5匹）、  
開始時 雄48～54日齢、雌49～55日齢、体重雄199～251g、雌160～209g

投与期間：28日間（投与開始日：雄2011年3月3日、雌2011年3月4日）

投与方法：被験物質を0、750、3000および12000 ppmの濃度で飼料に混入し、28日間にわたって随時摂食させた。被験物質を混入した飼料は、1週間に1回調製し保存安定性が保証される期間内に使用した。なお、陽性対照群には、最終屠殺の4日前からシクロホスファミドを25 mg/kg/day (2.5 mg/mL 生理食塩水液を投与容量10mL/kgで投与)の用量で1日1回計4日間腹腔内投与した。  
用量設定根拠

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；一般状態および生死を毎日観察した。

投与期間中、雌雄とも死亡はなかった。また、被験物質投与に関連する一般状態の変化は認められなかった。

詳細な状態の観察；全動物を対象に投与開始日の投与前に1回、投与期間中には週1回、および最終屠殺日に1回詳細な状態の観察を実施した。

雌雄いずれの投与群においても被験物質投与に関連する変化はみられなかった。

体重変化；全動物について投与開始日の投与前に1回、その後は毎週1回体重を測定した。

雌雄いずれの投与群においても被験物質投与に関連する変化はみられなかった。

摂餌量；摂餌量を週1回測定した。

雌雄いずれの投与群においても被験物質投与に関連する変化はみられなかった。

被験物質摂取量；投与期間中の平均被験物質摂取量は次のとおりであった。

投与量(ppm)		750	3000	12000
被験物質摂取量 (mg/kg/day)	雄	61.1	253.9	1004.2
	雌	74.6	253.3	1026.0

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

肉眼的病理検査および臓器重量 ; 4週間の投与終了後に全動物について剖検後、脳、脾臓および胸腺の重量を測定し（絶対重量）、対体重比（相対重量）も算出した。被験物質投与に関連する肉眼的病理変化および臓器重量の変化は、いずれの投与群にも認められなかった。

陽性対照群では雌雄とも脾臓および胸腺の絶対および相対重量の低値が認められ、想定された反応と考えられた。

免疫毒性学的検査 ; 最終屠殺の4日前に全動物を対象として、異種抗原であるヒツジ赤血球（SRBC）を単回尾静脈内投与した。剖検時に重量測定後の脾臓を用いて脾臓細胞数の計測およびプラークフォーミングセルアッセイにより抗体産生細胞を計測した。

結果を次表に示す。被験物質の免疫機能に対する影響はみられなかった。全ての動物は対照群と同等、あるいはそれ以上の脾臓細胞（ $10^6$ ）個当りの抗体産生細胞数及び脾臓当り抗体産生細胞数（ $10^3$ ）を有していた。3000及び12000 ppm 投与群動物における全体の脾臓細胞数及び生存細胞数/脾臓は対照群よりも少なく、また雄では統計的に有意に低値であったが、臓器重量に変化がみられず、これらの動物は対照群よりも大きい脾臓細胞（ $10^6$ ）個当りの抗体産生細胞数、また同程度の脾臓当り抗体産生細胞数を有しており、これはT細胞依存性抗体反応が対照群と同等に機能していることを示唆していることから、これらの値は毒性学的に関連するとは考えられず、また生物学的変動によると考えられる。

一方、シクロホスファミドを投与した陽性対照群では対照群に比べて明らかな抗体産生細胞数の低値が認められ、試験系の妥当性が確認された。

プラークフォーミングセルアッセイ結果

投与量 (ppm)	対照	被験物質			CP
	0	750	3000	12000	25
雄					
細胞数 ( $10^3$ /脾臓細胞懸濁液 $\mu$ L 当り)	41.27	37.27	↓27.91	↓23.77	↓4.62
脾臓細胞の相対生存率 (%) #	100	100	99	100	99
脾臓細胞の絶対生存細胞数 ( $10^6$ )/脾臓当り	411	371	↓277	↓237	↓46
抗体産生細胞数/脾臓細胞 ( $10^6$ ) 個当り	1667	1869	2599	2436	↓0
抗体産生細胞数 ( $10^3$ )/脾臓当り	658	641	645	566	↓0
雌					
細胞数 ( $10^3$ /脾臓細胞懸濁液 $\mu$ L 当り)	28.41	34.69	27.28	30.44	↓4.11
脾臓細胞の相対生存率 (%) #	100	100	100	100	100
脾臓細胞の絶対生存細胞数 ( $10^6$ )/脾臓当り	284	347	272	304	↓41
抗体産生細胞数/脾臓細胞 ( $10^6$ ) 個当り	1695	1550	2350	1886	↓102
抗体産生細胞数 ( $10^3$ )/脾臓当り	481	530	620	528	↓1

脾臓細胞の相対生存率 (%) # : 細胞数に対する生存脾臓細胞数の割合

CP: シクロホスファミド (陽性対照物質)

Dunnett の t-検定 ↓:  $P \leq 0.05$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

以上、12000 ppm を最高濃度としたフルトラニル原体のラットにおける4週間飼料混入投与によるT-細胞依存性抗体産生能に及ぼす影響試験において、フルトラニルは免疫機能に影響を及ぼさないと結論された。臨床症状、体重、摂餌量及び解剖学的病理には影響が認められなかったことから、無毒性量 (NOEL) は、12000 ppm と考えられた [雄では 1004.2 mg 被験物質/kg 体重/day (mg/kg/day)、雌では 1026.0 mg/kg/day に相当]。