

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1-6 繁殖性に及ぼす影響および催奇形性

1) ラットにおける繁殖毒性試験

(資料 28)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1994 年

検体純度:

試験動物: ウィスター系 Chbb:THOM ラット、1 群雌雄各 25 匹、投与開始時 5 週齢

投与期間: F₀ 世代: F₀ 親動物への投与開始から F_{1b} 児離乳時までの 32 週間

F₁ 世代: F₁ 児離乳時から F₂ 児離乳時までの 26 週間

(1992 年 9 月 28 日~1993 年 8 月 11 日)

投与方法: 検体を飼料に直接 0、50、1000、4000 および 16000 ppm の濃度で混合した飼料を自由に摂取させた。飼料の調製頻度は安定性の保証されている期間 (32 日) を超えない間隔とした。

投与量設定根拠:

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

交配・調整・選抜および観察・検査項目：概要を次頁にまとめた。

表 1 試験の概要

世代	期間	作業手順	観察/検査項目
F0	生育(10週)		一般状態・生死：毎日観察。 体重：週1回測定。 摂餌量：週1回測定。 交配状況の観察。
	1回目交配(3週間) 妊娠(3週間)	雌雄1:1で交配。交配は膣垢検査で精子の有無で確認(妊娠0日)。	体重：妊娠0, 7, 14, 20日に測定。 摂餌量：週1回測定。 出産状況の観察。
F1a	出産	(哺育1日)	新生児数、死産児数、外表異常、性別、同腹生存児体重測定。
	哺育(3週間)	哺育4日に1腹の同腹児数を雄4匹、雌4匹に調整(不可能なとき、合計8匹)。	母動物：体重：出産後1, 4, 7, 14, 21日に測定。 摂餌量：出産後1, 4, 7, 14日に測定。 児動物： 生存児数・体重：生後1, 4, 7, 14, 21日に測定 外表/内臓異常検査：死亡児、生後4日目屠殺の新生児、哺育時死亡児。 機能/発育検査：生後4日—耳介展開 生後13日前後—外耳道開通、握り反射 生後15日—眼瞼開裂 生後20日前後—瞳孔反射 生後21日前後—聴覚反応
	F1a 離乳	継代用の各群雌雄各25匹を各腹からできる限り1匹ずつ無作為に離乳前に選抜。	
F1	休息(2週間) 2回目交配(3週間) 妊娠(3週間)	(1回目交配に準ずる) (1回目交配に準ずる)	(1回目交配に準ずる) (1回目交配に準ずる) (1回目交配に準ずる)
	出産	(哺育1日)	
	哺育(3週間)	(1回目交配に準ずる)	(1回目交配に準ずる)
	F1b 離乳	離乳児屠殺 親動物：採血(各群12匹) 不妊動物の再交配：不妊雌/雄は対照群の交尾能確認雄/雌と交配。再交配で妊娠確認雌は出産前に、不妊雌は交配終了約10日後に屠殺。 親動物：屠殺(妊性評価後)。	外表/内臓異常検査、異常があれば骨格検査 (F1a 離乳児に準ずる) 血液生化学的検査 剖検後、雌の子宮の検査 親動物の剖検、臓器重量測定(肝臓、腎臓、精巢上体、精巢)および病理組織学的検査(生殖器官を中心)。 (P世代に準ずる) (P世代に準ずる) (P世代に準ずる)
F2	生育(14週) 交配(3週間) 妊娠(3週間)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる) (P世代に準ずる) (P世代に準ずる)
	出産		(P世代に準ずる)
	哺育(3週間)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
F2	離乳	児動物：離乳時に屠殺 親動物の採血(各群12匹) 不妊動物の再交配 親動物：屠殺(妊性評価後)	(F1世代に準ずる) (F1a 離乳児に準ずる) (P世代に準ずる) (P世代に準ずる) (P世代に準ずる)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

親動物

一般状態および死亡率：全投与期間を通して全動物の一般状態および生死を毎日観察した。

体重：交配前投与期間中および交配期間中、毎週体重を測定した。交配雌は妊娠 0、7、14、20 および哺育 1、4、7、14、21 日に体重を測定した。

摂餌量：交配前投与期間中は週 1 回摂餌量を測定した。妊娠雌は妊娠 0-7、7-14 および 14-20 日ならびに哺育 1-4、4-7 および 7-14 日に測定した。

検体摂取量：生育期間、妊娠期間および哺育期間中の体重、摂餌量および飼料中の設定検体濃度から検体摂取量 (mg/kg/日) を算出した。

交配および妊娠の確認：交配は 3 週間を限度として、雌雄 1:1 で同居させ、翌日、精子により交尾を確認し、確認日を妊娠 0 日とした。妊娠は出産および子宮内の着床痕の有無によって確認した。2 産 (F1a および F1b) を得たが、F1a を次世代とした。

不妊動物の再交配：F1b の離乳後、不妊雌/雄は対照群の交尾能確認雌/雄と交配。再交配で妊娠確認雌は出産前に、不妊雌は交配終了約 10 日後に屠殺し、子宮の検査を行った。

繁殖性に関する指標：交配、妊娠および哺育期間と剖検時の観察に基づき、以下の指標を算出した。

雄交尾率 = (交尾した雄数/交配に用いた雄数) × 100

雌交尾率 = (交尾した雌数/交配に用いた雌数) × 100

雄授精率 = (妊娠させた雄数/交配に用いた雄数) × 100

妊娠率 = (妊娠した動物数/交尾した動物数) × 100

出産率 = (出産日に生存児を有する雌数/妊娠した雌数) × 100

妊娠期間 = 交配日 (妊娠 0 日) から出産日 (哺育 1 日) までの期間を日数で表した。

血液生化学的検査：F_{1b} および F₂ 児動物の離乳 1 ~ 3 週間内に酵素活性 (ALT、AIP、AST、GGT) について検査した。

臓器重量：肝臓、腎臓、精巣上体、精巣の重量を測定した。

肉眼的病理検査：すべての F₀ および F₁ 親動物について児の離乳後、さらに不妊動物は再交配検査後に剖検を行なった。

病理組織学的検査：対照群と 16000 ppm 群の F₀ および F₁ 親動物について、生殖器官 (雄の精巣、精巣上体、精囊、凝固腺および前立腺、雌の卵巣、頸部を含む子宮、膈、卵巣および卵管) および下垂体並びに肉眼的異常部位の病理標本を作製し、鏡検した。再交配を行った動物も同様に鏡検した。更に、肝臓、腎臓および肉眼的異常部位は各群の全動物について鏡検した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

児動物

一般状態および死亡率：全動物の全検査期間に一般状態および生死を毎日観察した。

出産時に新生児数、生存児数、死産児数を調べた。

生存児に関し、以下の指標を算出した。

出生時生存児率(%) = 生存児数/総新生児数 x100

哺育4日生存率(%) = 哺育4日の生存児数/出産時の生存児数 x100

離乳率(%) = 哺育21日の生存児数/哺育4日の調整後児数 x100

性比 = 雄または雌の児数/総児数 x100

体重： 生後 1、4(調整前および後)、7、14 および 21 日に個体別に測定し、腹および児当たりの平均体重を求めた。

機能/発育検査：以下の指標について検査した。

耳介展開(生後4日)、外耳道開通(生後13日)、眼瞼開裂(生後15日)、握り反射(生後13±1日)、瞳孔反射(生後20±1日)、聴覚反応(生後21±1日)

病理学的検査：死亡および屠殺したすべての児動物について剖検を行なった。顕著な異常を有する動物は骨格検査も行なった。

試験結果：

親動物：試験結果を「表2」にまとめた。

体重の変化：16000 ppm 群の F₀ および F₁ 世代雌雄の生育期並びに妊娠から哺育時(哺育時の体重増加を除き)とも統計学的に有意な体重の抑制がみられ、16000 ppm 群では極わずかな摂餌量の低下を伴っていた。4000 ppm 群でも同様の傾向にあったが、影響の程度は16000 ppm 群より若干軽度であった。

摂餌量：16000 ppm 群 F₀ 世代において、摂餌量は雌雄で生育期の初期に有意な低下が散見され、第1産の妊娠時では妊娠0~14日、哺育時では哺育4~14日に有意な低下が認められたが、平均摂餌量には有意差は認められなかった。第2産ではいずれの時期でも有意差は認められなかった。しかし、いずれも対照群に比し数%のわずかな低下であった。F₁ 親世代でもほぼ同様の傾向であった。これらの変化は有意ではないが検体の投与に起因するものと考えられる。

4000 および 1000 ppm 群の雌では生育期の初期に摂餌量の有意な低下が散見されたのみで、用量との明らかな関連もないので、これらの低下は偶発的と考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

繁殖能：平均交尾までの日数、交尾率、妊娠/受精率、出産率、妊娠期間に投与の影響はいずれの投与群とも認められなかった。

血液生化学的検査：酵素活性のみ検査したが、GGT が 4000 ppm 以上の雌雄で増加ないし増加傾向にあった。AIP は 1000 ppm 以上の群で F_0 および F_1 世代の雌雄とも、ALT は 16000 ppm 群の両世代の雌雄とも、4000 ppm 群では F_0 世代の雄および F_1 世代の雌雄、1000 ppm 群は F_0 世代の雄で有意な低下がみられた。しかし、AIP および ALT は低下であることから毒性学的意義はないと判断される。

臓器重量： F_0 世代において、16000 ppm 群で肝臓(雌雄)、腎臓(雌雄)、精巣および精巣上体、4000 ppm 群で肝臓(雄)および腎臓(雌)の対体重比の増加がみられたが、いずれも最終体重の低下に基づく計算上の増加であると考えられる。また、1000 ppm 群で腎臓(雄)の対体重比の増加も有意に増加したが、用量関連性もなく、組織学的にも変化がないことから毒性学的に意義はないものと考えられる。

F_1 世代において、16000 および 4000 ppm 群の雌の腎臓の絶対重量が有意に低下した。これは検体投与に関連すると考えられる。16000 および 4000 ppm 群の雄で腎臓、精巣および精巣上体の対体重比の増加ないし増加傾向がみられたが、いずれも最終体重の低下に基づく計算上の増加であると考えられる。

肉眼的病理所見：いずれの群とも検体投与に起因する異常は認められなかった。

病理組織学的所見：肝臓の瀰漫性脂肪浸潤が雄において多く発生したが、16000 および 4000 ppm 群における発生率は対照群より少なかった。

児動物

検体投与の影響は体重あるいは体重増加に認められた。生後 1 日の児体重に有意な差は認められなかったが、生後 4 ないし 7 日目頃から体重あるいは体重増加の有意な抑制が 16000 および 4000 ppm 群の雌雄で認められ、これに伴うと考えられる耳介展開の遅延がみられた。4000 ppm 群雄(第 2 産)の眼瞼開裂の遅延は偶発的と考えられる。

その他に(産児数、出生時生存児数、生存率、性比、一般状態、剖検所見等)に両世代とも対照群との差はいずれの群とも認められなかった。

以上の結果から、2 世代にわたって本剤を飼料中に混入して投与した場合の毒性影響として、16000 ppm 群で雌雄親動物に摂餌量のわずかな低下を伴い体重および体重増加の抑制が認められた。GGT の有意な増加、腎臓重量の減少が認められた。4000 ppm 群でも程度は若干軽減しているが同様の所見が認められた。繁殖能に対してはいずれの群においても影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

肝臓の脂肪浸潤の減少が 4000 ppm 以上の群で認められたが、毒性影響であるかは明確でなかった。

児動物に対しては、4000 ppm 以上の群で、児体重の抑制が認められた。

従って、無毒性量は親および児動物に対し 1000 ppm (F₀ 世代：雄 102.6 mg/kg/日、雌 108.7 mg/kg/日；F₁ 世代：雄 88.3 mg/kg/日、雌 100.8 mg/kg/日) であると判断された。繁殖能力に対する影響は最高用量の 16000 ppm でも影響は認められなかった。

表 2. 親動物の試験結果

世代		親: F ₀ , 児: F ₁					親: F ₁ , 児 F ₂					
投与量 (ppm)		対照群	50	1000	4000	16000	対照群	50	1000	4000	16000	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
死亡/切迫殺数	雄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	雌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
交尾雌数	a/b	25/25	25/25	25/25	25/25	25/25	25	25	25	25	25	
妊娠雌数	a/b	25/25	23/24	25/25	22/23	24/24	24	22	24	25	23	
出産雌数		25/25	23/24	25/25	22/23	24/24	25	25	25	25	25	
出産1日に生存児を有する雌数 (a/b)		25/25	23/24	25/25	22/23	24/24	24	22	24	25	23	
離乳時に生存児を有する雌数 (a/b)		25/25	23/24	25/25	22/23	24/24	24	22	24	25	23	
一般状態	雄 雌	検体投与に起因する異常は認められなかった。										
体重%	雄生育期 ^(注)	10週			94↓	91↓				94↓	90↓	
		29/22週			94	92↓				93↓	90↓	
	雌生育期 ^(注)	10/14週			92↓	92↓				94↓	91↓	
	妊娠0日	a			93↓	93↓				93↓	92↓	
		b			94↓	92↓	-	-	-	-	-	
	妊娠20日	a			95	94↓				96	91↓	
		b			96	93↓	-	-	-	-	-	
	哺育1日	a								92↓	90↓	
b				94↓	92↓	-	-	-	-	-		
哺育21日	a			97	94↓				97	89		
	b				95	-	-	-	-	-		
体重増加%	雄生育期 ^(注) (0-29/22週)				92	89↓				93↓	91↓	
	雌生育期 ^(注) (0-10/14週)				90↓	90↓				93	93	
	妊娠0-20日	a				97				3	89	
		b				96	-	-	-	-	-	
	哺育1-21日	a			132	133				420↑	440↑	
		b			150	162↑	-	-	-	-	-	
摂餌量	雄生育期				99	97					95	
	雌生育期				96	96					97	
	妊娠0-20日 (a/b)					95/96					93	
	哺育1-14日 (a/b)					95/97					95	
検体採取量 (mg/kg)	雄生育期		-	5.1	102.6	411	1623.1	-	4.4	88.3	362.7	1481.6
	雌生育期		-	5.6	108.7	437.2	1741.1	-	5.0	100.8	416.6	1652.6
	妊娠時	a		4.6	91.7	383.8	1482.5		4.1	84.5	351.1	1349.1
		b		4.3	84.8	348.9	1389.3	-	-	-	-	-
	哺育時	a		8.3	162	661.8	2610.5		6.8	136.4	564.4	2278.8
		b		7.1	14.32	587.2	2409	-	-	-	-	-

注: a, b: aは第1産、bは第2産。

生育期の体重: 雄の29/22週はF₀が29週、F₁が22週。雌の10/14週はF₀が10週、F₁が14週。

生育期の体重増加: 雄の0-29/22週はF₀が0-29週、F₁が0-22週。雌の0-10/14週はF₀が0-10週、F₁が0-14週。

統計学的方法: 、摂餌量: Dunnett-t検定(両側)↓↓; p ≤ 0.05, ↑↑; p ≤ 0.01 矢印のない数値は有意差なし。

体重、体重増加量は変動の目安として対照群に対する比率%を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 2. 親動物の試験結果(続き)

世代		親 : F ₀ 児 : F ₁					親 : F ₁ 児 F ₂					
投与量 (ppm)		対照群	50	1000	4000	16000	対照群	50	1000	4000	16000	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
繁殖能	平均交尾までの日数	a	2.6	2.2	2.2	2.2	2.8	2.3	2.6	2.7	2.3	2.6
		b	2.9	3.0	2.4	1.9	2.7	-	-	-	-	-
	交尾率 (%)	a	25 (100)	25 (100)	25 (100)	25 (100)	25 (100)	25 (100)	25 (100)	25 (100)	25 (100)	25 (100)
		b	25 (100)	25 (100)	25 (100)	25 (100)	25 (100)	-	-	-	-	-
	妊娠率 (%)	a	25 (100)	23 (92)	25 (100)	22 (88)	24 (96)	24 (96)	22 (88)	24 (96)	25 (100)	23 (92)
		b	25 (100)	24 (96)	25 (100)	23 (92)	24 (96)	-	-	-	-	-
	授精率 (%)	a	25 (100)	23 (92)	25 (100)	22 (88)	24 (96)	24 (96)	22 (88)	24 (96)	25 (100)	23 (92)
		b	25 (100)	24 (96)	25 (100)	23 (92)	24 (96)	-	-	-	-	-
	出産率 (%)	a	25 (100)	23 (100)	25 (100)	22 (100)	24 (100)	24 (100)	22 (100)	24 (100)	25 (100)	23 (100)
		b	25 (100)	24 (100)	25 (100)	23 (100)	24 (100)	-	-	-	-	-
	妊娠期間 (日)	a	22.0	22.0	21.9	21.9	21.8	22.1	22.2	22.2	22.0	22.0
		b	22.0	21.8	21.8	21.7	21.8	-	-	-	-	-
	酵素活性											
	AIP (%)	雄			80↓	82↓	77↓			76↓	71↓	74↓
雌				79↓	74↓	81↓			82↓	77↓	84↓	
ALT (%)	雄			83↓	85↓	75↓				80↓	67↓	
	雌				95	70↓				81↓	72↓	
GGT (nkat/L)	雄	0	5	9	41↑	71↑	9	15	6	30	102↑	
	雌	1	0	3	8	11	0	0	4	10	16↑	
臓器重量												
最終体重	雄				94	92↓				93↓	89↓	
	雌				94	95↓				93↓	91↓	
肝臓	対体重比	雄			106↑	109↑						
		雌				105↑						
腎臓	絶対重量	雄								94↓	94↓	
		雌										
	対体重比	雄					107↑				108↑	
		雌		105↑	99	105↑	107↑				108↑	
精巣	対体重比	雄				109↑				108		
精巣上体	対体重比	雄				107↑				112↑		
肉眼的病理所見	雄 雌	検体投与に起因する異常は認められなかった。										
病理組織学的所見(雌雄とも各 25 例中の発生頻度)												
肝臓脂肪浸潤	雄	17	20	15	10	8	7	14	17	8	7	
	雌	0	0	0	2	0	0	3	0	2	0	

注 : a, b : aは第1産、bは第2産。

生育期 : 雄の 29/22 週は F₀が 29 週、F₁が 22 週。雌の 10/14 は F₀が 10 週、F₁が 14 週。

統計学的方法 : 交尾までの日数、妊娠期間、酵素活性、臓器重量 : Dunnett-t 検定(両側)

交尾率、妊娠率、授精率、出産率、病理組織学的所見 : Fisher の直接確率検定(片側)

↓ : p ≤ 0.05, ↑ : p ≤ 0.01 矢印のない数値は有意差なし。

酵素活性、臓器重量は変動の目安として対照群に対する比率%を示す。ただし GGT については実測値を示した。

表 3. 児動物の試験結果

世代		F ₀ 親、F _{1a} およびF _{1b} 児					F ₁ 親、F ₂ 児						
投与量 (ppm)		対照	50	1000	4000	16000	対照	50	1000	4000	16000		
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25		
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25		
出産 1 日に生存児を有する雌数 (a/b)		25/25	23/24	25/25	22/23	24/24	24	22	24	25	23		
産児数	a	合計	350	357	340	304	329	299	277	314	327	276	
		生存児数	343	343	332	299	319	281	260	307	325	271	
		死亡児数	7	14	8	5	10	18	17	7	2	5	
	b	合計	392	379	397	360	382	-	-	-	-	-	
		生存児数	384	367	387	349	375	-	-	-	-	-	
		死亡児数	8	12	10	11	7	-	-	-	-	-	
出生時生存児数/腹		a	13.7	14.9	13.3	13.6	13.3	11.7	11.8	12.8	13.0	11.8	
		b	15.4	15.3	15.5	15.2	15.6	-	-	-	-	-	
生存率 (%)	出生時	a	98	96	98	98	97	94	94	98	99	98	
		b	98	97	97	97	98	-	-	-	-	-	
	生後 4 日	a	97	97	98	96	97	96	95	94	95	96	
		b	95	95	98	95	97	-	-	-	-	-	
	離乳率	a	100	100	99	100	98	99	99	98	99	99	
		b	99	99	98	99	97	-	-	-	-	-	
性比(雄の割合%)	生後 0 日	a	52.8	53.4	48.8	55.5	52.0	51.2	54.6	44.3	55.1	52.4	
		b	52.6	53.4	51.4	54.7	49.9	-	-	-	-	-	
	生後 21 日	a	50.8	52.2	49.7	52.6	50.3	51.6	51.8	45.3	49.5	51.7	
		b	50.5	49.5	49.5	48.6	49.7	-	-	-	-	-	
一般状態		a/b	検体投与に起因する異常は認められなかった。										
体重	生後 1 日		a/b 雌雄とも有意差なし										
	生後 21 日	雄	a			99↓	92↓	83↓				92↓	82↓
			b				88↓	77↓	-	-	-	-	-
		雌	a				90↓	81↓				92↓	82↓
b						90↓	78↓	-	-	-	-	-	
体重増加	生後 1-4 日	雄	a					86↓				89↓	
			b					67↓	-	-	-	-	
	生後 4-21 日	雌	a					86↓				87↓	
			b					71↓	-	-	-	-	
		雄	a			95↓	87↓	76↓				92↓	78↓
			b				87↓	75↓	-	-	-	-	-
雌	a				89↓	78↓				91↓	79↓		
	b				90↓	76↓	-	-	-	-	-		
発育(完了率/腹%)/行動検査成績(陽性率/腹%)													
耳介展開 (生後 4 日)	a	98.7	99.7	98.5	93.9	88.0	100.0	100.0	100.0	99.3	99.0		
	b	92.9	92.5	89.7	77.0↓	79.5↓	-	-	-	-	-		
眼瞼開裂 (生後 15 日)	a	94.5	97.8	92.1	92.0	88.3	95.3	95.5	99.2	95.0	90.2		
	b	98.0	91.1	87.5	86.4↓	91.7	-	-	-	-	-		
外耳道開通/握り反射/瞳孔反射/聴覚反射		a/b 雌雄とも有意差なし											
剖検所見		検体投与に起因する異常は認められなかった。											

注: a, b: aは第1産、bは第2産。

統計学的方法: 体重、体重増加: Dunnett-t 検定(両側)、発育/行動検査: Wilcoxon 検定(片側)

産児数、出生時生存児数、生存率: Fisher の直接確率検定(片側)

↑↓: p ≤ 0.05, ↑↑: p ≤ 0.01 矢印のない数値は有意差なし。

体重、体重増加量は変動の目安として対照群に対する比率%を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

2) ラットにおける催奇形性試験

(資料 29)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1994 年

検体純度:

試験動物: ウィスター系 Chbb:THOM (SPF) 妊娠ラット、妊娠 0 日で 81~83 日齢、1 群 25 匹

投与期間: 器官形成期の 10 日間 (1993 年 6 月 21 日~7 月 2 日)

投与方法: 雌を同系統の雄と 2:1 で交配し、膈垢中に精子が認められた日を妊娠 0 日とした。
検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁して毎日調製し、0(対照群)、100、400 および 1000 mg/kg の用量で妊娠 6~15 日までの 10 日間、毎日 1 回強制経口投与した。なお、対照群の動物には、0.5% CMC 水溶液のみを同様に投与した。投与容量 (10 mL/kg) は妊娠 6 日の個体別体重に基づき算出した。

投与量設定根拠:

試験項目:

母動物:

臨床症状および生死について毎日観察した。妊娠 0、1、3、6、8、10、13、15、17 および 20 日に体重と摂餌量を測定した。

妊娠 20 日に屠殺し、肉眼的病理検査を行い、妊娠子宮重量を測定した後、黄体数、着床数、生存および死亡・吸収胎児数を検査した。

生存胎児: 性別の判定、体重と胎盤重量の測定および外表異常の観察を行った。各同腹児の約半数の胎児について骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については内臓異常の有無を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結 果:

母動物(表 1):

いずれの群とも母動物の一般状態に特記すべき異常はなく、死亡/切迫殺もなかった。体重、摂餌量および繁殖性に関する指標にも投与に起因する影響は認められなかった。1000 mg/kg 群で 1 例の死亡胎児がみられたが、この腹の生存胎児数が 13.2 匹と対照群と同等であったことを考慮すると投与の影響とは考えられなかった。

表 1. 母動物の一般状態、体重、摂餌量および着床所見

群 (mg/kg/日)		対照	100	400	1000
1 群当り動物数		25	25	25	25
交尾雌数		25	25	25	25
妊娠雌数 (%)		24 (96)	23 (92)	23 (92)	25 (100)
未妊娠雌数		1	2	2	0
死亡/切迫殺雌数		0	0	0	0
全胚吸収雌数		0	0	1	0
生存胎児を有する腹数		24	23	22	25
一般状態		(検体に起因する異常なし)			
体重		(検体に起因する異常なし)			
体重変化		(検体に起因する異常なし)			
補正体重変化 ^a		(検体に起因する異常なし)			
摂餌量		(検体に起因する異常なし)			
妊娠子宮重量		(検体に起因する異常なし)			
腹当り 着床所見	検査動物数	24	23	23	25
	黄体数	15.8	16.1	15.7	15.6
	着床数	14.4	14.7	14.3	14.8
	着床前損失率 (%)	9.0	8.5	8.9	5.0
	早期吸収胚数	0.6	0.6	1.3	1.2
	後期吸収胚数	0.2	0.1	0.2	0.3
	子宮内死亡胚数	0.8	0.7	1.6	1.5
	着床後損失率 (%)	5.8	4.9	10.7	9.9
	生存胎児数	13.6	14.0	13.3	13.2
	生存胎児数/着床数 (%)	94.5	95.0	89.0	89.5
死亡胎児数(総数)		0	0	0	1
剖検所見		(検体に起因する異常なし)			

^a 補正体重変化は妊娠 20 日の体重から妊娠子宮重量および妊娠 6 日の体重を減じた値。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

胎児 (表 2) :

体重には、高用量の 1000 mg/kg まで検体投与の影響は認められなかった。

腹当りおよび胎児の異常発生率において、外表、内臓および骨格の奇形および変異ともに、生物学的変動の範囲内にあり、検体の投与に起因する異常は認められなかった。また、唯一の統計学的に有意な差として、1000 mg/kg 群で胸椎体不完全骨化を有する胎児の腹数および影響のあった腹当り胎児の発生率の増加がみられたが、試験実施機関での対照背景データで高頻度に認められる (表 3) ことから、検体の投与に起因するとは考えられなかった。

以上の結果から、本剤を妊娠ラットに経口投与したとき、母動物および胎児に対して 1000 mg/kg/日でも投与に起因する影響は認められなかった。

従って、無毒性量は親動物および胎児に対して 1000 mg/kg/日であると判断される。また、催奇形性は最高投与量の 1000 mg/kg/日でも認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 2 胎児 (括弧内の数値は腹数) : 骨格の変異/発育遅延は主要なものを示した。

試験群 (mg/kg)		対照	100	400	1000	
生存胎児総数 (腹数)		326 (24)	321 (23)	292 (22)	331 (25)	
性比 (雄の%)		48.5	48.6	53.1	54.1	
平均胎児体重 (g)	雄	4.0	3.9	3.9	3.9	
	雌	3.7	3.7	3.8	3.6	
平均胎盤重量 (g)	雄	0.45	0.47	0.43	0.46	
	雌	0.43	0.46	0.42	0.44	
外表検査	検査胎児総数 (腹数)	326 (24)	326 (24)	326 (24)	326 (24)	
	奇形 胎児総数 (腹数) 奇形の種類	0 (0)	1 (1) 全身浮腫/ 口蓋裂	1 (1) 無尾	1 (1) 髄膜瘤/ 小眼球症	
内臓検査	検査胎児総数 (腹数)	158 (24)	154 (23)	136 (22)	160 (25)	
	奇形 胎児総数 (腹数) 奇形の種類	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1) 水頭症	
	変異 胎児総数 (腹数) 胎児発生率% (腹当り)	21 (12) 13.7	19 (10) 11.9	16 (10) 12.6	12 (9) 7.1	
	腎盂拡張 尿管	21 (12) 5 (5)	19 (10) 4 (2)	16 (10) 1 (1)	12 (9) 4 (3)	
骨格検査	検査胎児総数 (腹数)	168 (24)	167 (23)	156 (22)	172 (25)	
	奇形	胎児総数 (腹数)	5 (5)	11 (7)	13 (7)	10 (8)
		胎児発生率% (腹当り)	3.3	7.0	7.9	5.6
		肋骨/脊柱の複合奇形	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		脊柱側弯症	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		胸椎体亜鈴型 (非対称)	4 (4)	7 (5)	10 (6)	7 (6)
		胸椎体二分 (非対称)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
		腰椎体亜鈴型 (非対称)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		仙椎体癒合または不定型	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		仙椎体二分 (非対称)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		仙椎欠損	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	尾椎欠損	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	胸骨分節二分/骨化中心部位異常	1 (1)	4 (4)	1 (1)	2 (2)	
	変異	胎児総数 (腹数)	82 (23)	82 (22)	82 (22)	83 (24)
胎児発生率% (腹当り)		48.5	48.6	52.5	48.6	
胸骨分節不定型		71 (22)	76 (22)	73 (22)	80 (24)	
胸骨分節二分		2 (2)	3 (3)	2 (2)	3 (3)	
第 13 肋骨短縮		22 (13)	12 (9)	16 (10)	2 (2)	
発育遅延	胎児総数 (腹数)	78 (22)	83 (22)	75 (19)	98 (24)	
	胎児発生率% (腹当り)	47.8	48.3	48.2	57.0	
	胸椎体亜鈴型 (対称)	37 (17)	33 (19)	34 (17)	22 (12)	
	胸椎体不完全骨化 胎児発生率% (腹当り)	12 (5) 6.9	12 (9) 6.9	12 (7) 7.9	23 (14)F 14.2W	
	胸骨分節未骨化	8 (6)	15 (9)	6 (5)	13 (7)	
	胸骨分節不完全骨化または不全 胸骨分節の片側性骨化中心	33 (16) 26 (14)	41 (18) 14 (10)	32 (14) 17 (11)	51 (19) 16 (10)	

統計学的方法: F: Fisher 直接確率検定 (片側)、W: Wilcoxon 検定 (片側) †: $p \leq 0.05$ 、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 3 胸椎体不完全骨化の発生頻度の比較

		本試験		背景データ (21 試験) BASF 毒性研究所 (範囲)
		対照	1000 mg/kg	
検査胎児数		168	172	3324
検査腹数		24	25	471
胸椎体 不完全骨化	胎児数	12	23	298
	発生率%	7.1	13.4	8.9 (0~49)
	腹数	5	14†F	119
	発生率%	20.8	56.0	25.3 (0~100)
胎児発生率/腹		6.9	14.2†W	8.6 (0~50)

背景データは 1988~1993 に実施した 21 試験の結果である。括弧内の範囲は最低値および最大値である。

統計学的方法: F: Fisher 直接確率検定(片側)、W: Wilcoxon 検定(片側) †; $p \leq 0.05$

3) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 30)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1993 年

検体純度:

試験動物: ヒマラヤ種妊娠ウサギ、妊娠 0 日: 19~25 週齢、1 群 15 匹
(1 週間間隔で各群 5 匹ずつ、3 節に分けて実施)

投与期間: 器官形成期の 13 日間(1991 年 11 月 11 日~12 月 7 日)

投与方法: 検体を 0.5% CMC(カルボキシメチルセルロース)水溶液に懸濁し、0(対照群)、100、400 および 1000 mg/kg の用量で妊娠 7~19 日(人工授精を行った日を妊娠 0 日とした)までの 13 日間、毎日 1 回強制経口投与した。なお、対照群の動物には、0.5% CMC 水溶液のみを同様に投与した。投与容量(10 mL/kg)は妊娠 7 日の個体別体重に基づき算出した。

投与量設定根拠:

試験項目:

母動物:

臨床症状および生死について毎日観察した。体重は、妊娠 0、2、4、7、9、11、14、16、19、21、23、25 および 29 日に測定した。飼料摂取量は毎日測定した。

妊娠 29 日に屠殺し、肉眼的病理検査を行い、妊娠子宮重量を測定した後、黄体数、着床数、生存および死亡・吸収胎児数を検査した。

生存胎児:

性別の判定、体重と胎盤重量の測定、外表および内臓異常について全胎児の観察を行った。各胎児の骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結 果:

母動物(表 1) :

投与開始前のすべての投与群と投与期間中の 100 mg/kg 群で飼料摂取量が有意に増加したが、検体の投与とは関係のない偶発的な変化と考えられた。その他の一般状態、体重、体重変化、補正体重増加、剖検所見、妊娠子宮重量、黄体数および着床数、妊娠率、剖検所見に検体投与の影響は認められなかった。

児動物(表 2) :

生存胎児数、性比、死亡/吸収胚数、胎児体重および胎盤重量には検体投与の影響は認められなかった。

外表、内臓および骨格奇形とも、対照群に比し有意な増加は認められなかった。少数の胎児に内臓奇形が認められたが、通常自然発生で認められるものであり、試験実施機関の背景データの範囲内にある(表 3)ことから、検体投与に関連するものとは考えられなかった。変異についても、検体投与に関連すると思われる増加はみられなかった。

以上の結果から、本剤を妊娠ヒマラヤ種ウサギに経口投与したとき、母動物および胎児に対して 1000 mg/kg/日でも、投与に起因する影響は認められなかった。

従って、無毒性量は親動物および胎児に対して 1000 mg/kg/日であると判断される。また、催奇形性は最高投与量の 1000 mg/kg/日でも認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 1. 母動物の一般状態、体重、摂餌量および着床所見

試験群 (mg/kg)		対照	100	400	1000
1 群当りの動物数		15	15	15	15
妊娠動物数		13	14	15	14
未妊娠雌数		2	1	0	1
死亡/切迫殺雌数		0	0	0	0
全胚吸収雌数		0	0	0	0
妊娠率 (%)		87	93	100	93
生存児を有する腹数		13	14	15	14
一般状態		(検体に起因する異常なし)			
体重		(検体に起因する異常なし)			
体重変化		(検体に起因する異常なし)			
補正体重変化 ^a		(検体に起因する異常なし)			
妊娠子宮重量		(検体に起因する異常なし)			
摂餌量 (対照群 に対する%)	妊娠 0-7 日	100	119↑	116↑	109↑
	妊娠 7-19 日	100	118↑	109	102
	妊娠 19-29 日	100	105	107	104
	妊娠 0-29 日	100	113↑	110↑	104
腹 当 り 着 床 所 見	検査動物数	13	14	15	14
	黄体数	7.2	8.1	8.7	8.1
	着床数	6.5	6.6	7.6	7.7
	早期吸収胚数	0.5	0.7	0.2	0.6
	後期吸収胚数	0.3	0.1	0.3	0.2
	吸収胚数合計	0.8	0.9	0.5	0.8
	着床前損失率 (%)	10.9	17.6	11.2	4.6
	生存胎児数	5.6	5.8	7.1	6.9
	子宮内死亡胚数	0.08	0	0	0
	着床後損失率 (%)	11.6	10.8	6.4	10.0
	胎児生存率	88.4	89.2	93.6	90.0
剖検所見		(検体に起因する異常なし)			

^a 補正体重変化は妊娠 20 日の体重から妊娠子宮重量および妊娠 6 日の体重を減じた値。

統計学的方法 ; Dunnett の t 検定 (両側) ↑ ; p ≤ 0.05, ↑ ; p ≤ 0.01 矢印のない数値は有意差なし。

摂餌量は変動の目安として対照群に対する比率%を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 2 胎児 (括弧内の数値は腹数) : 骨格の変異/発育遅延は主要なものを示した。

試験群 (mg/kg)		対照	100	400	1000	
生存胎児総数 (腹数)		73 (13)	81 (14)	106 (15)	97 (14)	
性比 (雄の%)		47.9	38.3	37.7	45.4	
平均胎児体重 (g)	雄	39.8	40.4	39.4	39.2	
	雌	38.9	38.7	38.8	40.1	
平均胎盤重量 (g)	雄	4.5	4.9	4.2	4.4	
	雌	4.6	4.6	4.1	4.3	
外表検査	検査胎児総数	74 ^a (13)	81 (14)	106 (15)	97 (14)	
	奇形胎児総数	0 (0)	1 (1) 小頭症/ 下顎短小症	0 (0)	0 (0)	
内臓検査	検査胎児総数	74 (13)	81 (14)	106 (15)	97 (14)	
	奇形	奇形胎児総数	0 (0)	2 (1)	2 (2)	4 (3)
		心室中隔欠損		1 (1)	2 (2)	2 (1)
		胆嚢無発生		1 (1)		1 (1)
		水頭症				1 (1)
		大動脈弓および下行大動脈の拡張				1 (1)
	変異	変異胎児総数	21 (11)	16 (11)	26 (12)	14↓ (10)
		頸動脈の分離始点	11 (8)	8 (7)	14 (7)	9 (7)
		心室間孔/心室中隔膜性部の痕跡	8 (5)	7 (6)	11 (7)	5 (4)
		胆嚢の低形成	2 (2)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
腎盂拡張		0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
骨格検査	検査胎児総数	74 (13)	81 (14)	106 (15)	97 (14)	
	奇形	奇形胎児総数	0 (0)	2 (1)	2 (2)	0 (0)
		腰椎の欠損	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
		前肢骨格の屈曲	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		後肢骨格の屈曲	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		頸椎体垂鈴型 (非対称)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		胸椎癒合/不整	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		胸骨重度癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	変異	変異胎児総数	9 (7)	19 (9)	20 (10)	15 (10)
		頭蓋骨分離	1 (1)	0 (0)	3 (3)	3 (3)
		鼻骨と前頭骨間の過剰骨	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
		胸骨分節癒合*	3 (3)	11† (8)	7 (4)	9 (6)
		胸骨分節不整	6 (5)	8 (5)	8 (5)	2 (2)
		過剰胸椎	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0 (0)
		過剰胸骨分節	0 (0)	4 (2)	0 (0)	1 (1)
	過剰第 13 肋骨	2 (2)	0 (0)	6 (3)	0 (0)	
	骨化遅延	骨化遅延胎児総数	41 (12)	39 (13)	49 (14)	47 (14)
		頭蓋骨不完全骨化	3 (3)	3 (2)	2 (2)	0 (0)
		腰椎弓不完全骨化	3 (3)	1 (1)	1 (1)	5 (3)
		胸骨分節未骨化	23 (11)	27 (11)	27 (12)	23 (12)
胸骨分節不完全骨化/小型化		16 (11)	9 (8)	19 (9)	21 (12)	
仙椎弓不完全骨化		0 (0)	1 (1)	2 (2)	1 (1)	
距骨不完全骨化		1 (1)	2 (2)	5 (3)	2 (2)	

* 軽度の癒合は変異に分類

統計学的方法: Fisher の直接確率検定 (両側) †: $p \leq 0.05$

矢印のない数値は有意差なし。

^a: 死亡胎児 1 匹を含む。

表 3 内臓奇形の発生頻度の比較

ヒマラヤウサギ	本試験		背景データ BASF 毒性研究所	
	対照	1000 mg/kg	平均	範囲
検査胎児数	74	97	2074	
検査腹数	13	14	340	
奇形胎児 率%)	総数(発生率%) 腹数(発生率%)	4 (4.1) 3 (21.4)	41 (2.0) 40 (11.8)	
水頭症 率%)	胎児数(発生率%) 腹数(発生率%)	0 (0.0) 1 (1.0) 0 (0.0) 1 (7.1)	1 (0.05) 1 (0.3)	0.0~1.1 0.0~6.7
大動脈弓および下行大動脈の拡張	胎児数(発生率%) 腹数(発生率%)	0 (0.0) 1 (1.0) 0 (0.0) 1 (7.1)	2 (0.1) 2 (0.6)	0.0~1.1 0.0~7.1
心室中隔欠損	胎児数(発生率%) 腹数(発生率%)	0 (0.0) 2 (2.1) 0 (0.0) 1 (7.1)	26 (1.3) 26 (7.6)	0.0~4.8 0.0~28.6
胆嚢無発生	胎児数(発生率%) 腹数(発生率%)	0 (0.0) 1 (1.0) 0 (0.0) 1 (7.1)	10 (0.5) 9 (2.6)	0.0~3.0 0.0~13.3

1-7 変異原性

1) 細菌を用いた復帰変異試験

(資料 31)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1993 年

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA100、TA1537、TA98 株) およ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) の存在下および非存在下で、標準プレート法およびプレインキュベーション法により Ames らの方法で変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験濃度は「毒性に関する試験成績を作成するに当たっての指針」等に基づき最高 5000 µg/プレートとした。試験は 3 反復で行った。

結 果:

検体は代謝活性化系の存在下および非存在下において、5000 µg/プレートの濃度でも復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-AA (2-aminoanthracene)、MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)、ENNG (N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)、AAC (9-aminoacridine chloride monohydrate) および NPD (4-nitro-o-phenyldiamine) では、全ての検定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変異誘発性を有しないものと判断される。

標準プレート法

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 Mix	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					
			WP2 uvrA			TA1535			TA100			TA1537			TA98		
対照 (DMSO)		-	31	32	32	18	16	22	121	133	140	7	10	10	26	28	31
検体	20	-	27	28	29	23	23	18	133	114	141	8	6	6	27	20	22
	100	-	31	27	25	19	20	22	142	110	135	8	11	8	29	34	30
	500*1	-	28	24	26	18	16	20	112	135	104	10	4	9	25	22	19
	2500*1	-	27	21	27	14	18	20	100	118	115	11	9	10	23	27	22
	5000*1	-	21	27	24	14	15	18	128	112	120	9	6	11	19	24	14
対照 (DMSO)		+	36	28	33	19	20	19	136	138	147	9	11	13	42	41	47
検体	20	+	30	36	29	18	18	15	148	148	139	7	14	10	39	44	41
	100	+	36	27	28	14	12	18	151	163	134	11	16	16	46	46	43
	500*1	+	27	24	26	12	18	16	141	142	138	14	10	10	47	44	37
	2500*1	+	27	22	25	14	18	14	140	140	146	11	10	7	45	34	39
	5000*1	+	17	17	23	19	13	13	110	126	130	9	4	8	36	39	35
陽性 対照*2	2-AA 2.5	+				111	112	101	870	959	843	112	123	117	742	663	752
	2-AA 60	+	136	108	114												
	MNNG 5	-				1020	947	787	824	906	814						
	ENNG 10	-	744	854	719												
	AAC 100	-										777	621	606			
	NPD 10	-													1000	970	910

プレインキュベーション法

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 Mix	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					
			WP2 uvrA			TA1535			TA100			TA1537			TA98		
対照 (DMSO)		-	30	21	25	21	17	17	111	119	126	6	8	9	17	29	23
検体	20	-	23	33	23	18	19	15	118	128	113	12	5	8	17	26	26
	100	-	24	23	21	16	21	18	123	128	107	10	7	12	19	26	22
	500*1	-	25	22	20	20	22	14	103	117	118	9	7	7	19	18	19
	2500*1	-	19	19	17	19	20	19	120	96	102	7	9	6	19	17	15
	5000*1	-	20	17	13	15	14	19	100	80	112	8	5	6	14	12	21
対照 (DMSO)		+	26	27	28	16	16	19	126	119	124	7	9	10	27	34	33
検体	20	+	28	21	27	17	18	13	103	106	113	9	12	7	32	26	30
	100	+	28	25	21	14	11	22	115	143	136	7	9	9	33	30	37
	500*1	+	27	25	22	17	16	17	131	137	150	8	8	6	33	28	30
	2500*1	+	27	29	24	11	15	13	129	144	134	4	6	5	26	27	34
	5000*1	+	24	16	19	13	17	17	126	104	120	5	5	6	37	28	26
陽性 対照*2	2-AA 2.5	+				108	102	113	605	662	608	112	104	106	602	747	688
	2-AA 60	+	139	135	149												
	MNNG 5	-				672	511	568	784	660	778						
	ENNG 10	-	562	467	666												
	AAC 100	-										745	702	666			
	NPD 10	-													1118	899	1020

*1. 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で不溶性沈殿物を認める。空欄は該当なし。

*2. 2-AA: 2-aminoanthracene MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine AAC: 9-aminoacridine chloride monohydrate
 NPD: 4-nitro-o-phenyldiamine

2) チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (HPRT 試験) (資料 38)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1994 年

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣細胞由来の培養細胞 (CHO-K1 細胞) のヒポキサンチン-グアニン ホスホリボシル トランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子座における *in vitro* 突然変異誘発性試験を代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下および非存在下で、2 回行なった。溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

用量設定のために、

これらの結果から以下の用量を選定した。

試験 1 (±S-9 mix): 0, 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL

試験 2 (±S-9 mix): 0, 0.001, 0.00215, 0.00464, 0.01, 0.0215, 0.0464, 0.1 mg/mL

陽性対照 [S-9 mix の非存在下ではエチルメタンサルホネート (EMS) 0.3 mg/mL、S-9 mix の存在下では 3-メチルコラントレン (MCA) 0.01 mg/mL] および陰性 (溶媒) 対照も同様に試験した。

自然 HPRT 欠損突然変異体を除いた細胞を播種し (5×10^5 個/フラスコ)、代謝活性化系の非存在下および存在下で、無血清培地中で 4 時間、検体処理を行った。細胞を Hank's 平衡塩溶液で洗浄後、Ham's F12 培地を加え培養を続けた。突然変異発現時間 (1 週間) の間に 4 回継代培養した。3 および 4 回目の継代培養時に、選択培地 (6-チオグアニン 10 μ g/mL 添加) を含むシャーレに約 3×10^5 細胞/フラスコを播種した。培養 1 週間後、固定・染色して変異コロニー数を計測した。

細胞毒性は検体処理後の最初の継代時 (処理 18~20 時間後) および発現時間後の再播種時に約 200 細胞/フラスコを播種し、Ham's F12 培地を加え、1 週間培養後、固定・染色して変異コロニー数を計測した。

試験結果: 結果を表 1~4 に示した。

細胞密度: 1 回目の継代時における細胞密度は代謝活性化系の非存在下で 0.0464 mg/mL 以上で大幅に減少したが、存在下では明らかな細胞毒性は観察されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

細胞毒性：検体処理 18~20 時間後に実施した細胞毒性試験 1 では代謝活性化系の非存在下では 0.1 mg/mL でコロニー形成率の低下が認められたが、存在下では細胞毒性は観察されなかった。細胞毒性試験 2 では細胞毒性は観察されなかった。

突然変異誘発性：検体は 2 回の試験において代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの濃度においても突然変異頻度の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたエチルメタンスルホネートおよび 3-メチルコラントレンでは明らかな突然変異頻度の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無に係らず本試験の条件下において遺伝子突然変異誘発性を有しないものと判断される。

表 1. 試験結果-試験 1

濃度 (mg/mL)	S-9 mix	1 回目 継代時 細胞密度 ($\times 10^3$ /mL)	細胞毒性試験 1 (処理 18~20 時間後)		細胞毒性試験 2 (突然変異発現時間後)		突然変異試験		
			コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		突然変異頻度 (10^6 個当り)		
			絶対値	相対値	絶対値	相対値	補正前	補正後 ^b	
0	-	442.48	86.50	93.01	98.50	111.30	0.00	0.00	
溶媒対照 2% DMSO	-	395.26	93.00	100.00	88.50	100.00	7.78	8.79	
検体	0.0001	-	346.02	118.00	126.88	72.25	81.64	0.00	0.00
	0.0005	-	378.79	89.50	96.24	91.50	103.39	7.78	8.50
	0.001	-	354.61	85.75	92.20	77.50	87.57	3.33	4.30
	0.005	-	377.36	78.25	84.14	80.75	91.24	3.33	4.12
	0.01	-	347.22	76.00	81.72	76.50	86.44	0.00	0.00
	0.05 ^a	-	200.80	77.50	83.33	82.75	93.50	2.78	3.36
	0.1 ^a	-	153.85	67.00	72.04	96.00	108.47	0.00	0.00
陽性対照 EMS 0.3	-	401.61	43.00	46.24	72.50	81.92	306.67 [†]	422.99	
0	+	413.22	61.75	78.66	85.75	108.89	0.00	0.00	
溶媒対照 2% DMSO	+	416.67	78.50 ^c	100.00	78.75	100.00	11.67	14.82	
検体	0.0001	+	423.73	75.50	96.18	83.50	106.03	5.00	5.99
	0.0005	+	427.35	75.00	95.54	93.50	118.73	8.33	8.91
	0.001	+	393.70	69.75	88.85	73.25	93.02	3.33	4.55
	0.005	+	423.73	71.50	91.08	81.50	103.49	10.56	12.96
	0.01	+	450.45	76.75	97.77	82.50	104.76	2.78	3.37
	0.05 ^a	+	357.14	74.25	94.59	74.00	93.97	1.11	1.50
	0.1 ^a	+	361.01	75.00	95.54	78.75	100.00	2.22	2.82
陽性対照 MCA 0.01	+	255.10	55.75	71.02	78.75	100.00	310.56 [†]	394.36	

DMSO: ジメチルスルホキシド EMS: エチルメタンスルホネート MCA: 3-メチルコラントレン

統計学的方法: Fisher-Pitman の検定 (片側) $\uparrow p < 0.01$

^a: 沈殿 ^b: 発現時間後のコロニー形成率 (細胞毒性試験 2) により補正を行った

^c: 汚染のため 1 フラスコの値

表 2. 試験結果-試験 2

濃度 (mg/mL)	S-9 mix	1 回目の継代時の細胞密度 (x10 ³ /mL)	細胞毒性試験 1 (処理 18~20 時間後)		細胞毒性試験 2 (突然変異発現時間後)		突然変異試験		
			コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		突然変異頻度 (10 ⁶ 個当り)		
			絶対値	相対値	絶対値	相対値	補正前	補正後 ^b	
0	-	497.51	77.25	119.31	75.75	95.28	3.33	4.40	
溶媒対照 2% DMSO	-	520.83	64.75	100.00	79.50	100.00	5.00	6.29	
検体	0.001	-	467.29	79.25	122.39	77.00	96.86	2.22	2.88
	0.00215	-	476.19	66.50	102.70	75.50	94.97	2.22	2.94
	0.00464	-	492.61	65.25	100.77	77.25	97.17	0.00	0.00
	0.01	-	420.17	83.75	129.34	83.75	105.35	3.33	3.98
	0.0215 ^a	-	324.68	75.25	116.22	80.50	101.26	0.56	0.70
	0.0464 ^a	-	177.62	65.75	101.54	91.00	114.47	8.33	9.15
	0.1 ^a	-	156.49	59.00	91.12	91.25	114.78	4.44	4.87
陽性対照 EMS 0.3	-	436.68	51.25	79.15	82.75	104.09	158.89 [↑]	192.01	
0	+	444.44	66.75	77.17	69.00	90.79	7.50	10.87	
溶媒対照 2% DMSO	+	403.23	86.50	100.00	76.00	100.00	5.56	7.32	
検体	0.001	+	462.96	79.50	91.91	81.75	107.57	1.11	1.36
	0.00215	+	442.48	61.50	71.10	82.75	108.88	5.56	6.72
	0.00464	+	429.18	72.75	84.10	91.50	120.39	6.67	7.29
	0.01	+	458.72	77.50	89.60	104.25	137.17	2.78	2.67
	0.0215 ^a	+	473.93	68.00	78.61	79.25	104.28	10.56	13.32
	0.0464 ^a	+	454.55	77.00	89.02	87.50	115.13	1.11	1.27
	0.1 ^a	+	404.86	69.50	80.35	79.25	104.28	6.11	7.71
陽性対照 MCA 0.01	+	272.48	46.00	53.18	67.75	89.14	398.33 [↑]	587.94	

DMSO: ジメチルスルホキシド

EMS: エチルメタンスルホネート

MCA: 3-メチルコラントレン

統計学的方法: Fisher-Pitman の検定 (片側) \uparrow $p < 0.01$

^a: 沈殿

^b: 発現時間後のコロニー形成率 (細胞毒性試験 2) により補正を行った

3) ヒトリンパ球細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験

(資料 32)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1993 年

検体純度:

方 法: ヒト静脈血を培養したリンパ球細胞を用いた予備試験の結果に基づき、本試験における最高濃度を検体の培地に対する溶解限界濃度である 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、以下、20 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 2 濃度を設け、代謝活性化系の存在下および非存在下で染色体異常誘発性を検定した。各試験区とも 2 プレートを用いた。なお、この最高濃度では分裂頻度の低下は認められなかった。

検体はアセトンに溶解した。溶媒対照(アセトン)および陽性対照[S9 mix 非存在下: マイトマイシン C(MMC)、S9 mix 存在下: シクロホスファミド(CPA)]を加えた。

全血を 37°C で 48 時間培養後、検体、陽性対照あるいは溶媒のいずれかを添加し、さらに 3 時間培養した。これを無添加培地で洗浄後、さらに完全培地で 21 時間培養した(全培養時間 72 時間)。培養終了 2~3 時間前にコルセミドを添加して、細胞分裂を停止させた。標本は Giemsa-Titrisol で染色した。

観察は各濃度で少なくともプレート当り 100 個(ただし、陽性対照区は 50 個)の分裂中期像を観察し、染色体異常はギャップ、切断、断片、欠失、複数の異常、細粉化および交換に分類し、また数的染色体異常は異数性および倍数性に分類した。

結 果: 結果は次表に示す。

検体処理区は、代謝活性化系の有無に係らず構造的および数的染色体異常の出現頻度の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いた MMC ならびに CPA では、明確な構造的染色体異常の出現頻度の増加を認めた。

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、ヒトリンパ球を用いた染色体異常誘発性試験において、染色体異常誘発性を有しないと判断する。

ヒトリリンパ球細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験の結果

S-9 Mix の有無	試験区 ^a	用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	異常を有する細胞数										分裂頻度 (%)		
				Gを 含む	構造的染色体異常 ^d								数的 染色体異常		平均 値	相対 値 ^b
					Gを含まない								倍数 性	異数 性		
					合計	B	D	F	Ex	mA	DC					
無	無処理対照		200	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	6.5	
	溶媒対照 (アセトン)	0.07mL	200	9	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	7.5 ^c	100
	検体	10	200	9	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7.1	94.7
		20	200	9	4	3	1	0	0	0	0	0	0	0	6.6	88.0
		40	200	10	4	3	0	1	0	0	0	0	0	3	5.6	74.7
陽性対照 (MMC)	0.1	100	26 [↑]	18 [↑]	-	-	-	2	-	0	0	0	0	8.1	108	
有	無処理対照		200	5	3	2	1	0	0	0	0	3	0	5.3	-	
	溶媒対照 (アセトン)	0.07mL	200	7	2	2	0	0	0	0	0	0	0	4.9 ^{c)}	100	
	検体	10	200	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5.4	110.2
		20	200	12	5	4	0	0	1	0	0	0	1	0	5.9	120.4
		40	200	5	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	6.1	124.5
陽性対照 (CPA)	5	100	29 [↑]	25 [↑]	-	-	-	11 [↑]	-	0	0	0	0	3	61.2	

^a MMC: マイトマイシン C

CPA: シクロホスファミド

^b 溶媒対照に対する分裂頻度の比率

^c 0.1 mL で試験

^d 構造的染色体異常:

G = ギャップ、B = 切断、D = 欠失、F = 断片、Ex = 交換、mA = 複数(≥5)の異常、DC = 細粉化
統計学的方法: BONFERONI-HOLM 変更による Fisher 直接確立検定 ↑; $p \leq 0.01$

4) CHL 細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験

(追加資料 1)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1997 年

検体純度:

方 法: チャイニーズ・ハムスター肺由来の細胞株 (CHL 細胞) を用いて代謝活性化系の存在下 (+S9) および非存在下 (-S9) で染色体異常誘発性を検定した。試験は「直接法 24 および 48 時間処理」と「代謝活性化法: 6 時間処理」で行い、陽性対照物質として直接法はマイトマイシン C (24 時間処理は 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48 時間処理は 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、代謝活性化法ではベンゾ(a)ピレン (-S9 および +S9 いずれも 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を使用した。下記の試験濃度を設定した。

直接法 24 時間処理: 2.04、6.11、18.3、55 $\mu\text{g}/\text{mL}$

48 時間処理: 0.45、0.9、1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$

代謝活性化法: -S9: 50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

+S9: 50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

各試験区について 2 プレートを用い、それぞれ 100 個/プレート (1 用量当り 200 個) の分裂中期像を観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap)、染色分体切断 (ctb)、染色分体交換 (cte)、染色体切断 (csb)、染色体交換 (cse)、染色体断片 (frg) およびその他の構造異常 (oth) に分類し、倍数体についても記録した。

染色体異常誘発性の判定は構造的染色体異常と数的染色体異常のそれぞれについて行い、いずれの検体濃度においても染色体異常を有する細胞の出現頻度 (構造的染色体異常の場合はギャップを除く) に有意な変動が認められない場合には陰性と判定し、同出現頻度に有意な増加と用量相関性が認められた場合には陽性と判定した。

試験濃度設定根拠:

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結果：次頁にみられるように、検体は 24 および 48 時間の「直接法」および-S9 mix では構造的染色体異常誘発性は認められなかった。+S9 mix では中程度の誘発性を示したが、この反応を認めた試験濃度では検体溶液を加えた直後の濁り (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 並びに処理時間終了時の結晶析出 (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上) が観察された。なお、倍数性細胞の出現頻度には、いずれの処理群においても溶媒対照群に比較して有意な増加は認められなかった。

以上の結果から、検体は代謝活性化系の存在下において中程度の構造的染色体異常誘発性を有するものと考えられる。

CHL 細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験の結果

試験法	処理時間	処理	S9 Mix	用量 (µg/プレート)	分析細胞数	分裂頻度 (%)	倍數体	構造的染色体異常細胞数							分裂中期異常細胞数	
								gap	ctb	cte	csb	cse	frg	oth	+gap	-gap
直接法	24 時間	無処理	-	-	200	5.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		溶媒対照 (DMSO)	-	0.5%	200	5.5	0	1.0	0	0	0	0	0	0	1.0	0
		検体	-	2.04	200	2.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			-	6.11	200	3.1	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	0
			-	18.3	200	3.2	0.5	3.0	0	0	0	0	0	0	3.0	0
	陽性対照 (MMC)	-	0.05%	200	2.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	48 時間	無処理	-	-	200	3.4	0.5	0	0	0	0	0.5	0	0	0.5	0.5
		溶媒対照 (DMSO)	-	0.5%	200	3.9	0	1.0	0	0.5	0	0	0	0	1.5	0.5
		検体	-	0.45	200	3.4	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0	1.0	0.5
			-	0.9	200	2.7	0.5	1.5	0	0	0	0	0	0	1.5	0
-			1.8	200	1.6	0	2.0	0.5	0	0	0	0	0	2.5	0.5	
陽性対照 (MMC)	-	0.05	200	2.8	0.5	9.5	21.5	36.0	1.0	3.0	0	0	50.5	47.5†		
代謝活性化法	6 時間 ¹⁾	無処理	+	-	200	7.2	0.5	0	0	0	0.5	0	0	0	0.5	0.5
		溶媒対照 (DMSO)	+	0.5%	200	5.8	0.5	0	0.5	0.5	0	0	0	0	1.0	1.0
		検体	+	50	200	6.2	1.0	1.0	0	0.5	0	0	0	0	1.0	0.5
			+	100 ²⁾	200	5.6	2.5	0.5	2.0	2.5	0	0.5	0	0	5.0	4.5†
			+	150 ^{2,3)}	200	2.6	0	1.5	13.0	19.5	2.5	0.5	0	1.5	28.5	27.5†
	陽性対照 (BaP)	+	40	200	2.2	0	4.5	14.0	20.0	3.0	2.0	0.5	1.5	31.5	29.5†	
	6 時間 ¹⁾	無処理	-	-	200	7.3	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	0
		溶媒対照 (DMSO)	-	0.5%	200	6.9	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	0
		検体	-	50	200	3.7	0	1.0	1.0	0.5	0	0	0	0	2.5	1.5
			-	100	200	3.7	0	0.5	1.0	0	0.5	0	0	0	2.0	1.5
-			150	200	3.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
-	200		200	3.3	0	0	0.5	0.5	0	0	0	0	1.0	1.0		
陽性対照 (BaP)	-	40	200	5.5	0.5	1.0	0	0	0.5	0	0	0	1.5	0.5		

1) CHL 細胞を検体で S9 mix の存在下/非存在下で 6 時間処理後、新しい培地で更に 18 時間培養。

2) 検体溶液を加えた直後に、微量の結晶析出。

3) 処理終了後に結晶析出。

備考: gap: 欠損、ctb: 染色体分断、cte: 染色体交換、csb: 染色体切断、cse: 染色体交換、frg: 染色体断片、

oth: その他の構造異常、+gap: 欠損を含む、-gap: 欠損を含まず

DMSO: ジメチルスルホキシド MMC: マイトマイシン C BaP: ベンゾ(a)ピレン

統計学的方法: カイ二乗検定 † p ≤ 0.05, †† p ≤ 0.001

5) マウスにおける細胞遺伝学的試験 (小核試験)

(資料 33)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1993 年

検体純度:

試験動物: NMRI 系マウス (平均体重約 28 g)、1 群雌雄各 5 匹 (陽性対照群は雌雄合計で 5 匹)

方 法: 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し、500、1000 および 2000 mg/kg の投与量で 1 回腹腔内投与した。陰性対照として 0.5% CMC 水溶液のみを同様に投与した。陽性対照としては、蒸留水に溶解したシクロホスファミド 20 mg/kg およびピンクリスチン 0.15 mg/kg を同様に投与した。

2000 mg/kg 群は投与後 16、24 および 48 時間に、その他の群はすべて投与 24 時間後に屠殺して、各動物の大腿骨髄を採取して、スライドグラス上にキシレンで固定後、ギムザ液で染色し、骨髄標本を作製した。

各標本について、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。同時に正染性赤血球数および小核を有する正染性赤血球数も計数した。

用量設定根拠:

結 果: 骨髄標本の観察結果を次表に示す。

中毒症状として、すべての投与群で不規則呼吸、立毛および蹲り姿勢等が認められ、1000 および 500 mg/kg 群では投与後約 30 分間継続したが、2000 mg/kg 群では投与後 4 時間継続した。

検体投与群ではいずれの用量および屠殺時期とも小核を有する多染性赤血球の出現頻度に対照群と差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割合に差もなく、赤血球生成の抑制は認められなかった。

一方、陽性対照群においては、いずれの陽性対照物質においても小核を有する多染性赤血球の明らかな増加が認められた。

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

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

多染性赤血球 1000 個当り小核を有する赤血球数

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	MNPCE 数 (平均値)	NCE 数 (平均値)	MNCE 数 (平均値)		
16 時間	検体	2000	雄	5	3.2	449.4	1.2		
			雌	5	2.4	509.2	0.4		
			雄+雌	10	2.8	479.3	0.8		
24 時間	検体	2000	雄	5	3.6	487.2	2.2		
			雌	5	0.8	483.2	0.2		
			雄+雌	10	2.2	485.2	1.2		
		1000	雄	5	3.0	469.0	0.8		
			雌	5	1.0	501.2	0.4		
			雄+雌	10	2.0	485.1	0.6		
		500	雄	5	3.0	539.0	1.2		
			雌	5	0.8	464.2	1.0		
			雄+雌	10	1.9	501.6	1.1		
	陰性対照 (0.5%CMC)	10mL/kg	雄	5	2.8	438.2	2.0		
			雌	5	1.8	451.8	0.8		
			雄+雌	10	2.3	445.0	1.4		
			陽性対照 (シクロホファミド [*])	20	雄	2	26.5	396.5	1.0
					雌	3	25.0	479.0	0.3
					雄+雌	10	25.6	446.0	0.6
陽性対照 (ヒンクリスチン)	0.15	雄	3	105.0	492.3	2.7			
		雌	2	87.0	702.0	1.5			
		雄+雌	10	97.8	576.2	2.2			
48 時間	検体	2000	雄	5	2.4	486.2	1.0		
			雌	5	1.6	483.8	0.6		
			雄+雌	10	2.0	485.1	0.8		

MNPCE: 多染性赤血球 1000 個当り小核を有する多染性赤血球数、

NCE: 赤血球 1000 個当り正染性赤血球数、

MNCE: 多染性赤血球 1000 個当り小核を有する正染性赤血球数

6) ラットにおける細胞遺伝学的試験 (小核試験)

(追加資料 2)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1997 年

検体純度:

試験動物: Wistar 系ラット (Chbb:THOM, SPF) (平均体重約 295 g)、1 群雌雄各 5 匹 (陽性対照群は誤って雌雄各 1 匹を 48 時間後に屠殺した)

方 法: 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し、用量 500、1000 および 2000 mg/kg を容量 10 mL/kg で 1 回腹腔内投与した。なお、陰性対照群には 0.5% CMC 水溶液のみを同様に投与した。

陽性対照群として、蒸留水に溶解したシクロホスファミド 20 mg/kg を同様に投与した。

対照群、500 および 1000 mg/kg 群は投与後 24 時間後に、さらに、対照群および 2000 mg/kg 群は投与 48 時間後にも屠殺した。陽性対照群は雌雄各 4 匹を投与後 24 時間後に、残りの各 1 匹を投与 48 時間後に屠殺した。屠殺後、各動物の大腿骨骨髓を採取して、スライドガラス上にキシレンで固定後、ギムザ液で染色し、骨髓標本を作製した。

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。同時に正染性赤血球数および小核を有する正染性赤血球数も計数した。

用量設定根拠:

結 果: 骨髓標本の観察結果を次表に示す。

中毒症状は検体投与群および陽性対照群ともに認められなかった。

検体投与群ではいずれの用量および屠殺時期とも小核を有する多染性赤血球の出現頻度に対照群と差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割合に差もなく、赤血球生成の抑制は認められなかった。

一方、陽性対照群では、投与 24 および 48 時間後屠殺とも小核を有する多染性赤血球の明らか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BASF ジャパン株式会社にある。

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。

多染性赤血球 1000 個当り小核を有する赤血球数

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察動物数	MNPCE 数 (平均値)	NCE 数 (平均値)	MNNCE 数 (平均値)
24 時間	陰性対照 (0.5%CMC)	10 mL/kg	雄	5	2.4	773.9	0.1
			雌	5	2.1	748.6	1.3
			雄+雌	10	2.3	761.3	0.7
	検体	500	雄	5	1.4	846.0	0.5
			雌	5	1.6	833.9	0.1
			雄+雌	10	1.5	840.0	0.3
		1000	雄	4*	2.0	711.9	0.4
			雌	5	2.0	806.9	1.0
			雄+雌	9	2.0	759.4	0.7
		2000	雄	5	1.6	750.8	0.8
			雌	5	1.1	814.0	0.6
			雄+雌	10	1.4	782.4	0.7
	陽性対照 (シクロスファミド*)	20	雄	4	11.0	840.8	1.1
			雌	4	11.8	1042.4	0.6
			雄+雌	8	11.4 [↑]	941.6	0.8
48 時間	陰性対照 (0.5%CMC)	10 mL/kg	雄	4*	1.8	748.9	0.8
			雌	5	2.3	623.4	1.1
			雄+雌	10	2.1	686.2	1.0
	検体	2000	雄	5	1.4	917.8	0.5
			雌	4*	2.0	956.3	0.3
			雄+雌	9	1.7	937.1	0.4
	陽性対照 (シクロスファミド*)	20	雄	1	8.5	702.0	0.7
			雌	1	10.0	1477.5	0.3
			雄+雌	2	9.3	1089.8	0.5

*: 各群の 1 例は芽細胞が破裂し、細胞顆粒がスライド全体に分布しており、小核と明確に区別できなかったため、各 4 例について検査した。

MNPCE: 多染性赤血球 1000 個当り小核を有する多染性赤血球数、

NCE: 赤血球 1000 個当り正染性赤血球数、

MNNCE: 多染性赤血球 1000 個当り小核を有する正染性赤血球数

Wilcoxon 検定: \uparrow ; $p \leq 0.05$ $\uparrow\downarrow$; $p \leq 0.01$

7) 細菌を用いた DNA 修復試験 (Rec assay)

(資料 34)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1994 年

検体純度:

方法: 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換修復機構保持株 (H17) と欠損株 (M45) を用い、代謝活性化系の存在下および非存在下における DNA 損傷の誘発性を検定した。

溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。検体の DMSO に対する溶解限度を最高用量として、活性化系の存在下では 6100 µg/disk、非存在下では 3050 µg/disk とし、公比 2 で各 6 用量を試験した。

陰性対照としてカナマイシンを 0.3 µg/disk の用量で、陽性対照としてマイトマイシン C を 0.02 µg/disk、あるいは 3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド (4,3-b) インドール (Trp-P-1) を 20 µg/disk の用量で用いた。試験は各用量 3 枚のプレートで実施した。

結果: 結果を次表に示す。

代謝活性化の有無	薬物	濃度 (µg/disk)	阻止域 (mm)		差 (mm)
			M45	H17	
無	対照 (DMSO)	50 (µL)	0.0	0.0	0.0
	検体	191	0.0	0.0	0.0
		381	0.0	0.0	0.0
		763	0.0	0.0	0.0
		1525	0.0	0.0	0.0
		3050	0.0	0.0	0.0
		6100	0.0	0.0	0.0
	陰性対照カナマイシン	0.3	7.8	7.8	<0.0
陽性対照マイトマイシン C	0.02	13.7	0.0	13.7	
有	対照 (DMSO)	25 (µL)	0.0	0.0	0.0
	検体	95.3	0.0	0.0	0.0
		191	0.0	0.0	0.0
		381	0.0	0.0	0.0
		763	0.0	0.0	0.0
		1525	0.0	0.0	0.0
		3050	0.0	0.0	0.0
	陽性対照 Trp-P-1	20	13.0	0.0	13.0

DMSO: ジメチルスルホキシド

Trp-P-1: 3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド (4,3-b) インドール

検体処理群では、代謝活性化系の有無にかかわらず最高用量でも両株に生育阻止を認めなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

一方、陽性対照のマイトマイシン C あるいは Trp-P-1 では、両株間に明らかな生育阻止の差が生じた。

以上の結果より、本剤は DNA 損傷の誘発性が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 BASF ジャパン株式会社にある。

8) ラット初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成試験

(資料 35)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1994 年

検体純度:

試験方法:

供試細胞: ウイスター Chbb:THOM 系ラット雄(体重約 230 g)から分離した初代培養肝細胞を用いた。

処理: 検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、0.33~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培地の範囲で 6 濃度を用いた。陰性対照として DMSO 2%、陽性対照は 2-AAF (2-アセチルアミノフルオレン) 2.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (=10 μM) 培地を用いた。各濃度とも試験は 2 回行った。

4×10^5 個の初代培養肝細胞を well (濃度あたり 6 well) 中のカバースリップに播種し、付着用培地で 2 時間培養後、培養液を検体あるいは陽性対照物質および ^3H -チミジン(比放射能約 37 MBq/mL)を 1% 添加した培養液に交換し、さらに 18 時間培養を継続した。培養は 37°C、95% O_2 /5% CO_2 気中で行った。

細胞毒性を検討する実験では、カバースリップを入れず、 ^3H -チミジンを加えなかったこと以外は同様に培養した。

UDS の定量: 培養終了後、細胞を固定し、オートラジオグラフィーを取り、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。各用量につきスライド 3 枚 (25~50 細胞/スライド、合計 100 細胞/用量)を観察し、核銀粒子数および細胞質銀粒子数を計数し、細胞当り正味の銀粒子数(=核銀粒子数-細胞質銀粒子数)、修復細胞の割合(正味銀粒子数が ≥ 5 個あるいは ≥ 0 の細胞の割合)を求めた。

結果の判定: 正味のグレイン数の平均が 5 個以上、あるいは修復細胞の割合が 20%以上の場合を陽性とした。

用量設定根拠:

試験結果: 用量設定根拠とした試験と異なり、本試験では検体は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で細胞毒性が見られた(表 3)。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

2 回の試験の何れにおいても、不定期 DNA 合成活性の上昇は認められなかった(表 1, 表 2)。

一方、陽性対照として用いた 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) では修復細胞の割合が大きく増加した。

以上の結果から、本検体は不定期 DNA 合成を誘発しないと判断される。

表 1. 試験 1 100 細胞当たり平均銀粒子数および修復細胞の割合

濃度 [µg/mL]	銀粒子数			修復細胞%		
	核	細胞質	正味	正味銀粒子数 ≥ 0	正味銀粒子数 ≥ 5	
0	10.59±5.34	14.07±6.23	-3.48±3.04	14	0	
2%DMSO (溶媒対照)	10.79±5.56	15.22±6.41	-4.43±3.94	13	0	
検体	0.33	13.23±6.29	17.67±7.27	-4.44±4.00	17	0
	1.0	14.36±5.69	20.14±6.49	-5.78±5.89	16	0
	3.33	11.45±6.91	17.48±7.19	-6.03±3.70	5	0
	10.0	2.88±3.77**	6.23±4.65**	-3.35±2.90**	8	0
	33.3	*	*	*	-	-
	100	*	*	*	-	-
10µM 2-AAF (陽性対照)	25.95±22.02	22.52±14.69	3.43±10.36	62	41	

DMSO : ジメチルスルホキシド

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

* : 細胞毒性のため評価不可能

** : 細胞毒性のため、65 個の細胞しか評価できなかった

表 2. 試験 2 100 細胞当たり平均銀粒子数および修復細胞の割合

濃度 [µg/mL]	銀粒子数			修復細胞%		
	核	細胞質	正味	正味銀粒子数 ≥ 0	正味銀粒子数 ≥ 5	
0	8.60±4.32	12.39±4.23	-3.79±3.31	12	0	
2%DMSO (溶媒対照)	7.66±3.79	12.62±3.65	-4.96±3.62	9	0	
検体	0.33	6.47±3.49	10.76±3.51	-4.29±3.45	14	0
	1.0	9.29±5.19	13.37±5.48	-4.08±4.36	18	2
	3.33	9.65±4.22	13.99±4.69	-4.34±4.30	16	1
	10.0	9.29±5.13	13.42±5.94	-4.13±5.10	24	2
	33.3	*	*	*	-	-
	100	*	*	*	-	-
10µM 2-AAF (陽性対照)	19.57±9.75	12.97±4.31	6.60±7.70	83	52	

DMSO : ジメチルスルホキシド

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

* : 細胞毒性のため評価不可能

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 3 細胞毒性

濃度 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	乳酸脱水素酵素活性	陰性対照比%
0	49.33	26.0
2% DMSO (溶媒対照)	189.50	100.0
検 体	0.33	181.50
	1.0	215.17
	3.33	184.67
	10.0	289.83
	33.3	373.00
	100	363.17
10 μM 2-AAF (陽性対照)	214.67	113.3

DMSO : ジメチルスルホキシド

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

9) ラット肝細胞における *ex vivo* 不定期 DNA 合成 (UDS) および S 期反応 (SPR) 試験

(資料 36)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1994 年

検体純度:

試験動物: ウイスター系 Chbb:THOM 雄ラット、1 群 3 匹、開始時 70~72 日齢(体重約 300 g)

試験期間: 1993 年 12 月 19 日~1993 年 12 月 22 日

試験方法:

投与量: 検体を 20、200 および 1000 mg/kg の濃度で単回強制経口投与した。検体は 0.5% カルボキシメチルセルロース (CMC) に懸濁した。

溶媒対照群には 0.5% CMC (10 mL/kg)、陽性対照群にはコーンオイルに溶解した 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF 50 mg/kg) (UDS 試験) および 4-アセチルアミノフルオレン (4-AAF 1000 mg/kg) (SPR 試験) を単回強制経口投与した。

肝細胞の分離・培養: 投与 18 時間後に麻酔下で灌流し、肝臓から肝細胞を分離して単細胞浮遊液を調製した。4 x 10⁵ 個の分離肝細胞を well (UDS/SPR 試験用に動物当り 6 well、系の感度評価用に 2 well) 中のカバースリップに播種し、付着用培地で 2 時間培養後、培地を ³H-チミジン (比放射能約 37 MBq/mL) を 1% 添加した培地に交換した。4 時間培養後、細胞を洗浄し、非標識チミジンを含んだ新鮮培地を加え、さらに約 18 時間培養した。培養は 37°C、95% O₂/5% CO₂ 気中で行った。

細胞毒性検査: トリパンブルー排出法による肝細胞生存率および細胞形態より実施した。

UDS の定量: 培養終了後、細胞を固定し、オートラジオグラフィーを取り、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。動物当りスライド 3 枚 (25~50 細胞/スライド、合計 100 細胞) を観察し、核銀粒子数および細胞質銀粒子数を計数し、細胞当り正味の銀粒子数 (= 核銀粒子数 - 細胞質銀粒子数)、修復細胞の割合 (正味銀粒子数が ≥ 5 個あるいは ≥ 0 の細胞) を求めた。

S 期反応検査: 動物当りスライド 3 枚 (600~1000 細胞/スライド、合計 2000 細胞) を観察し、S 期細胞 (銀粒子数が多くて黒化した核を有する細胞) の比率を求めた。

結果の判定: 正味のグレイン数の平均が 5 個以上、あるいは修復細胞の割合が 20% 以上の場合を陽性とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

用量設定根拠:

試験項目および結果:

細胞毒性: 表 1 にトリパンブルー排出法による細胞毒性を示す。

いずれの投与群とも、投与の影響は認められなかった。

表 1. 細胞毒性 (3 動物の平均値)

用量 (mg/kg)		生存率	陰性対照群に対する%
0 (陰性対照群)		80.0±2.39	100.0
検体	20	84.4±7.00	105.5
	200	77.7±3.76	97.1
	1000	82.0±3.06	102.5
2-AAF (UDS の陽性対照群)	50	74.8±9.06	93.5
4-AAF (SPR の陽性対照群)	1000	83.0±6.22	103.8

AAF: アセチルアミノフルオレン

不定期 DNA 合成 (UDS): 表 2 に UDS 検定結果を示す。

いずれの検体投与群とも、検体投与の影響は認められなかった。

一方、陽性対照 2-AAF 群では DNA 修復細胞の著しい増加が観察された。

表 2. 100 細胞当り平均銀粒子数および修復細胞の割合 (3 動物の平均値)

用量 (mg/kg)	検体				陽性対照群 2-AAF 50
	0	20	200	1000	
核銀粒子数	12.31±2.89	11.88±2.66	13.34±1.14	12.66±1.57	29.26±0.63
細胞質銀粒子数	19.87±3.82	18.68±3.09	21.31±0.79	21.37±1.66	25.28±0.18
正味銀粒子数	-7.56±1.89	-6.81±0.46	-7.97±1.56	-8.71±0.71	3.98±0.45
修復細胞率% (正味銀粒子数≥0)	6.67±2.52	6.33±1.53	6.33±5.13	4.67±3.51	70.00±3.61
修復細胞率% (正味銀粒子数≥5)	0 ± 0	0.67±0.58	0.33±0.58	0 ± 0	47.00±3.46

AAF: アセチルアミノフルオレン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

S 期反応: オートラジオグラフィーにより、S 期細胞率を検査した結果を表 3 に示す。

20 および 200 mg/kg 群では対照群に比較し S 期細胞率が増加する傾向がみられたが、1000 mg/kg 群で 200 mg/kg 群以上に増加することはなかった。

表 3. S 期反応 (3 動物の平均値)

用量 (mg/kg)	検体				陽性対照群 2-AAF 50
	0	20	200	1000	
S 期細胞率%	1.00±0.26	1.37±1.07	2.78±2.18	2.58±1.60	5.87±1.07

AAF: アセチルアミノフルオレン

以上の結果から、本検体は不定期 DNA 合成を誘発しないと判断される。

また、200 mg/kg 以上の用量において、S 期細胞率が増加し、本試験条件下で検体は多少の細胞増殖誘発能を有していると判断された。

10) 3週間混餌投与ラットの肝細胞における *ex vivo* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

(資料 37)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1994 年

検体純度:

試験動物: ウイスター系 Chbb:THOM 雄ラット、1群3匹、開始時投与群 54~56 日齢、対照群 70~72 日齢

試験期間: 3週間、1993年11月29日~1993年12月22日

試験方法:

投与: 検体を 200 および 16000 ppm の濃度で基礎飼料に直接混入し、3週間にわたって混餌投与した。検体を混入した飼料は、投与開始前に1回調製した。

なお、溶媒対照群[0.5%CMC (10 mL/kg)]、陽性対照群[2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF 50 mg/kg)]は本試験では設定せず、並行して実施した経口投与試験(資料 36)のデータを使用した。

観察: 一般状態および生死を毎日観察し、摂餌量は毎週測定、飲水量は毎日、目視検査を行った。

肝細胞の分離・培養: 投与終了後あるいは強制経口投与 16 時間後に麻酔下で灌流し、肝臓から肝細胞を分離して単細胞浮遊液を調製した。4 x 10⁵ 個の分離肝細胞を well (動物当り 6 well、系の感度評価用に 2 well) に入れたカバースリップに播種し、付着用培地で 2 時間培養後、培地を ³H-チミジン(比放射能約 37 MBq/mL)を 1% 添加した培地に交換した。4 時間培養後、細胞を洗浄し、非標識チミジンを含んだ新鮮培地を加え、さらに約 18 時間培養した。培養は 37°C、95% O₂/5% CO₂ 気中で行った。

細胞毒性検査: トリパンブルー排出法による肝細胞生存率および細胞形態より実施した。

UDS の定量: 培養終了後、細胞を固定し、オートラジオグラフィーを取り、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。動物当りスライド 3 枚 (25~50 細胞/スライド、合計 100 細胞) を観察し、核銀粒子数および細胞質銀粒子数を計数し、細胞当り正味の銀粒子数 (= 核銀粒子数 - 細胞質銀粒子数)、修復細胞の割合 (正味銀粒子数が ≥ 5 個あるいは ≥ 0 の細胞) を求めた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

結果の判定：正味のグレイン数の平均が5個以上、あるいは修復細胞の割合が20%以上の場合を陽性とした。

用量設定根拠：

結果：

細胞毒性：表1にトリパンプルー排出法による細胞毒性を示す。

いずれの投与群においても、投与の影響は認められなかった。

表1. 細胞毒性(3動物の平均値)

用量 (ppm)		生存率	陰性対照群に対する%
0 (陰性対照群)		80.0±2.39	100.0
検体	200	78.8±2.74	98.5
	16000	81.6±3.38	102.0
2-AAF (陽性対照群) (50 mg/kg)		74.8±9.06	93.5

AAF: アセチルアミノフルオレン

不定期 DNA 合成 (UDS)：表2に UDS 検定結果を示す。

いずれの検体投与群とも、検体投与の影響は認められなかった。

一方、陽性対照 2-AAF 群では、DNA 修復細胞の著しい増加が観察された。

表2. 100細胞当り平均銀粒子数および修復細胞の割合 (3動物の平均値)

用量 (ppm)	0	200	16000	陽性対照群 2-AAF 50
	0	200	16000	
核銀粒子数	12.31±2.89	12.84±1.48	11.78±1.49	29.26±0.63
細胞質銀粒子数	19.87±3.82	23.56±3.40	21.67±3.43	25.28±0.18
正味銀粒子数	-7.56±1.89	-10.72±2.00	-9.90±1.94	3.98±0.45
修復細胞率% (正味銀粒子数≥0)	6.67±2.52	2.67±1.15	2.33±1.53	70.00±3.61
修復細胞率% (正味銀粒子数≥5)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	47.00±3.46

以上の結果から、本検体は不定期 DNA 合成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 BASF ジャパン株式会社にある。

11) ハムスターの胚細胞を用いた *in vitro* 細胞形質転換試験

(資料 49)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2008 年

検体純度:

供試動物: Syrian golden ハムスター

試験方法:

用量設定根拠:

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

評 価 :

結 果 :

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

以上の結果より、本試験条件下で検体は *in vitro* SHE 細胞を用いた形質転換試験において陽性であると判断される。

1-8 生体機能に及ぼす影響

1) 一般薬理試験

(資料 39)

試験機関¹⁾:

報告書作成年: 1994 年

検体純度:

①中枢神経系に対する作用

1) マウスの一般症状

供試動物: SPF NMRI 系マウス 体重 21~28 g、5 週齢、1 群 雄動物 3 匹

方 法: 0.5% CMC (カルボキシメチルセルロース) 水溶液に検体を懸濁させ、0、1000、2000、5000 mg/kg の用量で経口投与し、投与前、投与 30 分、1、2、4、8 時間後に Irwin 変法に従って行動を多次元観察した。

結 果: 認められた所見を表 1 にまとめた。

表 1

投与時間 (hr)	用量群 (mg/kg)	0	1000	2000	5000
0.5	所見	3	3	3	3
	検査動物数	3	3	3	3
1	円背位	0	0	0	2
	円背位	0	0	1	1
2	円背位	2	1	2	1
	行動不活発	0	1	1	0
	発声	1	0	0	0

表中の数値は所見の認められた動物数を示す。

全ての所見は用量に関連なく発生し、投与 4 時間後には全例回復した。検体に起因する一般症状の異常は認められなかったと判断した。

2) マウスの自発運動量に対する作用

供試動物: SPF NMRI 系雄マウス 体重 21~31g、4 週齢、1 群 4 匹

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

方 法: 0.5% CMC 水溶液に検体を懸濁させ、0、1000、2000、5000 mg/kg の用量で経口投与し、投与前、投与 30 分、1、2、4、8 時間後に赤外線ビームの遮りを 5 分間隔で 3 回ずつ測定することによって自発運動量を測定した。

結 果: 各測定時点における 3 回の合計値の群平均は、対照群に対していずれの投与群にも有意な変動 (Dunnett 検定) は認められず、検体に起因する自発運動量の変化はなかったと判断した。

3) ラットの自発脳波に対する作用

供試動物: SPF Han ウィスター系雄ラット 体重 325~375 g、15 週齢、1 群 4 匹

方 法: 0.5% CMC 水溶液に検体を懸濁させ (但し、2000 および 5000 mg/kg は 5% CMC に懸濁)、0、1000、2000 および 5000 mg/kg の用量で 3~9 日間隔で 4 回強制経口投与し、投与 6 時間後まで前頭部、後頭部の皮質脳波、頸部の筋電図を測定し、異常脳波および周波数解析を行った。脳波と筋電図のパワースペクトルから、以下のサイクルの時間を求めた。

覚醒、睡眠 I、睡眠 II、睡眠 III、パラ睡眠

結 果: 結果を表 2 に示す。

表 2

用量群 (mg/kg)	1000		2000		5000	
検査時期 (hr)	3	6	3	6	3	6
項 目						
覚醒					78 ↓	
睡眠 I					148 ↑	131 ↑
睡眠 II				51 ↓		
睡眠 III				84 ↓		77 ↓
パラ睡眠						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の割合 (%)

T-検定; ↑ ↓ : $p < 0.05$, 空欄は有意差なし。

前頭部のパワーが用量に依存して減少し、5000 mg/kg 投与群に軽度な睡眠 I の延長、睡眠 III の短縮が認められたが、この変化は大量を投与したことに起因するものであり、検体の毒作用によるものとは考えられなかった。

②呼吸、循環器系に対する作用

1) ラットの呼吸、循環器に対する作用

供試動物：SPF ウィスター系雄ラット 体重 222~248 g、9 週齢、1 群 4 匹

方 法：0.5% CMC 水溶液に検体を懸濁させ、0、5000 mg/kg の用量でウレタン麻酔下の動物に十二指腸内投与し、投与 15 分前から 60 分後まで 5 分間隔で、呼吸数、1 回呼吸量、1 分呼吸量、最高血圧、最低血圧、心拍数を測定した。

結 果：各側的時点における群平均値について、対照群に比して投与群は有意な変動を示さなかった (Dunnett 検定；有意差なし)。従って、検体に起因する呼吸、循環器系のパラメーターの変化はないと判断した。

③自律神経系に対する作用

1) モルモットの摘出気管に対する作用

供試動物：SPF 1bm: GOHI 系雄モルモット 体重 386~500 g、5 週齢、1 群 4 匹

方 法：マグヌス管に懸垂した摘出気管に、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した検体を 0、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} g/mL の濃度で適用した時の作用を調べた。さらに、アセチルコリン (10^{-8} ~ 10^{-3} g/mL)、ヒスタミン (10^{-8} ~ 10^{-4} g/mL) 収縮に対する検体の作用も調べ、それぞれの拮抗薬であるアトロピン 10^{-7} g/mL、ジフェンヒドラミン 10^{-7} g/mL の作用と比較した。

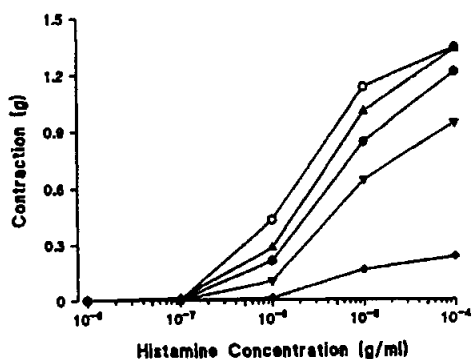
結 果：摘出気管に対する検体単独の作用は 10^{-4} g/mL でも認められなかった。

ヒスタミンおよびアセチルコリンによる摘出気管の収縮への検体の影響およびこれらの拮抗薬の影響の結果を図 1-4 に示す。

ヒスタミンおよびアセチルコリンの収縮に対し、検体高濃度では抑制を示したが、検体を洗浄除去すると、検体適用前と同等の収縮が認められ、検体の影響は可逆的であることが確認された。

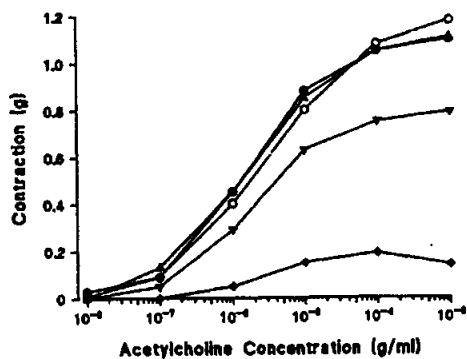
以上の結果より、検体は平滑筋収縮に軽度で可逆的な拮抗活性を有すると結論した。

図 1. 検体のヒスタミン収縮への影響



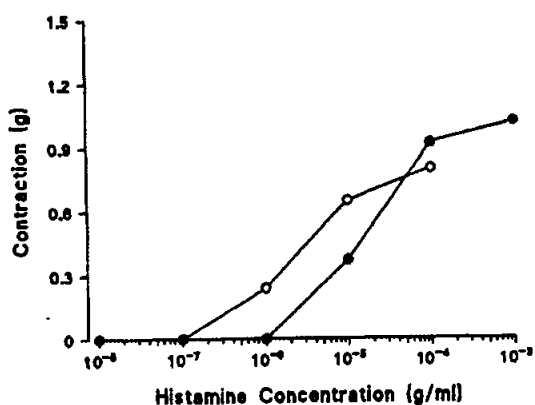
- : ヒスタミンの濃度-反応曲線
- : ヒスタミン+検体 10^{-7} g/mL
- ▲ : ヒスタミン+検体 10^{-6} g/mL
- ▼ : ヒスタミン+検体 10^{-5} g/mL
- ◆ : ヒスタミン+検体 10^{-4} g/mL

図 2. 検体のアセチルコリン収縮への影響



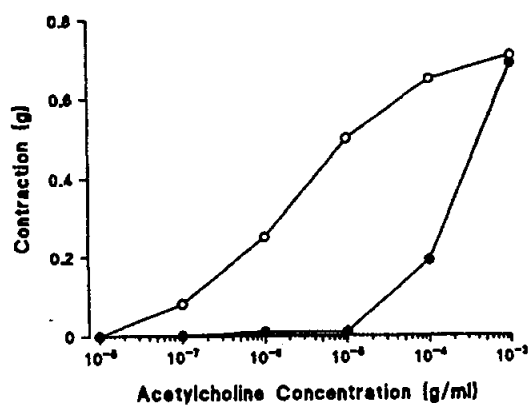
- : アセチルコリンの濃度-反応曲線
- : アセチルコリン+検体 10^{-7} g/mL
- ▲ : アセチルコリン+検体 10^{-6} g/mL
- ▼ : アセチルコリン+検体 10^{-5} g/mL
- ◆ : アセチルコリン+検体 10^{-4} g/mL

図 3. ジフェントラミンのヒスタミン収縮への影響



- : ヒスタミンの濃度-反応曲線
- : ヒスタミン+ジフェントラミン 10^{-7} g/mL

図 4. アトピンのアセチルコリン収縮への影響



- : アセチルコリンの濃度-反応曲線
- : アセチルコリン+アトピン 10^{-7} g/mL

④消化器に対する作用

1) マウスの炭末輸送能に対する作用

供試動物: SPF NMRI 系雄マウス 体重 24~30 g、6 週齢、1 群 6 匹

方 法: 0.5% CMC 水溶液に検体を懸濁させ、0、1000、2000 および 5000 mg/kg の用量で経口投与し、30 分後に炭末懸濁液を経口投与し、その 30 分後に屠殺して炭末の小腸内移動率(全小腸の長さに対する小腸起始部から炭末先端までの長さの比率)を測定した。

結 果: 結果を表 3 に示す。検体に起因する炭末輸送率の変化は認められなかった。

表 3

用量群 (mg/kg)	0	1000	2000	5000
炭末の小腸内移動率 (%)	52	58	61	60

Dunnett 検定: 有意差なし。

2) モルモットの摘出回腸に対する作用

供試動物: SPF Ibm: GOHI 系雄モルモット 体重 308~360 g、5 週齢、1 群 2 匹

方 法: マグヌス管に懸垂した摘出回腸に、ジメチルスルホキシドに溶解した検体を 0、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} g/mL の濃度で適用した時の作用を調べた。さらに、アセチルコリン (10^{-10} ~ 3×10^{-7} g/mL)、ヒスタミン (10^{-10} ~ 10^{-6} g/mL) 収縮に対する検体の作用も調べ、それぞれの拮抗薬であるアトロピン 10^{-8} g/mL、ジフェンヒドラミン 10^{-7} g/mL の作用と比較した。

結 果: 結果を図 5-8 に示す。

摘出回腸に対する検体単独の作用は認められなかった。 10^{-6} g/mL 以上適用するとアセチルコリン収縮、ヒスタミン収縮の可逆的で濃度に依存した抑制がみられた。H1 受容体の競合拮抗剤であるジフェンヒドラミンおよびムスカリン受容体であるアトロピンを処置すると濃度反応曲線は右方移動し、最大収縮に変化がなかった。ヒスタミンおよびアセチルコリンにより誘発された抑制に対して非競合的拮抗作用を示した。したがって、平滑筋収縮に対して軽度で可逆的拮抗作用を有する。

図 5. 検体のヒスタミン収縮への影響

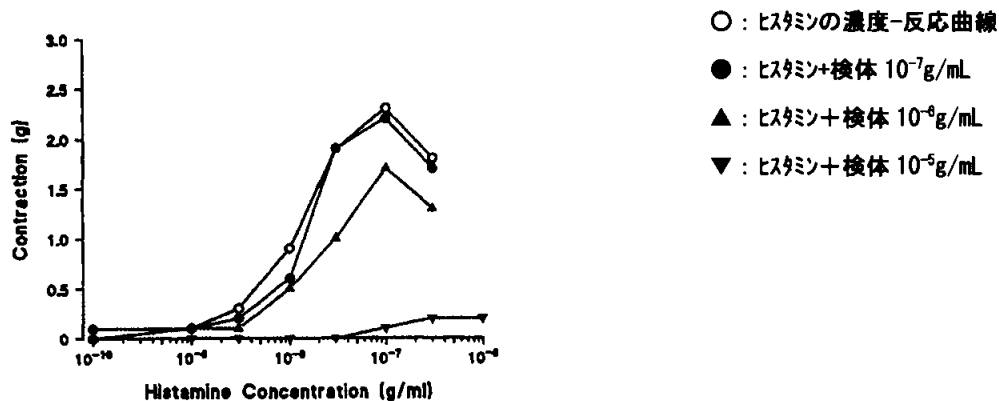


図 6. 検体のアセチルコリン収縮への影響

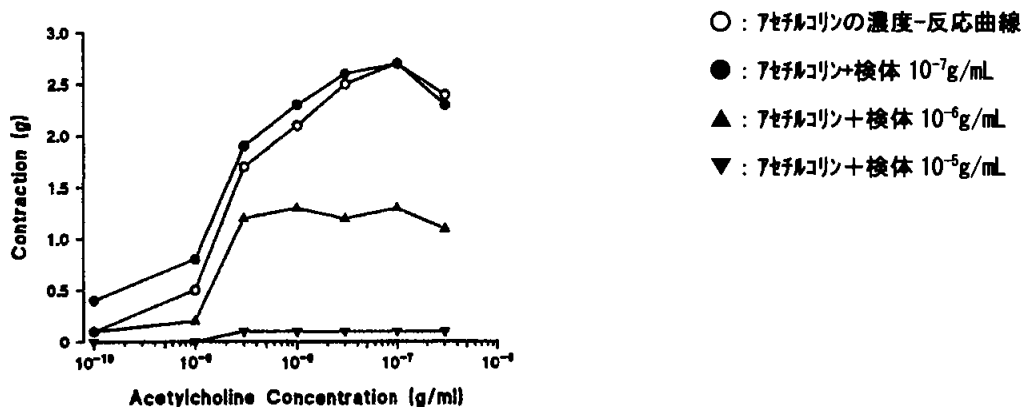


図 7. ジフェントラミンのヒスタミン収縮への影響

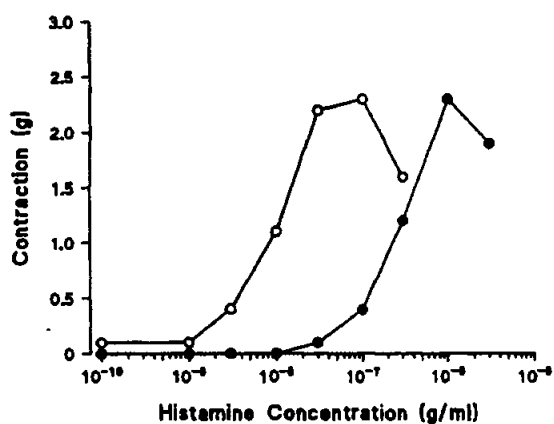
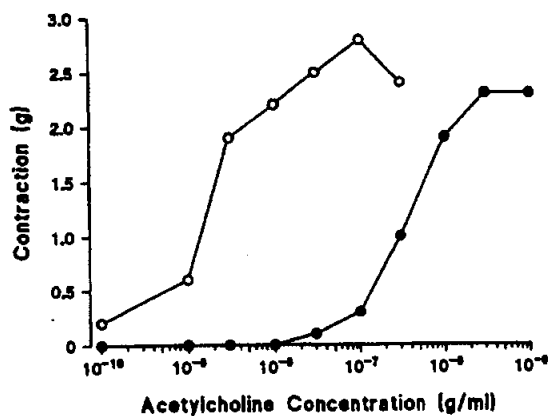


図 8. アトピンのアセチルコリン収縮への影響



⑤骨格筋に対する作用

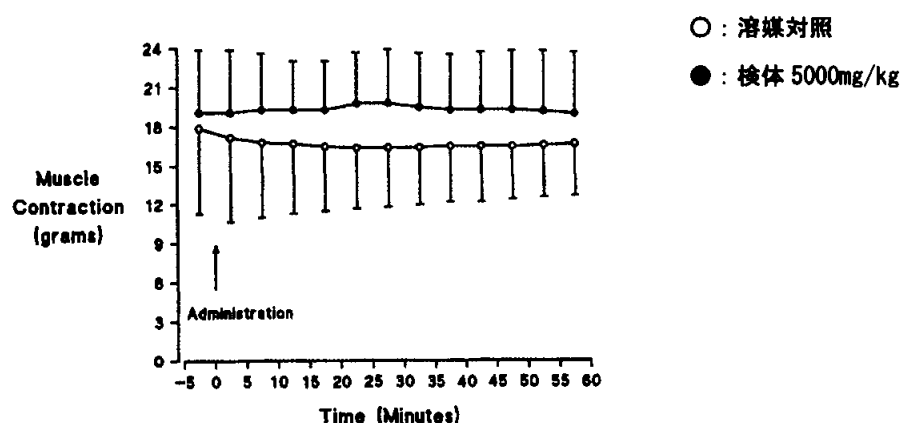
1) ラットの腓腹筋標本に対する作用

供試動物: SPF Han ウィスター系 雄ラット 体重 197~249 g、7~8 週齢、1 群 4 匹

方 法: 0.5% CMC 水溶液に検体を懸濁させ、0、5000 mg/kgの用量でウレタン麻酔下の動物に十二指腸内投与し、投与 5 分前から投与 60 分後まで、坐骨神経で惹起した腓腹筋収縮を 5 分間隔で測定した。さらに、血圧と心拍数を測定した。

結 果: 結果を図 9 に示す。 検体に起因する筋収縮の変化は認められなかった。血圧と心拍数にも影響は認められなかった。

図 9



⑥血液に対する作用

1) ラットの血液に対する作用(溶血作用)

供試動物: SPF Han ウィスター系雄ラット 体重 284~345 g、10 週齢、1 群 2 匹

方 法: エタノールに溶解した検体を、0、1、10 および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でラットの眼窩静脈叢より採取した赤血球浮遊液に適用し、遠心上清の吸光度を測定した。5000 mg/kg の経口投与で 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に達することが報告されているので、この濃度を最大とした。

結 果: 結果を表 4 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASF ジャパン株式会社にある。

検体を 100 μ g/mL まで試験したが、溶血を示す OD の蒸留水に対する比率は、溶媒対照、生理食塩水と同等で、検体に起因する溶血は認められなかった。

表 4. 溶血試験結果

群	平均 OD	蒸留水に対する割合 (%)
蒸留水	0.546	100
エタノール	0.014	2.6
生理食塩水	0.020	3.7
検体 1 μ g/mL	0.013	2.4
検体 10 μ g/mL	0.015	2.7
検体 100 μ g/mL	0.014	2.6

⑦腎臓および肝臓機能に対する作用

1) ラットの腎臓および肝臓機能に対する作用

供試動物: SPF ウィスター系雄ラット 体重 221~273 g、8 週齢、1 群 6 匹

方 法: 0.5% CMC 水溶液に検体を懸濁させ、0、1000、2000 および 5000 mg/kg の用量で単回経口投与し、投与 8 および 24 時間後に採尿、投与 24 時間後に採血して以下の各種の腎臓および肝臓パラメーターを測定し、腎臓と肝臓の病理学的検査を行った。

尿検査項目: 尿量、尿 pH、グルコース、ケトン体、潜血、尿素、クレアチニン、電解質(ナトリウム、カリウム、塩素)および酵素活性(LDH、AIP、GGT、 β -N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ)

血液検査項目: クレアチニン、血漿中酵素活性(AST、ALT、LDH、AIP、GGT)

結 果: 対照群に比し統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	検査時期	用量 (mg/kg)		
		1000	2000	5000
尿検査				
尿量	8 時間	66↓	60↓	57↓
AIP	24 時間			163↑
ナトリウム	8 時間		53↓	
塩素	8 時間		57↓	
血液検査				
ALT	24 時間	80↓		82↓

統計学的手法: Dunnett の検定: ↑ ↓; $p \leq 0.05$ ↓; $p \leq 0.05$

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したものである。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

上表のように有意な変化が認められたが、検体に起因する明確な尿および血漿パラメーターの変化は認められなかった。さらに、腎臓および肝臓に肉眼的および組織学的な異常も認められなかった。

以上の結果より、摘出回腸、気管のアゴニスト収縮に非競合拮抗型の抑制が高濃度 (10^{-5} g/mL) でのみ認められた。ラットにおける代謝試験において、500 mg/kg (ラット慢性毒性試験の無毒性量=36 mg/kg の 10 倍以上の投与量) 投与時の最高血漿中濃度は $<0.4 \times 10^{-5}$ g/mL であることから、これらの抑制がリスク評価の上で問題となることはないと考えられる。これ以外、検体投与の影響は認められなかった。従って、本剤を大量摂取しても重篤な急性中毒を発現する可能性は低いと予想された。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 一般症状 [Irwin 変法] 雄マウス	経口投与 0.5%CMC 水溶液	0, 1000, 2000, 5000	3	-	5000	一般症状の異常なし。
自発運動量 雄マウス	経口投与 0.5%CMC 水溶液	0, 1000, 2000, 5000	4	-	5000	自発運動量の変化なし。
自発脳波 雄ラット	経口投与 0.5, 5% CMC 水溶液	0, 1000, 2000, 5000	4	-	5000	自発脳波の変化なし。
呼吸、循環器系 ウレタン麻酔 雄ラット	十二指腸内投与 0.5%CMC 水溶液	0, 5000	4	-	5000	呼吸、循環パラメーター の変化なし。
自律神経系 モルモットの 摘出気管	<i>in vitro</i> 試験 DMSO	0, 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁴ g/mL 7ゴニスト: 7セチルコリン (10 ⁻⁸ -10 ⁻³ g/mL) ヒスタミン (10 ⁻⁸ -10 ⁻⁴ g/mL) アンタゴニスト: ジフェントラミン (10 ⁻⁷ g/mL) アトロピン(10 ⁻⁷ g/mL)	4	- 7ゴニスト収縮 対7セチルコリン ≥10 ⁻⁶ g/mL 対ヒスタミン ≥10 ⁻⁶ g/mL	10 ⁻⁴ g/mL 対7セチルコリン 10 ⁻⁶ g/mL 対ヒスタミン 10 ⁻⁷ g/mL	収縮作用なし。 7ゴニスト(7セチルコリンおよびヒ スタミン)の収縮の抑制は明確 で可逆的であった。 アンタゴニストはそれぞれの7 ゴニストの濃度-反応曲線を 右方へ移動させ、最大収 縮には影響しなかった。 従って、平滑筋収縮に対 して軽度で可逆的拮抗作 用を有する。
消化器 炭末輸送能 雄マウス	経口投与 0.5%CMC 水溶液	0, 1000, 2000, 5000	2	-	5000	炭末輸送能の変化なし。
モルモットの 摘出回腸	<i>in vitro</i> 試験 DMSO	0, 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵ g/mL 7ゴニスト: 7セチルコリン (10 ⁻¹⁰ -3x10 ⁻⁷ g/mL) ヒスタミン (10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁶ g/mL) アンタゴニスト: ジフェントラミン (10 ⁻⁷ g/mL) アトロピン (10 ⁻⁸ g/mL)	2	単独作用 7ゴニスト収縮 対7セチルコリン ≥10 ⁻⁶ g/mL 対ヒスタミン ≥10 ⁻⁶ g/mL	10 ⁻⁵ g/mL 対7セチルコリン 10 ⁻⁷ g/mL 対ヒスタミン 10 ⁻⁷ g/mL	検体単独の作用なし。 7ゴニスト(7セチルコリンおよびヒ スタミン)の収縮の抑制は明確 で可逆的であった。 アンタゴニストはそれぞれの7 ゴニストの濃度-反応曲線を 右方へ移動させ、最大収 縮には影響しなかった。 従って、平滑筋収縮に対 して軽度で可逆的拮抗作 用を有する。
骨格筋収縮 ウレタン麻酔 雄ラットの 腓腹筋標本	十二指腸内投与 0.5%CMC 水溶液	0, 5000	4	-	5000	検体に起因する腓腹筋収 縮の変化なし。
血液 雄ラットの 赤血球	<i>in vitro</i> 試験 エタノール	0, 1, 10, 100 μg/mL	2	-	10 ⁻⁴ g/mL	溶血作用なし。
腎臓、肝臓機能 雄ラット	経口投与 0.5%CMC 水溶液	0, 1000, 2000, 5000	6	-	5000	腎臓および肝臓の機能な らびに肝臓の形態学的異 常なし。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

1-9 その他の試験

- 1) クレソキシムメチルのラット血清酵素活性に対する作用 (資料 50)

試験機関:

報告書作成年: 1994 年

試験目的:

A. AIP 活性の低下に対する検討

試験項目および結果:

試験 1. 検体投与による AIP の変動について;

検体を含まない飼料を摂取していた 1 群雌雄各 5 匹の動物から採血した。その後、8000 ppm 混餌飼料を 2 週間投与し、再度採血して AIP を測定した。

検体投与の AIP に対する影響は次表に示す。

表 1. 検体投与による AIP の変動およびその構成 (雌雄各 5 匹の平均値±標準偏差)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

	雄動物		雌動物		総平均
	腸 AIP	肝臓/骨 AIP	腸 AIP	肝臓/骨 AIP	
検体投与前採血試料 (U/1)	117.4±56.7	140.2±16.8	141.0±23.8	66.0±16.2	116.1
検体投与後採血試料 (U/1)	45.2±25.8	138.4±14.0	66.2±11.5	58.8±11.4	77.1
投与後/投与前 (%)	36.2±14.8	99.0±4.9	48.7±14.9	93.4±27.8	66

検体投与により AIP は全体として約 66%に低下し、これは投与後 36.2~48.7%に低下した「腸 AIP」によるものであった。肝臓/骨 AIP には検体投与による低下はほとんど認められなかった。

試験 2. 検体投与による AIP 変動に対する脂肪あるいは炭水化物添加の影響について:

表 2. AIP 変動に対する脂肪あるいは炭水化物添加の影響 [測定値 (U/1)]

試験群	動物数	給餌飼料	検体投与	総 AIP	腸 AIP	肝臓/骨 AIP	
A I	0	10	通常飼料	無投与	243(100)	165(100)	78(100)
	1	5	絶食	無投与	138(58)	40(24)	98(126)
	2	5	通常飼料	投与	193(81)	115(70)	78(100)
	3	5	絶食	投与	121(51)	33(20)	88(113)
A II	0	10	通常飼料	無投与	219(100)	144(100)	75(100)
	1	5	絶食	無投与	129(59)	39(27)	90(120)
	2	5	通常飼料	投与	183(84)	109(76)	74(99)
	3	5	絶食	投与	108(49)	37(26)	71(95)
B I	0	5	通常飼料	無投与	303(100)	221(100)	82(100)
	1	5	通常飼料+ 油	無投与	447(148)	332(150)	115(140)
	2	5	通常飼料	投与	233(77)	108(49)	125(152)
	3	5	通常飼料+ 油	投与	332(110)	211(95)	121(148)
B II	0	5	通常飼料	無投与	238(100)	169(100)	69(100)
	1	5	通常飼料+ 糖	無投与	189(79)	72(43)	117(170)
	2	5	通常飼料	投与	190(80)	97(57)	93(135)
	3	5	通常飼料+ 糖	投与	220(92)	120(71)	100(145)

注:括弧内の値はそれぞれの試験群の 0 群(通常飼料のみ給餌)の値に対する比率を示す。

試験群 A I、II の結果にみられるように、総 AIP は検体投与に関係なく、絶食により低下し、この低下は腸 AIP の顕著な低下によるもので、肝臓/骨 AIP に対する絶食の影響は認められなかった。絶食動物に検体を投与した場合の低下は検体無投与の絶食動物の値とほぼ同じであった。

ラットにおいて、摂食後腸から脂肪が吸収されて AIP 活性が増加することが知られており、本試験においても試験群 B I にみられるように、脂肪(油)添加飼料の給餌により

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

総 AIP は顕著に増加し、このため、油添加飼料を給餌した動物に検体を投与しても AIP は通常飼料のみを給餌した動物の値より低くなることはなかった。

炭水化物(糖)添加飼料を給餌した試験群 BII では、糖添加による効果あるいは検体投与による影響は結果が変動していることから明らかではなかった。

試験 3. 検体投与動物および無投与動物からの血清混合による AIP 変動について:

表 3. 混合血清中の AIP の変動 [測定値(U/l)]

試験群	動物数	給餌飼料	検体投与	総 AIP	腸 AIP	肝臓/骨 AIP	
AI	1	5	絶食	無投与	155	40	115
	3	5	絶食	投与	139	34	105
	混合血清(1+3)			実測値	146	36	110
				理論値*	147	37	110
AI	0	10	通常飼料	無投与	254	164	90
	2	5	通常飼料	投与	202	114	88
	混合血清(0+2)			実測値	226	139	87
				理論値*	228	139	89
BI	1	5	通常飼料+ 油	無投与	415	326	89
	3	5	通常飼料+ 油	投与	312	226	86
	混合血清(1+3)			実測値	364	272	92
				理論値*	364	276	88
BII	1	5	通常飼料+ 糖	無投与	171	72	99
	3	5	通常飼料+ 糖	投与	213	122	91
	混合血清(1+3)			実測値	191	96	95
				理論値*	192	97	95

理論値: 各試験群における混合前の各測定値の平均値(抑制物質がないと推定したときの予測値)。

検体投与、無投与動物の血清を混合しても理論値との間に差は無く、検体投与により血清中に何らかの抑制物質が生成している可能性は認められなかった。

試験 4. 検体投与による腸 AIP 濃度への影響について:

検体投与による腸 AIP 濃度への影響について、検体無投与ラットおよび検体投与ラットそれぞれ 5 例から摘出した小腸の腸 AIP 濃度を比較した。

表 4. 検体投与による腸 AIP への影響

	AIP 濃度		蛋白濃度 (mg/mL)	腸 AIP (U/mg 蛋白)
	U/g 湿重量	U/g		
検体無投与群	158.9U/1.609g	98.76	2.80	19.6
検体投与群	197.4U/2.013g	98.06	2.74	20.6

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 4 にみられるように、小腸における腸 AIP 濃度は、検体の投与あるいは無投与による差はなく、検体投与による腸 AIP 濃度の低下は認められなかった。

B. ALT 活性の低下に対する検討

試験 5. 検体投与による ALT 補酵素の再活性化阻害について:

表 5 の結果にみられるように、PP の添加により ALT に賦活が認められ、その程度は検体の投与あるいは無投与に係わらず同程度であったことから、検体あるいはその代謝物が ALT の補酵素による再活性化を阻害することはなかった。

表 5. 検体投与による ALT 補酵素の再活性化阻害 [測定値 (U/l)]

試験群	動物数	給餌飼料	検体投与	PP 添加		
				無添加	添加	
A I	0	10	通常飼料	無投与	31.4	29.9
	1	5	絶食	無投与	17.5	18.5
	2	5	通常飼料	投与	29.1	30.7
	3	5	絶食	投与	20.0	18.9
A II	0	10	通常飼料	無投与	30.5	32.2
	1	5	絶食	無投与	21.3	23.2
	2	5	通常飼料	投与	26.9	26.1
	3	5	絶食	投与	21.0	22.1
B I	0	5	通常飼料	無投与	45.1	45.1
	1	5	通常飼料+ 油	無投与	34.9	37.0
	2	5	通常飼料	投与	31.8	34.5
	3	5	通常飼料+ 油	投与	36.0	39.6
B II	0	5	通常飼料	無投与	31.6	34.9
	1	5	通常飼料+ 糖	無投与	33.3	35.4
	2	5	通常飼料	投与	29.3	32.8
	3	5	通常飼料+ 糖	投与	35.8	38.1

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

試験 6. 検体投与による ALT 変動に対する脂肪あるいは炭水化物添加の影響について:

上記「表 5」にみられるように、「試験 2」で得られた AIP 活性に関する試験の結果と同様に、ALT は検体投与に関係なく、絶食により低下した。この低下は検体投与によりさらに低下することはなかった。検体無投与においては、脂肪(油)あるいは炭水化物(糖)の添加試験群と無添加試験群の間では ALT 活性はほぼ同程度であった。検体を投与した場合には、それらを添加することで ALT がわずかに増加する傾向がみられた。

C. 血清中の血糖、コレステロール、トリグリセリド濃度に対する影響

試験 7. 検体投与による血糖、コレステロール、トリグリセリド濃度に対する影響

表 6 にみられるように、検体投与群の血糖値あるいはトリグリセリド値の低下が、それぞれ糖あるいは油の添加の有無に係わらずみられた他は、検体投与による影響は認められなかった。

表 6. 検体投与による血糖、コレステロール、トリグリセリド濃度に対する影響

[測定値 (mmol/L)]

試験群	動物数	投与	検体投与	血糖	コレステロール	トリグリセリド	
B I	0	5	通常飼料のみ投与	無投与	8.4(100)	1.68(100)	2.33(100)
	1	5	通常飼料+ 油	無投与	9.3(110)	1.81(107)	2.10(90)
	2	5	通常飼料のみ投与	投与	7.8(92)	1.82(108)	2.01(86)
	3	5	通常飼料+ 油	投与	8.8(104)	1.88(111)	1.72(73)
B II	0	5	通常飼料のみ投与	無投与	8.3(100)	1.98(100)	1.80(100)
	1	5	通常飼料+ 糖	無投与	7.6(92)	1.83(92)	3.11(172)
	2	5	通常飼料のみ投与	投与	7.7(93)	2.10(106)	2.26(126)
	3	5	通常飼料+ 糖	投与	7.3(88)	1.98(100)	2.28(127)

注:括弧内の値はそれぞれの試験群の 0 群(通常飼料のみ投与)の値に対する比率を示す。

以上、各種試験の結果、AIP および ALT は飼料摂取の有無により顕著に変動することが確認された。絶食動物における両酵素の低下は検体投与による低下に比して極めて大きく、また AIP

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

の低下は腸 AIP の低下によるものであり、検体投与による肝臓/骨 AIP の低下はほとんど認められなかった。

ヒトおよび動物において、AIP および ALT の増加は、肝臓機能障害/損傷に対する鋭敏な指標である。即ち、肝臓由来の AIP の増加は肝臓内外における胆汁うっ滞による AIP の誘導を反映し、ALT は毒性/感染物質が原因で、実質細胞が障害を受けたり、あるいは壊死して直接漏洩するために増加する。本試験において、検体投与による両酵素の有意な増加は認められなかったことから、検体には肝臓毒性作用がないことを示唆している。また、ALT の補酵素に対する検体の影響も認められなかった。

これらのことから、混餌投与毒性試験において観察された検体投与によるラットの AIP および ALT の低下は、動物の飼料摂取・吸収のわずかな差によるものと推定され、このわずかな差は体重、体重増加あるいは摂餌量に大きな影響を与えていないことから、両酵素の活性低下は検体の有害作用によるものとは考えられない。さらに、ラットで実施された他の混餌投与毒性試験において、AIP および ALT の低下を引き起こすような病理学的所見も認められていない。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

2) 3週間混餌投与によるラットの肝酵素活性に及ぼす影響 (補足資料 6)

試験機関:

(GLP)

報告書作成年: 1996年

検体純度:

試験動物: 若齢ウィスター系 Chbb:THOM ラット、開始時 88 日齢、1 群雌雄各 10 匹

投与期間: 3 週間 (1993 年 11 月 22 日~1993 年 12 月 13 日)

投与方法: 検体を 0、200 および 16000 ppm の濃度で基礎飼料に直接混入し、3 週間にわたって混餌投与した。検体を混入した飼料は投与開始前に 1 回調製した。投与量は、既に実施済みの慢性毒性試験の結果を基に同試験の最高用量および最低用量と同じ用量を設定した。

試験項目および結果:

一般状態および死亡率: 一般状態および生死を毎日観察した。

検体投与に関連のある一般状態の異常はなく、死亡例も認められなかった。

体重変化: 投与 0、7、14 および 21 日に体重を測定した。

16000 ppm 投与群雄の体重増加が有意に抑制された(対照群の約 83%)が、同群の雌および 200 ppm 投与群の雌雄とも、検体投与に関連のある体重の変化はなかった。

摂餌量および飲水量: 摂餌量は 1 週間に 1 回測定し、飲水量は毎日目視で検査した。

摂餌量および飲水量とも、検体投与に起因する変化は認められなかった。

検体摂取量: 投与期間中の群平均検体摂取量は以下の通りであった。

試験群	濃度 (ppm)	検体摂取量 (mg/kg/日)		
		雄	雌	全動物
1	200	13	15	14
2	16000	973	1186	1080

肝酵素活性の測定: 投与終了後、全動物の肝臓の以下の項目について検査した。

- γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)
- シアン耐性パルミトイル-CoA-酸化酵素 (PAL CoA)
- チトクローム P450 含量 (P450)
- ラウリン酸 ω-酸化酵素 (OM-OX)
- ペントキシレゾルフィン-デペンチラーゼ (PROD)
- エトキシレゾルフィン-デエチラーゼ (EROD)
- グルタチオン

測定結果を次表にまとめた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表. 肝酵素測定結果

測定項目	雄		雌	
	試験群 1 (200ppm)	試験群 2 (16000ppm)	試験群 1 (200ppm)	試験群 2 (16000ppm)
P450	92.8	123.2†	107.3	125.2
GGT	97.7	481.9†	83.4	127.1
PAL CoA	81.8	88.9	97.8	78.2
グルタチオン	87.0 _u	96.0	99.7	109.8
OM-OX	107.1	155.3	108.9	129.5
PROD	71.4	200.0†	85.2	284.0
EROD	62.5	94.4	95.0	159.8

GGT: γ -グルタミルトランスフェラーゼ PAL CoA: シアン耐性パルミトイル-CoA-酸化酵素

P450: チトクローム P450 含量

OM-OX: ラウリン酸 ω -酸化酵素

PROD: ペントキシレゾルフィン-デペンチラーゼ

EROD: エトキシレゾルフィン-デエチラーゼ

統計学的手法: GGT, PAL CoA: Anova + Dunnett 検定, グルタチオン: Dunnett 検定,

P450, OM-OX, PROD, EROD: Wilcoxon 検定

†↓; $p \leq 0.05$, †_u; $p \leq 0.01$

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。

16000 ppm の雄においてチトクローム P450 含量がわずかに有意に増加し、PROD 活性の亢進も確認され、フェノバルビタール誘導型の P450 アイソザイム 2B1 の活性の亢進が示唆された。統計学的には有意ではないが、雌でも同様の傾向が認められた。EROD 活性の亢進がないことから、3-メチルコラントレン型 P450 アイソザイム 1A1 の誘導もない。

ペロキシゾーム増殖性物質により誘導される PAL CoA および OM-OX 活性に対しては検体投与による影響はなかった。グルタチオンに変化がないことから、反応性代謝物の生成および酸化ストレスの誘導もないことを示唆している。

GGT の増加は検体に対する適応反応としてのミクロソーム酵素誘導に起因していると考えられる。

200 ppm 群では雌雄いずれにおいても全ての測定項目で検体投与に関連のある変化は認められなかった。

結論として、検体の 16000 ppm (約 1080 mg/kg/日) 投与により雌雄でフェノバルビタール型の肝薬物代謝酵素の誘導が観察されたが、200 ppm (約 14 mg/kg/日) 投与では如何なる作用もないことが確認された。

3) ラットを用いた反復経口投与後の尿中への酵素排泄

(追加補足資料 3)

試験機関:

(GLP)

報告書作成年: 1997 年

検体純度:

試験動物: ウィスター系ラット (Chbb:THOM (SPF))、1 群雌雄各 10 匹 (開始時 11 週齢)

投与期間: 2 週間 (1996 年 11 月 4 日 ~ 1996 年 11 月 20 日)

投与方法: 検体 0 および 16000 ppm の濃度で飼料に混入し、2 週間にわたって随時摂食させた。混餌は 1 回のみ調製した。

投与量設定根拠:

試験項目および結果:

一般状態および死亡率: 中毒症状および生死を毎日観察した。

いずれの動物の一般状態にも変化は認められず、死亡例も認められなかった。

体重変化: 投与期間中週 1 回、全動物の体重を測定した。

投与後の体重の変化を次表に示す。

投与量 (ppm)	検査時期(日)					
	雄			雌		
	0	7	14	0	7	14
16000	100	99	97↓	100	100	98

統計学的方法: Student t-test (両側): $\uparrow\downarrow$: $p \leq 0.05$ 矢印のない数値は有意差なし。
表中の数値は対照群に対する変動率 (%) を示す。

雄で、体重が投与 14 日後に有意に低下したが、雌では有意差は認められなかった。

摂餌量: 全動物の摂餌量を週 1 回測定した。

次表のように、雄では投与 7 および 14 日後、雌では投与 7 日後に摂餌量が有意に低下した。

投与量 (ppm)	検査時期(日)			
	雄		雌	
	7	14	7	14
16000	88↓	91↓	88↓	93

統計学的方法: Student t-test (両側): $\uparrow\downarrow$: $p \leq 0.01$
矢印のない数値は有意差なし。
表中の数値は対照群に対する変動率 (%) を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

検体摂取量：投与期間中の群平均検体摂取量を次表にまとめた。

投与量 (ppm)	検体摂取量 (mg/kg/day)		
	雄	雌	雌雄平均
16000	913	1138	1025

血液生化学的検査：投与終了時（投与 14 日）に全動物の眼窩静脈叢から血液を採取し、血清を用い ALT および AIP の測定を行った。

次表のように、検体投与群の雌雄とも ALT および AIP の酵素活性が約 25%低下した。

性別	雄	雌
ALT	75↓	76↓
AIP	75↓	75↓

Student t-test (両側) : ↓ ; $p \leq 0.001$

表中の数値は対照群に対する変動率 (%) を示す。

尿検査：投与終了時（投与 15 日）に、動物を代謝ケージに移し、絶食および絶水下で一夜尿を採取し、各動物の尿について、ALT および AIP、クレアチニンおよび尿量を検査した。

酵素の尿中排泄量および濃度、尿量並びにクレアチニンの尿中排泄量を次表に示す。

ALT および AIP の尿中排泄量および尿中濃度は対照群と試験群との間に差はなく、また尿量およびクレアチニンの尿中排泄量においても差は認められず、検体の腎臓への影響はなかった。

性別	用量群	尿中排泄量 (nkat/16hr)		尿中濃度 (μ kat/L)		尿量 (mL)	クレアチニン 尿中排泄量 (μ mol/16hr)
		ALT	AIP	ALT	AIP		
雄	対照群	0.02	18.79	0	1.07	4.4	73.1
	16000ppm	0.06	24.69	0	1.43	4.9	62.8
雌	対照群	0.17	25.22	0.02	3.08	2.1	47.7
	16000ppm	0.16	25.18	0.02	2.51	2.5	46.8

統計学的方法 : Student t-test (両側) : 有意差なし

以上の結果から、本剤のラットに対する 2 週間混餌投与による尿中への酵素排泄に関する試験における影響として、16000 ppm で血清 ALT および AIP が約 25%低下したが、これら酵素の尿中排泄量あるいは濃度並びに尿量およびクレアチニンの排泄量のいずれにおいても対照群との間に差は認められなかった。したがって、この低下は検体投与に起因する腎毒性あるいは腎機能への影響によるものではないと考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

4) ラットを用いた飼料混入投与による変異肝細胞巢イニシエーション活性試験

(補足資料 2)

試験機関:

(GLP)

報告書作成年: 1995 年

検体純度:

試験動物: ウィスター系 Chbb:THOM ラット、開始時 8 週齢、1 群雌雄各 10 匹

投与期間: 2 ヶ月(1994 年 5 月 2 日~7 月 14 日)

投与方法:

試験群は以下の通りである。

試験群	イニシエーション (単回強制経口投与)	プロモーション (8 週間)
0	溶媒 (0.5% CMC 水溶液)	基礎飼料
1		PB 500 ppm
2	陽性対照(NNM) 25 mg/kg	基礎飼料
3		PB 500 ppm
4	検体の原体 2000 mg/kg	基礎飼料
5		PB 500 ppm
6	検体の純品 2000 mg/kg	基礎飼料
7		PB 500 ppm

注: 投与液を分析した結果、実際の投与量は設定用量より高く、平均用量は陽性対照物質 28 mg/kg、検体の原体は 2388 mg/kg、および純品は 2508 mg/kg であった。

投与量設定根拠:

試験項目および結果:

一般状態および死亡率: イニシエーション後、一般状態および生死を毎日観察した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

投与による異常所見は認められなかった。また、雌雄いずれの投与群にも検体投与による死亡はなかった。試験群 4 (検体の原体 2000 mg/kg、基礎飼料) の雄および試験群 1 (溶媒、PB 投与) の雌各 1 例が肝臓部分切除の影響で、それぞれ試験 5 および 6 日に死亡した。

体重変化：体重はイニシエーション時から週 1 回測定した。

体重および体重増加に検体投与の影響はみられなかった。

摂餌量および食餌効率：プロモーション期間中に週 1 回個体別摂餌量を測定し、食餌効率も算出した。

投与に関連のない偶発的な有意な変動が食餌効率に散見されたのみであった。

肝臓重量：投与終了後、動物を屠殺し、肝臓重量を測定した。

肝臓重量の溶媒対照群に対する比率を次表に示す。

試験群			雄			雌		
			最終体重	絶対重量	相対重量	最終体重	絶対重量	相対重量
0	溶媒	基礎飼料	100	100	100	100	100	100
1	(0.5%CMC 水溶液)	PB 500ppm	100	97	100	100	100	100
2	陽性対照 (NNM)	基礎飼料	100	96	96	96	103	107
3	25mg/kg	PB 500ppm	102	120	118†	99	102	102
4	検体の原体	基礎飼料	100	91	91	96	101	105
5	2000mg/kg	PB 500ppm	101	109	108	101	107	106†
6	検体の純品	基礎飼料	98	92	93	94	101	107
7	2000mg/kg	PB 500ppm	103	112	109	95	88	97

統計学的手法：Dunnett 検定 (両側) †; $p \leq 0.05$, †; $p \leq 0.01$ 矢印のない数値は有意差なし。
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。

群 3 (陽性対照群で PB 投与群の雄) および群 5 (検体の原体投与群で PB 投与群の雌) で肝臓相対重量の増加が認められた。

病理学的検査：投与終了後、動物を肉眼的病理検査に供し、特に肝臓について詳細に観察した。

肝臓の HE 染色標本と同時に胎盤型グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST-P) 染色標本について病理組織学的検査を実施した。検体あるいは対照物質を投与した群ごとに GST-P 陽性肝細胞数を定量解析 (肝臓組織 1 cm² あたりの細胞数) した。但し、溶媒対照群と検体投与群の間に差が認められなかったため、試験群 6 および 7 (「純品」投与群) の標本作製および評価は実施しなかった。

検体投与群雌雄における変異肝細胞数および GST-P 陽性細胞数は溶媒対照群とほとんど差がなく、1 cm² 当りの肝臓組織中細胞数の平均値は溶媒対照群より少なかった。したがって、検体にイニシエーション作用の示唆は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

一方、陽性対照群では変異肝細胞巢および GST-P 陽性細胞巢はほぼ全例で観察され、雄では 100 個以上、雌では 50 個まで観察され、明らかなイニシエーション作用が認められた。

GST-P 陽性細胞巢の多くは HE 染色で好酸性細胞に相当し、明細胞に相当するものはわずかであった。すべての好塩基性細胞および多くの明細胞は GST-P 陰性であった。

肝細胞巢の発生を下表にまとめた。

試験群			雄				雌			
			細胞巢を有する動物数		GST-P 陽性細胞巢数		細胞巢を有する動物数		GST-P 陽性細胞巢数	
			変異肝細胞巢	GST-P 陽性	検査肝臓当り最大	肝臓 1cm ² 当り	変異肝細胞巢	GST-P 陽性	検査肝臓当り最大	肝臓 1cm ² 当り
0	溶媒対照	基礎飼料	3/10	8/10	3	0.23	2/10	6/10	3	0.17
1	(CMC)	PB 500ppm	3/10	8/10	10	0.46	1/9	5/9	1	0.11
2	陽性対照 (NNM)	基礎飼料	8/10	10/10	100	nm	10/10	10/10	50	nm
3		PB 500ppm	10/10	10/10	>100	nm	10/10	10/10	50	nm
4	検体の原体 2000mg/kg	基礎飼料	1/9	4/9	3	0.12	2/10	4/10	2	0.12
5		PB 500ppm	4/10	7/10	3	0.25	4/10	5/10	1	0.11

nm : 測定せず

肝臓における前癌病変に関連する主要な所見(各群 10 例中の発生頻度)を次表に示す。

検体の原体/基礎飼料投与群(群 4)では溶媒対照/基礎飼料(群 0)と主要所見の発生頻度に差は認められなかった。肝細胞肥大の増加は PB 投与に起因していると考えられる。一方、陽性対照群は変異細胞巢の顕著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 BASF ジャパン株式会社にある。

所見 \ 群		0	1	2	3	4	5
		溶媒 (CMC)		陽性対照 (NNM)		検体原体	
		基礎飼料	PB	基礎飼料	PB	基礎飼料	PB
雄	変異細胞巢	3	3	8	10	1	4
	好塩基性変異細胞巢	2	0	6	1	1	0
	明細胞性変異細胞巢	1	0	3	2	0	1
	好酸性変異細胞巢	0	3	5	10	0	3
	肝細胞肥大	0	10	1	10	0	10
雌	変異細胞巢	2	1	10	10	2	4
	好塩基性変異細胞巢	1	0	5	1	1	0
	明細胞性変異細胞巢	0	1	8	1	1	0
	好酸性変異細胞巢	1	0	4	10	0	4
	肝細胞肥大	0	9	0	10	0	10

結論として、本試験の条件下では、検体に腫瘍イニシエーション作用はないものと判断された。

5) ラットを用いた飼料混入投与による変異肝細胞巢プロモーション活性試験

(追加補足資料 1)

試験機関:

報告書作成年: 1997 年

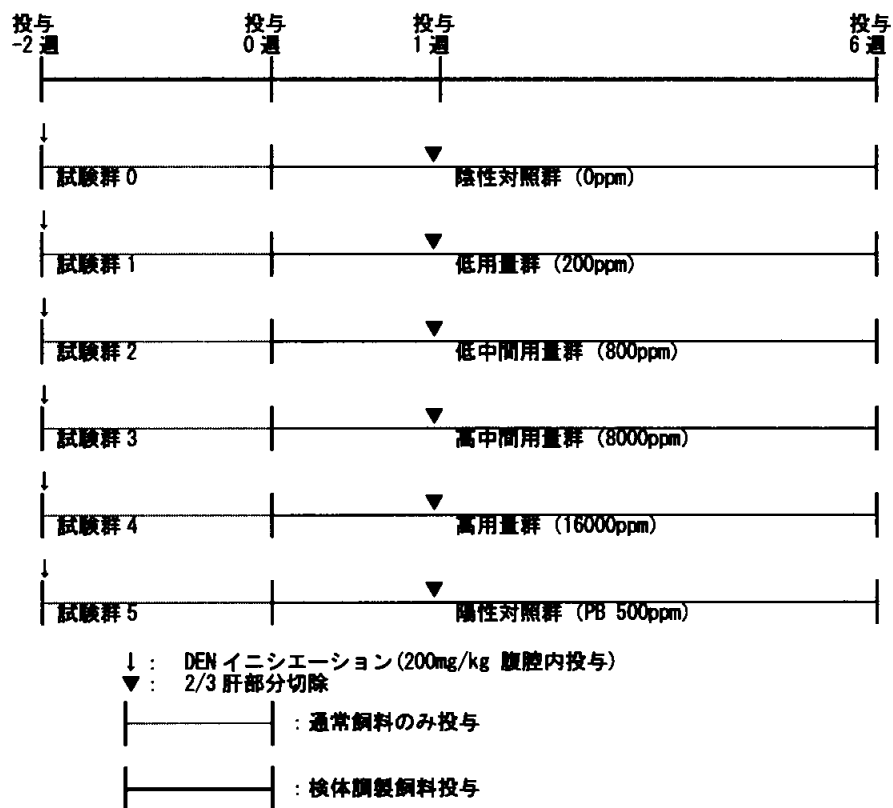
検体純度:

試験動物: フィッシャー系ラット、1 群雄 16 匹、(開始時 8 週齢)

投与期間: 6 週間(1996 年 10 月 8 日~11 月 20 日)

投与方法:

試験群の構成を以下に示した。



投与量設定根拠:

試験項目および結果:

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

一般状態および死亡率；全動物について調製飼料投与期間中、一般状態および生死を毎日観察した。

一般状態および死亡率において、検体投与に起因する異常は認められなかった。但し、肝部分切除時の技術的失敗により、表 1 の例数が死亡し、これらは試験から除外した。

表 1. 死亡例数

試験群 (投与量 ppm)	死亡例数
0: 陰性対照	0
1: 検体 200	2
2: 検体 800	3
3: 検体 8000	2
4: 検体 16000	2
5: 陽性対照 (PB 500)	2

体重変化；投与期間中、週 1 回および投与終了時の剖検直前に体重を測定した。

投与開始後の各週における体重の変化を表 2 に示す。

表 2. 体重の変化

試験群 (投与量 ppm)	検査時期 (投与週)						
	0	1	2	3	4	5	6
1: 検体 200	100	99	99	99	98	99	99
2: 検体 800	100	99	99	100	99	99	100
3: 検体 8000	100	99	98	99	98	98	98
4: 検体 16000	100	98	96	96	96	96	97
5: 陽性対照 (PB 500)	100	103	104†	104†	103	102	103†

統計学的方法：Dunnet 多重比較検定：†: $p \leq 0.05$

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

検体投与による体重への影響は認められなかった。PB (陽性対照) 群で有意な体重増加が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

摂餌量；投与期間中、週1回3日分のケージ別摂餌量を測定した。

投与開始後の各週における摂餌量は表3に示す。

表3. 摂餌量

試験群 (投与量 ppm)	検査時期(調製飼料投与週)					
	1	2	3	4	5	6
1: 検体 200	100	82	100	100	102	102
2: 検体 800	99	86	100	99	102	101
3: 検体 8000	95	86	98	103	106	103
4: 検体 16000	100	70	103	106	106	105
5: 陽性対照 (PB 500)	119††	92	109†	106	104†	105†

統計学的方法：Dunnet 多重比較検定：†: $p \leq 0.05$, ††: $p \leq 0.01$

表中の数値は対照群に対する変動率(%)

検体投与による摂餌量への影響は認められなかった。PB (陽性対照) 群で有意な摂餌量の増加が認められた。

検体摂取量；投与期間中の検体摂取量は表4のとおりであった。

表4. 検体摂取量

試験群 (投与量 ppm)	1 (200)	2 (800)	3 (8000)	4 (16000)	5 (PB500)
検体摂取量 (mg/kg/day)	10.72	42.47	430.6	886	27.99

肉眼的病理検査；投与期間終了後、全生存動物について、胸腔および腹腔内の諸臓器について肉眼的病理検査を行った。

表5に示すように、8000、16000 ppm 群および PB 500 ppm 群の全例に有意な肝臓の肥大が認められた。800 ppm 群では2例に肝臓の肥大が観察されたが有意ではなく、200 ppm 群ではいずれの動物にも肥大は認められなかった。

表5. 肝臓の肥大

試験群 (投与量 ppm)	0 (0)	1 (200)	2 (800)	3 (8000)	4 (16000)	5 (PB500)
検査動物数	16	14	13	14	14	14
肥大動物数	0	0	2	14†	14†	14†

統計学的方法：Fisher の直接確率検定：†: $p \leq 0.01$

臓器重量；投与期間終了時の全生存動物について、肝臓重量を測定し、対体重比を算出した。

各群における統計学的有意差の認められた測定結果は表6のとおりで、検体の投与量の増加に伴い肝臓の重量および対体重比の有意な増加が認められた。PB 群の増加は顕著であった。

表 6. 肝臓重量

試験群 (投与量 ppm)	1 (200)	2 (800)	3 (8000)	4 (16000)	5 (PB500)
体重					103↑
肝臓重量		108↑↑	126↑↑	129↑↑	143↑↑
対体重比		109↑↑	129↑↑	133↑↑	139↑↑

統計学的方法 : Dunnet 多重比較検定: ↑: $p \leq 0.05$, ↑↑: $p \leq 0.01$

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

変異肝細胞巣 ; 抗 Glutathione-S-transferase P (GST-P) 抗体を用いた免疫組織化学的染色標本について 0.0314 mm² 以上の GST-P 陽性細胞小増殖巣の数 (小増殖巣数/cm²) および面積 (mm²/cm²) をコンピューター処理画像解析装置で測定し、統計学的に解析した。

変異肝細胞巣についての試験の結果を表 7 に示す。

表 7. 肝細胞小増殖巣

試験群	投与量 (ppm)	検査 動物数	GST-P 陽性細胞小増殖巣		
			細胞巣数 (cm ² 当り)	細胞巣面積 (mm ² /cm ²)	
0	陰性対照	-	16	12.01	1.16
1	検体	200	14	15.08	1.48
2		800	13	14.45	1.39
3		8000	14	18.48↑	1.71↑
4		16000	14	22.17↑	1.99↑
5	陽性対照 (PB)	500	14	17.96↑	2.48↑

統計学的方法 : Dunnet 多重比較検定: ↑: $p \leq 0.01$

8000、16000 ppm 群および PB 500 ppm 群では GST-P 陽性小増殖巣の数および面積が共に有意に増加したが、200 および 800 ppm 投与群での増加は陰性対照群と同等であった。

以上、本試験の結果、DEN によるイニシエーション後の検体投与では、8000 ppm 以上の高用量投与で GST-P 陽性小増殖巣の数および面積の有意な増加が認められ、検体が明らかに肝発がんプロモーション作用を有することが示唆された。800 ppm 以下の低用量投与群ではプロモーション活性は認められなかった。

陽性対照物質 (PB) 500 ppm 投与により GST-P 陽性小増殖巣は明らかに増加し、本試験がプロモーション活性検索の方法として妥当であったことを示している。

6) 若齢ラットにおける3週間混餌投与S期反応試験

(補足資料3)

試験機関:

(GLP)

報告書作成年: 1994年

試験目的:

検体純度:

試験動物: ウィスター系 Chbb:THOM 雄ラット、開始時64日齢、1群5匹

投与期間: 3週間(1993年11月18日~1993年12月9日)

投与方法: 検体を0、200および16000ppmの濃度で直接基礎飼料に混入し、3週間にわたって混餌投与した。検体を混入した飼料は、投与開始前に1回調製した。

剖検の1週間前に BrdU (5-プロモ-2'-デオキシウリジン)を充填した浸透圧ミニポンプを皮下に埋入した。

用量設定根拠:

試験項目および結果:

一般状態および死亡率: 一般状態および生死を毎日観察し、さらに詳細な臨床観察を1週間に1回行った。

一般状態に検体投与に関連のある異常および死亡動物は観察されなかった。

体重変化: 1週間に1回測定した。

いずれの群においても検体投与の影響はなかった。

摂餌量および飲水量: 摂餌量は毎週測定し、飲水量は毎日目視で検査した。

いずれの群においても検体投与の影響はなかった。

検体摂取量: 投与期間中の群平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量(ppm)	200	16000
検体摂取量(mg/kg/日)	15	1140

臓器重量: 肉眼的病理検査時に肝臓重量を測定し、その対体重比を算出した。

肝臓重量に検体投与の影響はなかった。

肉眼的病理検査: 試験終了時に全動物について剖検を実施した。

いずれの群においても検体投与の影響はなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

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、肝臓の外側右葉、内側右葉および尾状突起の病理標本を作製し、鏡検した。

いずれの群においても検体投与の影響はなかった。

細胞増殖検査(S期反応)：

表1~3にその結果を示す。

表1：各葉における標識率(zone 1)^a

投与量(ppm)	0	200	16000
内側右葉	2.8	3.8	10.5 [↑]
外側右葉	3.0	4.0	10.8 [↑]
尾状突起	5.0	5.6	12.3 [↑]
群平均値	3.6	4.5	11.2 [↑]

^a 各標本 1100 細胞、動物当り 3300 細胞を計測。5 動物の平均値。
統計学的手法：WILCOXON 検定 ↑； $p \leq 0.05$ 、[↑]； $p \leq 0.01$

表2：各葉における標識率(zone 1、2 および一部 zone3)^b

投与量(ppm)	0	200	16000
内側右葉	2.5	3.1	7.0 [↑]
外側右葉	2.7	3.2	7.2 [↑]
尾状突起	4.1	4.5	7.8 [↑]
群平均値	3.1	3.6	7.3 [↑]

^b 各標本 2200 細胞、動物当り 6600 細胞を計測。5 動物の平均値。
統計学的手法：WILCOXON 検定 ↑； $p \leq 0.05$ 、[↑]； $p \leq 0.01$

表3：対照群に対する標識率の増加幅(%)の葉間の相違(表1から作成)

投与量(ppm)	0	200	16000
内側右葉	100	136	375
外側右葉	100	133	360
尾状突起	100	112	246

16000 ppm 群で、細胞増殖性の統計学的に有意な増加が、肝小葉内(zone1、2 および一部 zone 3)、特に zone 1 で観察された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

肝葉間の比較ではすべての群に共通して、尾状突起の細胞増殖性が最も高く、内側右葉と外側右葉ではごく軽度の差しかなかった(表 1 および 2)。対照群と 16000 ppm 群の比較では内側右葉および外側右葉の細胞増殖性は尾状突起より明らかに亢進していた。

以上の結果から、ラットに検体を 0、200 および 16000 ppm の用量で 3 週間混餌投与し、肝細胞増殖性(S 期反応)に及ぼす影響を検索したところ、16000 ppm 群で細胞増殖性の統計学的に有意な増加が肝小葉内、特に zone 1 で観察された。200 ppm 群では細胞増殖性に影響は観察されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

7) 16 ヶ月齢ラットにおける 3 週間混餌投与 S 期反応試験

(補足資料 4)

試験機関:

(GLP)

報告書作成年: 1994 年

試験目的:

検体純度:

試験動物: 老齢ウイスター系 Chbb:THOM 雄ラット、開始時 16 ヶ月齢、1 群 5 匹

投与期間: 3 週間(1994 年 4 月 25 日~1994 年 5 月 16 日)

投与方法: 検体を 0、200 および 16000 ppm の濃度で直接基礎飼料に混入し、3 週間にわたって混餌投与した。検体を混入した飼料は投与開始前に 1 回調製した。

剖検の 1 週間前にプロモデオキシウリジン (BrdU) を充填した浸透圧ミニポンプを皮下に埋入した。

用量設定根拠:

試験項目および結果:

一般状態および死亡率: 一般状態および生死を毎日観察し、さらに詳細な臨床観察を 1 週間に 1 回行った。

一般状態に検体投与に関連のある異常および死亡動物は観察されなかった。

体重変化: 投与 0 日および 21 日に体重を測定した。

いずれの群においても検体投与の影響はなかった。

検体摂取量: 投与期間中の群平均検体摂取量は以下のように推測*される。

投与量 (ppm)	200	16000
検体摂取量 (mg/kg/日)	9	700

* 本試験においては摂取量の測定は行っていないことから、当該検体摂取量はラットの長期毒性試験(資料 25-2)における同月齢のラットの摂取量から推測した値である。

臓器重量: 肉眼的病理検査時に肝臓重量を測定し、その対体重比を算出した。

肝臓重量に検体投与の影響はなかった。

肉眼的病理検査: 試験終了時に全動物について剖検を実施した。

いずれの群においても検体投与の影響はなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

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、肝臓の外側右葉、内側右葉および尾状突起の病理標本を作製し、鏡検した。

いずれの群においても検体投与の影響はなかった。

細胞増殖検査(S期反応):

表 1 にその結果を示す。

表 1. 肝臓の各葉の標識率^a

投与量 (ppm)	0	200	16000
内側右葉	3.51	3.69 (105)	11.53 (329)↑
外側右葉	3.73	3.47 (93)	10.76 (289)↑
尾状突起	3.67	4.36 (112)	9.76 (266)↑
群平均値	3.64	3.84 (105)	10.68 (293)↑

()内の数値は対照群に対する比率%

^a 各標本 1100 細胞、動物当り 3300 細胞を計測。5 動物の平均値。

統計学的手法: WILCOXON 検定 ↑: $p \leq 0.01$

16000 ppm 群の検査したすべての葉で、門脈周囲 zone 1 (Rappaport) の肝細胞増殖性に統計学的に有意な増加が観察された。同群の平均標識率は、対照群のほぼ 3 倍に増加していた。肝葉ごとにみると、標識率は内側右葉 > 外側右葉 > 尾状突起の順に高かった。

200 ppm 群における肝細胞増殖性の増加はなかった。

齢の違いによる標識率の差異[(老齢ラット(本試験)と若齢ラット(補足資料 3)を用いた試験の比較): 各葉間における標識率の対照群に対する比率]を表 2 に示す。

表 2. 各葉間における標識率の対照群に対する比率

肝臓の検査部位	供試動物	0 ppm	200 ppm	16000 ppm
内側右葉	若齢動物	100	136	375
	老齢動物	100	105	329
外側右葉	若齢動物	100	133	360
	老齢動物	100	93	289
尾状突起	若齢動物	100	112	246
	老齢動物	100	119	266

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

これら 2 試験から、本検体による肝細胞増殖性作用は、16000 ppm 群において若齢動物でわずかに感受性が高いが若齢、老齢の区別なく生じることが確認された。

結論として、16 ヶ月齢の老齢ラットに検体を 0、200 および 16000 ppm の用量で 3 週間混餌投与して、肝臓の zone 1 の肝細胞増殖性に及ぼす影響を検討したところ、16000 ppm 群で有意な細胞増殖性の増加が観察された。また、肝細胞増殖性作用は齢による差がなく生じることが確認された。

一方、200 ppm 群では検体投与の影響は観察されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

8) 1、6 および 13 週間混餌投与したラットにおける S 期反応試験および回復試験

(補足資料 5)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年: 1996 年

試験目的:

検体純度:

試験動物: 若齢ウイスター系 Chbb:THOM 雄ラット、開始時 42 日齢、1 群 5 匹

投与期間: 1 週間 (1995 年 5 月 3 日~1995 年 5 月 10 日)、回復期間 2 週間 (~1995 年 5 月 24 日)

6 週間 (1995 年 5 月 3 日~1995 年 5 月 24 日)、回復期間なし

13 週間 (1995 年 5 月 3 日~1995 年 8 月 2 日)、回復期間 5 週間 (~1995 年 9 月 6 日)

投与方法: 検体を 0 および 16000 ppm の濃度 (設定根拠: ラットにおける慢性毒性試験/発がん性試験の最高投与量) で基礎飼料に直接混入し、1、6 あるいは 13 週間にわたり混餌投与した。また、1 および 13 週間投与群にはそれぞれ 2 および 5 週間の回復期間を設け、基礎飼料のみ投与した。検体混入飼料は、4~5 週間に 1 回調製した。

それぞれの投与群の動物に、剖検 1 週間前にプロモデオキシウリジン (BrdU) を充填した浸透圧ミニポンプを皮下に埋入した。

投与群の構成を下表に示す。

試験群	1 週間投与群				6 週間投与群		13 週間投与群			
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
投与量 (ppm)	0	16000	0	16000	0	16000	0	16000	0	16000
投与期間 (週)	1	1	1	1	6	6	13	13	13	13
回復期間 (週)	なし	なし	2	2	なし	なし	なし	なし	5	5

試験項目および結果:

一般状態および死亡率: 一般状態および生死を毎日観察した。

検体投与に関連のある一般状態の異常はなく、死亡例も認められなかった。

体重変化: 投与開始日 (投与 0 日後) から 1 週間に 1 回測定した。

13 週間投与した 16000 ppm 群 (群 7) の体重が有意に減少 (次表) したが、その他の投与群では検体投与の影響はなかった。

投与期間 (日)	14	28	35
16000 ppm (群 7)	97↓	95↓	94↓

統計学的手法: Mann-Whitney u-test: ↓: $p \leq 0.05$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表中の数値は対照群(群 6)に対する変動率(%)

体重増加には、いずれの試験群とも検体投与の影響はなかった。

摂餌量および食餌効率：投与開始から毎週 7 日間の摂餌量を測定し、食餌効率を算出した。

13 週間投与した 16000 ppm 群の回復期間なし(群 7)および 5 週間回復(群 9)に、下表のとおり検体投与の影響と思われる摂餌量の減少が認められたが、その他の投与群では減少は認められなかった。なお、食餌効率には検体投与の影響はなかった。

投与期間(日)	7	28	35	42	49	56	77	91
16000 ppm(群 7)	89 μ	95 μ	93 μ	92 μ	93 \downarrow	94 μ	94 μ	93 μ
16000 ppm(群 9)	90 \downarrow							

統計学的手法：Mann-Whitney u-test: \downarrow : $p \leq 0.05$, μ : $p \leq 0.02$

表中の数値は対照群(それぞれ試験群 6 および 8)に対する変動率(%)

検体摂取量：投与期間中の 16000 ppm 群の平均検体摂取量(mg/kg/日)は以下の通りであった。

試験群	1	3	5	7	9
投与期間(週)	1	1	6	13	13
検体摂取量	1658	1662	1362	1140	1159

臓器重量：全動物について臓器重量を測定し、その対体重比を算出した。

1 週間投与した 16000 ppm 群(群 1/回復期間なし)の絶対および対体重比が有意に増加(下表)したが、1 週間投与後回復期間を設けた試験群 3 およびその他の全ての投与群において変化は認められなかった。

試験群		1	3	5	7	9
投与期間(週)		1				
肝臓	絶対重量	117 \uparrow				
	対体重比	119 \uparrow				

統計学的手法：Wilcoxon-test: \uparrow : $p \leq 0.05$ 、

表中の数値は対照群(試験群 0)に対する変動率(%)

肉眼的病理検査：試験終了時に全動物について剖検を実施した。

いずれの投与群においても検体投与の影響はなかった。

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、肝臓の病理標本を作製し、鏡検した。

いずれの投与群においても検体投与の影響はなかった。

細胞増殖検査(S 期反応)：

1、6 および 13 週間投与後の標識率を表 1 に示す。

表 1. 各投与期間後の標識率〔()内の値は対照群に対する割合〕

試験群/投与期間	検体摂取量 (mg/kg/日)	Zone 1	Zone 2	Zone 3	平均
対照群 0	-	16.86 (100)	19.12 (100)	8.73 (100)	14.90 (100)
16000 ppm 群 1/1 週間	1658	29.66↑ (176)	32.57↑ (170)	14.20 (163)	25.48↑ (171)
対照群 4	-	3.41 (100)	2.44 (100)	1.60 (100)	2.48 (100)
16000 ppm 群 5/6 週間	1362	7.53↑ (216)	2.24 (92)	1.52 (95)	3.70↑ (149)
対照群 6	-	2.58 (100)	0.82 (100)	0.55 (100)	1.31 (100)
16000 ppm 群 7/13 週間	1140	3.72 (144)	1.14 (139)	0.51 (93)	1.79 (137)

統計学的手法：Wilcoxon-test: ↑; $p \leq 0.05$

16000 ppm を 1 週間投与後、全ての zone で標識率の増加が認められた。6 週間投与後では zone 1 に標識率の増加がみられたが、zone 2 および 3 では対照群に比して軽度の標識率の減少がみられた。13 週間投与においては、zone 1 および 2 に細胞増殖の増加が認められたが、zone 3 の標識率は対照群に比して軽度の減少がみられた。従って、全期間を通じて zone 1 に最も強い細胞増殖反応が検出されたことを示している。

1 および 13 週間投与後、それぞれ 2 および 5 週間の回復後の標識率を表 2 に示す。

表 2. 回復期間後の標識率〔()内の値は対照群に対する割合〕

試験群 (投与期間/回復期間)	検体摂取量 (mg/kg/日)	Zone 1	Zone 2	Zone 3	平均
対照群 2	-	7.30 (100)	6.14 (100)	4.26 (100)	5.90 (100)
16000ppm 群 3 (1 週間投与/2 週間回復)	1662	2.89↓ (40)	2.42↓ (39)	2.25 (53)	2.52↓ (43)
対照群 8	-	2.68 (100)	1.42 (100)	0.57 (100)	1.56 (100)
16000ppm 群 9 (13 週間投与/5 週間回復)	1159	0.89↓ (33)	0.39↓ (27)	0.14↓ (25)	0.47↓ (30)

統計学的手法：Wilcoxon-test: ↓; $p \leq 0.05$, ↓↓; $p \leq 0.01$

16000 ppm 投与後、回復期間を設定した場合の標識率はそれぞれの対照群に比して、1 週間投与/2 週間回復では 43%まで、13 週間投与/5 週間回復では 30%まで減少した。このように対照群の値よりも低い値を維持したことは負の抑制という意味で注目に値す

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

る。5 週間の回復期間後に DNA 複製の 70% の減少が認められたことは、13 週間の投与期間中に維持された増加が検体による重要な作用機序であるという仮説を支持していると考えられる。

結論として、検体 16000 ppm 混入飼料の 1、6、13 週間投与により DNA 複製が促進されると推定され、投与 1 週間後が最も高く、時間の経過とともに減少したが、細胞増殖は増加したままである。この影響は 1 週間および 6 週間投与とも投与中止により可逆的に低下した。増加した細胞増殖の分布層から、検体は肝細胞の zone 1 に対して選択的に作用することが示唆された。また、1 週間投与後の肝臓重量のみ対照群に比し増加した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

9) 3週間混餌投与した64日齢ラットにおけるS期反応試験 (追加補足資料2)

試験機関:

(GLP対応)

報告書作成年: 1997年

検体純度:

試験動物: Wister系ラット[Chbb:THPOM (SPF)]、1群雄5匹、開始時64日齢

投与期間: 3週間(1996年10月15日~1996年11月5日)

投与方法: 検体を0、800および8000 ppmの濃度で基礎飼料に混入し、3週間にわたって混餌投与した。剖検の1週間前に5-ブromo-2'-デオキシウリジン(BrdU)を充填した浸透圧ミニポンプを皮下に埋入した。なお、混餌は、投与開始前に1回調製した。

投与量設定根拠:

試験項目および結果:

一般状態および死亡率: 一般状態および生死を毎日観察し、さらに詳細な臨床観察を1週間に1回行った。

検体投与に関連した一般状態の異常および死亡は認められなかった。

体重変化: 1週間に1回測定した。

いずれの群においても検体投与の影響は認められなかった。

摂餌量および飲水量: 毎日測定した。但し、飲水量は目視により観察した。

投与7日後、8000 ppm群の摂餌量が有意に低下し、対照群に比して6%低値であった。800 ppm投与群では、検体投与の影響は認められなかった。

検体摂取量: 投与期間中の群平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)	800	8000
検体摂取量 (mg/kg/day)	61	603

臓器重量: 投与終了後、全動物を対象として臓器重量を測定し、その対体重比を算出した。

いずれの群においても検体投与の影響は認められなかった。

肉眼的病理検査: 投与終了時に全動物を対象として剖検を実施した。

いずれの群においても検体投与の影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

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、肝臓の外側右葉、内側右葉および尾状突起の免疫組織学的標本を作製し、鏡検した。

いずれの群においても検体投与の影響は認められなかった。

細胞増殖検査(S期反応)：

次表のように、各葉の標識率は8000 ppm群で有意に増加し、800 ppm群では増加は認められなかった。zone1の標識率は8000 ppm群で対照群の約2倍に増加していたが、800 ppm群では対照群と同等であった(表1)。zone1および2の平均値では8000 ppm群で標識率は有意に増加し(対照群に比し136%)、800 ppm群では対照群と差は認められなかった(表2)。肝小葉内(zone1および2)では特にzone1で増加が顕著であった。また、対照群および投与群間において、肝葉の領域で標識率に一定の傾向は認められなかった。

表1：各葉における標識率(zone1)

投与量(ppm)	0	800	8000
内側右葉	5.49	5.27 (96)	10.57†† (193)
外側右葉	4.75	4.11 (87)	8.38†† (176)
尾状突起	5.09	5.43 (107)	8.59†† (169)
群平均値	5.11	4.93 (96)	9.18†† (180)

統計学的方法：WILCOXON検定：†： $p \leq 0.05$ 、††： $p \leq 0.01$
表中の()内の数値は対照群を100とした場合の割合を示す。

表2：各葉における標識率(zone1および2)

投与量(ppm)	0	800	8000
内側右葉	4.52	3.64 (81)	6.54†† (145)
外側右葉	4.52	2.89 (64)	5.39† (119)
尾状突起	3.95	4.20 (106)	5.76 (146)
群平均値	4.33	3.58 (83)	5.90†† (136)

統計学的方法：WILCOXON検定：†： $p \leq 0.05$ 、††： $p \leq 0.01$
表中の()内の数値は対照群を100とした場合の割合を示す。

以上の結果から、本剤のラットに対する3週間混餌投与による肝細胞増殖性(S期反応)試験における影響として、8000 ppm群で投与7日後に摂餌量が有意に低下および細胞増殖性の有意な

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

増加が認められ、小葉内では、特に門脈領域 (zone1) で増殖性が顕著であった。800 ppm 群では、検体投与の影響は認められなかった。従って、検体の細胞増殖性に関する無作用量 (NOEL) は 800 ppm (61 mg/kg 体重/日) と判断される。

2) 細菌を用いた復帰変異試験 (追加資料 4)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1997 年

由 来:

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA100、TA1537、TA98 株) およ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) の存在下および非存在下で、プレインキュベーション法により変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験濃度は最高 5000 µg/プレートとし、公比 2 で 6 用量を、さらに TA1537 は 4 用量を追加した。試験は 3 反復で行った。

なお、試験溶液にリン酸緩衝液あるいは S9 mix を添加時に、313 µg/プレート以上の用量で白濁し、コロニー計数時に -S9 および +S9 mix とも析出が観察されたので、-S9 mix では 313 µg/プレート、+S9 mix では 625 µg/プレート以上では目視で観察した。

[用量設定根拠]

結 果: 結果は表 1 に示す。

検体は代謝活性化系の存在下および非存在下において、いずれの濃度ともに試験菌株に生育阻害作用は認められず、5000 µg/プレートの濃度でも復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

一方、陽性対照として用いた AF-2 [2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)-アクリルアミド]、 NaN_3 [アジ化ナトリウム]、ACR [9-アミノアクリジン]、2-AA [2-アミノアントラセン] では、全ての検定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変異誘発性を有しないものと判断される。

表 1 本試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 Mix	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	
			WP2 uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)	0	-	22 22	14 14	110 91	10 10	19 18
検体	9.77	-				7 8	
	19.5	-				13 16	
	39.1	-				12 13	
	78.1	-				8 6	
	156	-	24 27	18 13	92 113	10 9	22 20
	313 ^a	-	24 22	10 16	92 90	10 9	22 20
	625 ^a	-	21 22	11 10	96 101	6 8	19 20
	1250 ^a	-	24 24	11 10	90 94	8 8	19 19
	2500 ^a	-	29 23	12 18	105 97	10 6	19 20
5000 ^a	-	29 21	10 10	106 99	7 7	15 15	
対照 (DMSO)	0	+	21 17	11 10	97 98	11 11	25 28
検体	156	+	25 26	15 15	121 126	16 13	34 34
	313 ^a	+	26 24	14 14	136 133	14 14	31 29
	625 ^a	+	25 17	10 10	128 133	10 9	26 30
	1250 ^a	+	24 21	15 17	136 140	10 14	32 31
	2500 ^a	+	26 26	10 12	140 145	17 15	31 28
	5000 ^a	+	23 20	11 11	125 126	10 11	33 32
陽性対照 ^b	AF-2 0.01	+	184 191		615 645		
	AF-2 0.1	-					352 340
	NaN_3 0.5	-		347 380			
	ACR 80	-				450 459	
	2-AA 0.5	+					292 326
	2-AA 1	+			517 483		
	2-AA 2	+		373 411		163 163	
	2-AA 10	+	411 409				

^a 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上でプレート表面に白色の粉末状あるいは小塊状の析出物を認める。

^b 2-AA: 2-アミノアントラセン

NaN_3 : アジ化ナトリウム

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)-アクリルアミド

ACR: 9-アミノアクリジン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

表 2. 用量設定試験の結果

[数値は 2 プレートの平均]

薬物	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 Mix	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	
			WP2 uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)	-	-	30	11	96	6	23
検体	51.2	-	32	8	106	12	18
	128	-	33	9	94	7	18
	320 ^a	-	33	10	89	8	16
	800 ^a	-	33	7	78	10	12
	2000 ^a	-	30	7	84	7	18
	5000 ^a	-	34	8	100	4	11
対照 (DMSO)	-	+	32	11	99	12	30
検体	51.2	+	33	12	135	7	32
	128	+	42	16	130	8	26
	320 ^a	+	31	15	138	11	26
	800 ^a	+	28	16	142	11	22
	2000 ^a	+	30	16	125	11	32
	5000 ^a	+	34	8	146	8	32
陽性 対照 ^b	AF-2 0.01	-	167		696		
	AF-2 0.1	-					319
	NaN ₃ 0.5	-		352			
	ACR 80	-				382	
	2-AA 0.5	+			489		262
	2-AA 1	+					
2-AA 2	+		271		140		
2-AA 10	+		340				

^a プレート表面に白色の粉末状あるいは小塊状の析出物を観察。

^b 2-AA: 2-アミノアントラセン

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)-アクリルアミド

NaN₃: アジ化ナトリウム

ACR: 9-アミノアクリジン

2-2. 代謝物の毒性

1) のラットにおける急性経口毒性試験 (資料 40)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1995 年

検体純度:

試験動物: ウィスター系 Chbb:THOM ラット、6~7 週齢、体重: 雄 176~194 g、雌 172~189 g、
1 群雌雄各 5 匹

観察期間: 14 日間観察

投与方法: 検体を 0.5%CMC 蒸留水溶液に懸濁し、単回強制経口投与した。投与前に 16 時間絶食した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は試験開始時、その後 1 週ごとに測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について、肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	200、2000、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄: 約 2000、雌: 約 1090、雄+雌: 約 2000
死亡開始時間および終了時間	投与 2 時間から死亡開始 投与 1 日後終了
症状発現および消失時期	投与直後~5 日後
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共: 200

中毒症状として、2000 および 5000 mg/kg 投与群の雌および/または雄に、一般状態の悪化、衰弱、呼吸困難、鎮静、腹臥姿勢、横臥姿勢、よろめき歩行、筋弛緩、不全麻痺、振戦、攣縮、紅斑、立毛、流涙の症状が観察された。生存動物は投与 2 日後には立毛を除き正常に回復し、体重増加も正常であった。

剖検所見では途中死亡例に胃および/または腸の内容物の変色、小腸に水様状物質が認められた。

生存動物では特記すべき異常は認められなかった。

2)

のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 41)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1994 年

検体純度:

試験動物: ウィスター系 Chbb:THOM ラット、6~7 週齢、体重: 雄 189~204 g、雌 177~184 g、
1 群雌雄各 5 匹

観察期間: 14 日間観察

投与方法: 検体を 0.5%CMC 蒸留水溶液に懸濁し、単回強制経口投与した。投与前に 16 時間絶食した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は試験開始時、その後 1 週ごとに測定した。試験終了時の全生存動物について、肉眼的病理検査を行った。

結 果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌: >5000
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時期	症状の発現なし
最大無作用量 (mg/kg)	雌雄共: 5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共: 5000

中毒症状、体重および剖検所見に異常は認められなかった。

3) のラットにおける急性経口毒性試験 (資料 42)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1994 年

検体純度:

試験動物: ウィスター系 Chbb:THOM ラット、6~7 週齢、体重: 雄 179~194 g、雌 175~196 g、
1 群雌雄各 5 匹

観察期間: 14 日間観察

投与方法: 検体を 0.5%CMC 蒸留水溶液に懸濁し、単回強制経口投与した。投与前に 16 時間絶食した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は試験開始時、その後 1 週ごとに測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について、肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000、3000、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌: >5000 (5%危険率)
死亡開始時間および終了時間	投与 1 日後 1 例死亡のみ
症状発現および消失時期	投与 1 時間後発現、投与 1 日後消失
最大無作用量 (mg/kg)	雄: 5000、雌: 3000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄: 5000、雌: 3000

中毒症状として、5000 mg/kg 群の雄および/または雌で一般状態の悪化、衰弱、呼吸困難、鎮静、立毛の症状が観察され、雌 1 例が死亡したが、生存例は 1 日後には正常に回復した。

剖検所見において、投与 1 日後に死亡した 5000 mg/kg 群の雌 1 例の胃および腸に水溶性黄色液体の充満が認められた。

生存動物はいずれの投与群においても特記すべき異常は認められなかった。

4)

の復帰変異試験

(資料 43)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1995 年

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 [*Salmonella typhimurium*(TA1535, TA100, TA1537, TA98 株)] およ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) の存在下および非存在下で、標準プレート法およびプレインキュベーション法により Ames らの方法で変異原性を検定した。試験は 3 反復で行った。溶媒として DMSO を用い、5000 µg/プレートを最高試験濃度とした。

結 果:

検体は 2500 µg/プレート以上の濃度において細菌毒性作用を示した(特にプレインキュベーション法)が、代謝活性化系の存在下および非存在下の試験において、これらの試験濃度においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照[#]として用いた 2-AA、MNNG、ENNG、AAC および NPD では、全ての検定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(代謝物 M1)は復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

2-AA: 2-アミノアントラセン
AAC: 塩化 9-アミノアクリジン-水和物
MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン
NPD: 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン
ENNG: 1-エチル-3-ニトロ-1-ニトロソグアニジン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

標準プレート法

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix	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								
			WP2 uvrA			TA1535			TA100			TA1537			TA98		
対照 (DMSO)		-	39	40	39	17	17	17	101	93	102	10	17	17	36	22	34
検体	20	-	40	39	37	13	17	19	104	102	105	11	12	9	24	39	31
	100	-	36	30	40	10	18	16	96	98	111	9	5	11	27	30	33
	500	-	38	40	30	20	9	18	119	99	110	8	13	7	36	29	20
	2500	-	45	35	45	19	15	15	101	92	98	7	9	8	22	25	18
	5000	-	a	a	a	23	14	14	98	89	104	7	2	6	26	29	26
対照 (DMSO)		+	36	42	35	21	18	16	110	119	107	13	10	17	52	44	37
検体	20	+	42	34	44	14	16	17	120	106	99	13	20	11	36	45	42
	100	+	44	39	39	12	15	17	112	120	123	10	8	5	38	44	28
	500	+	39	38	40	14	16	15	91	89	100	9	11	15	30	27	26
	2500	+	36	40	37	14	15	15	80	96	71	13	5	10	25	22	22
	5000	+	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	17a	19a	16a
陽性 対照*	2-AA 2.5	+				162	140	92	1566	1550	1145	181	183	175	1158	1088	1318
	2-AA 60	+	425	315	399												
	MNNG 5	-				1044	1112	1024	857	803	860						
	ENNG 10	-	475	600	571												
	AAC 100	-										426	410	472			
	NPD 10	-													735	810	613

プレインキュベーション法

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix	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								
			WP2 uvrA			TA1535			TA100			TA1537			TA98		
対照 (DMSO)		-	35	39	47	17	17	17	114	122	112	12	7	8	29	24	30
検体	4	-	43	34	42	19	14	16	102	93	110	7	7	9	26	29	32
	20	-	35	37	40	14	16	18	96	124	128	6	8	5	23	26	26
	100	-	43	33	42	11	17	16	105	104	91	8	11	5	21	30	26
	500	-	46	39	37	13	16	16	107	85	99	3	4	7	27	23	23
	2500	-	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
対照 (DMSO)		+	35	40	34	14	19	18	105	127	128	11	8	6	34	36	36
検体	4	+	32	30	39	16	15	15	114	106	136	7	8	7	31	27	34
	20	+	32	37	37	13	14	15	112	114	117	6	8	7	26	22	24
	100	+	35	36	36	13	12	9	117	113	116	4	9	5	29	22	24
	500	+	36	31	31	11	13	14	130	100	97	1	4	5	23	30	21
	2500	+	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
陽性 対照*	2-AA 2.5	+				103	98	102	798	760	813	99	102	100	809	649	727
	2-AA 60	+	153	218	222												
	MNNG 5	-				1170	1150	1101	1112	1101	1213						
	ENNG 10	-	519	607	600												
	AAC 100	-										755	701	683			
	NPD 10	-													698	744	746

a : 菌株の生育阻止を認めた。

* 2-AA: 2-アミノアントラセン

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

ENNG: 1-エチル-3-ニトロ-1-ニトロソグアニジン

空欄は試験せず。

AAC: 塩化 9-アミノアクリジン-水合物

NPD: 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

5)

の *in vitro* 細胞形質転換試験

(資料 51)

試験機関:

報告書作成年: 2005 年 [GLP 対応]

検体純度:

供試動物: Syrian golden ハムスター [LAK:LVG (SYR)],

投与方法:

用量設定根拠:

評 価:

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

以上の結果より、本試験条件下で検体は *in vitro* SHE 細胞を用いた形質転換試験において陰性であると判断される。