

(16) その他

イミダクロプリドのラットにおける発達神経毒性試験

(毒性資料No.原体-47)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2001年 9月 14日

検体の純度：

試験動物：ウイスター(Crl:W(HAN)BR系ラット、雌雄各 120 匹)

交配開始時；雄 15 週齢、雌 12 週齢(平均体重 雄 155g、雌 117g)

投与期間：1999年 7月～1999年 10月

投与方法：

交配後、検体を 0(対照群)、100、250 及び 750ppm の濃度で飼料に混入し、妊娠雌親動物に妊娠 0 日から児動物の哺育 21 日まで投与した。児動物は離乳後、無添加の飼料を試験終了時の生後 75±5 日まで与えた(哺育 28 日までは群飼育、その後個別飼育とした)。雄親動物は交配後屠殺、雌親動物は哺育 21 日に屠殺した。

試験項目及び結果：

1. 繁殖成績

妊娠期間を含み、交尾率、受胎率、出産率を指標とした繁殖成績に検体投与の影響は認められなかった。妊娠雌動物数は 0(対照群)、100、250 及び 750ppm 群でそれぞれ 21、25、23、23 匹であった。

2. 親動物

2-1. 臨床観察

ケージサイド観察は少なくとも 1 日 1 回(休日及び週末は 1 日 1 回)行った。詳細な身体的観察も 1 日に 1 回、妊娠 0 日より哺育 21 日まで行った。

試験期間を通じて何らの臨床症状も認められなかった。死亡例は認められなかった。

2-2. 体重及び摂餌量

妊娠期間及び哺育期間を通じ、毎週、個体毎に体重及び摂餌量の測定を行った。

更に哺育期間4日、11日にも体重を測定した。

雌親動物の体重に有意な変動は認められなかった。一方、750ppm群の摂餌量は妊娠3週に9%（統計学的な有意差なし）、さらに哺育1週に統計学的有意に14%減少し、検体投与の影響と考えられた。

2-3. 検体摂取量

雌親動物における検体の平均1日摂取量は、それぞれ、飼料を分析して得た実測濃度0、99.5、227、691ppmから計算すると、表1の通りであった。

表1. 検体摂取量(mg/kg体重/日)(各測定値の幅で示す。)

用量	100ppm	250ppm	750ppm
妊娠期間	8.0-8.3	19.4-19.7	54.7-58.4
哺育期間	12.8-19.5	30.0-45.4	80.4-155.0

2-4. 雌親動物の機能観察(FOB)

各群少なくとも10例の母動物について、機能観察(FOB：ホームケージ内、ハンドリング時、オープンフィールド)を妊娠6、13、20日と授乳4、11、21日に実施した。観察は主として流涙、流涎、立毛、眼球突出、排尿、排便、瞳孔機能、眼瞼閉鎖、痙れん、振せん、異常動作/異常行動、姿勢、歩行異常について実施した。

その観察の結果、検体投与に起因した異常はいずれの投与群にも認められなかった。

3. 児動物

3-1. 児動物のデータ

各群ごとの総産児数、同腹児数、死産児数、出生率、生存率を検査した。

その結果、これらの項目に投与に起因した変化は認められなかった。

3-2. 臨床観察

児動物は生後直ちに性別を判定し、体重を測定した。以降、哺育期間及び離乳後の飼育期間中の死亡率、瀕死状態、神経行動学的変化、一般毒性症状についてケージサイドから少なくとも1日1回観察した。

児動物に検体投与に起因すると考えられる臨床的異常は認められなかった。

3-3. 体重

児動物の体重を生後0、4、11、17、21日、その後毎週1回測定した。更に、包皮分離、臆開口時にも体重を測定した。

出生時体重に投与群と対照群との間に差は認められなかったが、哺育期間中、

雌雄 750ppm の新生児に増体重抑制がみられた (哺育 11 日に最大-13%)。離乳後の飼育期間中においても、増体重抑制が離乳初期に雌雄共にみられたが (最大; 第 1 週 雄-11%、雌-8%)、その後の測定において順調な体重増加傾向が認められた (最終時雄; -4%, 雌; 対照群と同等)。

3-4. 摂餌量

検体の無添加の飼料を給餌した児動物における摂餌量を離乳 28 日より試験終了日まで週 1 回測定した。

その結果、児動物の摂餌量に意味の有る変動は認められなかった。

3-5. 発育の指標

各腹雌雄 1 例の児動物 (各群雌雄 16 匹) について正向反射 (生後 4 日から)、開眼 (生後 10 日から)、聴覚性驚愕反応 (生後 10 日から) が認められた日齢を観察した。また全ての児動物について包皮分離 (生後 38 日から)、臆開口 (生後 29 日から) の認められた日齢を観察した。瞳孔収縮については、全児動物について生後 21 日に調べた。

これらの項目において検体投与群と対照群に差は認められなかった。

3-6. 機能観察 (FOB)

各腹雌雄 1 例の児動物 (各群雌雄 16 匹) について取扱い時の反応、筋緊張、閉眼、流涙、流涎、鼻汁、体毛の汚れなどを指標として生後 4、11、21、35、45、60 日に観察した。

その結果、対照群に比して用量群に著変は観察されなかった。

3-7. 運動能及び移動運動能試験

各腹雌雄 1 例の児動物 (各群雌雄 16 匹) について運動能、移動運動能を生後 13、17、21 及び 60 日に自動測定器で測定した。

その結果、雄 750ppm 群では生後 17 日に運動能と移動運動能が、また、雌 750ppm 群では生後 17 日と 21 日に運動能と移動運動能が抑制され、統計学的には有意差は認められなかったが、検体投与の影響と考えられた。この対照群と 750ppm 群での差は、生後 60 日にはもはや認められなかった。60 分を 10 分毎に分けて評価した場合にも、雌雄 750ppm 群では生後 17 日と 21 日に運動能と移動運動能が抑制された (雌の 17 日における最初の 10 分のみ統計学的に有意)。慣れへの影響は全ての投与群で認められなかった。

60分間/運動能(MA)及び移動運動能(LA) (対照群からの差異%)¹

雄									
用量 (ppm)	13日		17日		21日		60日		
	MA	LA	MA	LA	MA	LA	MA	LA	
100	-32	-52	+8	0	+18	+12	+7	+4	
250	-18	-5	-12	-6	+12	-3	-5	-9	
750	-12	-38	-38	-39	+3	-9	-3	-5	
雌									
用量 (ppm)	13日		17日		21日		60日		
	MA	LA	MA	LA	MA	LA	MA	LA	
100	+12	+25	-26	-13	-10	-9	+3	-5	
250	+21	+25	+1	-4	-17	-6	-7	-2	
750	+3	-19	-31	-37	-37	-26	-7	-8	

¹対照群より大きい%(+), 対照群より小さい%(-), ANOVA(有意差なし)

最初の10分間/運動能(MA)及び移動運動能(LA) ; 17日; 雌

用量(ppm)	MA	LA
0	133 ± 52	31 ± 11
100	91 ± 43	27 ± 20
250	106 ± 63	24 ± 13
750	71* ± 35	16* ± 8

平均±SD * : P<0.05 (ANOVA)

申請者注) 追記事項を 246 頁～247-5 頁に追記した。

3-8. 聴覚性驚愕反応

自動聴覚測定装置を用い、各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄 16 匹)を用いて各段階の周波数音に対する反応を生後 22、38、60 日に測定した。

その結果、児動物の聴覚性驚愕反応に対照群と各用量群の差は認められなかった。

3-9. 受動回避能

各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄 16 匹)を用い、四肢への電気ショックに対する受動回避能について、その学習能と短時間記憶能力及び長時間記憶能力を生後 24 及び 31 日に測定した。

その結果、これらの能力獲得において対照群と用量群との間に差は認められなかった。

3-10. 水迷路試験

各腹雌雄 1 例の児動物(各群雌雄 16 匹)について水迷路を用いた学習能力及び記憶能力を生後 60 日に測定した。またその 7 日後に再試験を行った。

その結果、これらの能力獲得において対照群と用量群との間に差は認められなかった。

3-11. 眼科学的検査

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

観察された眼科学的所見には検体投与に関連するものは認められなかった。

4. 剖検

4-1. 中間検査例の剖検(生後 11 日)

中間検査のため、生後 11 日に各群雌雄それぞれ 10 例の児動物を剖検した。

検査した例には肉眼的に著変は認められなかった。

4-2. 最終屠殺例の剖検(生後 70 日)

試験終了時に全例について剖検した。

検査した例には肉眼的に著変は認められなかった。

5. 最終体重および臓器重量

中間検査した生後 11 日児動物各群雌雄それぞれ 10 例の体重を測定した。また、脳を *in situ* で固定し、脳重量を測定した。さらに、試験終了時に全例の体重を測定し、全身の灌流固定後に(一部の例は固定せず)脳重量も測定した。

全ての用量群における生後 11 日中間検査例の体重には対照群との差を認めなかった。また、最終屠殺例の体重にも対照群との差は認められなかった。さらに、11 日中間検査例及び最終屠殺例の脳重量にも用量群と対照群との差は認められなかった。

6. 脳の計測

6-1. 肉眼的計測

中間検査した生後 11 日児動物各群雌雄それぞれ 10 例の脳を *in situ* で固定し大脳及び小脳の長軸の長さを計測した。また、灌流固定した最終屠殺例の脳についても計測した。

中間検査例及び最終屠殺例の脳の計測結果に用量群と対照群との差は認められなかった。

6-2. 検鏡による計測

中間検査した生後 11 日児動物各群雌雄それぞれ 10 例及び最終屠殺例(生後 75 日)の脳について鏡検的に以下の部位を計測した。なお、対照群と最高用量の 750ppm 群について計測した。

前頭葉皮質背部の厚さ Level 4 (視神経交差部)、頭頂葉皮質背側部の厚さ

Level 4 (視神経交差部)、尾状核被殻と淡蒼球断面の長さ level 4 (視神経交差部)、脳梁の厚さ Level 4 (視神経交差部)、海馬回の幅 Level 5、小脳高 Level 7、胎児性顆粒層の厚さ (小脳)

中間検査例(生後 11 日)及び最終屠殺例(生後 75 日)の脳の計測結果に用量群と対照群との差は認められなかった。

申請者注)追記事項を 246 頁～247-5 頁に追記した。

7. 病理組織学的検査

中間検査した生後 11 日児動物各群雌雄それぞれ 10 例の脳 (8 部位) 及び灌流固定した 1 群それぞれ 10 例の最終屠殺例の脳 (8 部位)、脊髄 (頸髄、胸髄、腰髄と馬尾)、眼球、視神経、腓腹筋、背根神経節 (頸部及び腰部脊髄膨大部)、ガッサー神経節、末梢神経 (坐骨神経、脛骨神経、腓腹神経) を病理組織学的に検査した。なお、対照群と最高用量の 750ppm 群について実施した。

中間検査例及び最終屠殺例の脳の計測結果に用量群と対照群との差は認められなかった。

以上、本発達神経毒性試験の結果、750ppm を投与された雌親動物において、哺育期間に統計学的に有意な摂餌量の減少がみられた。

児動物では、雌雄 750ppm 群において哺育期間及びその後の飼育期間において増体重の抑制が認められ、同群の運動能、移動運動能が抑制された。一方、児動物の各種機能検査、学習能及び記憶能、眼科学的検査、脳重量及び脳の計測ならびに神経組織の病理組織学的検査の結果には検体投与の影響は認められなかった。

これらの結果に基づいて、総合的な無影響量 (NOEL) は親動物、児動物とも 250ppm (30.0-45.4mg/kg 体重/日 [親動物: 哺育期間]) であると判断した。

発達神経毒性は 750ppm まで認められなかった。

[申請者による追記]

イミダクロプリド等のネオニコチノイド系農薬を用いて実施された in vitro 系試験において発表された結果に基づき、欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority, EFSA) はイミダクロプリドの発達神経毒性 (developmental neurotoxicity: DNT) を誘発する可能性について科学的意見書を出すよう、植物保護製品および残留物パネル (Panel on Plant Protection Products, PPR) に依頼した。そして、EFSA は 2013 年 12 月 17 日 (改訂版、2014 年 2 月 21 日) に、PPR が提出した科学的意見を公表した。その中で、PPR は、本発達神経毒性試験で認められた所見に基づき、イミダクロプリドに発達神経毒性に対する懸念が払拭できていないとの見解を示した。

PPR が懸念とした根拠は、脳の計測 (尾状核被殻幅、脳梁の厚さ) および運動能での変化であった。

そのため、PPR のアセスメントと共に申請者の考察を以下のとおり追記する。

検鏡による尾状核被殻幅および脳梁の厚さについて

計測結果を次表に示す。

PPR の指摘は以下のとおりであった。

- ・雌の最高用量群の生後 11 日において尾状核被殻幅および脳梁の厚さの低下がみられた。
- ・雌の最高用量群では試験最終時点の生後 75 日においても尾状核被殻幅の低下が確認されている。
- ・これらの変化はイミダクロプリドによる影響を示している可能性ある。
- ・11 日齢および 75 日齢ともに尾状核被殻幅の低下が確認されたことから、日齢を問わず一貫した影響を示している。
- ・中間用量での検査をすればより明らかな NOAEL を得ることができた。

表. 尾状核被殻幅および脳梁の厚さ

性	11 日				75 日			
	雄		雌		雄		雌	
用量 (ppm)	0	750	0	750	0	750	0	750
尾状核被殻幅 (mm)	2.6996	2.7080	2.7692	2.6166	3.6650	3.7034	3.7504	3.6774
(%) [#]		+0.3		-5.5		+1.0		-1.9*
脳梁の厚さ (mm)	0.5366	0.5341	0.6018	0.4360	0.4989	0.5286	0.5358	0.4981
(%) [#]		-0.6		-27.6		+6.0		-7.1

#: 対照群からの変動率, *: P<0.05, 両側 T 検定

試験責任者は、PPR が指摘する雌の最高用量で認められた尾状核被殻幅および脳梁の厚さの対照群に対する差は誤差であり、検体投与による影響とは考えなかった。そのため中間用量の脳の計測は行っていない。

検体投与による影響と考える理由は以下のとおりである。

- ・雌の生後 11 日および 75 日における尾状核被殻の幅について

750ppm の尾状核被殻の幅は生後 11 日では対照群に比べ-5.5% (対照群 2.7692mm に対して 750ppm 2.6166mm) とその差は小さく、統計学的な有意差も認められなかった。そして、生後 75 日には統計学的に有意な差は認められたもののその差は-1.9% (対照群 3.7504mm に対して 750ppm 3.6774mm) と差はより小さくなった。さらに、生後 75 日における本試験の対照群の値は同試験施設で実施された発達神経毒性試験 (本試験を含む)、19 試験の対照群値 (生後 75 日±5 日) の最上限であり、750ppm 群の値は背景データ範囲内[#]にあった。

[#]背景データ (19 試験, 1998 年~2005 年) 平均値幅 ; 3.2127mm~3.7504mm
 対照群 平均値 : 3.7504mm, 750ppm 群 平均値 : 3.6774mm

また、尾状核被殻の幅は、生後 11 日から 75 日の間に対照群では 35%、750ppm では 41%ほど成長していることを考慮に入れるべきと考える。発達初期過程においてこれほど成長をする脳領域の神経病理に関連した欠損は、生育するに従ってより明らかになり、差が軽減されることはないと言われている (Bolon et al., 2011)。

・雌の生後 11 日における脳梁の厚さについて

雌の脳梁の厚さは、生後 11 日の 750ppm (-27.6%) と対照群との間に統計学的に有意な差はなかった。なお、事実として脳梁の厚さは変動幅が大きく、このようなことから、同試験施設では 1998 年から 1999 年の間に生後 11 日で測定した試験は本試験とは別に 1 試験しかなく (1999 年以降、生後 21 日に変更)、背景データとの比較はできなかった。一方、生後 75±5 日での測定については他に 11 試験で試験に組み込んでいたが、2003 年以降、いずれの試験においても測定時期にかかわらず、測定を中止した。その理由は、上記に示したように、脳梁の幅は変動幅が大きく、評価において信頼できる値とはみなされなかったことである (この項目は要求項目でない)。ただし、生後 75 日の脳梁の厚さは対照群と最高用量群の間に統計学的な有意差は認められず背景データ範囲内に入っていた。

*背景データ (12 試験, 1998 年~2003 年) 平均値幅 ; 0.4691mm~0.6588mm
対照群 平均値 : 0.5358mm, 750ppm 群 平均値 : 0.4981mm

・生後 11 日における脳の計測について

生後 11 日の脳は柔らかく、8 部位に切り分けるための脳表面の目安が後期のより成長した脳よりわかりにくいため、脳の均一した切片を得るのは技術的にむずかしい。さらに脳の大きさは、この時期脳の成長がとても早いため、個体変動が大きいと言われている (Garman et al., 2001)。

・尾状核被殻幅および脳梁の厚さにおける雌雄差について

雄では、雌と同様の変化が尾状核被殻幅および脳梁の厚さにみられていない。イミダクロプリドが脳の発達において雌雄特異的な差を生じさせる証拠はない。さらに、性的未成熟な発達段階に暴露されたことにより、性特異的な脳の病変をおこす化学物質は今まで報告されていない。このような観点からも、イミダクロプリドによって雌雄で違う尾状核被殻幅および脳梁の厚さに変化がおこったとは考えにくく、今回認められた雌での尾状核被殻幅および脳梁の厚さの低値は意味がないものと考えられ、従って投与によっておこったものではないものと考えられた。

・申請者としての見解

以上のことから、高用量の雌のみで認められた尾状核被殻幅および脳梁の厚

さの低下は、イミダクロプリドを暴露したことによる発達神経毒性というよりはむしろ生物学的な変動、切片部位のわずかな差による技術的な影響、および対照群が高い平均値を示したことなどによるものと考えられた。この解釈は、時間（日齢）や性別による一貫性がなかったこと、背景データとの比較からも支持されるものとする。

運動能

PPRの指摘は以下のとおりであった。

観察された運動能の低下(雌雄)は、尾状核被殻幅の減少(雌のみ)を伴っている。イミダクロプリドによって、運動能の影響が認められることはPPRの意見と同意である。しかし、申請者はこの影響が発達神経毒性に関連するものとは考えられなかった。

その理由を以下のとおり説明する。

・背景情報

運動能は、動物の一般状況あるいは状態を反映しており、神経毒性および非神経毒性学的作用に対して鋭敏に反応する(Reiter, 1983)。したがって、運動能の測定は上手くコントロールされた条件では化合物の毒性をスクリーニングの上では有意義なものであるが、これのみで根底にある原因を特徴づけることはできないものである。従って、神経毒性試験の中で、運動能自動測定は、詳細な一般症状観察、機能観察検査、神経病理学的検査などと組み合わせて実施されている。そして持続的な運動能の亢進、慣れの減少などはヒトおよび動物において脳の損傷と関連していると可能性があるといわれている(Norton, 1976)。一方、運動能の一時的な低下は、低血糖症、低体温症、胃腸障害、あるいは中枢神経系を含むその他のいろいろな系に対する影響によっても観察されることから、不特異的な影響であるものとする。このように特異性に欠けていることから、運動能の一時的な低下では作用機作を特定することはできないものとする。

発達神経毒性試験のガイドラインでは運動能の測定は離乳前の3時点と、離乳後の持続性を確認するために生後60日での測定が規定されている。この試験において、運動能の亢進および慣れの低下は発達神経毒性の証拠となりうるものであることから、生後60日においても、持続的な運動能の変化(特に運動能の亢進)、慣れの低下がみられた場合には、発達神経毒性のより明らかな証拠となりうるものとする。比較として、投与を中止したあとに完全な回復性を伴う暴露期間中に認められた運動能の一時的な低下は、発達神経毒性というよりは急性毒性の範疇に入るものと考えられる。

・イミダクロプリドの発達神経毒性試験でみられた運動能について

イミダクロプリドで認められた児動物の運動能に対する影響は最高用量群の750ppm群で雌雄ともに生後17日以降にみられた。その影響は、総運動能では統計学的な有意差を伴わない程度の低下（雄：生後17日、雌：生後17日、21日）であり、10分毎の運動能では雌の生後17日目の最初の10分間にのみ有意差が認められた程度のものであった。そしてその低下は持続的なものではなく回復性（生後60日には変化なし）が認められた。また、慣れに変化は認められず、運動機能障害（正常な運動機能の維持、痙攣あるいは運動失調など）の兆候はみられず、学習能力や記憶力にも影響は認められなかった。

急性神経毒性試験（毒性資料NO.原体-12）においても150mg/kg以上で投与日に運動能の低下が認められ、次回測定日の投与後7日で回復性が確認されている。また発達神経毒性試験と同様に慣れに変化は認められなかった。

このようなことから、児動物が生後15日ごろから直接餌を食べ始めることを考慮に入れるべきであると考えた。下記に哺育期間中の検体摂取量を示す。

検体摂取量(mg/kg/日)

哺育期間	100ppm	250ppm	750ppm
0-7日	12.8	30.0	80.4
7-14日	17.2	42.3	128.8
14-21日	19.5	45.4	155.0

哺育第2週ころから摂取量が多くなっており、上記に示すように必然的に検体摂取量の増加が確認された。運動能の低下が生後17日あるいは21日の短期間に認められ、検体投与中止後の生後60日で運動能に影響が認められなかったことから、児動物が直接的に餌を食べたことに関連しているものと思われる。

・申請者としての見解

以上のことから、イミダクロプリド投与による運動能に対する影響は一時的な低下で、明らかな回復性がみられており、餌を食べ始めた時期と重なることから、母体経路による発達神経毒性というよりはむしろ直接的に検体を摂取したことによる影響と考えられた。

なお、尾状核被殻幅のわずかな低値は雌のみに認められ、一方雄では増加傾向をしめしているが、運動能では、低下が雌雄共に認められている。このように、尾状核被殻幅と運動能に一貫した関連性がみられなかった。以上のことから、雌雄で認められた投与期間中のみでの運動能の低下は、全身毒性によるものであり、尾状核被殻幅のわずかな低下に関連したものではないと考えられた。

・ 総合考察

本試験で認められた投与に関連した影響は最高用量群の 750ppm に限られ、雌親動物では摂餌量の減少が、児動物では増体重の抑制が認められ、運動能、移動運動能が抑制された（雄生後 17 日、雌生後 17 および 21 日）。これらの運動能に対する影響は一時的な低下で、生後 60 日には回復性が認められた。この低下は、母体を介して認められた影響というよりはむしろ、高用量の検体が含有された餌を食べたことによる直接的な影響と考えられた。最高用量群の雌のみにみられた尾状核被殻幅と脳梁の厚さについては対照群からの差は概して小さく、生物学的変動範囲内（背景データ範囲内）、あるいは測定誤差（特に生後 11 日）に起因したものであり、投与に関連した影響が疑われるような時間（日齢）や性別による一貫性のある変動を伴わなかったことから偶発的な変化と考えられた。

なお、児動物の各種機能検査、学習能及び記憶能、眼科学的検査、脳重量及び脳の計測ならびに神経組織の病理組織学的検査では検体投与の影響は雌雄ともに最高用量群においても認められなかった。

本試験は、科学的に信頼性のあるガイドラインに基づいて実施されたもので、発達神経毒性の有無を検査するには適した方法で実施されている。そしてこの試験で認められた成績を総合評価した結果、イミダクロプリドには発達神経毒性誘発作用はないものと考えられた。

イミダクロプリドの雄ラットを用いた混餌投与による 28 日間反復経口投与免疫 毒性試験

(毒性資料No.原体-48)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2010 年

検体の純度：

試験動物：ウイスターRj:WI (IOPS HAN)系雄ラット 1群各 10 匹、
投与開始時；7 週齢(平均体重 雄 240～244g)

投与期間：2010 年 5 月～2010 年 6 月

投与方法：

検体を 0(対照群)、150、600 および 2400ppm の濃度で飼料に混入し、28 日間にわたり随時摂食させた。

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

観察・検査項目および結果：

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

検体投与群、陽性対照群ともに死亡は認められなかった。

週 1 回行う詳細な検査において、2400ppm 群で 8 日に一般状態の不良がみられた 1 例は、8 日、15 日および 22 日に立毛が認められた。その他に認められた所見は、1 例にまた 1 回の観察時期に認められたことから検体の影響とは考えられなかった。600ppm 以下では投与に関連した臨床症状は何ら認められなかった。

陽性対照群では、投与期間を通じて、シクロホスファミド投与に起因した臨床症状は認められなかった。

体重；投与前は少なくとも週1回、投与開始日（試験1日目）、投与期間中週1回、および剖検前に全動物について測定した。

表1に体重を示した。

表にみられるように、投与期間を通じて2400ppm群の平均体重は、対照群に比べ19%から21%の低値を示した。この体重増加抑制は、投与8日までの体重推移が寄与しているものと考えられた。600ppm以下の群では体重に影響はみられなかった。

陽性対照群では、15日および22日に対照群に比べて低値となったが、試験期間を通じてその差は3%から5%であり、大きな差は認められなかった。

表1 体重(g)

用量	検体				陽性対照
	0ppm	150ppm	600ppm	2400ppm	3.5mg/kg/日
1日目	241	240	241	244	242
8日目	296	290	290	↓240	288
15日目	334	325	328	↓265	↓320
22日目	368	360	363	↓295	↓351
29日目	396	389	390	↓320	378

↓:p<0.01 (Dunnett あるいは Dunn's Rank Sum), ↓;p<0.05 (T-test)

摂餌量；全動物の摂餌量を毎週測定した。

2400ppm群では対照群に比べ、明らかな減少がみられた。600ppm以下では影響は認められなかった。

陽性対照群では影響はみられなかった。

検体摂取量；投与期間中における平均検体摂取量は表2に示すとおりであった。

表2 検体摂取量

用量 (ppm)	150	600	2400
検体摂取量 (mg/kg/日)	11.7	47.1	186

SRBC-特異的 IgM 反応；投与26日後に、羊赤血球 (SRBC) の PBS 溶液 (5×10^8 細胞/mL) を 0.5mL/動物で全動物に静注し、免疫性を付与した。SRBC 投与4日後（検体投与30日後）に、全動物の後眼窩静脈叢より血液を採取し、血清を得た。血清中の SRBC 特異的 IgM を ELISA 法により測定した。

各群における SRBC 特異的 IgM 濃度を表3に示す。

SRBC 特異的 IgM 濃度は、個体間変動が対照群を含めすべての試験群で大きかったが、検体処理群では SRBC 特異的 IgM 濃度に意義のある変化は認められな

かった。一方、シクロホスファミドは顕著に SRBC 特異的 IgM 濃度を低下させた(対照群に対して-95%)。

なお、対照群の平均濃度が他の投与群より高値を示しているが、これは 1 例の動物がとびぬけて高い濃度 (49079 u/mL) を示したことが影響しているものと考えられた。しかし、とびぬけて高い値を除いたとしても対照群の平均濃度 (申請者注 12474u/mL) から、試験動物の SRBC に対する感作能が確認されている。

表 3 平均 SRBC 特異的 IgM 濃度 (u/mL)

検体				陽性対照
0ppm	150ppm	600ppm	2400ppm	3.5mg/kg/日
17430	10541	8919	10775	↓916
±14985	±5232	±4743	±7899	±1003

↓ : p<0.05 (Mann-Whitney U-test)

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

各群の剖検前の体重および臓器重量の対照群に対する割合を表 4 に示す。

剖検前体重

2400ppm で対照群に比べ 19%低値を示した。600ppm 以下では影響は認められなかった。

脾臓

対体重比が、2400ppm で対照群に比べ 19%の増加がみられた。この変化は剖検前体重が対照群に比べ低かったことによるものと考えられた。600ppm 以下では対照群に比べ剖検前体重及び臓器重量に影響は認められなかった。

胸腺

2400ppm で実重量の 28%低値がみられた。これは、明らかな低体重が認められているように、全身的な一般状態の不良によるものと考えられ、したがって、免疫毒性を示すものとはみなさなかった。対体重比についても対照群に比べ 11%の低下がみられたが、対照群との間に有意な差は認められていないこと、また背景データ範囲内*であることから影響とは考えなかった。600ppm 以下では対照群に比べ剖検前体重及び臓器重量に影響は認められなかった。

シクロホスファミドでは剖検前体重に対照群との差は認められなかったが、

脾臓、胸腺ともに、対照群に比べ実重量および対体重比の明らかな低下が認められた。この変化はシクロホスファミドの影響と考えられた。

表 4 剖検前体重および臓器重量

		検体			陽性対照
		150ppm	600ppm	2400ppm	3.5mg/kg/日
用量					
剖検前体重		98	98	↓81	96
脾臓	実重量	103	100	97	↓69
	対体重比	105	103	↑119	↓72
胸腺	実重量	99	96	↓72	↓71
	対体重比	101	98	89	↓75

検体 ↑↓ : p<0.01 (Dunnett), 陽性対照群 ↓ : T-test

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものと

剖検では、2400ppm で 10 例中 3 例に小さい胸腺が認められた。これは、低体重が示すように全身状態が良好ではないことに起因しており、検体に起因した影響とは考えられなかった。Wistar ラットを用いた 90 日間の反復経口毒性試験 (毒性資料 No. 原体-14) において、2400ppm で一般毒性がみられ、また肝臓で回復性の認められる円形細胞浸潤や単細胞壊死、核の肥大などが認められ、明らかに肝臓に影響が認められているが、その用量で、胸腺に病理組織学的検査が認められていないことから、本試験で認められた小さい胸腺は、検体に起因した影響とは考えられなかった。

また、2400ppm で 10 例中 3 例に精巣のうっ血/赤の所見が認められた。この所見が偶発的にみられたのか、あるいは全身状態不良によるものかは明らかではないが、少なくとも、免疫毒性を示す所見ではなかった*。

その他 2400ppm でみられた所見は単発でみられたものなので、検体投与の影響とは考えられなかった。

600ppm 以下の群では検体投与に関連した剖検所見は認められなかった。

一方、シクロホスファミド群では、投与に関連したと考えられる小さい脾臓および胸腺がそれぞれ 10 例中 7 例および 3 例にみられ、これはシクロホスファミドの影響と考えられた。

*申請者注 同投与用量でより長い試験期間で行われたラット 90 日間反復経口投与毒性試験 (毒性資料 No. 原体-14) において、剖検および病理組織学的検査で影響は認められていないことから、本試験で精巣に認められた所見は偶発的なものと考えられる。

以上のことから本検体は Wistar ラットにおいて最大耐量を超える 2400ppm (186mg/kg/日) でも、免疫毒性を示さないことが確認された。

2. 原体混在物および代謝物

(1) 急性毒性

のラットを用いた急性経口毒性試験

(毒性資料 No. 代謝物-1)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1991年 3月 18日

検体の純度：87.0%

試験動物：SD(Crj:CD)系雌雄ラット、1群雌雄各5匹

(試験開始時7週齢、体重 雄 188~211g、雌 141~157g)

試験期間：14日間観察

試験方法：

検体調製

検体の所定量を秤量し、ポリエチレングリコール400を加えて懸濁液を調製した。

投与方法

この調製液を前日夕方から絶食させたラットに体重100g当り1mLの割合で胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

一般症状の観察及び体重の測定

投与後14日間にわたり、死亡および中毒症状の有無を観察した。体重の測定は、検体投与直前、投与後7日および14日目に測定した。

剖検

死亡動物および観察終了時の生存動物を剖検した。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄：150、240、390、630、1000 雌：150、240、390、630、1000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：300 (95%信頼限界;200~440) 雌：280 (95%信頼限界;210~370)
死亡開始時間及び 終了時間	雄：2分~1日 雌：6分~1日
症状発現時間及び 消失時間	雄：1分~14日 雌：1分~10日
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：- 雌：-
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：150 雌：150

一般症状の観察及び体重の測定

LD₅₀値は、雄が300mg/kg、雌が280mg/kgであり性差は認められなかった。

全投与群で検体投与に起因した中毒症状がみられ、これらの主なものは鎮静、眼瞼下垂、呼吸異常、ふるえであり、この他に皮膚温低下、けいれん、紅涙なども散見された。

死亡は雌雄ともに240mg/kg以上で認められた。

生存例の体重は、630mg/kg群の雄1例を除き順調な増加が認められた。投与翌日以降の死亡例の体重は、投与直前の体重に比べて減少していた。

剖検

生存例の剖検では、雌雄共に肺の赤褐色斑/域、灰白色斑/域が散見された。死亡例の剖検で雌雄共に、肺の赤褐色斑/域や胃と小腸の粘膜の赤色調がみられた。

のラットを用いた急性経口毒性試験
(毒性資料 No. 代謝物-2)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1991 年 11 月 29 日

検体の純度 :

試験動物 : SD(Crj:CD)系雌雄ラット、1群雌雄各5匹
(試験開始時7週齢、体重 雄 193~215g、雌 142~169g)

試験期間 : 14日間観察

試験方法 :

検体調製

検体の所定量を秤量し、ポリエチレングリコール400を加えて懸濁液を調製した。

投与方法

この調製液を前日夕方から絶食させたラットに体重100g当り1mLの割合で胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

一般症状の観察及び体重の測定

投与後14日間にわたり、死亡および中毒症状の有無を観察した。体重の測定は、検体投与直前、投与後7日および14日に測定した。

剖検

死亡動物および観察終了時の生存動物を剖検した。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄：440、660、990、1500、2220、3300、5000 雌：200、290、440、660、990、1500
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：3500 (95%信頼限界；2600～6000) 雌：1100 (95%信頼限界；760～2100)
死亡開始時間及び 終了時間	雄：4日～7日 雌：2日～6日
症状発現時間及び 消失時間	雄：25分～9日 雌：1時間～8日
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：- 雌：-
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：1500 雌：660

一般症状の観察及び体重の測定

LD₅₀値は、雄が3500mg/kg、雌が1100mg/kgであり性差が認められた。

全投与群で検体投与に起因した中毒症状がみられ、これらの主なものは散瞳、ふるえ、呼吸異常、流涙、紅涙、消瘦、歩行不能、血尿、立毛であった。

死亡は雄で2200mg/kg以上、雌で990mg/kg以上で認められた。

生存例の体重は雄の990mg/kg以上及び雌の660mg/kg以上の群で、投与7日目の体重測定時に増加抑制が認められたが、観察終了日においては順調な増加を示していた。投与翌日以降に認めた死亡例の体重は、投与直前の体重に比べ減少していた。

剖検

生存例の剖検では、雌雄共に何ら著変は認められなかった。死亡例の剖検で認められた主な所見は、肺（赤色肝変化、暗赤褐色調～赤褐色変化）、膀胱（膀胱内小塊及び赤色液の貯留）、脾臓（萎縮及び褪色）及び消化器（胃粘膜の暗赤色斑と菲薄化、大腸の腔拡張及び粘膜暗赤褐色巣、腸内容物黄色調）に見られた。

のラットを用いた急性経口毒性試験

(毒性資料 No. 代謝物-3)

特殊農薬製造株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1991年 3月 11日

検体の純度：

試験動物：SD(Crj:CD)系雌雄ラット、1群雌雄各5匹

(試験開始時7週齢、体重 雄 191~227g、雌 144~161g)

試験期間：14日間観察

試験方法：

検体調製

検体の所定量を秤量し、ポリエチレングリコール400を加えて懸濁液を調製した。

投与方法

この調製液を前日夕方から絶食させたラットに体重100g当り1mLの割合で胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

一般症状の観察及び体重の測定

投与後14日間にわたり、死亡および中毒症状の有無を観察した。体重の測定は、検体投与直前、投与後7日および14日目に測定した。

剖検

死亡動物および観察終了時の生存動物を剖検した。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄：980、1560、2500、4000 雌：980、1560、2500、4000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：1980 (95%信頼限界;1490~2640) 雌：3560 (95%信頼限界;2840~4450)
死亡開始時間及び 終了時間	雄：2時間~9日 雌：3時間~4日
症状発現時間及び 消失時間	雄：25分~7日 雌：25分~9日
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：- 雌：-
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：980 雌：1560

一般症状の観察及び体重の測定

LD₅₀値は、雄が1980mg/kg、雌が3560mg/kgであり性差が認められた。

全投与群で検体投与に起因した中毒症状がみられ、これらの主なものは散瞳、ふるえ、鎮静、眼球突出及び呼吸異常であった。その他、排糞量の明らかな減少が2500mg/kg以上の雌雄群で認められた。

死亡は雄で1560mg/kg以上、雌で2500mg/kg以上で認められた。

生存例の体重は4000mg/kg雌雄群と2500mg/kg雄群で投与7日目に増加抑制がみられたた以外は順調な増加を示し、14日においては、全群ともに順調な増加が認められた。また投与翌日以降に認めた死亡例の体重は投与直前の体重に比べ減少していた。

剖検

剖検において認められた主な所見は肺及び胃の所見であった。肺の所見は、赤褐色斑/域で死亡例13例のうち投与日に死亡した4000mg/kg群の3例を除いたすべての例で認められ、胃の所見は、肥厚、粘膜の赤色調ですべて検体投与日の死亡例にのみ認められた。

のマウスを用いた急性経口毒性試験

(毒性資料 No. 代謝物-4)

試験機関：

[非 GLP]

報告書作成年月日：1988年 9月 16日

検体の純度： —

供試動物： ICR系雌雄マウス， 1群雌雄各5匹

試験開始時；雌雄 5週齢（体重：雄 21.6～28.6g、雌 19.0～23.0g）

観察期間： 7日間

試験方法：

検体調製

検体を所定量秤量し、DMSOに溶解後、ポリエチレングリコール400を加えて懸濁液を調製し、投与検体とした。

投与方法

投与前に1晩絶食させた雌雄マウス及び非絶食（飽食）の雌雄マウスに胃ゾンデを用いて強制的に単回経口投与した。

一般症状の観察及び体重の測定

観察期間は7日間とし、検体投与日は頻繁に、翌日からは毎日1回以上注意深く臨床観察を行った。

検体投与直前及び投与後7日に体重を測定した。

剖検

観察終了時に全生存動物をジエチルエーテル吸入麻酔下で屠殺後、剖検した。

結果：

[絶食下]

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄：100、200、300、450
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：200 (110～340) 雌：200 (120～310)
死亡開始時間及び 終了時間	雄：10分～35分 雌：7分～1時間
症状発現時間及び 消失時間	雄：3分～1日 雌：3分～1日
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：－ 雌：－
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：100 雌：－

[非絶食下]

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	100(雄のみ)、200、300、450
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：240 (150～340) 雌：約300
死亡開始時間及び 終了時間	雄：10分～1時間 雌：8分～30分
症状発現時間及び 消失時間	雄：4分～1日 雌：2分～1日
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：－ 雌：－
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：100 雌：200

一般症状の観察及び体重の測定

中毒症状として雌雄共に歩行失調、呼吸異常、眼球突出、ふるえ、痙攣、ヒヨコ様鳴声などが認められた。

観察終了時における生存例の体重には群間差は認められなかった。

剖検

死亡例及び生存例の剖検の結果、雌雄共に検体に起因する所見は認められなかった。

検体の急性経口毒性に、投与前の摂餌状況や性による差は認められなかった。

のラットを用いた急性経口毒性試験

(毒性資料 No. 代謝物-5)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1991年 5月 2日

検体の純度：

試験動物：SD(Crj:CD)系雌雄ラット、1群雌雄各5匹

(試験開始時7週齢、体重 雄 193～226g、雌 138～152g)

試験期間：14日間観察

試験方法：

検体調製

検体の所定量を秤量し、ポリエチレングリコール400を加えて懸濁液を調製した。

投与方法

この調製液を前日夕方から絶食させたラットに体重100g当り1mLの割合で胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

一般症状の観察及び体重の測定

投与後14日間にわたり、死亡および中毒症状の有無を観察した。体重の測定は、検体投与直前、投与後7日および14日目に測定した。

剖検

死亡動物および観察終了時の生存動物を剖検した。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄：990、1480、2220、3330、5000 雌：990、1480、2220、3330、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：4080 (95%信頼限界:3230~5150) 雌：1820 (95%信頼限界:1440~2300)
死亡開始時間及び 終了時間	雄：1日 雌：5時間~1日
症状発現時間及び 消失時間	雄：10分~2日 雌：25分~2日
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：- 雌：-
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：2220 雌：990

一般症状の観察及び体重の測定

LD₅₀値は、雄が4080mg/kg、雌が1820mg/kgであり性差が認められた。

全投与群で検体投与に起因した中毒症状がみられ、これらの主なものは散瞳、歩行異常、鎮静、呼吸異常、歩行不能、流涎、振せん、鼻出血であった。

死亡は雄で3330mg/kg以上、雌で1480mg/kg以上で認められた。

生存例の体重は、順調な増加が認められた。投与翌日以降の死亡例の体重は、投与直前の体重に比べて減少していた。

剖検

生存例の剖検では、雌雄共に何ら著変は認められなかった。死亡例の剖検で雌雄共通して認められた主な所見は、肺（暗赤褐色調、赤色肝変化）及び気管（粘液貯留）の所見であった。

のラットを用いた急性経口毒性試験

(毒性資料 No. 代謝物-6)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1991年 3月 11日

検体の純度：

試験動物：SD(Crj:CD)系雌雄ラット、1群雌雄各5匹

(試験開始時7週齢、体重 雄 199～209g、雌 156～165g)

試験期間：14日間観察

試験方法：

検体調製

検体の所定量を秤量し、ポリエチレングリコール400を加えて懸濁液を調製した。

投与方法

この調製液を前日夕方から絶食させたラットに体重100g当り1mLの割合で胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

一般症状の観察及び体重の測定

投与後14日間にわたり、死亡および中毒症状の有無を観察した。体重の測定は、検体投与直前、投与後7日および14日目に測定した。

剖検

死亡動物および観察終了時の生存動物を剖検した。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄：2500、5000 雌：2500、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：>5000 雌：>5000
死亡開始時間及び 終了時間	雄：－ 雌：3日
症状発現時間及び 消失時間	雄：20分～13日 雌：15分～9日
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：－ 雌：－
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：5000 雌：2500

一般症状の観察及び体重の測定

LD₅₀ 値は、雌雄共に 5000mg/kg 以上であり性差が認められなかった。

全投与群で検体投与に起因した中毒症状がみられ、中毒症状として、鎮静、呼吸異常とそれに伴う喘鳴及び失禁が雌雄共に、雌 1 匹にヒヨコ様鳴声(投与翌日のみ)が観察された。

死亡は雄では最高用量の 5000mg/kg でも認められず、雌では 5000mg/kg で 1 例にみられた。

生存例の体重は、雌雄共に順調に増加したが、症状の消失に時間を要した 2500mg/kg 雄の 1 例はわずかに増加抑制傾向がみられた。死亡例の体重は、投与時に比べて減少した。

剖検

生存例の剖検では、肺に赤褐色斑/域が散見された。死亡例の 1 例では胃の粘膜に暗赤褐色巣がみられた。

のラットを用いた急性経口毒性

試験

(毒性資料 No. 代謝物-7)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1991年11月29日

検体の純度：

試験動物：SD(Crj:CD)系雌雄ラット、1群雌雄各5～10匹
(試験開始時7週齢、体重 雄 191～218g、雌 141～172g)

試験期間：14日間観察

試験方法：

検体調製

検体の所定量を秤量し、ポリエチレングリコール400を加えて懸濁液を調製した。

投与方法

この調製液を前日夕方から絶食させたラットに体重100g当り1mLの割合で胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

一般症状の観察及び体重の測定

投与後14日間にわたり、死亡および中毒症状の有無を観察した。体重の測定は、検体投与直前、投与後7日および14日目に測定した。

剖検

死亡動物および観察終了時の生存動物を剖検した。

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

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄：1800、2300、3000、3800、5000 雌：1800、2300、3000、3800、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄：3800 (95%信頼限界:3600~4100) 雌：3700 (95%信頼限界:3100~5300)
死亡開始時間及び 終了時間	雄：1時間~2日 雌：2時間~2日
症状発現時間及び 消失時間	雄：2分~2日 雌：1分~2日
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：- 雌：-
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：3000 雌：2300

一般症状の観察及び体重の測定

LD₅₀値は、雄が3800mg/kg、雌が3700mg/kgであり性差が認められなかった。

全投与群で検体投与に起因した中毒症状がみられ、中毒症状として、鎮静、よろめき歩行及び呼吸異常がみられ、さらに重篤な例では麻酔様状態や流涙が観察された。

死亡は雄で3800mg/kg以上、雌で3000mg/kg以上で認められた。

体重は雌雄共に順調に増加した。

剖検

生存例の剖検では、特記すべき所見はみられなかった。死亡例では胃の粘膜赤色調変化が散見された。また、肺気腫や気管内に貯留物がみられた。

(2) 90 日間反復経口投与毒性

のラットを用いた 12 週間反復経口投与

毒性試験(飲水投与)

(毒性資料No.代謝物-8)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1992 年 3 月 2 日

検体の純度：

試験動物：ウイスター[Bor:WISW(SPF-Cpb)]系ラット

主群；雌雄各 10 匹

中間検査群[投与 4 週間]；雌雄各 5 匹

試験開始時；雄約 5 週齢(平均体重 82g)

雌約 5 週齢(平均体重 78g)

投与期間：12 週間(1989 年 9 月～1989 年 12 月)

投与方法：

検体を 0、100、300 及び 1000ppm の用量で飲水中に混合し 12 週間投与した。

投与用量設定の根拠；

本試験の用量設定は、検体の水溶解度の最高値が約 1000ppm であることに基づいた。また、検体には粉塵爆発の可能性が考えられたため、投与経路として飲水投与を採用した。

本試験は、NTN33893 の代謝物である WAK3839 の雌雄ラットへの長期間暴露による毒性作用を確認するとともに、今後予想される亜慢性や慢性的な暴露試験における試験の用量設定のための情報を得ることを目的とした。

観察・検査項目及び結果：

1. 一般症状及び死亡率

臨床症状及び生死を少なくとも 1 日 1 回観察した。

試験期間中、全ての用量群の雌雄ラットに特記すべき所見は認められなかった。また、死亡例は認められなかった。

2. 体重

各動物の体重は、投与開始前、その後は週1回12週目まで測定した。加えて計画した剖検の直前にも体重を記録し、臓器対体重比の計算に用いた。

いずれの投与群の体重にも対照群との差異は認められなかった。

3. 摂餌量、飲水量及び検体摂取量

摂餌量、飲水量を週1回、個体毎に測定した。

雌雄における平均1日摂餌量について検体投与群と対照群との間に差は認められなかった。

飲水量については雌雄300ppmまでの群と対照群との間に差は認められなかった。一方、雌雄1000ppmの飲水量は対照群に比して減少し、最大で16%の減少であった。この結果、雌雄300ppmまでの検体摂取量は設定用量にほぼ関連していたが、1000ppm群の検体摂取量は設定量に比して雄で15%、雌で11%減少した。一日あたりの平均検体摂取量を次の表1に示した。

表1 検体摂取量(mg/kg/日)

投与量(ppm)		100	300	1000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	13	35	106
	雌	13	39	117

4. 臨床検査

血液学的検査、血液生化学検査及び尿検査は、第4週及び第12週に実施した。眼科学的検査は試験53及び83日に実施した。

4-1. 血液学的検査

非絶食の動物をエーテル麻酔下で心刺殺し、血液を採取した。以下の項目について測定又は算定した。

赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(HCT)、血小板数、白血球分画、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)、トロンボプラスチン時間(TP)、赤血球形態、網状赤血球数、ハイツ小体、メトヘモグロビン、スルフヘモグロビン

表2に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

表 2 血液学的検査 (有意差の認められた項目)

項目/用量(ppm)	100		300		1000	
	4週	12週	4週	12週	4週	12週
雄						
白血球		↑140		↑131		
MCV		↓96	↓91			
MCHC			↑111			
白血球分画						
リンパ球				↑104		↑106
分葉核好中球				↓52		↓49
雌						
MCH					↓87	↑105
MCHC					↓83	↑104
トロンボプラスチン時間					↓87	
血小板	↓87					
網状赤血球	↓47					↓67
ハイツ小体	↓50					
白血球分画						
リンパ球				↑104		↑104
分葉核好中球						↓62

↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01 (Mann and Whitney, Wilcoxon),
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

参考として背景データ[()内は2SD幅]

リンパ球 (%)

11-21 週齢/雄 88.8(79~98), 雌 87.7(76~100)

好中球 (%)

11-21 週齢/雄 8.9(~18), 雌 10.2 (~22)

赤血球系の変化として、投与期間中、赤血球数、赤血球恒数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、網状赤血球及び血小板に関して、いずれの投与群においても、検体投与に関連する明らかな変化は認められなかった。尚4週時の1000ppm雌群でMCHとMCHCが有意に減少し、それらは12週後に有意に増加した。また、同群の網状赤血球数は12週時に有意に減少したが、これらの変動は偶発性のものと考えられた。

血小板数やトロンボプラスチン時間に投与によると考えられる変動は認められなかった。

白血球数に用量に関連した変動は認められなかった。

12週の白血球分画において雌雄300ppm以上でリンパ球の増加と分葉核好中球の減少が認められたが、いずれの値も背景データの範囲での変動であることから、投与による変化ではないものと考えられた。

以下の項目について測定を行った。尚、これらの項目のうち、グルコースは無麻酔下、絶食の動物の尾静脈から採血し除蛋白処理した全血を用い測定した。その他の項目の測定には、エーテル麻酔下で心刺殺し、採取した血液の血漿を用いて行った。

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT), アルカリホスファターゼ (ALP), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH)

アルブミン (ALB), ビリルビン (BIL), コレステロール (CHOL), クレアチニン (CREA), 総蛋白 (PROT), トリグリセリド (TRIGL), 尿素 (UREA), グルコース (GLUC)

クロリド (Cl), カルシウム (Ca), 無機リン (P), カリウム (K), ナトリウム (Na)
トリヨードチロニン (T3), チロキシン (T4), チロキシン-結合能 (TBC),

表 3 に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

雌雄いずれの投与群にも ASAT、ALAT、ALP 及び GLDH の増加は認められなかった。一方 1000ppm までの多くの雌雄群の基質 (GLUC、CHOL、CREA、UREA、BIL、PROT、ALB 及び TRIGL) に対照群との有意差が認められたが、いずれも明らかな用量相関性を示さず、また時間の経過との関連性もないことから、これらの変動は投与に関連のないものと考えられた。

ナトリウムは雌雄 1000ppm 群で減少した。

申請者註：ナトリウムの測定結果は極めてわずかであり、背景データ範囲にあることから、毒性学的に意味のある変動とは考えなかった。

また、甲状腺ホルモンにも投与の影響は見られなかった。

表 3 血液生化学的検査/酵素・基質関連項目 (有意差の認められた項目)

項目/用量(ppm)	100		300		1000	
	4週	12週	4週	12週	4週	12週
雄						
ASAT		↓80		↓80		↓84
ALAT		↓82		↓79		↓79
グルコース					↑111	
コレステロール	↓85					
クレアチニン	↓72		↓72			↓80
総蛋白	↓91				↓94	↓95
ビリルビン				↑112		
アルブミン		↓96				↓97
無機リン	↓90		↓91		↓95	
T3		↑120				
TBC				↓95		
ナトリウム			↓99		↓97	
塩素						↑102
雌						
ALAT						↓80
トリグリセリド	↑157					
クレアチニン			↓61		↓60	↓90
ナトリウム			↓99		↓98	↓99

↑↓: p<0.05, ◆↓: p<0.01 (Mann and Whitney, Wilcoxon),
 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
 参考として背景データ[()内は 2SD 幅]

Na: 11-21 週齢/雄 146(142~149), 雌 144(142~147)mmol/l

4-3. 肝薬物代謝酵素及び中性脂肪

4 週および 12 週の剖検時に肝組織の一部を採取し、薬物代謝酵素 (N-デメチラーゼ、O-デメチラーゼ、チトクローム P-450) を測定した。また、肝組織中のトリグリセリド量を測定した。(*: 基質/アミノピリン **: 基質/4-ニトロアニソール)

その結果、これら肝薬物代謝酵素や、肝組織中の中性脂肪量に検体投与の影響は認められなかった (表 4)。

表 4 肝薬物代謝酵素及び中性脂肪 (有意差の認められた項目)

項目/用量(ppm)	100		300		1000	
	4週	12週	4週	12週	4週	12週
雌						
N-デメチラーゼ		↓84		↓74		↓81
P-450					↑110	
トリグリセリド		↑114				

↑↓: p<0.05, ◆↓: p<0.01 (Mann and Whitney, Wilcoxon),
 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

4-4. 尿検査

尿検体は16時間（夜間）室温で採取した。尿採取期間中は水も餌も与えなかった。

蛋白質、グルコース、潜血、ウロビリノーゲン、ビリルビン、ケトン体、pH、沈渣、尿量(VOL)を測定した。

半定量的に測定した蛋白質、グルコース、潜血、ウロビリノーゲン、ビリルビン、ケトン体、さらに尿量及びpH値に全動物群において異常はなかった。沈渣にも雌雄において異常はなかった。

4-5. 眼科学的検査

眼科学的検査を対照群及び最高用量群の10例を用いて5日と83日に実施した。両眼の瞳孔反射を最初に暗室で検査した。Roche 散瞳剤の点眼により瞳孔を散大させた後、屈折系及び眼底について間接検眼鏡を使用して検査した。

試験した全ての動物で、検体による眼に対する影響は観察されなかった。

5. 剖検

4週及び投与終了時にすべての動物をエーテルの深麻酔下で放血致死させた。動物を解剖し、臓器・組織の詳細な病理解剖学的検査を実施した。変化が認められた場合には、その位置、大きさ、色及び硬さについて記録した。

投与期間および回復期間の終了時には特記すべき臓器の変化は認められなかった。

6. 臓器重量

投与期間の終了時及び回復期間の終了時、全生存動物を対象として、脳、下垂体、甲状腺、肝臓、腎臓(両側)、心臓、肺、卵巣(両側)、精巣(両側)、脾臓、副腎(両側)、胸腺について臓器重量を測定し、それらの対体重比も算出した。

表5に統計学的に有意差の認められた項目を示した。

表 5-1 臓器実重量 (有意差の認められた項目)

項目/用量 (ppm)	100		300		1000	
	4 週	12 週	4 週	12 週	4 週	12 週
雄						
体重	(93)	(98)	(99)	(94)	(93)	(95)
副腎						↓84
胸腺					↓79	
肝臓	↓87					↓90
雌						
体重	(95)	(101)	(97)	(99)	(103)	(97)
脾臓						↓87

↑↓ : p<0.05 , ↓ : p<0.01 (Mann and Whitney, Wilcoxon) ,
 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

表 5-2 臓器対体重比 (有意差の認められた項目)

項目/用量 (ppm)	100		300		1000	
	4 週	12 週	4 週	12 週	4 週	12 週
雄						
体重	(93)	(98)	(99)	(94)	(93)	(95)
脳	↑109					
心					↑106	
胸腺					↓85	
腎臓					↑106	↑106
副腎						↓92
精巣				↑110		
雌						
体重	(95)	(101)	(97)	(99)	(103)	(97)
肝臓			↓92			
脾臓					↓86	↓90
腎臓						↑107

↑↓ : p<0.05 , ↑↓ : p<0.01 (Mann and Whitney, Wilcoxon) ,
 表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

雌雄 1000ppm 群においていくつかの臓器に統計学的有意差が散見されたが、いずれも一定の傾向を示すことはなく、むしろこれらの群のわずかに低い体重に related したものと考えられ、検体投与による変動ではないものと考えられた。

7. 病理組織学的検査

以下の臓器についてホルマリン溶液で固定した。

副腎、大動脈、脳、精巣上体、食道、眼、大腿骨、心臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節(下顎及び腸間膜)、卵巣、膵臓、脳下垂体、唾液腺、坐骨神経、骨格筋、脾臓、胸骨、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、膀胱、子宮および肉眼所見を有するすべての臓器・組織

上記組織から約 5 μ m の厚さの切片を作製し、ヘマトキシリン及びエオジン (H&E) で染色した。また肝組織の凍結切片はオイルレッド O (ORO) で染色した。

主要な病理組織学的所見は表 6 に示した。

表 6-1 病理組織学的検査 (中間屠殺: 主な所見)

組織・所見/性・用量 (ppm)	雄				雌			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
() : 検査動物数	0	100	300	1000	0	100	300	1000
膀胱 (5)								
好酸性円柱	0	0	1	0	0	0	0	0
上皮過形成	1	0	0	2	0	0	0	0
脳 (5)								
脳室拡張	0	1	0	0	0	0	0	0
直腸 (5)								
拡張	0	0	1	0	0	0	0	0
心臓 (5)								
うっ血	0	1	0	0	0	0	0	0
腎臓 (5)								
腎盂拡張	1	1	2	0	1	0	1	0
肺 (5)								
気管支周囲リンパ過形成	5	2	3	3	3	4	3	3
無気肺	0	0	0	0	1	0	0	0
子宮 (5)								
内腔拡張	—	—	—	—	5	3	3	4

表 6-2 病理組織学的検査（最終屠殺：主な所見）

組織・所見／性・用量 (ppm)	雄				雌			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
()：検査動物数	0	100	300	1000	0	100	300	1000
膀胱 (10)								
好酸性円柱	1	1	0	0	0	0	0	0
びらん	0	0	1	0	0	0	0	0
上皮過形成	2	0	0	3	0	0	0	0
うっ血	0	0	1	0	0	0	0	0
脳 (10)								
脳室拡張	1	0	0	0	0	0	0	0
直腸 (10)								
拡張	3	1	3	1	0	0	0	0
腎臓 (10)								
腎盂拡張	2	2	2	1	3	0	0	2
肝臓 (10)								
慢性炎症	0	0	1	2	2	1	2	1
脂肪浸潤	0	0	0	0	0	2	1	0
肺 (10)								
気管支周囲リンパ過形成	9	10	8	9	7	9	9	8
肺炎	0	0	1	0	0	0	0	0
鉍質沈着	1	0	3	1	0	0	0	0
無気肺	1	0	0	0	0	0	0	0
副腎 (10)								
副副腎	1	0	0	0	0	0	0	0
皮質細胞空胞	2	0	0	1	0	0	0	0
子宮 (10)								
内腔拡張	—	—	—	—	4	3	5	6

このように、検体投与に起因すると考えられる病変はいずれの用量群にも何ら認められなかった。

以上、本検体の雌雄ラットを用いた 12 週間飲水投与試験の結果、雌雄 1000ppm で飲水量の減少が認められた。その他の検査結果に検体投与の影響と考えられる異常は認められなかった。従って、本試験の無毒性量は雌雄とも 300ppm（雄：35mg/kg 体重/日、雌：39mg/kg 体重/日）であると判断した。

(3) 変異原性

の細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 No. 代謝物-9)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1991年3月29日

検体の純度：

投与方法（プレインキュベーション法）：

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) の4株及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の1株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の非存在下及び存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。使用溶媒は検体、陽性対照、陰性対照とも DMSO (陽性対照の NaN_3 は蒸留水) を用いた。

S-9 mix 存在下では 1250~78.1 μg /プレートの範囲で、S-9 mix 非存在下では 2500~156.3 μg /プレートの範囲でそれぞれ5濃度を実施した。試験は3反復とし、再現性を見るために2回行った。

復帰変異コロニー数が2倍以上で用量相関性を示した場合を変異原性陽性と判定した。

結果及び考察（表1、2）：

次表に結果を示したが、2回の試験共代謝活性化の有無にかかわらず、最高用量において生育阻害が認められたが、溶媒対照の復帰変異コロニー数の2倍以上で用量相関性のある増加ほどの菌株においても認められなかった。

一方、2回の試験共、陽性対照として用いた AF-2¹⁾、 NaN_3 ²⁾、9-AA³⁾ では溶媒対照と比較して著名な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁴⁾ は S-9 mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

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

1) : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide,

2) : Sodium azide

3) : 9-Amino-acridine,

4) : 2-Aminoanthracene

表1. 復帰変異試験成績 (第1回目) (表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	108	7	12	30	6
検体	156.3	—	116	9	11	33	6
	312.5	—	124	8	11	32	6
	625	—	110	10	11	37	5
	1250	—	127	5	9	34	8
	2500	—	K	K	K	K	k
対照 (DMSO)		+	120	9	13	29	10
検体	78.1	+	110	8	11	34	10
	156.3	+	113	5	13	34	9
	312.5	+	117	6	12	34	8
	625	+	125	7	15	41	12
	1250	+	K	K	K	K	k
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	348			
	NaN ₃ ²⁾	0.5	—		166		
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			241	
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				370
	9-AA ³⁾	80	—				4488
	2-AA ⁴⁾	1	+	618			
	2-AA ⁴⁾	2	+		177		70
	2-AA ⁴⁾	20	+			511	
2-AA ⁴⁾	0.5	+				266	

K:生育阻害

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): Sodium azide

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene

表 2. 復帰変異試験成績 (第 2 回目) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)		—	86	5	9	24	6	
検体	156.3	—	93	5	9	25	6	
	312.5	—	86	3	11	23	5	
	625	—	96	5	9	26	8	
	1250	—	99	5	11	23	6	
	2500	—	K	K	K	K	k	
対照 (DMSO)		+	99	6	10	27	5	
検体	78.1	+	99	4	12	29	5	
	156.3	+	104	7	11	34	6	
	312.5	+	97	6	12	34	8	
	625	+	105	7	14	36	8	
	1250	+	K	K	K	K	k	
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	365				
	NaN ₃ ²⁾	0.5	—		117			
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			274		
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				461	
	9-AA ³⁾	80	—					3767
	2-AA ⁴⁾	1	+	663				
	2-AA ⁴⁾	2	+		132			62
	2-AA ⁴⁾	20	+			258		
2-AA ⁴⁾	0.5	+				209		

K: 生育阻害

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): Sodium azide

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene

の細菌を用いた復帰突然変異試験
(毒性資料 No. 代謝物-10)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1991年 11月 29日

検体の純度：

投与方法 (プレインキュベーション法)：

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) の 4 株及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の 1 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の非存在下及び存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。使用溶媒は検体、陽性対照、陰性対照とも DMSO (陽性対照の NaN_3 は蒸留水) を用いた。

S-9 mix 存在下、非存在下共にでは 5000~312.5 μg /プレートの範囲で 5 濃度を実施した。試験は 3 反復とし、再現性を見るために 2 回行った。

復帰変異コロニー数が 2 倍以上で用量相関性を示した場合を変異原性陽性と判定した。

結果及び考察 (表 1、2)：

次表に結果を示したが、2 回の試験共代謝活性化の有無にかかわらず、最高用量において生育阻害が認められたが、溶媒対照の復帰変異コロニー数の 2 倍以上で用量相関性のある増加はどの菌株においても認められなかった。

一方、2 回の試験共、陽性対照として用いた AF-2¹⁾、 NaN_3 ²⁾、9-AA³⁾ では溶媒対照と比較して著名な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁴⁾ は S-9 mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

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

1) : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 2) : Sodium azide
3) : 9-Amino-acridine, 4) : 2-Aminoanthracene

表 1. 復帰変異試験成績 (第 1 回目) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	123	9	14	25	7
検体	312.5	—	147	8	16	29	7
	625	—	155	9	14	29	8
	1250	—	149	9	12	30	9
	2500	—	127	9	15	29	9
	5000	—	141	10	12	31	10
対照 (DMSO)		+	114	8	17	35	8
検体	312.5	+	134	9	17	42	10
	625	+	126	7	17	39	11
	1250	+	129	8	18	40	11
	2500	+	138	7	17	39	14
	5000	+	123	10	18	38	15
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	404			
	NaN ₃ ²⁾	0.5	—		94		
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			355	
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				425
	9-AA ³⁾	80	—				1806
	2-AA ⁴⁾	1	+	609			
	2-AA ⁴⁾	2	+		184		88
	2-AA ⁴⁾	20	+			397	
2-AA ⁴⁾	0.5	+				209	

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): Sodium azide

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene

表2. 復帰変異試験成績 (第2回目)

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照(DMSO)		—	137	7	15	29	6
検体	312.5	—	162	5	13	25	4
	625	—	172	5	10	32	7
	1250	—	128	7	12	31	5
	2500	—	129	10	8	29	5
	5000	—	149	7	7	29	5
対照(DMSO)		+	118	10	11	36	9
検体	312.5	+	111	8	13	41	8
	625	+	107	8	9	43	11
	1250	+	106	8	10	39	11
	2500	+	111	7	12	29	10
	5000	+	113	9	11	33	8
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	377			
	NaN ₃ ²⁾	0.5	—		86		
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			327	
	AF-2 ¹⁾	0.1	—			405	
	9-AA ³⁾	80	—				1715
	2-AA ⁴⁾	1	+	539			
	2-AA ⁴⁾	2	+		149		85
	2-AA ⁴⁾	20	+			382	
2-AA ⁴⁾	0.5	+				206	

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): Sodium azide

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene

の細菌を用いた DNA 修復試験

(毒性資料 No. 代謝物-11)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1991年3月1日

検体の純度：

試験系：細菌（枯草菌：H17 株、M45 株）

試験方法：

(1) 検体の調製方法

使用溶媒として検体には DMSO を用い、20 μ L に必要量を含有するよう調製した。予備試験の結果、検体は 1000 μ g/20 μ L で抗菌作用を示さず、最高 100mg/mL の溶液調製が可能であることから、2000 μ g/20 μ L を最高濃度とし、以下公比 2 で 5 濃度設定した。

陽性対照物質の 2-アミノアトレンは DMSO に、マイトマイシン C および陰性対照物質である硫酸カマイシンは蒸留水を用いて調製した。

(2) rec-assay (孢子法)

DNA 損傷の誘起作用を調べるために、*B. subtilis* の野生株である組換修復機構保持株 (H17) と欠損株 (M45) の孢子を用いた。

両菌株の孢子は、孢子浮遊液として 4 $^{\circ}$ C で保存しているものを使用した。約 45 $^{\circ}$ C に保った孢子法用のニュートリエントアガー 1L あたり孢子浮遊液を 10mL の割合で加え、攪拌後シャーレに 10mL ずつ分注し、室温で固化させた。代謝活性化させる場合は、S-9 mix の 0.1mL をシャーレに分注してから孢子法用ニュートリエントアガーをシャーレに 10mL ずつ分注し、冷蔵庫で固化させた。次に検体あるいは対照物質を含む検体 20 μ L をしみ込ませたディスク（直径 8mm の円形濾紙）を 1 プレートに 2 枚置き、37 $^{\circ}$ C の孵卵器で 24 時間培養した。代謝活性化させる場合は、ディスクに補酵素液を 20 μ L、検体あるいは対照物質を含む検体 20 μ L をしみ込ませ同様な操作を行った。

そして両菌株の阻止円の直径を測定し、ディスクの直径を差し引いたものを生育阻止円 (mm) の直径とした。そして両菌株の生育阻止円の直径の差が 5mm 以上の場合を陽性と判定した。

試験結果：

結果を次表に示した。

物質	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	-S-9 mix			+S-9 mix			
		阻止円 (mm)		差 (mm)	阻止円 (mm)		差 (mm)	
		H17	M45		H17	M45		
検体	125	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	
	250	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	
	500	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	
	1000	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	
	2000	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	
	マイトマイシン C (MMC)	0.005	0	14	14			
			0	14	14			
0.01		0	21	21				
		0	20	20				
2-アミノアントラセン (2-AA)	5	0	0	0	0	13	13	
		0	0	0	0	14	14	
	20	0	0	0	0	12	12	
		0	0	0	0	13	13	
硫酸カマイシン (KM)	0.5	3	5	2				
		3	4	1				
	1.0	5	4	-1				
		5	5	0				
ジメチルスルホキシド* (20 μL) (DMSO)	0	0	0	0	0	0		
	0	0	0	0	0	0		

表にみられるように検体は、125~2000 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ にわたる全濃度において S-9 mix の存在の有無にかかわらず両菌株ともに生育阻害が認められず、判定は陰性であった。対照物質の成績は、予期した結果が得られ適切な試験条件で実施されたことを保証するものであった。

従って、本検体には DNA 損傷の誘起作用は認められなかった。

の細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 No. 代謝物-12)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1990 年 11 月 26 日

検体の純度：

投与方法 (プレインキュベーション法)：

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) の 4 株及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の 1 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の非存在下及び存在下で 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、312.5~5000 μ g/プレートの範囲で 5 濃度で実施した。試験は 3 反復とし、再現性を見るために 2 回行った。陽性対照物質の調製についても DMSO を用いた。

復帰変異コロニー数が 2 倍以上で用量相関性を示した場合を変異原性陽性と判定した。

結果及び考察：(表 1、2)

1 回目の試験の非代謝活性化においては各菌株とも復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。代謝活性化の場合には TA100 及び TA1535 の高濃度でわずかな復帰変異コロニー数の増加傾向がみられたが、明らかな濃度相関性は認められなかった。また、2 回目の試験においても、各菌株とも復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。非代謝活性化の TA1535 の高濃度で復帰変異コロニー数のわずかな増加傾向がみられたが、これも明らかな濃度相関性は認められなかった。この 1 回目及び 2 回目にみられた復帰変異コロニーの増加傾向は、いずれもわずかであり、明らかな濃度相関性を示さず、更に 2 回の試験に共通して認められなかったことから、検体に起因しない所見と考えられた。一方、2 回の試験共、陽性対照として用いた AF-2¹⁾、ENNG²⁾、9-AA³⁾ では溶媒対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁴⁾ は S-9 Mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。更に、溶媒対照での自然復帰変異コロニー数は、背景データの変動範囲内にあった。

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

- 1) 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 2) N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 3) 9-Amino-acridine, 4) 2-Aminoanthracene

表 1. 復帰変異試験成績 (第 1 回目) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	91	9	14	20	6
検体	312.5	—	92	8	8	22	5
	625	—	84	11	11	23	4
	1250	—	100	11	9	20	5
	2500	—	97	12	9	25	6
	5000	—	92	12	9	20	7
対照 (DMSO)		+	67	9	14	23	8
検体	312.5	+	72	7	14	22	7
	625	+	79	7	17	23	10
	1250	+	89	12	14	20	9
	2500	+	79	13	15	23	8
	5000	+	87	13	14	24	10
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	490			
	ENNG ²⁾	5.0	—		149		
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			701	
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				224
	9-AA ³⁾	80.0	—				2936
	2-AA ⁴⁾	1.0	+	395			
	2-AA ⁴⁾	2.0	+		91		37
	2-AA ⁴⁾	20.0	+			277	
2-AA ⁴⁾	0.5	+				157	

- 1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 2): N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 3): 9-Aminoacridine
 4): 2-Aminoanthracene

表 2. 復帰変異試験成績 (第 2 回目)

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	80	8	12	19	5
検体	312.5	—	96	8	8	26	5
	625	—	79	5	12	20	5
	1250	—	86	7	10	19	8
	2500	—	94	11	11	22	6
	5000	—	96	12	14	17	3
対照 (DMSO)		+	82	10	15	34	13
検体	312.5	+	94	8	14	34	13
	625	+	84	10	12	35	8
	1250	+	95	12	11	34	13
	2500	+	90	11	17	32	15
	5000	+	98	10	14	24	16
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	527			
	ENNG ²⁾	5.0	—		150		
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			705	
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				347
	9-AA ³⁾	80.0	—				1788
	2-AA ⁴⁾	1.0	+	410			
	2-AA ⁴⁾	2.0	+		76		46
	2-AA ⁴⁾	20.0	+			214	
2-AA ⁴⁾	0.5	+				135	

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene

の CHO 細胞—HGPRT (前進突然変異) 法による

in vitro 変異原性誘発試験

(毒性資料 No. 代謝物-13)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1989 年 2 月 22 日

検体の純度 :

試験系 : チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞 (CHO-K1-BH₄)

試験方法 :

CHO 培養細胞の HGPRT 座における突然変異原性 (前進突然変異試験) を in vitro 条件下で評価した。検体の濃度は S9 mix 非存在下では 25 μ g/mL から 125 μ g/mL の範囲内で (試験中に 2000 μ g/mL までの濃度に変更)、S9 mix 存在下では 500 μ g/mL から 2000 μ g/mL (溶解限界濃度) の範囲とし、各々 6 濃度を設定した。その他、陰性対照群 (無処理) 1 群、溶媒対照群 1 群、陽性対照群として、エチルメタンサルホネート (EMS ; 非代謝活性化)、ジメチルベンゾアントラセン (DMBA ; 代謝活性化) それぞれ 1 群を設定した。検体および陽性対照物質の調製にはジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

コロニー形成率と突然変異試験

フラスコあたり 4×10^6 細胞の CHO 細胞を、各処理濃度あたり 2 個の 250mL のフラスコの培養用培地に入れた。接着後 (16~24 時間後) に、細胞を低血清量 (5%) の培地を用い、非代謝活性下及び代謝活性下条件で 5 時間各濃度の検体に暴露させた。各対照群は同じ条件下で培養した。その後、単層細胞を PBS で洗浄してトリプシン処理した。これをフラスコ中の培地に約 1.5×10^6 細胞の密度で、また 3 枚のペトリ皿それぞれに 200 個の細胞を、再播種した。ペトリ皿で 7 日間培養し、コロニー数

を算定することにより細胞毒性を判定した。

一方、フラスコに再播種した細胞は、細胞増殖と誘発変異株の発現のために培養し、3日と6日に継代した。最初の継代では、各処理群および対照群の2個の培養を各々2個の250mLのフラスコに、約 1.5×10^6 個の細胞を再播種し、6日間培養した。突然変異株細胞分離のために、 $10\mu\text{g/mL}$ の6-チオグアニン(6-TG)を添加したヒポキサンチン無含有培養液のペトリ皿(合計8皿)に 3×10^5 個の細胞を播種した。さらに、3枚のペトリ皿には各用量群のコロニー形成率を求めるために、ペトリ皿あたり200個の細胞を播種した。約5%炭酸ガスを含んだ加湿された空気中で、 37°C で7日間の培養後、コロニーを固定してギムザ液で染色した。突然変異株分離用のペトリ皿では6-TG抵抗性コロニー数を、コロニー形成率測定用ペトリ皿ではコロニー数を測定した。ただし、50個以下の細胞から形成されるのコロニーは除外した。

結果及び考察：

1. 非代謝活性化条件における突然変異原性試験

非活性化条件下で3試験を実施した。最初の試験において本検体は設定濃度範囲で細胞毒性を示さなかった。このため、その結果は評価から除外し、別に実施した2試験は $2000\mu\text{g/mL}$ までの濃度を採用した。その結果、1試験において相対生存率を指標とした細胞毒性が用量相関的に観察され、最高濃度では全ての細胞が死滅した。残りの試験では細胞毒性は見られなかった。一方、2回の試験の総合的な統計学的解析において、処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。

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

2. 代謝活性化条件における突然変異原性試験

活性化条件下で $2000\mu\text{g/mL}$ までの濃度を採用して2試験を実施した。1試験では相対生存率および相対増殖を指標として細胞毒性が観察されたが、もう一つの試験では細胞毒性はみられなかった。

1培養における $1500\mu\text{g/mL}$ の濃度で、突然変異の頻度にわずかな増加がみられた(統計学的に有意)。しかし、用量に関連した変異数の変動が無いことや、併行した2回目の試験で再現性がなかったことから、これらの増加は検体投与に起因したものは考えられなかった。従って、検体は本代謝活性化試験において非

変異原性物質と判断された。

陽性対照物質の DMBA は、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。

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

非代謝活性化

群	濃度 µg/mL	試験①					試験②				
		生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変 異株 数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞 数	相対 増殖 ^A	総変 異株 数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対照	0	89 ±5	152.2 112.7	2 5	98.5 111.2	1.3 2.8	64 ±1	94.2 -	13 -	103.5 -	7.9 -
溶媒対照 (DMSO)	0	46 ±1	100.0 100.0	1 1	106.7 118.5	0.6 0.6	95 ±12	100.0 100.0	4 1	91.8 82.2	2.7 0.8
陽性対照 EMS	900	8 ±0	51.0 59.0	273 225	56.3 67.2	303.1* 209.3*	20 ±3	62.7 34.8	194 236	53.8 45.0	225.4* 327.8*
検体	62.5	40 ±4	136.8 135.6	0 1	96.8 98.5	0 0.6	55 ±4	92.0 85.8	7 3	113.8 89.8	3.8 2.1
	125.0	40 ±9	115.7 133.4	5 3	101.0 104.3	3.1 1.8	52 ±6	114.1 90.3	2 3	106.8 86.3	1.2 2.2
	250.0	36 ±12	158.1 121.6	2 0	98.5 97.2	1.3 0	63 ±11	106.8 74.2	11 9	104.3 90.5	6.6 6.2
	500.0	35 ±6	136.4 103.5	0 6	111.2 96.3	0 3.9	54 ±7	126.2 58.7	3 8	101.0 89.2	1.9 6.4
	1000.0	38 ±11	110.3 108.6	1 2	114.5 106.3	0.5 1.2	37 ±11	105.2 83.2	4 6	108.2 91.5	2.3 4.1
	2000.0	41 ±10	84.6 112.8	1 1	108.5 92.0	0.6 0.7	0 ±0	- -	- -	- -	- -

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8ペトリ皿のコロニーの合計 C: 細胞 200 個あたりのコロニー形成率

-: 全細胞の消滅

EMS : エチルメタンサルホネート

統計学的処理: * p>0.05(Poisson 検定)

代謝活性化

群	濃度 µg/mL	試験①					試験②				
		生存 細胞数	相対増 殖 ^A	総変 異株 数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞 数	相対 増殖 ^A	総変 異株 数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対照	0	81 ±11	94.3 104.3	2 2	50.3 49.0	2.5 2.6	71 ±9	91.5 100.8	2 2	92.3 83.0	1.4 1.5
溶媒対照 (DMSO)	0	107 ±21	100.0 100.0	4 1	50.3 50.0	5.0 1.3	76 ±13	100.0 100.0	4 3	81.3 83.8	3.1 2.2
陽性対照 DMBA	20	41 ±3	61.0 48.7	66 274	32.3 38.8	127.7* 441.4*	85 ±29	86.6 79.7	106 82	71.5 73.0	92.7* 70.2*
検体	500.0	79 ±18	114.9 90.2	0 8	43.5 49.0	0 10.4	69 ±7	111.7 82.3	0 4	69.3 84.8	0 2.9
	750.0	70 ±12	77.9 87.1	4 3	50.5 46.8	5.0 4.0	67 ±21	131.0 115.1	0 0	69.5 81.5	0 0
	1000.0	80 ±2	123.3 93.8	3 3	45.0 43.8	4.2 4.3	63 ±4	84.2 105.5	0 2	87.5 85.2	0 1.5
	1250.0	70 ±14	115.3 89.5	6 7	41.8 44.2	9.0 9.9	70 ±13	103.6 116.8	4 5	84.2 76.8	3.0 4.1
	1500.0	42 ±6	100.8 80.5	4 11	53.8 55.5	4.6 12.4*	61 ±16	139.8 143.7	7 0	70.3 76.5	6.2 0
	2000.0	45 ±14	147.0 99.7	0 3	27.5 44.8	0 4.2	63 ±10	124.7 86.2	5 1	76.0 78.5	4.1 0.8

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8ペトリ皿のコロニーの合計 C: 細胞 200 個あたりのコロニー形成率
-: 全細胞の消滅

DMBA: ジメチルベンゾアントラセン

統計学的処理: * p>0.05(Poisson 検定)

の V79 細胞—HGPRT (前進突然変異) 法による

in vitro 変異原性誘発試験

(毒性資料 No. 代謝物-14)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1989 年 8 月 15 日

検体の純度 :

試験系 : チャイニーズハムスター肺細胞由来 V79 培養細胞

試験方法 :

V79 培養細胞の HGPRT 座における突然変異原性 (前進突然変異試験) を in vitro 条件下で評価した。検体の濃度は S9 mix の存在下及び非存在下において 500~2000 μ g/mL の 5 用量を変異原性試験に設定した。その他、陰性対照群 (無処理) 1 群、溶媒対照群 1 群、陽性対照群として、エチルメタンサルホネート (EMS ; 非代謝活性化)、ジメチルベンゾアントラセン (DMBA ; 代謝活性化) それぞれ 1 群を設定した。検体および陽性対照物質の調製にはジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

コロニー形成率と突然変異試験

フラスコあたり 4×10^6 細胞の V79 細胞を、播種して培養した。接着後 (16~24 時間後) に、細胞を低血清量 (5%) の培地を用い、非代謝活性下及び代謝活性下条件で 5 時間各濃度の検体に暴露させた。各対照群は同じ条件下で培養した。その後、単層細胞を PBS で洗浄してトリプシン処理した。これをフラスコ中の培地に約 1.5×10^6 細胞の密度で、また 3 枚のペトリ皿それぞれに 200 個の細胞を、再播種した。ペトリ皿で 7 日間培養し、コロニー数を算定することにより細胞毒性を判定した。

一方、フラスコに再播種した細胞は、細胞増殖と誘発変異株の発現のために培養し、2 日と 5 日 (または 3 日と 6 日) に継代した。最初の継代では、各処理群および対照群の 2 個の培養を各々 2 個の 250mL のフラスコに、約 1.5×10^6 個の細胞を再播

種し、6日間培養した。突然変異株細胞分離のために、10 μ g/mLの6-チオグアニン(6-TG)を添加したヒポキサンチン無含有培養液のペトリ皿(合計8皿)に 3×10^5 個の細胞を播種した。さらに、3枚のペトリ皿には各用量群のコロニー形成率を求めるために、ペトリ皿あたり200個の細胞を播種した。約5%炭酸ガスを含んだ加湿された空気中で、37 $^{\circ}$ Cで7日間の培養後、コロニーを固定してギムザ液で染色した。突然変異株分離用のペトリ皿では6-TG抵抗性コロニー数を、コロニー形成率測定用ペトリ皿ではコロニー数を測定した。ただし、50個以下の細胞から形成されるのコロニーは除外した。

結果及び考察：

1. 非代謝活性化条件における突然変異原性試験

非活性化条件下で4試験を500~2000 μ g/mLの用量幅で実施した。そのうち2回の試験ではほぼ全ての用量と陰性対照群で変異株が認められず、陽性対照群のEMSにおける変異株数もわずかであった。このため、これら2試験は評価に供しなかった。残りの2試験においては、相対増殖率が42.0%から80.3%の範囲で用量に関連して減少した。しかし、検体の遺伝毒性を評価する上では問題はないものと考えられた。なお、技術的理由によりこの内の1試験において生存率を判定できなかった。しかし、もう一方の試験において細胞毒性の弱いことが確認されているため、この試験の結果は評価できるものと考えられた。

総合的な解析において、処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。なお2回の試験のうち、1回の最高用量2000 μ g/mLの1培養において変異株数が統計学的有意に増加した。しかし、用量に関連した増加はなく、もう一方の培養には変動は見られず、またもう1回の試験の同用量には増加が見られていないことから、見られた増加には意味はないものと考えられた。

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

2. 代謝活性化条件における突然変異原性試験

活性化条件下で5試験を250~2000 μ g/mLの用量で実施した。この内3試験では、1試験では全ての用量で変異株が認められず、他の2試験では3高用量において本検体の細胞毒性によると考えられる細胞の損失が認められた。このため、これら3試験は評価に供しなかった。

残り 2 試験のうち 1 試験の 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では細胞毒性が見られたため播種できなかった。従って、もう一方の試験の最高用量を 1750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に変更した。

両試験で、相対生存率および相対増殖ともに用量相関的に減少した。しかし、変異原株数に統計学的有意な増加はいずれの用量においても認められなかった。

陽性対照物質の DMBA は、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。

活性化条件下で 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度を採用して 2 試験を実施した。1 試験では相対生存率および相対増殖を指標として細胞毒性が観察されたが、もう一つの試験では細胞毒性はみられなかった。

陽性対照物質の DMBA は、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。

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

非代謝活性化

群	濃度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	試験①					試験②				
		生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 $\times 10^{-6}$	生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 $\times 10^{-6}$
陰性対照	0	141 ± 11	126.3 119.4	10 24	64.8 68.0	6.4 14.7	—	116.2 96.3	15 9	49.5 77.8	12.6 4.8
溶媒対照 (DMSO)	0	113 ± 15	100.0 100.0	12 9	71.3 69.3	8.0 6.2	—	100.0 100.0	16 15	100.0 85.3	6.7 7.3
陽性対照 EMS	900	126 ± 21	78.8 55.5	463 440	60.5 56.0	318.9* 374.1*	—	68.9 54.7	587 531	70.0 69.5	349.4* 318.3*
検体	500.0	110 ± 14	80.0 79.0	18 19	62.0 52.7	12.1 17.2	—	90.2 91.2	15 3	85.8 74.0	7.3 1.7
	1000.0	81 ± 16	75.8 51.7	15 7	72.7 56.0	8.6 6.0	—	59.6 114.4	7 10	54.5 77.2	5.4 5.4
	1500.0	107 ± 13	80.3 65.1	21 9	65.3 43.5	13.4 8.6	—	114.2 112.8	7 4	49.5 77.2	5.9 2.2
	1750.0	50 ± 4	60.1 50.1	11 7	69.0 47.0	6.6 6.2	—	74.7 113.8	9 11	58.0 77.8	6.5 5.9
	2000.0	65 ± 1	59.1 42.0	10 6	72.3 44.2	5.8 5.7	—	58.3 57.8	10 5	17.0 95.7	24.5* 2.2

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8 ペトリ皿のコロニーの合計 C: 細胞 200 個あたりのコロニー形成率
—: 全細胞の消滅

EMS : エチルメタンサルホネート

統計学的処理: * $p > 0.05$ (Poisson 検定)

代謝活性化

群	濃度 μg/mL	試験①					試験②				
		生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー形 成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対照	0	134 ±9	109.8 85.1	7 18	58.8 76.5	5.0 9.8	95 ±6	95.9 75.7	3 8	53.7 62.7	2.3 5.3
溶媒対照 (DMSO)	0	128 ±13	100.0 100.0	19 12	82.8 70.2	9.6 7.1	103 ±5	100.0 100.0	5 5	56.3 59.8	3.7 3.5
陽性対照 DMBA	20	118 ±14	75.5 82.0	96 99	48.7 48.0	82.1* 85.9*	66 ±16	83.3 33.0	60 62	36.3 32.8	68.9* 78.8*
検体	500.0	94 ±13	79.5 52.0	20 6	73.0 23.2	11.4 10.8	98 ±20	132.4 93.8	2 3	41.7 43.3	2.0 2.9
	750.0	/	/	/	/	/	72 ±16	136.2 82.7	1 2	41.5 40.0	1.0 2.1
	1000.0	92 ±6	76.5 64.9	16 16	72.0 59.0	9.3 11.3	65 ±7	131.2 71.6	5 5	39.0 26.2	5.3 8.0
	1250.0	/	/	/	/	/	89 ±11	99.2 76.6	5 2	35.8 38.5	6.7 2.2
	1500.0	90 ±18	111.2 38.0	16 2	49.5 23.0	13.5 3.6	64 ±4	134.0 76.9	4 4	31.2 27.5	5.3 6.1
	1750.0	26 ±11	22.2 18.4	22 11	68.5 50.5	13.4 9.1	30 ±5	50.3 57.2	2 4	16.2 22.0	5.1 7.6
	2000.0	1 ±2	-	-	-	-	/	/	/	/	/

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8ペトリ皿のコロニーの合計 C: 細胞200個あたりのコロニー形成率
 - : 全細胞の消滅 / : 試験せず
 DMBA: ジメチルベンゾアントラセン
 統計学的処理: * p>0.05(Poisson 検定)

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

(毒性資料 No. 代謝物-15)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1989年9月27日

検体の純度：

供試生物： チャイニーズハムスターV79細胞

試験方法：

チャイニーズハムスターV79細胞に検体を以下に示す濃度で4時間暴露し、下記の通り、暴露開始から7時間（最高用量のみ）、18時間（低用量、中間用量、最高用量）及び28時間（最高用量のみ）後に染色体の標本を作成した。

S-9 mix 無添加	S-9 mix 添加
イ) 7時間：1.00mg/mL	イ) 7時間：1.00mg/mL
ロ) 18時間：0.10、0.30、1.00mg/mL	ロ) 18時間：0.10、0.30、1.00mg/mL
ハ) 28時間：1.00mg/mL	ハ) 28時間：1.00mg/mL

標本の作成

培養2日目の対数増殖期にあるV79細胞株をトリプシン処理し単細胞の懸濁液を調製した。

この細胞懸濁液を4区画に分割されたQuadriperm dishにMEM培地+10%FCS(10%胎仔牛血清)を入れ各区毎に $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ の細胞を標本作成時間にあわせて播種した。播種48時間後(イとハの場合)と55時間後(ロの場合)に、培地をS-9 mix添加(ラットにAroclor1254 500mg/kgを1回腹腔内投与後5日後のラット肝から調製)、無添加にかかわらず検体を含む血清フリーな培地と置き換え処理した。

48時間培養して処理開始7時間後標本作成の場合はその2時間前に、28時間後標本作成の場合はその2.5時間前にコルセミド(0.2 μ g/mL)を処理した。55時間培養して処理開始後18時間後標本作成の場合も2.5時間前にコルセミドを処理した。いずれの場合も検体処理時間は4時間としたので、処理が終わったら2回洗浄して、正常の培地に切り替えた。7時間、18時間、28時間の各標本作成時点で細胞を低張液(0.4%KCl)で37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベーションした後、細胞を無水メタノール+氷酢酸3+1で固定した。1群当たり全て4枚のスライドを作製し、固定後に細胞をギムザ液で染色した。

インキュベーションは全て4.5%CO₂の湿環境下で37 $^{\circ}$ Cで行った。

陽性対照は18時間後にのみ標本を同様に作成した。S-9 mix無添加の場合エチルメタンスルホネート0.72mg/mL、添加の場合シクロホスファミド1.4mg/mLを用いた。

投与量の決定

投与量は細胞毒性の為の予備試験を行い、S-9 mix の無添加で 1.00mg/mL を処理したときコロニー形成率が 60% に減少し、それ以上の濃度では培地中で沈殿を生じた事から決定した。

中期分裂細胞の検査

スライドの評価は陽性対照を除き、各実験群に 4 枚のスライドを用いた。光学顕微鏡を用いてスライド当たり 100 個の中期分裂像を調べ、切断、断片、欠失、交換、染色体崩壊を染色体の構造異常として検査した。

結果

1) 細胞分裂頻度

最初に細胞分裂頻度を 4 枚のスライドの細胞 (合計 1000 個) で測定したとき 1.00mg/mL の処理では S-9 mix の無添加の場合は 18 時間、S-9 mix 添加の場合は 7 及び 28 時間の調製時間で抑制を認めた。

2) 染色体異常頻度 (表 1、2、3)

検体は S-9 mix の存在下及び非存在下の両者において、どんな調製時間でも異常を示す細胞頻度に増加を認めなかった。検体処理後の細胞の異常割合は、0.75% ~ 1.75% であり対照値の 0.5~2.5% の範囲にあった。

陽性対照として使用したエチルメタンサルホネート (EMS: 0.72mg/mL) とシクロホスファミド (CPA: 1.40 μ g/mL) は染色体の構造異常を示す細胞が、明らかに増加した。

以上のことから、検体は、チャイニーズハムスターの V79 細胞系に染色体の構造異常を誘発しなかった。

表 1. 標本作成時間：投与開始後 7 時間

試験群	分析細胞数	濃度 mg/mL 当り	S-9 mix の有無	ギャップを含めた異常細胞率	ギャップを除く異常細胞率	交換を示す細胞率
溶媒対照	400	0	—	2.50	1.75	0.50
検体	400	1.0	—	2.50	1.75	0.25
溶媒対照	400	0	+	2.00	0.50	0.00
検体	400	1.0	+	3.50	0.75	0.75

表 2. 標本作成時間：投与開始後 18 時間

試験群	分析細胞数	濃度 mg/mL 当り	S-9 mix の有無	ギャップを含めた異常細胞率	ギャップを除く異常細胞率	交換を示す細胞率
陰性対照	400	0	—	2.75	1.50	0.75
溶媒対照	400	0	—	3.75	2.50	1.25
検体	400	0.10	—	3.25	1.50	0.50
検体	400	0.30	—	3.25	1.25	1.00
検体	400	1.00	—	4.00	1.75	0.25
陽性対照 EMS	200	0.72	—	10.50	10.00	7.50
陰性対照	400	0	+	3.00	1.00	0.50
溶媒対照	400	0	+	3.50	1.50	0.50
検体	400	0.10	+	1.50	0.75	0.25
検体	400	0.30	+	3.75	1.25	0.75
検体	400	1.00	+	4.25	0.75	0.25
陽性対照 CPA	200	1.40	+	14.00	11.50	2.00

表 3. 標本作成時間：投与開始後 28 時間

試験群	分析細胞数	濃度 mg/mL 当り	S-9 mix の有無	ギャップを含めた異常細胞率	ギャップを除く異常細胞率	交換を示す細胞率
溶媒対照	400	0	—	1.75	1.25	0.50
検体	400	1.0	—	2.25	1.50	0.00
溶媒対照	400	0	+	2.75	0.75	0.25
検体	400	1.0	+	1.50	1.00	0.00

のラット初代肝培養細胞を用いた in vitro

不定期 DNA 合成試験

(毒性資料No.代謝物-16)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1989 年 4 月 24 日

検体の純度：

試験方法：

新たに単離したラットの初代肝培養細胞を用い、検体を in vitro の条件で以下の用量で 18 時間曝露した。実験は独立して 3 回行なった。

実験 1： 0.04、0.13、0.44、1.33、4.44、13.33、44.44、133.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$

実験 2： 0.04、0.13、0.44、1.33、4.44、13.33、44.44、133.33、444.44、1333.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$

実験 3： 13.33、44.44、133.33、444.44、1333.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$

陽性対照として 2-アセチルアミノフルオレイン (2-AAF) の 11.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を用いた。

検体及び陽性対照はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

操作

新たに単離したラットの初代肝培養細胞を約 1.5 時間培養液中で培養し、単層固着細胞層を得た。この細胞層に検体とチミジン (^3H -TdR) 5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ を添加し、18 時間培養曝露した。曝露後、核内及び細胞質内の粒子数をオートラジオグラムで算定した。陰性対照及び陽性対照を含む各用量は 3 反復で試験した。対照区を含む各用量毎に 100 個の細胞を評価した。

観察及び結果：

1. 細胞毒性の評価（予備試験）

1. 33、4. 44、8. 89、13. 33、44. 44、88. 89、133. 33、444. 44、888. 89 及び 1333. 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で実施した。

その結果、1333. 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では検体の析出が観察された。またいずれの濃度においても細胞毒性は観察されなかった。

2. UDS の評価

3 回の実験において核内粒子数や核内補正粒子数に増加を示す結果が散見されたが、いずれも濃度相関性や再現性が見られず、従って、本試験法及び条件下において検体は用いた肝細胞に DNA 修復合成を誘発しなかった。一方、陽性対照物質（2-AAF）では核内粒子数や核内補正粒子数に再現性のある著明な増加が認められた。

従って、検体はラット初代肝培養細胞において、DNA 修復合成を誘発しなかったものと評価した。

実験 1 の結果

	核内粒子数	細胞質内粒子数	核内補正粒子数
対照群 (培養液)	30.59	29.95	0.64
溶媒対照群 (DMSO)	32.50	31.84	0.66
陽性対照群 (2-AAF)	65.83	20.68	45.15*
0.04 μ g/mL	42.49	33.17	9.32*
0.13	36.64	30.87	5.77*
0.44	25.40	26.11	-0.71
1.33	27.81	32.65	-4.84
4.44	22.33	17.97	4.38
13.33	21.11	21.91	-0.80
44.44	62.74	48.78	13.96*
133.33	29.28	22.13	7.15*

実験 2 の結果

	核内粒子数	細胞質内粒子数	核内補正粒子数
対照群 (培養液)	13.16	8.76	4.40
溶媒対照群 (DMSO)	22.56	18.15	4.41
陽性対照群 (2-AAF)	55.29	7.06	48.23*
0.04 μ g/mL	19.93	15.09	4.84
0.13	18.54	14.16	4.38
0.44	21.49	17.41	4.08
1.33	16.37	11.49	4.88
4.44	25.18	20.03	5.15*
13.33	20.33	13.63	6.70
44.44	12.37	6.95	5.42
133.33	17.17	10.80	6.37
444.44	17.38	10.15	7.27
1333.33	32.02	5.64	26.38*

実験 3 の結果

	核内粒子数	細胞質内粒子数	核内補正粒子数
対照群 (培養液)	20.10	23.37	-3.27
溶媒対照群 (DMSO)	11.48	12.40	-0.92
陽性対照群 (2-AAF)	93.11	19.13	73.98*
13.33 μ g/mL	14.12	15.92	-1.80
44.44	15.83	16.44	-0.61
133.33	13.43	11.48	1.95
444.44	9.69	10.01	-0.32
1333.33	9.82	9.81	0.01

溶媒対照に対する有意差*: $P>0.05$ (Mann-Whitney)

のマウスを用いた小核試験

(毒性資料 No. 代謝物-17)

試験機関：

[非 GLP]

報告書作成年月日： 1988 年 9 月 29 日

検体純度 : —

供試動物 : BDF₁系雄マウス、(試験開始時：9 週齢) 1 群 5 匹

投与方法：

検体をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解後、ポリエチレングリコール 400 に溶解し、0、40、80 および 160mg/kg の投与レベルで経口単回投与した。陽性対照物質マイトマイシン C (4mg/kg) は滅菌生理食塩水に溶解し、腹腔内投与した。陰性対照には DMSO・ポリエチレングリコール 400 を経口的に投与した。また、無処理対照群 1 群を設けた。投与用量はいずれの場合も 10mL/kg 体重とした。

動物は投与後 30 時間で屠殺した。各動物の大腿骨から骨髓を採取し、検査用の塗抹標本作製した。標本をギムザ染色後、光学顕微鏡を用いて評価した。各動物につき 500 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計測した。同時に正染性赤血球数、多染性赤血球数も計測した。

試験結果：

骨髓標本の観察結果を表に示した。

投与によって正染性赤芽球の多染性赤芽球に対する割合は影響を受けなかった。

小核を有する正染性赤芽球あるいは多染性赤血球の発現頻度に関して、陰性対照群と検体投与群の間に生物学的に重要あるいは統計学的に有意な差違は認められなかった。

陽性対照であるマイトマイシンCは、小核を有する多染性赤血球数を陰性対照群に比べ著明に増加させた。

投与群	評価した多染性赤血球総数	100個の正染性赤血球数あたりの多染性赤血球	小核を有する細胞数 1000個の多染性赤血球あたり
陰性対照 DMSO/PEG	2624	49.0±8.7	4.5±3.1
無処理対照	2104	35.7±17.7	7.2±4.1
検体 40mg/kg	2569	42.2±10.8	6.7±4.4
検体 80mg/kg	2575	42.1±3.9	2.3±1.6
検体 160mg/kg	2089	43.7±12.4	6.7±5.0
陽性対照 マイトマイシンC	2668	35.7±17.7	47.7±17.6

平均値±SD

以上の結果から本試験条件下において、検体は骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

のマウスを用いた経口投与による小核試験

(毒性資料 No. 原体-18)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1989年10月3日

検体の純度 :

試験動物 : NMRI系マウス雌雄、1群雌雄各5匹
(試験開始時8~12週齢、体重28~40g)

試験期間 : 1987年7月

試験方法 :

検体を0.5%クレモホア溶液で懸濁し、1群雌雄各5匹のマウスに対して100mg/kgを1回経口投与し、24、48及び72時間後に屠殺し、大腿骨の骨髄を摘出した。陰性対照は懸濁液のみを、陽性対照はシクロホスファミド(CYCL)20mg/kgを検体と同様に経口投与し24時間後に屠殺し、大腿骨の骨髄を摘出した。投与容量は、各群ともに10mL/kgとした。

検査用の標本はSchmidの方法により作製し、光顕下で各種の赤血球数を算定した。

試験結果 :

1) 一般症状

100mg/kgを経口的に1回投与した時、動物は2時間後までに、無感覚、よろめき歩行、呼吸困難を示したが、その後は正常に回復し死亡例はなかった。

2) 突然変異誘発性 (表1)

雌雄間に差は認められなかったので雌雄の結果をまとめて評価した。表に示すように、48時間後の検査において、検体投与群と陰性対照群との間で、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に統計学的な有意差が認められた。しかしながら、この有意差は48時間後の検査における小核の多染性赤血球の明らかな増加というよりも、陰性対照群のその細胞割合が相対的に低いことによるものと考えられた。対照群の背景成績をみると、小核を有する多染性赤血球の頻度は、0.8/1000~2.4/1000との開きがある。従って、48時間後の検査の2/1000の結果は生物学的

に意味のある変化とはみなさなかつた。

陽性対照薬剤のシクロホスファミドの作用は、小核を有する多染性赤血球の著明な増加（頻度は 16.1/1000）を示すことによって確認された。小核を有する正染性赤血球は投与群と陽性対照群とも有意な増加を認めなかつた。

3) 赤血球産生能（表 1）

赤血球産生能の指標としての多染性赤血球の正染性赤血球に対する比率について、投与群と陽性対照群とも有意な増加は認められなかつた。

以上の結果から、本検体には突然変異誘発作用も赤血球産生抑制作用もないものと判断された。

表 1. 小核試験結果

試験群 (mg/kg)	算定した 多染性 赤血球総数	1000 個の 多染性赤血球 あたりの 正染性赤血球数	小核を有する細胞数	
			1000 個の 正染性赤血球 あたり	1000 個の 多染性赤血球 あたり
陰性対照	10000	1023±496	0.9±1.0	0.7±0.9
検体 24 時間屠殺	10000	1142±571	0.7±0.9	1.2±1.0
検体 48 時間屠殺	10000	888±199	1.2±1.2	2.0**±0.9
検体 72 時間屠殺	10000	1355±902	0.8±1.1	1.4±1.4
陽性対照 シクロホスファミド 20mg/kg	10000	1034±675	1.2±1.3	16.1**±7.9

** : Wilcoxon の順位和検定で有意差 (p<0.01) あり。

のマウスを用いた小核試験

(毒性資料 No. 代謝物-19)

試験機関： .

[非 GLP]

報告書作成年月日： 1988年 9月 29日

検体純度 : -
供試動物 : BDF₁系雄マウス、(試験開始時：8週齢) 1群5匹
試験期間 : 1988年8月～9月

投与方法：

検体をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解後、オリーブ油を加えた(DMSO;10%)。検体の0、20、40および80mg/kgの投与レベルで腹腔内投与した。陽性対照物質マイトマイシンC(4mg/kg)は滅菌生理食塩水に溶解し、腹腔内投与した。陰性対照には10%DMSOオリーブ油溶液を腹腔内投与した。また、無処理対照群1群を設けた。投与用量はいずれの場合も10mL/kg体重とした。

動物は投与後30時間で屠殺した。各動物の大腿骨から骨髓を採取し、検査用の塗抹標本作製した。標本をギムザ染色後、光学顕微鏡を用いて評価した。各動物につき500個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計測した。同時に正染性赤血球数、多染性赤血球数も計測した。

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

試験結果：

骨髓標本の観察結果を表に示した。

投与によって正染性赤芽球の多染性赤芽球に対する割合は影響を受けなかった。

小核を有する正染性赤芽球あるいは多染性赤血球の発現頻度に関して、陰性対照群と検体投与群の間に生物学的に重要あるいは統計学的に有意な差違は認められなかった。

陽性対照であるマイトマイシンCは、小核を有する多染性赤血球数を陰性対照群に比べ著明に増加させた。

投与群	評価した多染性赤血球総数	100個の正染性赤血球数あたりの多染性赤血球	小核を有する細胞数 1000個の多染性赤血球あたり
陰性対照 DMSO/PEG	2569	43.1±21.6	5.5±2.2
無処理対照	2104	35.7±17.7	7.2±4.1
検体 20mg/kg	2620	46.2±15.0	6.1±3.0
検体 40mg/kg	2568	42.9±11.0	4.3±3.7
検体 80mg/kg	2604	52.3±4.3	5.0±1.1
陽性対照 マイトマイシンC	2781	35.9±27.7	44.1±22.2

平均値±SD

以上の結果から本試験条件下において、検体は骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

のマウスを用いた腹腔内投与による小核試験
(毒性資料 No. 原体-20)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 1989 年 10 月 3 日

検体純度 :

供試動物 : NMRI 系マウス、(試験開始時: 8~12 週齢、体重: 31~41g) 1 群雌雄各 5 匹

試験期間 : 1989 年 6 月

試験方法 :

検体を 0.5%クレモホア水溶液に懸濁し、0 および 50mg/kg の投与レベルで腹腔内に投与した。陽性対照物質シクロホスファミド (20mg/kg) は脱イオン水に溶解し、同一の方法で投与した。陰性対照には 0.5% Cremophor 水溶液を同一の方法で投与した。投与用量はいずれの場合も 10mL/kg 体重とした。

陰性対照群と陽性対照群の動物は投与後 24 時間で屠殺した。一方、検体投与群の動物は投与後 24、48、72 時間に屠殺した。各動物の大腿骨から骨髓を採取して Schmid の方法を用いて検査用の塗抹標本作製した。標本を染色後、光学顕微鏡を用いて評価した。各動物につき 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測した。同時に正染性赤血球数も計測した。

試験結果：

1) 一般症状

検体の 50mg/kg 投与によって投与後 2 時間までに無関心、よろめき歩行、呼吸困難のような検体に関連した症状が認められた。その後は動物の外観や行動に異常は認められなかった。また、摂餌行動は正常であった。死亡は認められなかった。

2) 突然変異誘発性

骨髓標本の観察結果を表に示した。

雌雄間に差は認められなかったので雌雄の結果をまとめて評価した。

投与によって正染色赤芽球の多染色赤芽球に対する割合がわずかに変動した(統計学的有意差なし)。

小核を有する正染色赤芽球あるいは多染色赤血球の発現頻度に関して、陰性対照群と検体腹腔内投与群の間に生物学的に重要あるいは統計学的に有意な差違は認められなかった。

陽性対照であるシクロホスファミドは、小核を有する多染色赤血球数を溶媒対照群に比べ統計学的に有意に増加させた。

投与群	評価した多染色赤血球総数	1000 個の多染色赤血球あたりの正染色赤血球数	小核を有する細胞数	
			1000 個の正染色赤血球あたり	1000 個の多染色赤血球あたり
陰性対照 0.5%クレモリン水溶液	10000	574±146	1.1±1.3	1.6±1.2
検体 50mg/kg、24 時間	10000	601±238	1.0±1.1	1.5±1.3
検体 50mg/kg、48 時間	10000	854±507	0.6±0.9	0.9±1.0
検体 50mg/kg、72 時間	10000	578±244	0.4±0.9	1.2±1.1
陽性対照 シクロホスファミド	10000	826*±263	1.3±1.5	19.5**±7.8

Wilcoxon の順位和検定で有意差あり (*p<0.05、**p<0.01)

以上の結果から本試験条件下において、検体は骨髓多染色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る。

の細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 No. 代謝物-21)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1991年5月2日

検体の純度：

試験期間： 1991年3月～4月

投与方法 (プレインキュベーション法)：

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) の4株及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の1株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の非存在下及び存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。使用溶媒として、検体、蒸留水で調製した NaN_3 ²⁾ を除いた陽性対照また陰性対照ではジメチルスルホキシド (DMSO) (陽性対照の NaN_3 は蒸留水) を用いた。

S-9 mix 存在下、非存在下共に、5000～312.5 μg /プレートの範囲でそれぞれ5濃度を実施した。試験は3反復とし、再現性を見るために2回行った。

復帰変異コロニー数が2倍以上で用量相関性を示した場合を変異原性陽性と判定した。

結果及び考察 (表1、2)：

次表に結果を示したが、2回の試験共代謝活性化の有無にかかわらず、最高用量において生育阻害が認められたが、溶媒対照の復帰変異コロニー数の2倍以上で用量相関性のある増加はどの菌株においても認められなかった。

一方、2回の試験共、陽性対照として用いた AF-2¹⁾、 NaN_3 ²⁾、9-AA³⁾ では溶媒対照と比較して著名な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁴⁾ は S-9 mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

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

- 1) : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide,
- 2) : Sodium azide
- 3) : 9-Amino-acridine,
- 4) : 2-Aminoanthracene

表 1. 復帰変異試験成績 (第 1 回目) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)		—	105	6	14	28	4	
検体	312.5	—	80	8	14	29	4	
	625	—	98	7	16	29	4	
	1250	—	88	5	12	34	5	
	2500	—	93	6	10	31	6	
	5000	—	82	7	12	27	3	
対照 (DMSO)		+	89	6	12	42	10	
検体	312.5	+	105	10	12	47	6	
	625	+	95	7	11	41	7	
	1250	+	89	7	10	40	7	
	2500	+	100	8	13	42	7	
	5000	+	86	8	13	40	5	
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	319				
	NaN ₃ ²⁾	0.5	—		179			
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			369		
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				433	
	9-AA ³⁾	80	—					3261
	2-AA ⁴⁾	1	+	910				
	2-AA ⁴⁾	2	+		228			82
	2-AA ⁴⁾	20	+			339		
2-AA ⁴⁾	0.5	+				288		

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): Sodium azide

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene

表 2. 復帰変異試験成績 (第 2 回目)

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)		—	88	5	11	24	5	
検体	312.5	—	100	5	14	21	5	
	625	—	91	5	14	20	4	
	1250	—	92	7	15	26	4	
	2500	—	103	4	11	22	4	
	5000	—	98	5	11	23	6	
対照 (DMSO)		+	98	8	15	24	9	
検体	312.5	+	99	8	11	32	8	
	625	+	92	7	16	29	9	
	1250	+	87	7	12	33	9	
	2500	+	96	6	11	31	6	
	5000	+	87	5	18	29	8	
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	326				
	NaN ₃ ²⁾	0.5	—		143			
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			357		
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				419	
	9-AA ³⁾	80	—					2752
	2-AA ⁴⁾	1	+	694				
	2-AA ⁴⁾	2	+		216			65
	2-AA ⁴⁾	20	+			373		
2-AA ⁴⁾	0.5	+				196		

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): Sodium azide

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene

の細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 No. 代謝物-22)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1991年3月29日

検体の純度：

試験期間： 1991年1月～2月

投与方法 (プレインキュベーション法)：

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) の4株及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の1株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の非存在下及び存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。使用溶媒として、検体、蒸留水で調製した NaN_3 ²⁾ を除いた陽性対照また陰性対照ではジメチルスルホキシド (DMSO) (陽性対照の NaN_3 は蒸留水) を用いた。

試験は3反復とし、再現性を見るために2回行った。

S-9 mix 存在下では1回目は5000～312.5 μg /プレートの範囲で、2回目は1回目の試験で5000 μg /プレートで生育阻害が認められたため、2500～156.3 μg /プレートの範囲で、S-9 mix 非存在下では2回の試験とも5000～312.5 μg /プレートの範囲でそれぞれ5濃度を実施した。

復帰変異コロニー数が2倍以上で用量相関性を示した場合を変異原性陽性と判定した。

結果及び考察 (表1、2)：

次表に結果を示したが、2回の試験共代謝活性化の有無にかかわらず、最高用量において生育阻害が認められたが、溶媒対照の復帰変異コロニー数の2倍以上で用量相関性のある増加はどの菌株においても認められなかった。

一方、2回の試験共、陽性対照として用いた AF-2¹⁾、 NaN_3 ²⁾、9-AA³⁾ では溶媒対照と比較して著大な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁴⁾ は S-9 mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

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

1) : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 2) : Sodium azide

3) : 9-Amino-acridine, 4) : 2-Aminoanthracene

表 1. 復帰変異試験成績 (第 1 回目) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
対照(DMSO)		—	118	5	10	29	5	
検体	312.5	—	130	6	9	32	7	
	625	—	127	7	11	32	6	
	1250	—	138	5	14	29	7	
	2500	—	109	7	8	26	5	
	5000	—	124	6	13	33	9	
対照(DMSO)		+	106	9	13	41	8	
検体	312.5	+	116	8	14	41	11	
	625	+	104	9	14	25	13	
	1250	+	106	8	13	35	9	
	2500	+	106	11	14	42	14	
	5000	+	K	K	K	K	K	
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	339				
	NaN ₃ ²⁾	0.5	—		125			
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			301		
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				365	
	9-AA ³⁾	80	—					3639
	2-AA ⁴⁾	1	+	790				
	2-AA ⁴⁾	2	+		182			113
	2-AA ⁴⁾	20	+			569		
2-AA ⁴⁾	0.5	+				292		

K : 生育阻害

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): Sodium azide

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene

表 2. 復帰変異試験成績 (第 2 回目) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	117	8	12	37	9
検体	312.5	—	136	14	7	27	5
	625	—	121	6	10	28	4
	1250	—	130	6	11	33	6
	2500	—	122	7	8	28	5
	5000	—	119	8	8	33	8
対照 (DMSO)		+	132	10	18	33	9
検体	156.3	+	117	8	9	30	8
	312.5	+	120	6	11	33	6
	625	+	115	7	17	32	7
	1250	+	115	10	12	30	8
	2500	+	120	6	10	31	10
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	277			
	NaN ₃ ²⁾	0.5	—		78		
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			317	
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				299
	9-AA ³⁾	80	—				2149
	2-AA ⁴⁾	1	+	618			
	2-AA ⁴⁾	2	+		124		84
	2-AA ⁴⁾	20	+			459	
2-AA ⁴⁾	0.5	+				182	

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): Sodium azide

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene

の細菌を用いた復帰突然変異試験
(毒性資料 No. 代謝物-23)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1991年 11月 19日

検体の純度：

試験期間： 1991年 10月

投与方法 (プレインキュベーション法)：

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) の 4 株及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の 1 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の非存在下及び存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。使用溶媒として、検体、蒸留水で調製した $\text{NaN}_3^{2)}$ を除いた陽性対照また陰性対照ではジメチルスルホキシド (DMSO) (陽性対照の NaN_3 は蒸留水) を用いた。

S-9 mix 存在下、非存在下共にでは 5000~312.5 μg /プレートの範囲で 5 濃度を実施した。試験は 3 反復とし、再現性を見るために 2 回行った。

復帰変異コロニー数が 2 倍以上で用量相関性を示した場合を変異原性陽性と判定した。

結果及び考察 (表 1、2)：

次表に結果を示したが、2 回の試験共代謝活性化の有無にかかわらず、最高用量において生育阻害が認められたが、溶媒対照の復帰変異コロニー数の 2 倍以上で用量相関性のある増加はどの菌株においても認められなかった。

一方、2 回の試験共、陽性対照として用いた AF-2¹⁾、 $\text{NaN}_3^{2)}$ 、9-AA³⁾ では溶媒対照と比較して著名な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁴⁾ は S-9 mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

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

1) : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 2) : Sodium azide
3) : 9-Amino-acridine, 4) : 2-Aminoanthracene

表 1. 復帰変異試験成績 (第 1 回目) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)		—	144	7	13	35	6	
検体	312.5	—	126	12	15	32	7	
	625	—	144	11	14	35	7	
	1250	—	152	8	11	34	6	
	2500	—	130	8	12	36	7	
	5000	—	137	9	12	38	6	
対照 (DMSO)		+	129	10	20	41	9	
検体	312.5	+	120	8	22	43	12	
	625	+	127	8	30	44	9	
	1250	+	114	7	22	43	9	
	2500	+	119	9	18	40	8	
	5000	+	118	7	16	40	8	
陽性 対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	418				
	NaN ₃ ²⁾	0.5	—		136			
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			355		
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				505	
	9-AA ³⁾	80	—					1735
	2-AA ⁴⁾	1	+	634				
	2-AA ⁴⁾	2	+		167			99
	2-AA ⁴⁾	20	+			427		
2-AA ⁴⁾	0.5	+				240		

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): Sodium azide

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene

表 2. 復帰変異試験成績 (第 2 回目) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)		—	136	5	16	31	4	
検体	312.5	—	157	4	13	32	5	
	625	—	159	6	16	33	4	
	1250	—	138	6	15	31	5	
	2500	—	121	5	15	33	4	
	5000	—	152	5	15	31	5	
対照 (DMSO)		+	126	6	28	35	10	
検体	312.5	+	113	6	25	39	9	
	625	+	111	6	25	36	10	
	1250	+	120	6	17	38	9	
	2500	+	125	7	16	40	8	
	5000	+	119	6	18	41	7	
陽性対照	AF-2 ¹⁾	0.01	—	428				
	NaN ₃ ²⁾	0.5	—		86			
	AF-2 ¹⁾	0.04	—			374		
	AF-2 ¹⁾	0.1	—				435	
	9-AA ³⁾	80	—					1319
	2-AA ⁴⁾	1	+	544				
	2-AA ⁴⁾	2	+		143			92
	2-AA ⁴⁾	20	+			466		
2-AA ⁴⁾	0.5	+				241		

1): 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2): Sodium azide

3): 9-Aminoacridine

4): 2-Aminoanthracene