

8.11 代謝物毒性

8.11.1 マウスにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-1)

試験機関

報告書作成年 1991年 [GLP 対応]

供試動物： ICR系(CD-1)マウス、1群雌雄各5匹、投与時6週齢、
体重 雄 28.7~34.9 g、雌 21.9~28.7 g

観察期間： 14日間

投与方法： 脱イオン水を媒体として用い、20 mL/kgの容量で2~3時間絶食後に経口投与

観察・検査項目：臨床症状及び生死を14日間観察。投与前、投与7日及び14日後に体重を測定。
死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結 果：

投与方法	経 口	
投与量 (mg/kg)	雌雄共	500、1000、2000、4000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 雌	1297 (1024~1642) 1231 (910~1665)
死亡開始時間及び終了時間	雄 雌	投与後3時間目~投与後7日目 投与後3時間目~投与後1日目
症状発現時間及び消失時間	雄 雌	投与後1時間目に発現、生存例には症状なし 投与後1時間目より発現、生存例では投与後 3日目までに消失
毒性徴候の認められなかつた 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共	< 500
死亡例の認められなかつた 最高投与量 (mg/kg)	雄 雌	< 500 500

投与後1時間目より自発運動低下、立毛及びよろめき歩行が認められた。これらの症状がみられたほぼ全例が死亡し、生存例では投与後3日目までに回復した。死亡は投与3時間後より7日目まで起こった。生存例の体重は、1000 mg/kg 投与群の雄3例に体重がわずかに減少したが、雌雄共にほぼ順調に増加した。

途中死亡例の剖検では腺胃部の黒色点又は黒色化、肝臓の小葉像明瞭、肝臓の白色斑、小腸の赤色内容物、外陰部の被毛の汚れ、腹膜の白色斑及び全身皮下の白色斑が認められた。生存例の剖検では2000 mg/kg 投与群の雄3例、500 mg/kg 投与群の雌1例で肝臓の黄色斑が認められたが、他に異常は認められなかった。

8.11.2 マウスにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-2)

試験機関

報告書作成年 1991年 [GLP 対応]

試験動物： ICR系(CD-1)マウス、1群雌雄各5匹、投与時6週齢、
体重 雄 27.9~35.3 g、雌 21.6~27.4 g

観察期間： 14日間

投与方法： 脱イオン水を媒体として用い、20 mL/kgの容量で2~3時間絶食後に経口投与

観察・検査項目：臨床症状及び生死を14日間観察。投与前、投与7日及び14日後に体重を測定。
死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結 果：

投与方法	経 口	
投与量 (mg/kg)	雌雄共	500、1000、2000、4000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄	1414 (算出できず)
	雌	1625 (1201~2197)
死亡開始時間及び終了時間	雄	投与後3時間目~投与後2日目
	雌	投与後3時間目~投与後2日目
症状発現時間及び消失時間	雄	投与後1時間目に発現、生存例では投与後3時間目までに消失
	雌	投与後1時間目より発現、生存例では投与後1日目までに消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共	500
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄	1000
	雌	1000

投与後1時間目より自発運動低下及びよろめき歩行が認められた。これらの症状がみられたほぼ全例が死亡し、生存例では投与後1日目までに回復した。死亡は投与3時間後より2日目まで起こった。体重は雌雄共に順調に増加した。

途中死亡例の剖検では腺胃部の黒色点又は黒色化、肝臓の小葉像明瞭、肝臓の暗調化、腸間膜の出血、膀胱の赤色尿及び外陰部の被毛の汚れが認められた。生存例の剖検では500 mg/kg投与群の雄1例で肝臓の小葉像明瞭が認められたが、他に異常は認められなかった。

8.11.3 マウスにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-3)

試験機関

報告書作成年 1991年 [GLP 対応]

試験動物 : ICR系 (CD-1)マウス、1群雌雄各5匹、投与時7週齢、
体重 雄 29.4~35.6 g、雌 22.3~28.5 g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 脱イオン水を媒体として用い、20 mL/kgの容量で2~3時間絶食後に経口投与

観察・検査項目 : 臨床症状及び生死を14日間観察。投与前、投与7日及び14日後に体重を測定。
死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結 果 :

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共 >2000
死亡開始時間及び終了時間	雌雄共 なし
症状発現時間及び消失時間	雌雄共 なし
毒性徴候の認められなかつた最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000
死亡例の認められなかつた最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000

中毒症状は全く認められず体重も順調に増加した。剖検所見も、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

8.11.4 マウスにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-4)

試験機関

報告書作成年 1991年 [GLP 対応]

供試動物 : ICR系(CD-1)マウス、1群雌雄各5匹、投与時6週齢、
体重 雄 27.0~34.0 g、雌 20.7~26.1 g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 脱イオン水を媒体として用い、20 mL/kgの容量で2~3時間絶食後に経口投与

観察・検査項目 : 臨床症状及び生死を14日間観察。投与前、投与7日及び14日後に体重を測定。
死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結 果 :

投与方法	経 口	
投与量 (mg/kg)	雌雄共	1000、2000、4000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄	2462 (1789~3390)
	雌	3564 (1285~9885)
死亡開始時間及び終了時間	雄	投与後6時間目~投与後1日目
	雌	投与後1時間目~投与後7日目
症状発現時間及び消失時間	雄	投与後1時間目に発現、生存例には症状なし
	雌	投与後1時間目に発現、生存例では投与後6時間目までに消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共	1000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共	1000

中毒症状として、投与1時間目より自発運動低下が認められた。これらの症状がみられたほぼ全例が死亡し、生存例では投与後6時間目までに回復した。死亡は投与1時間後より7日目まで起こった。生存例の体重は、雌雄共にほぼ順調に増加した。

途中死亡例の剖検では腺胃部の黒色斑又は黒色化、肝臓の小葉像明瞭、肝臓の退色、小腸の赤色内容物、腸間膜の出血が認められた。生存例の剖検では2000 mg/kg投与群の雄1例で肝臓の小葉像明瞭及び黄色斑散在並びに4000 mg/kg投与群雌の1例で脾臓の腫大が認められたが、他に異常は認められなかった。

8.11.5 マウスにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-5)

試験機関

報告書作成年 1992年 [GLP 対応]

供試動物 : ICR系 (CD-1)マウス、1群雌雄各5匹、投与時6週齢、
体重 雄 27.6~36.9 g、雌 21.0~27.4 g

観察期間 : 21日間

投与方法 : 脱イオン水を媒体として用い、20 mL/kgの容量で2~3時間絶食後に経口投与

観察・検査項目 : 臨床症状及び生死を21日間観察。投与前、投与7日、14日及び21日後に体重を測定。死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結 果 :

投与方法	経 口	
投与量 (mg/kg)	雌雄共	70、105、158、237、355、533、800
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄	268 (188~382)
	雌	268 (192~374)
死亡開始時間及び終了時間	雄	投与後3時間目~投与後4日目
	雌	投与後3時間目~投与後3日目
症状発現時間及び消失時間	雄	投与後1時間目に発現、生存例では投与後18日目までに消失
	雌	投与後1時間目に発現、生存例では投与後11日目までに消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄	70
	雌	105
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄	70
	雌	105

中毒症状として、投与1時間目より自発運動の低下、異常呼吸音あるいは咳、流涎、眼瞼下垂および赤色眼脂が多数例に、また沈静及び呼吸緩徐が少数例に認められた。沈静及び呼吸緩徐が認められた動物は死亡し、生存例では投与後18日目までに回復した。死亡は投与3時間後より4日目まで起こった。生存例の体重は、雌雄共7日目に減少が認められ、14日目でも投与前の体重に回復しないものがあったが、21日目には回復した。

途中死亡例の剖検では、雄の105 mg/kg群と雌の355 mg/kg群と雌雄の533 mg/kg投与群以上でそれぞれ1~2匹において透明胸水貯留が認められた。雄で533 mg/kg投与群以上で腺胃部の赤色化が1~2例認められた。雄の533 mg/kg投与群と雌の800 mg/kg投与群で小腸の赤色化が認められた。生存例の最終剖検では雄の158、237および355 mg/kg投与群でそれぞれ2~3例で肝臓に白色斑が認められた。

8.11.5A ラットにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-5A)

試験機関

報告書作成年 2017年 [GLP 対応]

供試動物： SD系ラット、投与時 8-9 週齢、体重 雌 195~229 g、雌 6 匹/区

観察期間： 14 日間

試験方法： 毒性等級法

投与方法： 検体を 0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し経口投与した投与前に一晚絶食した。

観察・検査項目： 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。投与前、投与 1、3、5、7、10 及び 14 日目に体重を測定した。試験終了時に全供試動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	50、300
LD ₅₀ (mg/kg)	50~300
死亡開始時間及び終了時間	投与後 1~2 日目
症状発現時間及び消失時間	投与後 1 時間~2 日目
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	50

300 mg/kg 投与群では、投与後 1~2 時間で流涎、投与後 1~2 日目で自発運動の減少、低体温、呼吸緩徐、腹臥位、鼻周囲汚れが観察された。投与後 1~2 日目に 2 例が死亡した。投与後 3 日目まで体重の減少がみられたが 5 日目には回復した。50 mg/kg 投与群では、一般状態に異常は観察されなかった。投与後 1 日目に体重の減少が散発的にみられたが 3 日目には回復した。

剖検所見では、死亡例の腺胃粘膜に複数の黒点がみられた。生存例に肉眼的変化は認められなかった。

8.11.6 ラットにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-6)

試験機関

報告書作成年 1993年 [GLP 対応]

供試動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹、投与時6週齢、
体重 雄 245~291 g、雌 211~268 g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 脱イオン水を媒体として用い、10 mL/kgの容量で経口投与した。

観察・検査項目 : 臨床症状及び生死を14日間観察。投与前、投与7日及び14日後に体重を測定。
死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結 果 :

投与方法	経 口	
投与量 (mg/kg)	雌雄共	800、1000、1400、2000、3150
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共	1580 (1360~1830)
死亡開始時間及び終了時間	雄	投与後1時間目~投与後2日目
	雌	投与後1日目~投与後3日目
症状発現時間及び消失時間	雄	投与後1時間目に発現、生存例では投与後14日目まで観察された。
	雌	投与後1時間目に発現、生存例では投与後8日目までに消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共	800
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄	1400
	雌	1000

中毒症状として、投与1時間目より糞量の減少もしくは全くないという所見が認められた。また口や肛門周囲の汚れ、流涎、流涙、自発運動の減少、円背位が観察された。さらに努力呼吸が認められた動物は死亡した。生存例では投与後14日目までに回復した。死亡は投与後1日目より3日目まで起こった。生存例は7日目の体重に減少が認められ、14日目に投与前の体重に回復した。

途中死亡例の剖検では鼻吻部や外陰部のよごれ、肺の蒼白、肝臓の変色、胃の黒~褐色内容物、小腸の赤色内容物、腸間膜リンパ節の変色が全群で共通して観察された。生存例の剖検では1000 mg/kg投与群で肺の暗赤色化と精巣の小型暗色、1400 mg/kg投与群では肺の黒色点と脾臓の変色、2000 mg/kg投与群では肺の蒼白と胃の膨張が観察された。生存例の剖検では1000 mg/kg投与群で肺の暗赤色化と精巣縮小暗色化が認められた。1400 mg/kg投与群では肺で黒色巣の散発と斑状の脾臓が観察された。2000 mg/kg投与群では肺の蒼白と胃の膨張が観察された。

8.11.7 ラットを用いた飼料混入による 28 日間反復経口投与毒性試験 (資料 No. TM-7)

試験機関

報告書作成年 1993 年 [GLP 対応]

供試動物： SD 系 CD VAF/PLUS ラット、1 群雌雄各 10 匹、投与開始時 46 日齢

投与期間： 28 日間 (1993 年 3 月 16 日～1993 年 4 月 14 日)

投与方法： 検体を 0、100、250、500 及び 1000 mg/kg/day の用量となるよう飼料に混入し、28 日間にわたって随時に摂食させた。検体を混入した飼料は週に 1 回調製した。

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡；生死及び一般状態を毎日 2 回観察した。

試験期間中に死亡例はなく、投与に関連した所見も認められなかった。

体重変化；投与開始 1 週間前、開始から毎週 1 回すべての動物の体重を測定した。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を下表に示す。

性別	雄				雌			
	100	250	500	1000	100	250	500	1000
投与量 (mg/kg/day)	100	250	500	1000	100	250	500	1000
増体量 (0-1 週)	98	101	107	114↑	98	110	105	102

Bonferroni / Dunn 検定 ↑↓ : P<0.05、↕ : P<0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

1000 mg/kg/day 投与群の雄で、投与 0-1 週の増体量が有意に増加したが、検体投与による影響ではないと考えられた。

摂餌量；投与開始 1 週間前、開始から毎週 1 回すべての動物の摂餌量を測定した。

検体投与による影響は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (mg/kg/day)		100	250	500	1000
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	94.5	235.6	473.6	942.3
	雌	95.0	237.4	473.9	947.9

血液学的検査；投与 29 日後に全動物を対象として、眼窩静脈叢から採血し、以下の項目の測定を行なった。

ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球数、白血球数、血小板数、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)

上記に加え、対照群及び 1000 mg/kg/day 投与群については白血球デファレンシエ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

ーションを測定した。
検体投与による影響は認められなかった。

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

尿素窒素、クレアチニン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、グルコース、ナトリウム、塩素、カリウム、カルシウム、無機リン、クレアチンキナーゼ、総コレステロール、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、グロブリン、アルブミン/グロブリン比

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を下表に示す。

1000 mg/kg/day 投与群の雄で尿素窒素の有意な上昇が、100 mg/kg/day 投与群の雄でナトリウムの有意な低下が認められたが、いずれも背景データの範囲内であるため検体投与による影響ではないと考えられた。

臓器重量；全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比及び対脳重量比も算出した。

副腎、脳、肝臓、腎臓、精巣または卵巣
検体投与による影響は認められなかった。

肉眼的病理検査；すべての動物について剖検を行なった。
検体投与による影響は認められなかった。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。

肺、肝臓、腎臓及び肉眼的異常部位
検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、BSAのラットに対する飼料混入による28日間反復経口投与毒性試験における影響は、1000 mg/kg/day投与群においても雌雄ともに認められなかった。
従って、無影響量 (NOEL)は雌雄ともに1000 mg/kg/day (雄 942.3 mg/kg/day、雌 947.9 mg/kg/day)と判断される。

8.11.8 細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 No. TM-8)

試験機関

報告書作成年 1991年 [GLP 対応]

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA1535、TA1537、TA98、TA100 の 4 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9 Mix) の存在下または非存在下で、Ames 等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体は純水に溶解し、313~5000 µg/Plate の範囲の 5 濃度で実施した。試験は 2 連制とした。

試験結果： 次表に示す様に、検体では S9 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に比べて復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。これに対し、陽性対照として用いた AF-2、SA、9-AA では S9 Mix の無添加において、また 2-AA では S9 Mix の添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において復帰変異誘発性は有さ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石原産業株式会社にある。

8.11.9 細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 No. TM-9)

試験機関

報告書作成年 1991 年 [GLP 対応]

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA1535、TA1537、TA98、TA100 の 4 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9 Mix) の存在下または非存在下で、Ames 等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体は純水に溶解し、313~5000 µg/Plate の範囲の 5 濃度で実施した。試験は 2 連制とした。

試験結果： 次表に示す様に、検体では S9 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に比べて復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。これに対し、陽性対照として用いた AF-2、SA、9-AA では S9 Mix の無添加において、また 2-AA では S9 Mix の添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において復帰変異誘発性は有さ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石原産業株式会社にある。

8.11.10 細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 No. TM-10)

試験機関

報告書作成年 1991年 [GLP 対応]

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA1535、TA1537、TA98、TA100 の 4 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9 Mix) の存在下または非存在下で、Ames 等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体は純水に溶解し、313~5000 µg/Plate の範囲の 5 濃度で実施した。試験は 2 連制とした。

試験結果： 次表に示す様に、検体では S9 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に比べて復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。これに対し、陽性対照として用いた AF-2、SA、9-AA では S9 Mix の無添加において、また 2-AA では S9 Mix の添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において復帰変異誘発性は有さ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石原産業株式会社にある。

8.11.11 細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 No. TM-11)

試験機関

報告書作成年 1991年 [GLP 対応]

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA1535、TA1537、TA98、TA100 の 4 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9 Mix) の存在下または非存在下で、Ames 等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体は純水に溶解し、313~5000 µg/Plate の範囲の 5 濃度で実施した。試験は 2 連制とした。

結果： 次表に示す様に、検体では S9 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に比べて復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。これに対し、陽性対照として用いた AF-2、SA、9-AA では S9 Mix の無添加において、また 2-AA では S9 Mix の添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において復帰変異誘発性は有さ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石原産業株式会社にある。

8.11.12 細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 No. TM-12)

試験機関

報告書作成年 1992 年 [GLP 対応]

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA1535、TA1537、TA98、TA100 の 4 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9 Mix) の存在下または非存在下で、Ames 等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体は DMSO に溶解し、313~5000 µg/Plate の範囲の 5 濃度で実施した。試験は 2 連制とした。

結果： 次表に示す様に、検体では S9 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に比べて復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。これに対し、陽性対照として用いた ENNG、2-NF、9-AA では S9 Mix の無添加において、また B(a)P、2-AA では S9 Mix の添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において復帰変異誘発性は有さ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石原産業株式会社にある。

8.11.12A 細菌を用いる復帰突然変異試験 (資料 No. TM-12A)

試験機関

報告書作成年：2016年 [GLP 対応]

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535、TA98、TA1537)及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株)を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 Mix)の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。
検体は水に溶解し、本試験 I は 4.88~5000 µg/プレート の 6 用量 (公比 4)、本試験 II は 313~5000 µg/プレート の 5 用量 (公比 2) で試験した。試験はプレインキュベーション法を用いて 3 連制で実施した。

結果： 結果を次表に示した。本試験 I 及び II において、S9 Mix の有無に関わらず、すべての用量及び菌株において復帰変異コロニー数の増加を示さなかった。尚、いずれの菌株においても生育阻害は認められず、S9 Mix の非存在下、存在下でいずれも検体の析出は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた AF-2、NaN₃ 及び ICR-191 では S9 Mix の非添加で、また 2-AA では S9 Mix の添加によりすべての菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、TZO は代謝活性化を含む本試験条件下において復帰突然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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.13 植物代謝物 4 種の単回強制経口投与マウスにおける コリンエステラーゼ活性阻害比較試験 (資料 No. TM-13)

結果に基づき、これら4種の植物代謝物では、原体に認められたようなコリンエステラーゼ活性阻害作用は無いものと判断された。

8.11.14 細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 No. TM-14)

試験機関

報告書作成年 1993 年 [GLP 対応]

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100 の 5 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S9 Mix) の存在下または非存在下で、Ames 等の方法で復帰変異誘発性を検定した。検体は蒸留水に溶解し、33~5000 µg/Plate の範囲の 5 濃度で実施した。試験はプレート法で行い、3 連制で 2 回実施した。

結果： 次表に示す様に、検体では S9 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に比べて復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。これに対し、陽性対照として用いた 2-NF、SA、9-AA では S9 Mix の無添加において、また 2-AA では S9 Mix の添加により復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において復帰変異誘発性は有さ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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.14A チャイニーズハムスター肺腺維芽細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験
(資料 No. TM-14A)

試験機関
報告書作成年 2017年【GLP 対応】

試験方法： チャイニーズハムスター肺由来の株化細胞である CHL/IU 細胞を用い、代謝活性化及び非代謝活性化によって染色体異常誘発性を検定した。
検体は水に溶解し、陽性対照にはマイトマイシン C (MMC)またはベンゾ[a]ピレン (B[a]P)を用いた。
試験は2連制とし、1濃度あたり300個の分裂中期像を観察し、短時間処理法(6時間)及び連続処理法(24時間)の試験を行った。

結 果： 結果を次表に示した。
検体は代謝活性化の有無にかかわらず、すべての処理群で染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。
一方、陽性対照として用いた MMC 及び B[a]P では染色体異常を示す分裂中期細胞の割合の明らかな増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.15 ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (資料 No. TM-15)

試験機関

報告書作成年 1993 年 [GLP 対応]

試験方法： マウスリンパ腫細胞の L5178Y TK⁺ 細胞を用いて代謝活性化系及び非代謝活性化系における Thymidine kinase 遺伝子座の遺伝子突然変異誘発性を評価した。検体は脱イオン水に溶解した。試験はソフトアガー法を用いて溶媒対照は 4 連制で、検体処理群および陽性対照群は 1 連制で 2 回行った。

結 果： 結果を次表に示した。

検体処理群において代謝活性化の有無にかかわらず、すべての処理群で突然変異頻度の有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたメタンスルホン酸エチル (EMS) または 7,12-ジメチルベンズアントラセン (DMBA) 処理群では、突然変異頻度の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、L5178Y TK⁺ 細胞に対し突然変異を誘発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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.16 マウスにおける小核試験 (資料 No. TM-16)

試験機関

報告書作成年 1994年 [GLP 対応]

試験動物： ICR系マウス、6-8週齢、
本試験1群雌雄各5匹(対照群10匹)、体重雄30.6~37.8g、雌23.4~31.2g
確認試験1群雄10匹、体重雄27.9~36.6g

試験方法： 検体は蒸留水に懸濁または溶解させ、雄は1000、500、250mg/kg、雌は1800、900、450mg/kgをそれぞれ単回強制経口投与し、投与の24、48及び72時間後に骨髓塗沫標本を作製した。陽性対照にはCyclophosphamid (CP)を30mg/kgで単回強制経口投与し、投与24時間後に骨髓採取した。各標本について、細胞毒性を調べるために1000個の赤血球を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した後、引き続き1000個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。なお初回試験の24時間群雄マウスに関しては各動物2000個の多染性赤血球を観察した。

結果： 結果を表に示した。本試験において、1000mg/kgを投与した雄マウスが2/20例、1800mg/kgを投与した雌マウスが10/20例死亡した。

また、雄マウス1000mg/kgにおいて嗜眠および眼脂、雌マウス1800mg/kgにおいて嗜眠、眼脂および沈静がみられた。なお、死亡例の多かった群は予備投与群から動物を補充した。

雄マウス500および1000mg/kg24時間標本作製群において小核を有する多染性赤血球の有意な($P \leq 0.05$)増加が認められたが、雌マウスでは有意な増加は認められなかった。

雄マウスの結果に関して、用量-反応相関が明確でなかったため1群10匹で1000、500、250mg/kgの用量で確認試験を行った。その結果、動物の死亡はみられなかった。一般症状として1000mg/kg群の2/10例で沈静、1/10例で眼脂がみられた。いずれの投与群においても小核を有する多染性赤血球の頻度の有意な増加は認められず、再現性はみられなかった。

一方、いずれの試験においても陽性対照のCPでは小核を有する多染性赤血球の頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

以上の結果より本試験条件下において、検体はマウスの骨髄細胞に対して小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.17 ウサギにおける皮膚刺激性試験 (資料 No. TM-17)

試験機関

報告書作成年 1993年 [GLP 対応]

供試動物： New Zealand White 系ウサギ、若齢成獣、体重 2.283 kg、雌 1 匹 (通常の皮膚刺激性試験の予備検討として実施されたため)

観察期間： 9 日間

投与方法： 検体貼付の 16～30 時間前にウサギの背部を刈毛して、検体貼付部位を設けた。検体原液 0.5 mL を貼付部位(約 2.54 cm×2.54 cm)に直接塗布し、非アレルギー性のテープ (約 5.08 cm×5.08 cm)にガーゼパッチを張り付けて貼付部位を覆った後に粘着テープで被覆した。4 時間貼付した後、パッチを剥がし、水およびペーパータオルで皮膚に残った検体を洗い流した。対照皮膚は設定しなかった。

観察項目： 貼付終了後 30～60 分、24 時間後から 9 日後までは一日一回、貼付部位を観察し、ドレイズ法の基準に従って皮膚反応を採点した。
また、一般状態の観察を毎日2回行なった。

結 果： 観察した刺激性変化の採点は、次頁の表に示した。

紅斑および痂皮

貼付終了後 30～60 分から 4 日後の観察において高度の紅斑が観察された。5 日後及び 6 日後に紅斑はいったん中等度となったが、7 日後から 9 日後までふたたび高度となった。

貼付終了後 30～60 分から 24 時間後、8 日後及び 9 日後に痂皮が観察された。

浮腫

貼付終了後 30～60 分から 24 時間後の観察において高度の浮腫が観察された。48 時間後には明瞭な浮腫が観察されたが、72 時間後には回復し、以降観察されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

その他の皮膚反応

貼付終了後 30～60 分から 8 日後まで投与部位にときに出血を伴う皮膚の裂創が観察された。

貼付終了後 30～60 分から 9 日後まで皮膚の壊死が観察された。

貼付終了後 72 時間から 9 日後まで皮膚の肥厚が観察された。

貼付終了後 9 日目には皮膚組織の脱落が観察された。

一般状態の異常は認められなかった。

以上の結果から、
性であるものと判断した。

ウサギの皮膚に対して、腐食

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

表 皮膚反応の評価点

動物番号	観察項目	最高 評点	暴露終了後における皮膚反応評点									
			30・ 60分	24 時間	48 時間	72 時間	4 日	5 日	6 日	7 日	8 日	9 日
2F	紅斑・痂皮	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	4
	浮腫	4	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0

8.11.18 ウサギを用いた眼刺激性試験 (資料 No. TM-18)

試験機関

報告書作成年 1993年 [GLP 対応]

供試動物： New Zealand White 系ウサギ、若齢成獣、体重 2.662 kg、1 群雌 1 匹 (通常の眼刺激性試験の予備検討として実施されたため)

観察期間： 10 日間

投与方法： 検体適用の前日にフルオレセイン染色および紫外線ライトによる眼の検査を実施し、眼の異常や角膜の損傷の認められないウサギを試験に用いた。右目の結膜嚢内に検体 0.1 mL を適用し、検体の流失を防ぐため、およそ 1 秒間上下眼瞼を軽く合わせた。適用した側と反対側の眼を無処理対照とし、洗眼群は設けなかった。

観察項目： 検体適用 1、24、48 及び 72 時間後、以降は 4 日後、7 日後、10 日後に眼の反応を観察し、フルオレセイン染色および紫外線ライトによる詳細な観察は 72 時間後及び 7 日後に実施した。角膜、虹彩および結膜の刺激性変化についてはドレイズ法の基準に従って眼の反応を採点した。また、一般状態の観察を毎日 2 回行なった。

結果： 観察した刺激性変化の採点は、次頁の表に示した。

角膜

検体適用 1 時間後から 10 日後まで角膜の混濁 (最高評点は混濁：評点 4、面積：評点 4) が観察された。7 日及び 10 日後では重度の結膜の浮腫により、角膜の混濁の面積を評価することが困難であったため、可能な範囲で観察を行った。検体適用 72 時間及び 7 日後に実施したフルオレセイン染色による観察では、角膜上皮の約 100 % に重篤な損傷が認められた。これらの症状は通常の観察期間である 21 日間では回復しないものと判断し、10 日後に試験を終了した。

虹彩

検体適用 1 時間から 24 時間後まで虹彩の充血 (最高評点：1) が観察されたが、その後重度の角膜の混濁が続いたため、48 時間後以降の虹彩の評価は不可能であった。

結膜

検体適用 1 時間から 10 日後まで結膜の浮腫、分泌物 (最高評点は浮腫：評点 4、分泌物：評点 3) が観察された。検体適用 7 日から 10 日後まで結膜の発赤 (最高評点：2) が観察された。

検体適用 1 時間から 4 日後まで結膜の白色化、24 時間から 10 日後まで膿を含む分泌物が観察された。

その他の反応

7 日から 10 日後まで眼瞼の褶曲、48 時間後に分泌物の結晶化が観察された。検体

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

適用 72 時間から 10 日後まで眼周囲の脱毛、10 日後には眼周囲に痂皮形成が観察された。

一般状態の異常は認められなかった。

以上の結果から、
刺激性であるものと判断した。

ウサギの眼に対して、重度の

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

結果表

動物 番号	観察項目		最 高 評 点	適用後時間						
				1 時間	24 時間	48 ^a 時間	72 ^a 時間	4 ^a 日後	7 ^a 日後	10 ^{a,b} 日後
1	角膜	程度(A)	4	3	3	4	4	4	4	4
		面積(B)	4	4	4	1	2	2	3 ^b	-
	角膜評点(A×B×5)		80	60	60	20	40	40	60	-
	虹彩(C)		2	1	1	-	-	-	-	-
	虹彩評点(C×5)		10	5	5	-	-	-	-	-
	結膜	発赤(D)	3	0	0	0	0	0	2	2
		浮腫(E)	4	2	3	3	3	3	4	4
		分泌物(F)	3	1	2	3	3	3	2	2
	結膜評点(D+E+F)×2		20	6	10	12	12	12	16	16
	個別別評点		110	71	75	-	-	-	-	-

*: Draize 法に従い、加重評点を記載 (最高 110 点)

a: 重篤な角膜の混濁のため、虹彩の観察を実施できなかった。

b: 重篤な結膜の浮腫のため、角膜の混濁・面積の観察を可能な範囲とした。

8.11.19 ラットにおける急性経口毒性試験（資料 No. TM-19）

試験機関

報告書作成年 2002 年 [GLP 対応]

供試動物： SD 系ラット、投与時 5～6 週齢、体重 雄 112.9～155.9 g、雌 86.5～128.3 g、雌雄 6 匹

観察期間： 14 日間

試験方法： 毒性等級法

投与方法： 検体を注射用水に溶解し経口投与した。投与前に約 17 時間絶食した。

観察・検査項目： 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。投与前、投与 1、3、7 及び 14 日目に体重を測定した。試験終了時に全供試動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	200、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	> 2000
死亡開始時間及び終了時間	なし
症状発現時間及び消失時間	投与後 30 分から発現、投与後 2 日まで
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	200
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状として、200 mg/kg 投与群の雌で自発運動の減少、2000 mg/kg 投与群の雌雄では自発運動の減少、腹臥姿勢、下腹部被毛の汚れが観察された。またその他の変化として、一過性の流涎、眼瞼下垂が散見された。投与後 2 日以降、異常は認められなかった。体重については、2000 mg/kg 投与群の雌雄で投与翌日に増加抑制傾向が窺われたが、その後は順調な体重推移が認められた。剖検所見では、雌雄全例に異常は認められなかった。

8.11.20 細菌を用いる復帰突然変異試験 (資料No. TM-20)

試験機関：

報告書作成年：2002年[GLP 対応]

試験方法：ヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* 菌 4 株 (TA1535、TA1537、TA98 及び TA100) およびトリプトファン要求性の大腸菌株 (*Escherichia coli* WP2 *uvrA*) を用い、ラット肝由来の代謝活性化系 (S9 mix) 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により変異原性を検定した。

検体は注射用水に溶解し、本試験では 313、625、1250、2500 及び 5000 µg/プレート (±S9 mix) を設定した。溶媒対照として注射用水を、陽性対照として、S9 mix 非存在下では AF-2、NaN₃ または 9-AA、S9 mix 存在下では 2-AA を用いた。

各用量 3 枚のプレートを用いて試験を実施した。結果の判定は復帰突然変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍を超えて増加し、用量相関性かつ再現性が認められる場合を陽性と判定した。

試験結果：プレインキュベーション法による用量設定試験及び本試験結果をそれぞれ表 1 及び表 2 に示した。いずれの試験においても、S9 mix の有無にかかわらず全ての供試菌株で復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、陽性対照では、全ての菌株で明らかな復帰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、
誘発性を有さないものと判断される。

S9 mix の有無にかかわらず、復帰突然変異

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.21 チャイニーズハムスターの CHL 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No.TM-21)

試験機関：

報告書作成年：2002 年 [GLP 対応]

試験方法： チャイニーズハムスター肺線維芽細胞由来の継代した細胞株CHL/IUを用い、代謝活性化及び非代謝活性化条件での染色体異常誘発性を検定した。検体は生理食塩水に溶解し、陽性対照にはマイトマイシンC (MMC)またはシクロホスファミド (CP)を用いた。観察は1濃度あたり200個の分裂中期細胞について行い、短時間処理法(6時間)および連続処理法(24時間、48時間)の試験を行った。

試験結果： 結果を表1及び2に示した。

検体は代謝活性化の有無に関わらず、すべての処理群において染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。

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

以上の結果より、検体は代謝活性化の有無に関わらず、本試験条件下において、染色体異常誘発性を有さ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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.22 ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (資料 No. TM-22)

試験機関 :

報告書作成年 : 2002 年 [GLP 対応]

試験方法 : マウスリンパ腫細胞由来の L5178Y *tk*⁺細胞を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、96 穴プレートを用いたマイクロウェル法によって遺伝子突然変異誘発性を評価した。検体は蒸留水に溶解し、代謝活性化系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で 3 時間 (3 時間処理) 及び S9 mix の非存在下で 24 時間 (24 時間処理)、細胞に処理した。陽性対照にはメタンスルホン酸メチル(MMS)またはシクロホスファミド (CP)を用いた。すべての試験について、以下の用量を設定した。

340、680 及び 1360 µg/mL (公比 2)

結 果 : 結果を次頁の表に示した。

いずれの処理方法においても、被験物質処理により突然変異体頻度は有意に増加しなかった。

一方、当該試験条件下において、陽性対照として用いた MMC 及び CP では突然変異誘発率の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、L5178Y *tk*⁺細胞に対し遺伝子突然変異を誘発しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.23 ラットにおける急性経口毒性試験 (資料 No. TM-23)

試験機関

報告書作成年 2002 年 [GLP 対応]

供試動物： SD 系ラット、投与時 5 週齢、体重 雄 97.3~118.5 g、雌 87.0~125.7 g、雄 3 匹、雌 6 匹

観察期間： 14 日間

試験方法： 毒性等級法

投与方法： 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し経口投与した。投与前に約 17 時間絶食した。

観察・検査項目： 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。投与前、投与 1、3、7 及び 14 日目に体重を測定した。死亡動物は発見したらすぐに、試験終了後に全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雄 200 雌 200、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	300~500
死亡開始時間及び終了時間	投与後 30 分から開始、投与後 2 時間に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後 30 分から発現、死亡まで
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	200
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	200

中毒症状として、2000 mg/kg 投与群の雌に腹臥姿勢、自発運動の減少、鎮静、流涎、尿失禁等が観察され、投与後 2 時間に全例が死亡した。200 mg/kg 投与群の雌雄には、一般状態、体重推移に異常は観察されなかった。剖検所見では、死亡例、生存例ともに肉眼的変化は認められなかった。

8.11.24 細菌を用いる復帰突然変異試験 (資料No. TM-24)

試験機関：

報告書作成年：2002年 [GLP 対応]

試験方法：ヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* 菌 4 株 (TA1535、TA1537、TA98 及び TA100) およびトリプトファン要求性の大腸菌株 (*Escherichia coli* WP2 *uvrA*) を用い、ラット肝由来の代謝活性化系 (S9 mix) 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により変異原性を検定した。

検体は注射用水に溶解し、本試験では 156、313、625、1250、2500 及び 5000 µg/プレート (-S9 mix) ならびに 78.1、156、313、625、1250、2500 及び 5000 µg/プレート (+S9 mix) を設定した。溶媒対照として注射用水を、陽性対照として、S9 mix 非存在下では AF-2、NaN₃ または 9-AA、S9 mix 存在下では 2-AA を用いた。

各用量 3 枚のプレートをを用いて試験を実施した。結果の判定は復帰突然変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍を超えて増加し、用量相関性かつ再現性が認められる場合を陽性と判定した。

試験結果：プレインキュベーション法による用量設定試験及び本試験結果をそれぞれ表 1 及び表 2 に示した。いずれの試験においても、S9 mix の有無にかかわらず全ての供試菌株で復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、陽性対照では、全ての菌株で明らかな復帰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

S9 mix の有無にかかわらず、復帰突然変

異誘発性を有さ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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.25 チャイニーズハムスターの CHL 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験(資料 No.TM-25)

試験機関：

報告書作成年：2002年 [GLP 対応]

試験方法： チャイニーズハムスター肺線維芽細胞由来の継代した細胞株CHL/TUを用い、代謝活性化及び非代謝活性化条件での染色体異常誘発性を検定した。検体は生理食塩水に溶解し、陽性対照にはマイトマイシンC (MMC)またはシクロホスファミド (CP)を用いた。観察は1濃度あたり200個の分裂中期細胞について行い、短時間処理法(6時間)および連続処理法(24時間、48時間)の試験を行った。

試験結果： 結果を表1及び2に示した。

48時間連続処理法において、1519及び3100 µg/mLで構造異常を有する細胞率が統計学的に有意に増加し、傾向検定で有意な用量相関性の増加を示した。また、

3100 µg/mLについて

は陽性と判定された。この3つの結果から、最高用量3100 µg/mLについては陽性と判断した。しかしながら、3100 µg/mLでは顕著な細胞毒性及び有糸分裂指数の減少(表3)が認められることから、細胞毒性による二次的な影響と考えられた。また、この用量におけるD₂₀値及びTR値(表4参照)はそれぞれ5.86 mg/mL及び

1.77/mgであることから、

変異原性は既知の変異原性物質と比較して弱い

ことが示唆された。なお、数的異常の増加は認められなかった。

その他の処理群では、検体は代謝活性化の有無に関わらず、染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。

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

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

以上の結果より、検体は細胞毒性を示す最高用量でのみ染色体異常(構造異常)誘発性を有するが、その作用は比較的弱く、細胞毒性による二次的なものと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.26 ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (資料 No. TM-26)

試験機関 :
報告書作成年 : 2002 年 [GLP 対応]

試験方法 : マウスリンパ腫細胞由来の L5178Y *tk*⁺細胞を用いて、代謝活性化系(S9 mix)の存在下及び非存在下で、96 穴プレートを用いたマイクロウェル法によって遺伝子突然変異誘発性を評価した。検体は生理食塩水に溶解し、S9 mix の存在下及び非存在下で 3 時間 (3 時間処理)及び S9 mix の非存在下で 24 時間 (24 時間処理)、細胞に処理した。陽性対照にはメタンスルホン酸メチル(MMS)またはシクロホスファミド(CP)を用いた。すべての試験について、以下の用量を設定した。

758、1520 及び 3030 µg/mL (公比 2)

結 果 : 結果を次頁の表に示した。
いずれの処理方法においても、被験物質処理により突然変異体頻度は有意に増加しなかった。
一方、当該試験条件下において、陽性対照として用いた MMS 及び CP では突然変異誘発率の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、L5178Y *tk*⁺細胞に対し遺伝子突然変異を誘発しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.27 マウスを用いた小核試験 (資料 No.TM-27)

試験機関

報告書作成年 2003 年 [GLP 対応]

供試動物： ICR 系マウス、約 6 週齢、体重：雄 24～30 g、雌 20～26 g
1 群雌雄各 5 匹(投与群及び溶媒対照群)または 3 匹(陽性対照群)

試験方法： 検体を蒸留水に溶解し、雄に 25、50 及び 100 mg/kg 体重、雌に 10、20 及び 40 mg/kg 体重の投与用量で単回強制経口投与した。陰性対照群には蒸留水を、陽性対照にはシクロホスファミド (CP)を 50 mg/kg 体重で同様に投与した。

雄の 100 mg/kg 体重群については、48 時間採取群で投与後約 18 時間に 2 例が死亡したため、3 例について観察を行った。それに伴い、より慎重に染色体異常誘発性を判定するため、統計検定に適切な例数を確保するために 24 時間採取群を 6 例に増やして実施した。

全群について投与 24 時間後に、雌雄とも最高用量群及び溶媒対照群についてはさらに 48 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髄を採取してスライドグラス上にメタノール固定後、メイ・ギムザ染色して骨髄標本作製した。

各標本について、2000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。また、細胞毒性を調べるために 1000 個の赤血球を観察し、正染性赤血球と多染性赤血球の比を算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

結果： 結果を表 1 及び 2 に示す。

雄の 100 mg/kg 体重群で 2 例が死亡した。また、同群の生存動物 1 例に円背位、嗜眠、立毛、呼吸数低下及び運動失調が認められた。その他の投与群の動物の一般状態には異常は認められなかった。

雌雄いずれの用量及び標本採取時間においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。正染性赤血球に対する多染性赤血球の比は、いずれの標本作製時間及び用量においても有意な減少は認められなかった。

陽性対照である CP では、小核を有する多染性赤血球の頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

結論： 以上の結果から本試験条件下において、検体はマウスの骨髄細胞に対して小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.28 チャイニーズハムスター肺腺維芽細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験
(資料 No. TM-28)

試験機関

報告書作成年 2017 年 [GLP 対応]

試験方法： チャイニーズハムスター肺由来の株化細胞である CHL/IU 細胞を用い、代謝活性化及び非代謝活性化によって染色体異常誘発性を検定した。
検体は水に溶解して用い、陽性対照にはマイトマイシン C (MMC) 及びベンゾ[a]ピレン (B[a]P)を用いた。
試験は 2 連制とし、1 濃度あたり 300 個の分裂中期像を観察した。

結 果： 結果を次表に示した。
検体は代謝活性化の有無にかかわらず、すべての処理群で染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。
一方、陽性対照として用いた MMC 及び B[a]P では染色体異常を示す分裂中期細胞の割合の明らかな増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.29 ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験（マウスリンフォーマ TK 試験）
(資料 No. TM-29)

試験機関 :

報告書作成年 : 2017 年 [GLP 対応]

試験方法 : マウスリンパ腫細胞 (L5178Y *TK*^{-/-}-3.7.2C 株) を用いて、マイクロウェル法により *tk* 遺伝子座における突然変異誘発性を評価した。検体は注射用水 (蒸留水) に溶解し、250、500、1000 及び 2000 µg/mL の濃度で、代謝活性化系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で 3 時間 (短時間処理) ならびに S9 mix の非存在下で 24 時間 (連続処理) 細胞に処理した。陰性対照として蒸留水を、陽性対照としてメタンスルホン酸メチル (MMS) またはシクロホスファミド (CP) を用いた。結果の判定には、総合的評価ファクター (Global Evaluation Factor; GEF) を用いた。

試験結果 : 遺伝子突然変異試験結果を表 1 に示した。
いずれの処理方法及び用量においても、細胞毒性及び検体の沈殿は観察されず、検体処理による突然変異頻度の増加は認められなかった。
陽性対照として用いた MMS 及び CP では突然変異頻度の明らかな増加が認められた。

結論 : 以上の結果より、本試験条件下において、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、マウスリンパ腫細胞 (L5178Y *tk*^{-/-}-3.7.2C 株) に対して遺伝子突然変異を誘発しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.30

ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 No. TM-30)

試験機関

報告書作成年 2017 年 [GLP 対応]

試験方法： 二名の健康な非喫煙成人男性から提供された血液をプールし、フィトヘマグルチニン(PHA)にて細胞分裂を誘発したリンパ球を用い、代謝活性化及び非代謝活性化によって染色体異常誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、陽性対照としてマイトマイシン C (MMC)及びシクロホスファミド(CP)を用いた。

観察は 1 濃度あたり 300 個の分裂中期像について行い、試験は 2 連とした。

結 果： 結果を次表に示した。

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

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

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.31

ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験（資料 No.TM-31）

試験機関

報告書作成年 2017 年 [GLP 対応]

試験方法： マウスリンパ腫細胞由来の L5178Y TK⁺細胞を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、96 穴プレートを用いたマイクロウェル法によって遺伝子突然変異誘発性を評価した。検体は DMSO に溶解し、代謝活性化系 (S9 Mix) の存在下及び非存在下で 3 時間 (3 時間処理) 及び S9 Mix の非存在下で 24 時間 (24 時間処理)、細胞に処理した。陽性対照にはメタンスルホン酸メチル (MMS) またはベンゾ[a]ピレン (B[a]P) を用いた。すべての試験について、以下の用量を設定した。

125、250、500、1000 及び 2000 µg/mL (公比 2)

結 果： 結果を次頁の表に示した。

全ての試験条件及び処理用量において、溶媒対照群に比べて突然変異誘発率の統計学的有意な増加は認められなかった。

当該試験条件下において、陽性対照として用いた MMS または B[a]P 処理群では、突然変異誘発率の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、L5178Y TK⁺細胞に対し変異原性を有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.32

ヒトリリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 No. TM-32)

試験機関

報告書作成年 2017 年 [GLP 対応]

試験方法： 二名の健康な非喫煙成人男性から提供された血液をプールし、フィトヘマグルチニン(PHA)にて細胞分裂を誘発したリンパ球を用い、代謝活性化及び非代謝活性化によって染色体異常誘発性を検定した。

検体は水に溶解して用い、陽性対照にはメタンスルホン酸メチル (MMS) またはシクロホスファミド (CP) を用いた。

観察は 1 濃度あたり 300 個の分裂中期像について行い、試験は 2 連とした。

結 果： 結果を次表に示した。

非代謝活性化の短時間処理の 1200 及び 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理で構造異常を示す分裂中期細胞の割合の統計学的に有意な増加を認めたが、長時間処理では認められなかった。代謝活性化の短時間処理では 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理で構造異常を示す分裂中期細胞の割合の統計学的に有意な増加を認めた。上記結果を確認するため、同一条件で短時間処理について追加確認試験を実施した。その結果、非代謝活性化の短時間処理では 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理のみでギャップを含む構造異常を示す分裂中期細胞の割合の統計学的に有意な増加を認めたが、代謝活性化の短時間処理では確認試験において染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。非代謝活性化の短時間処理の結果は疑陽性であるが、長時間処理で陰性であること、また代謝活性化の短時間処理の結果は再現性試験で陰性であったことから、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性は有しないものと判断した。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C (MMC) 及びシクロホスファミド (CP) では染色体異常を示す分裂中期細胞の割合の明らかな増加を示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性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石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.33

ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (資料No. TM-33)

試験機関

報告書作成年 2017年 [GLP 対応]

試験方法： マウスリンパ腫細胞由来の L5178Y TK^{+/+}細胞を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、96 穴プレートを用いたマイクロウェル法によって遺伝子突然変異誘発性を評価した。検体は水に溶解し、代謝活性化系 (S9 Mix) の存在下及び非存在下で 3 時間 (3 時間処理) 及び S9 Mix の非存在下で 24 時間 (24 時間処理)、細胞に処理した。陽性対照にはメタンスルホン酸メチル (MMS) またはベンゾ[a]ピレン (B[a]P) を用いた。すべての試験について、以下の用量を設定した。

62.5、125、250、500、1000 及び 2000 µg/mL (公比 2)

結 果： 結果を次頁の表に示した。

全ての試験条件及び処理用量において、溶媒対照群に比べて突然変異誘発率の統計学的有意な増加は認められなかった。

当該試験条件下において、陽性対照として用いた MMS または B[a]P 処理群では、突然変異誘発率の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、L5178Y TK^{+/+}細胞に対し変異原性を有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.34

マウスを用いた *in vivo* 小核試験 (資料 No.TM-34)

試験機関

報告書作成年 2017 年 [GLP 対応]

供試動物： ICR 系マウス、投与開始時 8 週齢、体重：31.2～38.1 g、1 群雄 5 匹
他にトキシコキネティクス (TK) 分析用衛星群として雄 15 匹 (溶媒対照：3 匹、
高用量投与：12 匹)

試験方法： 検体を注射用水 (蒸留水) に溶解し、雄マウスに 500、1000 及び 2000 mg/kg 体重
/日 (投与液量 10 mL/kg 体重) で 1 日 1 回、24 時間間隔で合計 2 回強制経口投与し
た。溶媒対照 (陰性対照) 群には蒸留水を同様に投与した。陽性対照群にはマイト
マイシン C (MMC) 2 mg/kg 体重を単回腹腔内投与した。
投与群及び溶媒対照群については最終投与 23～24 時間後に、陽性対照群について
は投与 24～25 時間後に、各動物の大腿骨から骨髓を採取し、スライドグラス上にメ
タノール固定後、アクリジンオレンジ蛍光染色して骨髓標本を作製した。
各動物について、計 4000 個の幼若赤血球を観察し、小核を有する幼若赤血球の頻度
を算出した。また、各動物について約 500 個の赤血球を観察し、全赤血球に占める
幼若赤血球の割合を算出した。
TK 分析用衛星群には、蒸留水または検体 2000 mg/kg 体重を単回強制経口投与し、
1、2、6 及び 24 時間後に後大静脈から採血した血漿を用いて 濃度を測定
した。

試験結果： 骨髓標本の観察結果を表 1 に、TK 分析結果を表 2 に示す。
いずれの投与群においても、一般状態及び体重変化に異常は認められなかった。各
投与群の小核を有する幼若赤血球の頻度及び全赤血球に対する幼若赤血球の割合の
いずれにおいても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。
陽性対照である MMC 投与群では、溶媒対照群と比較して小核を有する幼若赤血球
の頻度の有意な増加及び全赤血球に対する幼若赤血球の割合の有意な低下が認めら

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

れた。

TK分析の結果、2000 mg/kg 体重投与群における C_{max} 、 T_{max} 及び AUC_{0-24h} は、それぞれ 19600 ng/mL、1 時間及び 89100 ng · h/mL であった。

結論： 本試験条件下において、検体はマウスの骨髄細胞に対して小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

8.11.35

ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 No. TM-35)

試験機関

報告書作成年 2018 年 [GLP 対応]

試験方法： 二名の健康な非喫煙成人から提供された血液をプールし、フィトヘマグルチニン (PHA)にて細胞分裂を誘発したリンパ球を用い、代謝活性化及び非代謝活性化によって染色体異常誘発性を検定した。

検体は水に溶解し、陽性対照としてマイトマイシン C (MMC)及びシクロホスファミド (CP)を用いた。

観察は 1 濃度あたり 300 個の分裂中期像について行い、試験は 2 連とした。

結 果： 結果を次表に示した。

長時間処理法では 1200 及び 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で構造異常を有する細胞数が有意に増加し、検体処理の影響と判断された。短時間処置法の非代謝活性系の 720 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で構造異常を有する細胞数が試験実施施設の背景値を超えて有意に増加したが、用量との関連性はなく生物学的意義は不明であった。倍数性を示す細胞の有意な増加はなかった。

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

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

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.36

ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (資料 No.TM-36)

試験機関 Envigo

報告書作成年 2017年 [GLP 対応]

試験方法： マウスリンパ腫細胞由来の L5178Y TK⁺細胞を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、96 穴プレートを用いたマイクロウェル法によって遺伝子突然変異誘発性を評価した。検体は水に溶解し、代謝活性化系 (S9 Mix)の存在下及び非存在下で 3 時間 (3 時間処理)及び S9 Mix の非存在下で 24 時間 (24 時間処理)、細胞に処理した。すべての試験について、以下の用量を設定した。

62.5、125、250、500、1000 及び 2000 µg/mL (公比 2)

陽性対照にはメタンスルホン酸メチル (MMS)またはベンゾ[a]ピレン (B[a]P)を用いた。

結 果： 結果を次頁の表に示した。

全ての試験条件及び処理用量において、溶媒対照群に比べて突然変異誘発率の統計学的有意な増加は認められなかった。

当該試験条件下において、陽性対照として用いた MMS または B[a]P 処理群では、突然変異誘発率の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、L5178Y TK⁺細胞に対し変異原性を有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.37

マウスを用いた *in vivo* 小核試験 (資料 No.TM-37)

試験機関

報告書作成年 2018 年 [GLP 対応]

供試動物： ICR 系マウス、投与開始時 41～48 日齢、体重：29.4～35.1 g、1 群雄 6 匹

試験方法： 検体を注射用水（蒸留水）に溶解し、雄マウスに 500、1000 及び 2000 mg/kg 体重/日（投与液量 10 mL/kg 体重）で 1 日 1 回、24 時間間隔で合計 2 回強制経口投与した。溶媒対照群には蒸留水を同様に投与した。最終投与 18～24 時間後に、各動物の大腿骨から骨髓を採取し、スライドグラス上にメタノール固定後、アクリジンオレンジ染色して骨髓標本を作製した。

各動物について、計 4000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。また、各動物について少なくとも 1000 個の赤血球を観察し、多染性赤血球の割合及び小核を有する正染性赤血球数を計数した。陽性対照には試験実施施設のマイトマイシン C (MMC) 投与による背景データから得られた骨髓標本を参照した。

検体の骨髓への暴露証明試験を同施設にて同一系統のマウスを用いて行った結果(資料 No.TM-37 補遺)、2000 mg/kg の単回投与後の血漿中濃度は 0.25、0.5、1、4 及び 24 時間後でそれぞれ 54.1、87.4、21.8、11.7 及び 6.32 ng/mL であった。

試験結果： 骨髓標本の観察結果を表 1 に示す。

2000 mg/kg 体重/日投与群の 6 例中 1 例で重篤な臨床徴候（活動性低下、円背、半閉眼等）が認められたため、この動物を投与 2 日に切迫と殺した。剖検では誤投与の徴候は観察されなかった。500 及び 1000 mg/kg 体重/日投与群では、毒性徴候は認められなかった。いずれの投与群においても、小核を有する多染性赤血球数及び小核を有する正染色性赤血球数に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、全赤血球に対する多染性赤血球の割合に統計学的に有意な低下はみられなかった。

結論： 本試験条件下において、検体はマウスの骨髓細胞に対して小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.38

ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 No. TM-38)

試験機関

報告書作成年 2017年 [GLP 対応]

試験方法： 二名の健康な非喫煙成人男性から提供された血液をプールし、フィトヘマグルチニン(PHA)にて細胞分裂を誘発したリンパ球を用い、代謝活性化及び非代謝活性化によって染色体異常誘発性を検定した。

検体は水に溶解し、陽性対照としてマイトマイシン C (MMC)及びシクロホスファミド(CP)を用いた。

観察は1濃度あたり300個の分裂中期像について行い、試験は2連とした。

結果： 結果を次表に示した。

非代謝活性化の短時間処理では最高用量のみ、構造異常を示す分裂中期細胞の割合の統計学的に有意な増加を認めた。代謝活性化の短時間処理では、256.89 µg/mL以上の用量でギャップを含む構造異常を示す分裂中期細胞の割合の統計学的に明らかな有意な増加を認めた。短時間処理で明確な陽性であったため長時間処理の分析は実施しなかった。

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

以上の結果より、検体は本試験条件下において染色体異常誘発性を有するものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.39

ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (資料 No.TM-39)

試験機関

報告書作成年 2017年 [GLP 対応]

試験方法： マウスリンパ腫細胞由来の L5178Y TK^{+/+}細胞を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、96 穴プレートを用いたマイクロウェル法によって遺伝子突然変異誘発性を評価した。検体は DMSO に溶解し、代謝活性化系 (S9 Mix) の存在下及び非存在下で 3 時間 (3 時間処理) 及び S9 Mix の非存在下で 24 時間 (24 時間処理)、細胞に処理した。陽性対照にはメタンスルホン酸メチル (MMS) またはベンゾ[a]ピレン (B[a]P) を用いた。用量は以下のように設定した。

3 時間,-S9 : 7.74、15.49、30.97、61.94、123.89、247.78、495.55、991.1、1486.7
及び 1982.2 µg/mL

3 時間,+S9 : 61.94、123.89、247.78、495.55、743.3、991.1、1486.7 及び 1982.2
µg/mL

24 時間,-S9 : 30.97、61.94、123.89、247.78、495.55、991.1、1486.7 及び 1982.2
µg/mL

結 果： 結果を次頁の表に示した。

全ての試験条件及び処理用量において、溶媒対照群に比べて突然変異誘発率の統計学的有意な増加は認められなかった。

当該試験条件下において、陽性対照として用いた MMS または B[a]P 処理群では、突然変異誘発率の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、L5178Y TK^{+/+}細胞に対し変異原性を有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.40

マウスを用いた *in vivo* 小核試験 (資料 No.TM-40)

試験機関

報告書作成年 2017 年 [GLP 対応]

供試動物： ICR 系マウス、投与開始時 8 週齢、体重：30.6～37.0 g

1 群雄 5 匹 (高用量群のみ 7 匹)

他にトキシコキネティクス (TK) 分析用衛星群として雄 15 匹 (溶媒対照：3 匹、高用量投与：12 匹)

試験方法： 検体を注射用水 (蒸留水) に溶解し、雄マウスに 250、500 及び 1000 mg/kg 体重/日 (投与液量 10 mL/kg 体重) で 1 日 1 回、24 時間間隔で合計 2 回強制経口投与した。溶媒対照 (陰性対照) 群には蒸留水を同様に投与した。陽性対照群にはマイトマイシン C (MMC) 2 mg/kg 体重を単回腹腔内投与した。

投与群及び溶媒対照群については最終投与 20～22 時間後に、陽性対照群については投与 24～25 時間後に、各動物の大腿骨から骨髓を採取し、スライドグラス上にメタノール固定後、アクリジンオレンジ蛍光染色して骨髓標本を作製した。

各動物について、計 4000 個の幼若赤血球を観察し、小核を有する幼若赤血球の頻度を算出した。また、各動物について約 500 個の赤血球を観察し、全赤血球に占める幼若赤血球の割合を算出した。

TK 分析用衛星群には、蒸留水または検体 2000 mg/kg 体重を単回強制経口投与し 1、2、6 及び 24 時間後に後大静脈から採血した血漿を用いて 濃度を測定した。

試験結果： 骨髓標本の観察結果を表 1 に、TK 分析結果を表 2 に示す。

1000 mg/kg 体重/日投与群では 7 例中 4 例で臨床徴候 (活動性低下、不規則呼吸等) が認められ、2 例が死亡した。死亡動物の剖検では、用量設定試験と同様の所見 (胃

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

の穿孔、暗赤色巢等) が認められた。250 及び 500 mg/kg 体重投与群では、一般状態に異常は認められなかった。

いずれの投与群においても、小核を有する幼若赤血球の頻度には、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

全赤血球に対する幼若赤血球の割合には、用量相関性のある低下がみられ、1000 mg/kg 体重/日投与群では統計学的有意差が認められた。

陽性対照である MMC 投与群では、溶媒対照群と比較して小核を有する幼若赤血球の頻度の有意な増加及び全赤血球に対する幼若赤血球の割合の有意な低下が認められた。

TK 分析の結果、1000 mg/kg 体重投与群における C_{max} 、 T_{max} 及び AUC_{0-24h} は、それぞれ 40300 ng/mL、1 時間及び 275000 ng · h/mL であった。

結論： 本試験条件下において、検体はマウスの骨髄細胞に対して細胞増殖抑制作用を有するが、小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.41 細菌を用いる復帰突然変異試験 (資料 No. TM-41)

試験機関

報告書作成年 2018年 [GLP 対応]

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535、TA98、TA1537)及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株)を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 Mix)の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。
検体は水に溶解し、156~5000 µg/プレートの 6 用量で試験した。試験は 3 連制とした。

結果： 結果を次表に示した。

検体は S9 Mix の有無にかかわらず、菌株の生育阻害を起こさない最高用量 (5000 µg/プレート)においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた AF-2、NaN₃及び 9-AA では S9 Mix の非添加で、また 2-AA では S9 Mix の添加によりすべての菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰突然変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.42 チャイニーズハムスター肺腺維芽細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験
(資料 No. TM-42)

試験機関

報告書作成年 2018 年 [GLP 対応]

試験方法： チャイニーズハムスター肺由来の株化細胞である CHL/IU 細胞を用い、代謝活性化及び非代謝活性化によって染色体異常誘発性を検定した。
検体は水に溶解して用い、陽性対照にはマイトマイシン C (MMC)及びシクロホスファミド (CP)を用いた。
試験は 2 連制とし、観察可能な 3 濃度について 1 濃度あたり 300 個の分裂中期像を観察した。

結 果： 結果を次表に示した。
検体は代謝活性化の有無にかかわらず、すべての処理群で染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。
一方、陽性対照として用いた MMC 及び CP では染色体異常を示す分裂中期細胞の割合の明らかな増加を示した。

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

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.43 ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (資料 No. TM-43)

試験機関：

報告書作成年：2018年 [GLP 対応]

試験方法： マウスリンパ腫細胞由来の L5178Y *tk*^{-/-}細胞を用いて、代謝活性化系(S9 mix)の存在下及び非存在下で、96穴プレートを用いたマイクロウェル法によって遺伝子突然変異誘発性を評価した。検体は蒸留水に溶解し、S9 mix の存在下及び非存在下で3時間 (3時間処理)及びS9 mix の非存在下で24時間 (24時間処理)、細胞に処理した。すべての試験について、以下の用量を設定した。

62.5、125、250、500、1000 及び 2000 µg/mL (公比 2)

陽性対照にはメタンスルホン酸メチル (MMS)またはシクロホスファミド (CP)を用いた。

結果： 結果を次頁の表に示した。

3時間処理において、S9 mix の存在下及び非存在下ともに被験物質処理により突然変異体頻度は有意に増加しなかった。

24時間処理において、2000 µg/mLの用量で突然変異体頻度は有意な増加が認められた。上記結果を確認するため、24時間処理について追加確認試験を実施した。その結果、突然変異体頻度は用量に相関して有意な増加が認められた。

一方、当該試験条件下において、陽性対照として用いた MMS 及び CP では突然変異体頻度の明らか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において L5178Y *tk*^{+/-}細胞に対し遺伝子突然変異を誘発すると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.44

マウスにおけるコメットアッセイ(資料 TM-44)

試験機関

報告書作成年 2018 年[GLP 対応]

供試動物：ICR 系マウス

検体投与群及び陰性（溶媒）対照群；1 群雄 5 匹、陽性対照群；1 群雄 5 匹
投与開始時 9 週齢、投与開始時体重；32.8~38.0 g

試験方法：検体は水に溶解し、500、1000 及び 2000 mg/kg 体重/日の用量で 1 日 1 回、21 時間間隔で合計 2 回、強制経口投与した。陰性対照群には蒸留水を、陽性対照群にはメタンスルホン酸エチル（EMS）を 200 mg/kg の用量で同様に投与した。

全ての動物を最終投与 3 時間後に動物をイソフルラン麻酔下で安楽死させ、肝臓及び胃（腺胃）を摘出し、コメットアッセイに供した。Mincing buffer 中で組織から細胞（核）を単離後、アガロースゲルに包埋し、細胞溶解液に 4°C で浸漬した。翌日に冷暗所（4°C）のアルカリ条件下で定電圧電気泳動（25 V（0.7 V/cm）、初期電流 300 mA、20 分間）を行った。電気泳動後、アガロースゲルを中和液及びエタノールに浸漬し乾燥させた。

SYBR Gold 溶液で染色後、蛍光顕微鏡でスライド標本を観察した。コメット像は CCD カメラを通して、コメットアッセイ解析装置に取り込んだ後、画像解析を実施した。一動物一臓器につき各 150 個の核について、DNA 損傷の指標となる % tail DNA を計測した。

結 果：結果を表に示した。

いずれの群においても一般状態に異常は認められなかった。コメットアッセイにおいて、肝臓及び腺胃のいずれの用量群においても陰性対照群と比較して % tail DNA に統計学的に有意な増加は認められず、また Linear trend test による用量相関性も認められなかった。一方、EMS を投与した陽性対照群では、肝臓及び腺胃に % tail DNA の有意な増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下において、検体はラットの肝臓・胃・甲状腺に対し DNA 損傷誘発性はないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.45

細菌を用いる復帰突然変異試験 (資料 No. TM-45)

試験機関

報告書作成年 2018 年 [GLP 対応]

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535、TA98、TA1537)及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株)を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 Mix)の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。
検体は水に溶解し、156~5000 µg/プレートの 6 用量で試験した。試験は 3 連制とした。

結 果： 結果を次表に示した。

検体は S9 Mix の有無にかかわらず、菌株の生育阻害を起こさない最高用量 (5000 µg/プレート)においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた AF-2、NaN₃及び 9-AA では S9 Mix の非添加で、また 2-AA では S9 Mix の添加によりすべての菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰突然変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.46 チャイニーズハムスター肺腺維芽細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験
(資料 No. TM-46)

試験機関

報告書作成年 2018年 [GLP 対応]

試験方法： チャイニーズハムスター肺由来の株化細胞である CHL/IU 細胞を用い、代謝活性化及び非代謝活性化によって染色体異常誘発性を検定した。
検体は水に溶解して用いた。陽性対照には、マイトマイシン C (MMC)及びシクロホスファミド (CP)を用いた。
試験は2連制とし、1濃度あたり300個の分裂中期像を観察した。

結 果： 結果を次表に示した。
長時間処理法において、用量に依存して構造異常を示す分裂中期細胞数が有意に増加した。一方、短時間処理法では、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての処理群で染色体異常を示す細胞数の増加を示さなかった。
陽性対照として用いた MMC 及び CP では染色体異常を示す分裂中期細胞の割合の明らかな増加を示した。

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

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.47 ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (資料 No. TM-47)

試験機関 :
報告書作成年 : 2018 年 [GLP 対応]

試験方法 : マウスリンパ腫細胞由来の L5178Y *tk*⁻細胞を用いて、代謝活性化系 (S9 Mix)の存在下及び非存在下で、96 穴プレートを用いたマイクロウェル法によって遺伝子突然変異誘発性を評価した。検体は蒸留水に溶解し、代謝活性化系の存在下及び非存在下で 3 時間 (3 時間処理)及び S9 mix の非存在下で 24 時間 (24 時間処理)、細胞に処理した。すべての試験について、以下の用量を設定した。

62.5、125、250、500、1000 及び 2000 µg/mL (公比 2)

陽性対照にはメタンスルホン酸メチル (MMS)またはシクロホスファミド (CP)を用いた。

結 果 : 結果を次頁の表に示した。

いずれの処理方法においても、被験物質処理により突然変異体頻度は有意に増加しなかった。

一方、当該試験条件下において、陽性対照として用いた MMS 及び CP では突然変異誘発率の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、L5178Y *tk*⁻細胞に対し遺伝子突然変異を誘発しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

8.11.48 マウスを用いた *in vivo* コメットアッセイ及び小核併合試験

(資料 No. TM-48)

試験機関

報告書作成年 2018年 [GLP 対応]

供試動物： ICR 系マウス、投与開始時 9 週齢、体重：33.2～37.0 g、1 群雄 5 匹
なお、各群 6～8 匹に投与を行ったが、標本の観察は各群 5 匹（動物番号の若い順に 5 匹を選択）について実施した。

試験方法： 検体を注射用水（蒸留水）に溶解し、雄マウスに 500、1000 及び 2000 mg/kg 体重/日の投与用量で 1 日 1 回、合計 3 回強制経口投与した。2 回目の投与は初回投与 24 時間後に、3 回目の投与は 2 回目投与 21 時間後に行った。陰性対照群には蒸留水を同様に投与した。陽性対照群にはメタンスルホン酸エチル（EMS）を 200 mg/kg 体重/日の用量で 1 日 1 回、21 時間間隔で合計 2 回強制経口投与した。最終投与 3 時間後に、動物をイソフルラン麻酔下で安楽死させ、胃（腺胃）及び肝臓（コメットアッセイ用）ならびに大腿骨（小核試験用）を採取した。

コメットアッセイ

胃及び肝臓について、ホモジナイズ用緩衝液中で組織から細胞を単離して単細胞懸濁液を調製し、スライドガラス上でアガロースゲルに包埋し、細胞溶解液中に浸漬して遮光下で一晩冷蔵保存した。翌日、冷却した電気泳動用緩衝液にアガロースゲルを沈めて、定電圧電気泳動（0.7 V/cm（25V）、初期電流 300 mA、20 分間）を行った。電気泳動後、アガロースゲルを中和液及びエタノールに浸漬し、SYBR Gold 溶液で染色後、蛍光顕微鏡でスライド標本を観察した。コメット像は CCD カメラを通してコメットアッセイ解析装置に取り込んだ後、画像解析を実施した。一動物一臓器につき各 150 個の細胞について、DNA 損傷の指標となる % tail DNA を計測した。

小核試験

大腿骨から骨髄を採取し、スライドガラス上にメタノール固定後、ギムザ染色して骨髄標本を作製した。各動物について、計 4000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。また、検体の骨髄細胞増殖に対する影響について検討するために、各動物について 500 個の赤血球を観察し、多染性赤血球数を計数した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

試験結果： コメットアッセイ結果を表 1 に、小核試験結果を表 2 に示す。
1000 mg/kg 体重/日以上投与群では下痢が観察されたが、明らかな体重抑制は認められなかった。
コメットアッセイにおいて、肝臓及び胃のいずれの投与群においても、% tail DMA に陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。EMS を投与した陽性対照群では、肝臓及び胃のいずれの% tail DMA にも有意な増加が認められた。
小核試験では、いずれの投与群においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、全赤血球に対する多染性赤血球の割合に有意な低下はみられなかった。陽性対照である EMS 投与群では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に陰性対照群と比較して有意な増加が認められた。

結論： 本試験条件下において、検体はマウスの肝臓及び胃に対して DNA 損傷を誘発せず、マウスの骨髄細胞に対して小核を誘発しないと判断される。

(参考資料)

8.12 解毒試験

8.12.1 ラットを用いた解毒試験 (資料 No. T-7.1)

試験機関

報告書作成年 1990年

試験期間： 1990年10月18日～1990年11月30日

<死亡率確認試験>

供試動物： SD系雄ラット、10匹、5～6週齢、体重 86～115g

試験方法： 検体をトウモロコシ油に溶解し、この検体のラットにおける LD₈₀～LD₉₀ 値に相当する 100 mg/kg を経口投与し、投与後の臨床症状を観察し、死亡率を確認した。

結果： 投与2時間後より腹臥姿勢、自発運動減少、ふらつき歩行、筋弛緩、流涎及び呼吸粗大等の症状がみられ、その後、体温低下、眼球突出及び流涙もみられた。8時間までに3例が死亡し、24時間までにさらに3例、その後2日後までに3例合計9例が死亡した。生存例1例は3日後にやや回復の兆しがみられ、7日後には異常症状はみられなかった。7日後の死亡率は90%であった。

<解毒薬検討試験>

供試動物： SD系雄ラット、1群5匹、5～6週齢、体重 141～163g

試験方法： 検体をトウモロコシ油に溶解し、全群全動物に 100 mg/kg を経口投与した。解毒薬を検討するため、検体投与後に安息香酸ナトリウムカフェイン(以後アンナカと略記) 20 mg/kg を腹腔内投与する群(アンナカ投与群)、アトロピン 10 mg/kg 及び 2-pyridinealoxime methiodied (以後 PAM と略記) 75 mg/kg を腹腔内投与する群(アトロピン+PAM 投与群)、アトロピン 10 mg/kg 及び PAM 75 mg/kg を腹腔内投与し、更に3時間後に同様の処理をする群(アトロピン+PAM 2回投与群)並びに解毒薬を投与しない群(無処理群)の4群を設けた。解毒薬投与群についてはそれぞれの症状が出現した時点で解毒薬の投与を開始した。解毒薬投与後の臨床症状を観察し、死亡率も算出し、群間で比較し、解毒薬の効果について検討した。

結果： 各群の解毒薬の投与時間と死亡例の分布を次表に示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

群	動物 番号	検 体 投 与 後 時 間												
		時 間								日				
		0	1	2	3	4	6	12	24	2	3	4	7	
無処理群	1													生存
	2								×					
	3						×							
	4													生存
	5								×					
アンナカ投与群	1		▲						×					
	2		▲						×					
	3		▲					×						
	4				▲				▲					生存
	5		▲						×					
アトロピン +PAM 投与群	1		▲						▲	▲	×			
	2			▲					▲	▲				生存
	3			▲					▲	▲	×			
	4		▲						▲					生存
	5			▲					▲	▲				生存
アトロピン +PAM2 回投与群	1			▲			▲		▲	▲				生存
	2		▲				▲		▲	×				
	3		▲				▲		▲		▲			生存
	4						▲		▲		▲			生存
	5			▲			▲		▲	×				

▲：解毒薬の投与 ×：死亡

無処理群；死亡率確認試験と同様の症状がみられた。24時間後までに3例が死亡した。生存例2例は3日後より回復し、5日後には異常症状は消失した。7日後までの死亡率は60%であった。

アンナカ投与群；アンナカ投与後もさほど症状に改善はみられず、24時間後までに4例が死亡した。生存例1例につま先立ち歩行がみられたのでさらにアンナカを投与した。2日後には異常症状はみられなかった。7日後までの死亡率は80%であった。

アトロピン+PAM投与群；アトロピン及びPAMの投与後一時的に改善したが、24時間後に無処理群と同様の症状を呈していたため再投与した。症状は一時的に改善したが、2日後に症状を呈した。更に再投与を行ったところ、2例がTwitchを呈した後死亡した。生存例3例は3日後から回復し、5日後には異常症状は消失した。7日後までの死亡率は40%であった。

アトロピン+PAM2回投与群；アトロピン及びPAMの投与後一時的に改善したが、24時間後に無処理群と同様の症状を呈していたため再投与を行ったところ、2例がTwitchを呈した後死亡した。生存例3例はその日に再投与し、2日後に再び投与した。3日後から回復し、5日後には異常症状は消失した。7日後までの死亡率は40%であった。

以上の結果より、アンナカでは検体による中毒症状を抑える事はできず、解毒効果はみられなかった。アトロピン及びPAMでは投与後症状の改善がみられたが、その後処理前の症状に戻った。反復投与すると再び症状の改善はみられるが3回以上の処理によって死亡例が発現した（死亡例はTwitchを呈したことからアトロピンによる毒性であると考えられる）。死亡率においては統計学的に有意な改善はみられなかったが、アトロピン及びPAMの処置は検体の中毒症状を改善する作用が認められた。

8.12.2 ラットを用いた解毒試験

—コリンエステラーゼ阻害作用に対する影響 (資料 No. T-7.2)

試験機関

報告書作成年 1991 年

供試動物： SD 系雄ラット、1 群 5 匹、投与時 5 週齢、体重 81~98 g

試験期間： 単回投与 24 時間後にコリンエステラーゼ活性測定

試験方法： 事前に急性経口毒性試験を実施し、死亡が認められないことが予想される用量として本試験の投与量を 50 mg/kg とした。コーンオイルを媒体として用い、10 mL/kg の容量で一晩絶食後に経口投与した。検体無投与群には溶媒のみを同様に投与した。解毒薬としては硫酸アトロピン (1 水和物) (以後アトロピンと略記)及びプラリドキシムヨウ化メチル (以後 PAM と略記)を用い、次の表に示すような処置量で、検体投与 1、3、6 時間後に 10 mL/kg の容量で背部皮下に投与した。アトロピンは滅菌生理食塩液を用いて溶解し、PAM は同液で希釈した。検体無投与群及び解毒薬無処置群には滅菌生理食塩液を投与した。

試験群	投 与 量 (mg/kg/回)		
	検 体	アトロピン	PAM
検体無投与群	0	0	0
解毒薬無処置群	50	0	0
アトロピン群	I	50	6.25
	II	50	25
	III	50	100
PAM 群	I	50	0
	II	50	0
	III	50	0
アトロピン +PAM 併用群	I	50	6.25
	II	50	25
	III	50	100

検体を単回投与し、投与 1、3、6 時間後に解毒薬を皮下投与

試験項目： 検体投与 1 日後に、エーテル麻酔下で腹大動脈より採血後、全脳を摘出した。血液は遠心分離し、血漿を分離した。血球は生理食塩液で 2 度洗浄後、生理食塩液に浮遊させ測定試料とした。全脳は 0.05 M 磷酸緩衝液に懸濁後、遠心分離し、その上清を測定試料とした。DTNB 法を用いて、血漿ブチルコリンエステラーゼ活性 (PBChE)、血漿アセチルコリンエステラーゼ活性 (PACHe)、血球アセチルコリンエステラーゼ活性 (CACHe) 及び全脳アセチルコリンエステラーゼ活性 (BACHe) を測定した。

また検体投与前及びコリンエステラーゼ活性測定前に体重を測定した。

結 果： 各群の平均コリンエステラーゼ活性値を次表に示した。

試 験 群	コリンエステラーゼ活性値			
	PBChE (IU/L)	PACChE (IU/L)	CACChE (IU/mL)	BACChE (IU/g)
検体無投与群	451**	1205**	30.5	3.74**
解毒薬無処置群	132	641	32.5	3.04
アトロピン群	I	161	616	29.8
	II	142	582	29.3
	III	197*	540	29.3
PAM 群	I	182	686	30.5
	II	181	638	30.1
	III	168	602	27.9
アトロピン+ PAM 併用群	I	160	597	30.2
	II	113	542	32.2
	III	154	620	31.2

*、**：解毒薬無処置群に比較して統計学的に有意差あり。

*：P<0.05、**：P<0.01、Dunnnett 又は Scheffe の検定

検体投与により、PBChE、PACChE、BACChEが抑制されたが、アトロピン、PAM及び両薬物の併用処理では、検体による活性抑制に対して明らかな影響は認められなかった。

体重に関しては、解毒薬無処置群において体重の増加が認められなかったが、検体無投与群、アトロピン群 I 及び II (6.25及び10 mg/kg/回処置)の体重は、解毒薬無処置群の体重と比較して有意に高い値を示した。

以上の結果より、本試験条件下でアトロピン、PAM又はその両薬物の併用による処置により、明確なホスチアゼートによるコリンエステラーゼ活性阻害の回復作用は認められなかった。従って、アトロピン及びPAMはホスチアゼートによるコリンエステラーゼ阻害に対する解毒薬としては有効と考えられなかった。しかし、検体による体重増加抑制作用に対して、アトロピンが拮抗したことから、ホスチアゼートによる急性中毒に対する解毒薬としてアトロピンは有効なものである可能性が考えられた。

8.12.3 ラットを用いた解毒試験—致死作用に対する影響 (資料 No. T7.3)

試験機関

報告書作成年 1991年

供試動物： SD系雄ラット、1群10匹、投与時5週齢、体重83~103g

試験期間： 単回投与後7日間観察

試験方法： 事前に急性経口毒性試験を実施し、70%程度の死亡率が予想される用量として本試験の投与量を90mg/kgとした。コーンオイルを媒体として用い、10mL/kgの容量で一晩絶食後に経口投与した。解毒薬としては硫酸アトロピン(1水和物)(以後アトロピンと略記)及びプラリドキシムヨウ化メチル(以後PAMと略記)を用い、次の表に示すような処置量で、検体投与1、3、6時間後及び1日後に10mL/kgの容量で背部皮下に投与した。アトロピンは滅菌生理食塩液を用いて溶解し、PAMは同液で希釈した。解毒薬無処置群には滅菌生理食塩液を投与した。

試験群	投与量 (mg/kg/回)		
	検体	アトロピン	PAM
解毒薬無処置群	90	0	0
アトロピン群	I	90	6.25
	II	90	25
	III	90	100
PAM群	I	90	0
	II	90	50
	III	90	200
アトロピン+ PAM併用群	I	90	6.25
	II	90	25
	III	90	100

検体を単回投与し、投与1、3、6時間後及び1日後に解毒薬を皮下投与

試験項目： 中毒症状及び死亡を投与日は投与1、3、6時間後に、その後は1日1回投与7日後まで観察した。投与日、投与後7日目又は死亡時に体重を測定した。

結果：

死亡： 各群の死亡の状況を次表に示した。

試験群	死亡率 (累積死亡数/総数)										
	1時間	3時間	6時間	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	
解毒薬無処置群	0/10	0/10	3/10	3/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	
アトロピン群	I	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10**	2/10*	3/10*	3/10*	3/10*	3/10*
	II	0/10	0/10	0/10	2/10	4/10	4/10	4/10	4/10	4/10	4/10
	III	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10*	4/10	7/10	8/10	8/10	8/10
PAM群	I	0/10	0/10	2/10	4/10	8/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	II	0/10	0/10	0/10	1/10	6/10	7/10	8/10	8/10	8/10	8/10
	III	0/10	0/10	1/10	4/10	6/10	6/10	6/10	6/10	6/10	6/10
アトロピン+ PAM併用群	I	0/10	0/10	0/10	1/10	2/10*	3/10*	4/10	5/10	6/10	6/10
	II	0/10	0/10	0/10	1/10	2/10*	2/10*	3/10*	3/10*	3/10*	3/10*
	III	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10**	4/10	5/10	7/10	7/10	7/10

*、**：解毒薬無処置群に比較して統計学的に有意差あり。

*：P<0.05、**：P<0.01、Fisherの直接確率法

解毒薬無処置群では、検体投与により投与日に3例、2日後に5例が死亡した。この解毒薬処置群と比較してアトロピン群及びアトロピン+PAM併用群では有意な死亡率の減少が認められた。解毒薬無処置群とPAM群の間には有意な差は認められなかった。

一般症状；解毒薬無処置群においては、中枢及び自律神経の異常を示唆する種々の異常、すなわち円背位、腹臥、自発運動の低下、線維束性収縮、痙攣、体温低下、下腹部の汚れ、流涎、心拍低下、呼吸数低下、あえぎ呼吸、鼻汁、縮瞳、赤色眼脂、眼球突出、下痢が投与1時間後から認められ、投与4日後には回復した。アトロピン群においては、解毒薬無処置群に比較して腹臥、自発運動の低下、線維束性収縮、体温低下、下腹部の汚れ、流涎、心拍低下、呼吸数低下、鼻汁、縮瞳、眼球突出の出現頻度の有意な減少が認められた。アトロピン+PAM併用群でも同様の症状の出現頻度の有意な減少が認められたが、PAM群では少数例の症状の回復しかみられなかった。

以上の結果より、本試験条件下でアトロピン又はアトロピンとPAMの併用による処置により、ホスチアゼートによる毒性症状が著明に回復したが、PAMのみの処置では軽度の回復しか認められなかった。さらに、アトロピン又はアトロピンとPAMの併用による処置は死亡発現時期を延長し、また検体投与7日後の死亡率も有意に減少させたが、PAM処置では影響はなかった。従って、ホスチアゼートの急性中毒に対し、PAMの解毒薬としての効果は弱い、アトロピンは解毒薬として著効を示すことが予想された。

8.12.4 ラットを用いた解毒試験—アトロピンの解毒作用 (資料 No. T-7.4)

試験機関

報告書作成年 1992 年

致死作用に対する影響をみたラットを用いた解毒試験 (資料No. T-7.3)により硫酸アトロピン(1水化物)(以後アトロピンと略記)の解毒作用の可能性が予想されたので、本試験を実施し、より詳細なアトロピンの解毒作用を確認した。

供試動物： SD系雄ラット、1群10匹、投与時5週齢、体重88～121g

試験期間： 単回投与後7日間観察

試験方法： 検体高用量(90 mg/kg)区と低用量(50 mg/kg)区の2区を設け、コーンオイルを媒体として用い、10 mL/kgの容量で一晩絶食後に経口投与した。解毒薬としてアトロピンを用い、次表に示すような処理量で検体投与1、3、6時間後及び1日後に10 mL/kgの容量で背部皮下に投与した。処理量は致死作用に対する影響をみた解毒試験 (資料 No. T-7.3)においてアトロピンによる解毒作用が認められた最低処理量を最高処理量にし、公比4で下げた計4用量を用いた。アトロピンは滅菌生理食塩液を用いて溶解した。アトロピン無処理群には滅菌生理食塩液のみを投与した。

試験群	投与量 (mg/kg/回)	
	検体	アトロピン
(検体低用量区)		
アトロピン無処理群	50	0
アトロピン群	I	0.10
	II	0.39
	III	1.56
	IV	6.25
(検体高用量区)		
アトロピン無処理群	90	0
アトロピン群	I	0.10
	II	0.39
	III	1.56
	IV	6.25

検体を単回投与し、投与1、3、6時間後及び1日後に解毒薬を皮下投与

試験項目：

一般症状及び生死；中毒症状及び生死を投与日は投与1、3、6時間後に、その後は1日1回投与7日後まで観察した。

体 重；投与日、投与1、3、7日後に体重を測定した。死亡例については、死亡時にも体重を測定した。

体 温；検体低用量区のアトロピン無処理群とアトロピン群IV (6.25 mg/kg処理)の全例について、投与直前、投与後1、3、6時間後、その後は1日1回投与7日後まで測定。

結 果：

死 亡；各群の死亡の状況を次表に示した。

試 験 群	死 亡 率 (累積死亡数/総数)									
	1時間	3時間	6時間	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日
(検体低用量区)										
アトロピン無処理群	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	3/10	4/10	4/10	4/10	4/10
I	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10
アトロピン群	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10
II	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10
III	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10*	0/10*	0/10*	0/10*
IV	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10*	0/10*	0/10*	0/10*
(検体高用量区)										
アトロピン無処理群	0/10	0/10	6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
I	0/10	0/10	2/10	7/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
アトロピン群	0/10	0/10	1/10*	6/10*	7/10	8/10	9/10	9/10	9/10	9/10
II	0/10	0/10	1/10*	4/10**	7/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
III	0/10	0/10	0/10**	3/10**	6/10*	6/10*	10/10	10/10	10/10	10/10
IV	0/10	0/10	0/10**	3/10**	6/10*	6/10*	10/10	10/10	10/10	10/10

*、**：アトロピン処理群に比較して統計学的に有意差あり。

*：P<0.05、**：P<0.01、Fisherの直接確率法

死亡率；

検体低用量区；アトロピン無処理群では、投与2日後に3例、4日後に1例が死亡した。このアトロピン無処理群と比較してアトロピン群では死亡率の減少が認められ、アトロピン群IV (6.25 mg/kg処理)では4日以降に有意に減少した。

検体高用量区；アトロピン無処理群では、投与当日に6例、1日後に4例が死亡した。アトロピン群でもほぼ全例が死亡したが、無処理群と比較すると、アトロピンの用量に依存して、死亡の発現が遅延した。投与6時間後～3日目にかけてアトロピンの高濃度処理群で死亡率が有意に減少した。

一般症状； 検体低用量区及び高用量区共に、アトロピン無処理群においては腹臥、自発運動の低下、線維束性収縮、振戦、痙攣、体温低下、下腹部の汚れ、流涎、呼吸数の低下、鼻汁、縮瞳、流涙、赤色眼脂、眼球突出、眼裂の低下、肛門周囲の汚れ、軟便、下痢等が投与1時間目から認められたが、投与6日後には回復した。アトロピンの処理により、これらの症状の種類数及び出現率がアトロピンの用量に依存して低下した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は石原産業株式会社にある。

体 重；両区共アトロピン無処理群及びアトロピン群において、検体投与前の体重より減少している動物がみられたが、その減少量はアトロピンの処理量が増加するに従い、低下する傾向がみられた。その後、すべての群の体重には増加傾向がみられた。

体 温；検体低用量区のアトロピン無処理群では、検体投与6時間後にピークをもつ体温低下がみとめられたが、6.25 mg/kgのアトロピン処理により、検体投与3、6時間後及び1日後の低下が有意に減少した。

以上の結果より、本試験条件下で検体低用量区におけるアトロピン無処理群では検体投与4日後までに10例中4例の死亡と体温低下が認められたが、6.25 mg/kg/回のアトロピン処理により、死亡率が有意に減少し、体温低下も減少した。検体高用量区においてはアトロピン処理用量に依存して死亡は遅延した。また、両区共に検体投与に起因する一般症状の種類数、出現頻度が減少した。以上の結果から、アトロピンはホスチアゼートの解毒薬として著効を示すと考えられた。