

(13) 変異原性

1) 復帰突然変異試験

① 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 NoT-35)

試験機関：野村生物科学研究所

報告書作成年：1986年 [GLP 対応]

検体の純度： %

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA102、TA1535、TA100、TA1537、TA98 株)、トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方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) に溶解させた。

試験結果：結果を下表に示した。

S-9 mix	薬物	濃度 (µg/プレート)	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	TA102	TA1535	TA100	TA1537	TA98
-	溶媒対照 (DMSO)		29 25 (27)	193 186 (190)	22 18 (20)	120 116 (118)	9 8 (9)	19 20 (20)
	メタクロール	50	32 26 (29)	205 204 (205)	29 29 (29)	140 156 (148)	11 10 (11)	20 22 (21)
		100	28 22 (25)	185 198 (192)	28 22 (25)	134 136 (135)	11 9 (10)	20 34 (27)
		500	17 19 (18)	193 166 (180)	25 21 (23)	127 132 (130)	12 8 (10)	21 18 (20)
		1000	26 29 (28)	99 108 (104)	20 21 (21)	127 131 (129)	6 2 (4)	15 20 (18)
		5000	10 11 (11)	5 9 (7)*	9 12 (11)	96 100 (98)	0 1 (1)*	17 11 (14)
陽性対照	名称		AF-2	MMC**	ENNG	AF-2	9-AA	AF-2
	濃度***		0.01	0.1	5	0.01	80	0.1
	コロニー数/プレート		80 78 (79)	519 592 (556)	335 389 (362)	261 255 (258)	1489 1581 (1535)	365 396 (381)

() 内の数値は平均値

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

MMC : mytomycin C

ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

9-AA : 9-aminoacridine

* : 菌の生育阻害が認められたことを示す。

** : MMC のみ、蒸留水を溶媒として用いた。

*** : µg/プレート

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

S-9 mix	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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 <i>uvrA</i>	TA102	TA1535	TA100	TA1537	TA98	
+	溶媒対照 (DMSO)	/	44 (44)	271 (267)	17 (19)	117 (121)	12 (14)	25 (25)	
			43	263	21	125	15	24	
	メトクロール	50	43 (47)	274 (274)	25 (23)	153 (137)	17 (17)	29 (25)	
			50	273	20	120	16	21	
		100	46 (46)	263 (260)	26 (24)	148 (159)	21 (21)	31 (27)	
			45	257	22	169	21	23	
		500	41 (44)	260 (273)	27 (25)	154 (142)	13 (13)	23 (22)	
			46	286	23	130	13	20	
		1000	38 (41)	220 (223)	23 (23)	155 (151)	12 (13)	25 (23)	
			44	225	23	147	13	20	
		5000	32 (35)	39 (42)	12 (12)	135 (131)	1 (3)*	27 (24)	
			37	45	11	127	5	21	
		陽性対照	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
			濃度**	80	2	2	0.5	2	0.5
	コロニー数 /プレート		1099 (1147) 1194	717 (691) 664	269 (266) 262	641 (650) 658	309 (317) 324	226 (210) 194	

() 内の数値は平均値

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 菌の生育阻害が認められたことを示す。

** : $\mu\text{g}/\text{プレート}$

検体処理群では、代謝活性化系も含めた本試験条件下でいずれの検定菌株において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 AF-2、MMC、ENNG、9-AA 及び 2-AA では各々の検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、メトクロールは代謝活性化系を含む本試験条件下で、復帰変異誘発性を有さないものと判断された。

② 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No.T-36)

試験機関：日本食品分析センター

報告書作成年：1985年

検体の純度： %

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA100、TA1537、TA1538、TA98 株)、トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方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) に溶解させた。

試験結果：結果を下表に示した。

S-9 mix	薬物	濃度 (μg/プレート)	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	TA1538	TA98		
-	溶媒対照 (DMSO)		22 27 (25)	13 9 (11)	101 108 (105)	5 3 (4)	5 9 (7)	16 14 (15)		
	メトクロール	1	18	6	91	4	6	20		
		[10]**	12 (15)	15 (11)	114 (103)	4 (4)	6 (6)	18 (19)		
		5	22	11	97	4 (4)	5	19		
		[50]	13 (18)	6 (9)	108 (103)	4 (4)	7 (6)	14 (17)		
		10	14	7	99	3	5	13		
		[100]	15 (15)	3 (5)	102 (101)	3 (3)	10 (8)	14 (14)		
		50	15	11	96	1	3	16		
		[500]	11 (13)	3 (7)	108 (102)	4 (3)	6 (5)	18 (17)		
		100	10	9	104	8	8	15		
		[1000]	12 (11)	3 (6)	111 (108)	3 (6)	5 (7)	19 (17)		
		250	7	4	115	4	4	13		
		[2500]	5 (6)*	6 (5)	108 (112)	4 (4)	3 (4)	22 (18)		
		500	0	0	62	0	0	16		
		[5000]	0 (0)*	0 (0)*	82 (72)*	0 (0)*	0 (0)*	17 (17)*		
		1000	0	0	0	0	0	0		
		[10000]	0 (0)*	3 (2)*	0 (0)*	0 (0)*	0 (0)*	0 (0)*		
		陽性対照	名称		AF-2	ENNG	AF-2	9-AA	2-NF	AF-2
			濃度***		0.01	5	0.01	80	2	0.1
	コロニー数/プレート			191 196 (194)	2697 2522 (2610)	331 380 (356)	510 942 (726)	353 261 (307)	317 239 (278)	

() 内の数値は平均値

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

ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

9-AA : 9-aminoacridine

2-NF : 2-nitrofluorene

* : 菌の生育阻害が認められたことを示す。

** : WP2 uvrA 株についてのみ [] 内の濃度で実施した。

*** : μg/プレート

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

S-9 mix	薬物	濃度 (μ /プレート)	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	TA1538	TA98
+	溶媒対照 (DMSO)	/	13 (17)	8 (7)	123 (132)	7 (7)	11 (11)	26 (26)
			21	6	140	6	10	25
	メトラクロール	10	21 (15)	7 (6)	121 (117)	7 (7)	7 (9)	18 (25)
			8	5	112	7	11	32
		50	9 (14)	9 (10)	120 (117)	7 (6)	14 (17)	30 (31)
			19	10	114	5	20	31
		100	12 (15)	6 (8)	127 (119)	7 (8)	7 (11)	18 (19)
			17	9	111	8	14	20
		500	13 (16)	5 (8)	137 (129)	10 (8)	11 (12)	33 (25)
			18	11	121	5	12	16
		1000	14 (15)	9 (10)	136 (134)	3 (7)	16 (12)	24 (21)
			15	11	131	10	8	17
		2500	16 (16)	5 (5)	78 (98)	4 (4)	10 (11)	23 (23)
			16	4	118	3	11	22
5000	9 (11)*	1 (2)*	51 (45)*	0 (0)*	2 (2)*	10 (9)*		
	13	3	38	0	2	7		
10000	1 (2)*	2 (3)*	4 (2)*	0 (0)*	0 (0)*	0 (0)*		
	2	3	0	0	0	0		
陽性対照	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	濃度**	80	2	0.5	0.5	0.5	0.5	
	コロニー数 /プレート	1114 (1053) 992	220 (185) 150	554 (421) 287	128 (136) 144	227 (237) 246	237 (243) 248	

() 内の数値は平均値

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 菌の生育阻害が認められたことを示す。

** : μ g/プレート

検体処理群では、代謝活性化系も含めた本試験条件下でいずれの検定菌株において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 AF-2、ENNG、9-AA、2-NF 及び 2-AA では各々の検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、メトラクロールは代謝活性化系を含む本試験条件下で、復帰変異誘発性を有さないものと判断された。

③ 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No.T-37)

試験機関：野村総合研究所

報告書作成年：1979年

検体の純度： %

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA100、TA1537、TA1538、TA98 株)、トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法により、変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。

試験結果：結果を下表に示した。

S-9 mix	薬物	濃度 (µg/プレート)	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	TA1538	TA98	
-	溶媒対照 (DMSO)		34 36 (35)	9 13 (11)	73 87 (80)	6 8 (7)	11 15 (13)	21 27 (24)	
	メタクロール	100	53 50 (52)	18 13 (16)	55 91 (73)	7 6 (7)	11 15 (13)	18 29 (24)	
		200	43 39 (41)	12 21 (17)	46 72 (59)	10 7 (9)	16 11 (14)	22 18 (20)	
		500	41 37 (39)	8 15 (12)	67 71 (69)	11 11 (11)	20 14 (17)	32 23 (28)	
		1000	27 39 (33)	18 18 (18)	61 77 (69)	4 6 (5)	13 18 (16)	26 27 (27)	
		2000	32 26 (29)	20 19 (20)	63 49 (56)	6 4 (5)	9 14 (12)	3 15 (9)	
		5000*	32 28 (30)	15 14 (15)	53 47 (50)	4 3 (4)	15 19 (17)	16 22 (19)	
	陽性対照	名称		AF-2	ENNG	AF-2	9-AA	2-NF	AF-2
		濃度**		0.04	10	0.05	50	5	0.02
		コロニー数/プレート		67 73 (70)	1420 1383 (1402)	296 327 (312)	611 670 (641)	598 523 (561)	180 176 (178)

() 内の数値は平均値

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

ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

9-AA : 9-aminoacridine

2-NF : 2-nitrofluorene

* : 油滴の生成を認めたことを示す。

** : µg/プレート

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

S-9 mix	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	TA1538	TA98
+	溶媒対照 (DMSO)		51 (46)	10 (9)	76 (76)	33 (35)	33 (38)	30 (27)
			41	8	76	37	43	24
	メトクロール	100	44 (51)	11 (9)	76 (82)	20 (21)	26 (29)	16 (20)
			57	6	88	22	32	23
		200	38 (41)	13 (10)	67 (73)	37 (31)	41 (34)	23 (25)
			44	7	78	25	27	27
		500	43 (44)	11 (10)	78 (81)	29 (25)	31 (32)	25 (28)
			45	9	83	21	33	30
		1000	46 (45)	9 (8)	87 (96)	26 (26)	39 (36)	27 (27)
			43	7	105	25	33	27
		2000	45 (43)	7 (16)	94 (93)	20 (18)	30 (24)	21 (22)
			40	24	91	15	17	23
		5000*	53 (46)	13 (14)	113 (98)	4 (6)	40 (36)	26 (24)
			39	15	83	7	32	22
陽性対照	名称		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	濃度**		40	1	0.5	1	0.5	0.5
	コロニー数		517 (553)	21 (22)	407 (415)	169 (175)	493 (485)	315 (284)
	/プレート		589	23	422	181	476	253

() 内の数値は平均値

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 油滴の生成を認めたことを示す。

** : $\mu\text{g}/\text{プレート}$

検体処理群では、代謝活性化系も含めた本試験条件下でいずれの検定菌株においても対照群と比較して、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 AF-2、ENNG、9-AA、2-NF 及び 2-AA では、各々の検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を認めた。

以上の結果より、メトクロールは代謝活性化系を含む本試験条件下で、復帰変異誘発性を有さないものと判断された。

④ 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No. T-38)

試験機関：Ciba-Geigy Ltd. (スイス国)

報告書作成年：1976年

検体の純度： %

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA100、TA1537、TA98株)を用い、代謝活性化系 S9mix の存在下及び非存在下で Amesらの方法により、変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。

1群当り 6 プレートを用いた。S9+試験では 3 プレートのみに前処理を行った。尚、陽性対照試験は別途以下の化合物を用いて行った。

S-9 mix	細菌	陽性対照化合物と濃度
-	TA1535	N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、20µg/mL
	TA100	4-ニトロキノリン-n-オキsid、100µg/mL
	TA1537	9-アミノアクリジンビドクロロドモノビドプレート、100 あるいは 1000µg/mL
	TA98	ゲリブラスチン、100 あるいは 1000µg/mL
+	TA1535	シロホスファミド、100 あるいは 1000µg/mL
	TA100	同上

試験結果：結果を下表に示した。

S-9 mix	化合物	濃度 (µg/mL)	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	
			TA1535	TA100	TA1537	TA98
-	溶媒 (DMSO)	-	29	102	5	22
	メトラクロール	100	27	100	5	22
		1,000	27	102	4	21
		10,000	0	57	0	0
		100,000	0	14	0	0
+	溶媒 (DMSO)	-	14/18	82/82	5/7	39/43
	メトラクロール	100	13/15	88/73	6/9	35/37
		1,000	14/17	72/81	4/5	42/43
		10,000	13/12	75/83	7/9	46/41
		100,000	5/9	22/17	2/4	30/31

S-9 mix +試験での n/n は前処理なしの場合/前処理ありの場合

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

S-9 mix 無添加の 10,000 および 100,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、S-9 mix 添加の 100,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で細胞阻害作用が認められ、コロニー数が対照に比較して低かった。検体各濃度で溶媒対照に比較して有意なコロニー数の増加は認められず、メトラクロールは代謝活性化系を含む本試験条件下で、復帰変異誘発性を有さないものと判断された。

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

2) マウスリンホーマ細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験 (資料 No.T-39)

試験機関：Ciba-Geigy Ltd. (スイス国)

報告書作成年：1984年 [GLP 対応]

検体の純度： %

試験方法：マウスリンホーマ細胞 (L5178Y/TK⁺) を用い、ラットの肝から調製した代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下における 5-bromodeoxy uridine 耐性突然変異誘発性を検定した。検体は 1%ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。

検体の処理時間は 4 時間 (37°C)、発現時間は 24 時間とし、発現した TK⁺細胞を計数した。

試験 1：S9 mix の非存在下では 10.6~212 μ g/mL、存在下で 11.7~235 μ g/mL までの 7 段階濃度で試験を行った。

試験 2：S9 mix の存在下では、試験 1 で最高濃度においても十分な生育抑制がみられなかったため、62.6~313 μ g/mL までの 7 段階濃度で繰り返し試験を行なった。

陽性対照として、代謝活性化系非存在下ではエチルメタンサルホネート (EMS)、存在下ではジメチルニトロサミン (DMN) 処理群を、溶媒対照として DMSO 処理群を、陰性対照として無処理対照群を設けた。

用量設定根拠；

判定基準；生存細胞 10⁶ 個あたりの TK⁺細胞の発現数が、溶媒対照群の 2.5 倍以上を陽性と判定した。

試験結果：結果を表 1 に示した。

検体処理群では、突然変異細胞の発現数において溶媒対照群と比較して明らかな差異は認められなかった。

一方、陽性対照に用いた EMS 及び DMN 処理群のいずれも溶媒対照群と比較して顕著な突然変異細胞発現数の増加がみられた。

以上の結果から、メトラクロールは本試験条件下においてマウスリンホーマ細胞 L5178Y TK⁺に対する *in vitro* 突然変異誘発性は陰性であると判断された。

表 1 試験 1 および試験 2 の結果

S9 mix	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$) ^{a)}	突然変異 細胞発現数 ^{b)}	評価
- (試験 1)	溶媒対照 (DMSO)		14.6	
	メトラクロール	10.6	16.7	-
		21.2	20.9	-
		42.4	10.9	-
		84.9	16.2	-
		127	11.8	-
		170	16.2	-
212	9.2	-		
	陰性対照		15.0	-
	陽性対照 (EMS)	900	188.4	+
+ (試験 1)	溶媒対照 (DMSO)		6.2	
	メトラクロール	11.7	3.9	-
		23.5	4.5	-
		46.9	4.1	-
		93.8	4.2	-
		141	2.4	-
		188	3.4	-
235	2.0	-		
	陰性対照		6.9	-
	陽性対照 (DMN)	750	43.9	
+ (試験 2)	溶媒対照 (DMSO)		9.1	
	メトラクロール	62.6	19.0	
		125	18.6	
		188	19.0	-
		219	9.3	-
		250	20.5	-
		281	細胞毒性発現のため	
313	計数不可			
	陰性対照		7.3	-
	陽性対照 (DMN)	750	140.6	+

^{a)}: 比重 (検体では 1.117) を用いて容量から重量に申請者が換算

^{b)}: 生存細胞 10^6 個あたりの数

EMS: エチルメタンサルホネート (比重 1.206)

DMN: ジメチルニトロサミン (比重 1.0)

3) 染色体異常試験

① チャイニーズハムスターの CHL 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No.T-40)

試験機関：野村生物科学研究所

報告書作成年：1986年 [GLP 対応]

検体の純度： %

試験方法：雌チャイニーズハムスターの肺由来の CHL 細胞を用いた。

試験前に行なった細胞毒性試験で得られた 50%細胞増殖抑制濃度より、処理濃度を6時間処理では代謝活性化系(S-9 mix)存在下で2.4mM、非存在下で1.2mM、24時間処理では0.6mM、48時間処理では0.3mM までとした。検体をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解させた。なお、陽性対照としてS-9 mix 存在下でジメチルニトロサミン(DMN)、非存在下でマイトマイシンC(MMC)処理群を、陰性対照として溶媒対照群を設けた。

染色体異常の観察には、処理条件ごとに観察に耐える上位3濃度を選び、各々100個の分裂中期細胞についてギャップ、切断、交換及びその他ならびに倍数体細胞の出現数を観察した。

結果：結果を下表に示した。

S-9 mix	処理時間	50%増殖抑制濃度(mM)	薬物	濃度(mM)	形態的異常										数的異常 倍数体細胞出現率(%)			
					異常数											TA	TAG	
					ギャップ		切断		交換			その他						
ctg	csg	ctb	csb	tr	qr	cx	ace	dic	r	mis								
	6 ^h)	1.2	DMSO	—											0	0	1	
				0.15											0	0	0	
			メタクロール	0.3											0	0	0	
				0.6	1				1						1	2	1	
			MMC	3.74×10 ⁻⁴	1		28		37	8	2		1	2	4	54**	55**	0
		+	0.68	DMSO	—			1								1	1	0
					0.15			1								1	1	0
				メタクロール	0.3	1		1								1	2	0
	0.6							1						1	1	0		
		DMN	3.37	6		9		23	14	5	1		2	4	46**	49**	0	

^h) : S-9 mix 存在下あるいは非存在下で検体に6時間処理した後、新たな培地で18時間培養した。

ctg : 染色分体ギャップ、csg : 染色体ギャップ、ctb : 染色分体切断、

csb : 染色体切断、tr : 三放射状交換、qr : 四放射状交換、cx : 複雑交換、

ace : 無動原体染色体、dic : 二動原体染色体、r : 環状染色体、

mis : 複数の異常をもつもの、TA : 異常を有する細胞数(ただしギャップは除く)、

TAG : 異常を有する細胞数(ただしギャップを含む)

** : 対照群と比較して有意差あり (P<0.01)

S-9 mix	処理時間	50%増殖抑制濃度 (mM)	薬物	濃度 (mM)	形態的異常											数的異常 倍数体細胞出現率 (%)			
					異常数												TA	TAG	
					ギャップ		切断		交換			その他							
ctg	csg	ctb	csb	tr	qr	ex	ace	dic	r	mis									
-	24	0.32	DMSO	-	2										0	2	1		
			メトクロール	0.15												0	0	1	
				0.3	3		8										7*	10*	1
				0.6	1		7										4	4	0
			MMC	14.96×10 ⁻⁵	2		8	1	22	8	1			1		36**	37**	1	
-	48	0.14	DMSO	-											0	0	1		
			メトクロール	0.0375			2		1							3	3	0	
				0.075	1			1								1	2	0	
				0.15			2	1	2	1					1	7*	7*	1	
			MMC	7.48×10 ⁻⁵	1	1	7		7	3				1	2	18**	19**	2	

ctg : 染色分体ギャップ、csg : 染色体ギャップ、ctb : 染色分体切断、
csb : 染色体切断、tr : 三放射状交換、qr : 四放射状交換、ex : 複雑交換、
ace : 無動原体染色体、dic : 二動原体染色体、r : 環状染色体、
mis : 複数の異常をもつもの、TA : 異常を有する細胞数 (ただしギャップは除く)、
TAG : 異常を有する細胞数 (ただしギャップを含む)
*, ** : 対照群と比較して有意差あり (P<0.05, 0.01)

検体処理群では、24 時間処理の 0.3mM 群及び 48 時間処理の 0.15mM 群で、染色体異常を有する細胞数のわずかな増加が認められた。両濃度とも各処理条件下での細胞増殖をおおよそ 50%抑制する濃度であった。

一方、陽性対照の MMC 及び DMN 処理群では、種々の染色体異常を有する細胞数が明らかに増加した。

以上の結果より、メトクロールは微弱ながら染色体異常を誘発すると判断される。

② チャイニーズハムスターの CHO 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No.T-41)

試験機関: Ciba-Gigy Limited (スイス)

報告書作成年: 1990 年 [GLP 対応]

検体の純度: %

試験方法: 雌チャイニーズハムスターの卵巣由来の CHO 細胞 (CCL61) を用い、ラットの肝から調製した代謝活性化系(S-9mix)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。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。溶媒対照として DMSO、陽性対照として S9-mix 存在下ではシクロホスファミドおよび非存在下ではマイトマイシン C を用いた。

[細胞毒性試験 (分裂指数の測定) と濃度選択];

細胞毒性試験を 1.95~1000 μ g/m 範囲の 10 段階の濃度で実施した。CHO 細胞を 24 時間培養した後に、短時間処理の場合には S-9mix 非存在下および存在下で 3 時間処理し、さらに 21 時間 (回復期間) 培養した後に標本を作製した。また、長時間処理については S-9mix 非存在下で 21 時間処理した後標本を作製した。各処理系列とも、作製した染色体標本で分裂指数 (細胞 2000 個中の有糸分裂細胞の比率) を求めた。

その結果、短時間処理 (3 時間) については、S-9mix 非存在下では 250 μ g/mL で分裂指数が溶媒対照群に比べて 56.4%低下し、S-9mix 存在下では 125 μ g/mL で分裂指数は溶媒対照群に比べて 35.8%低下し、250 μ g/mL では生存細胞がみられなかった。一方、24 時間長時間処理では、S-9mix 非存在下において 62.5 μ g/mL で分裂指数が溶媒対照群に比べて 68.2%低下した。

この細胞毒性試験結果から、有糸分裂が約 50~80%阻害する最低用量を染色体異常試験の最高濃度とした。

[染色体異常試験];

分裂指数の顕著な低下がみられた濃度を最高濃度とし、短時間処理 (3 時間処理) の S-9mix 非存在下では 250、125 および 62.5 μ g/mL、S-9mix 存在下では 125、62.5 および 31.25 μ g/mL、長時間処理 (24 時間) の S-9mix 非存在下では 62.5、31.25 および 15.63 μ g/mL を用いて、染色体異常誘発性を調べた。

観察は、検体処理群および溶媒対照群では 200 個、陽性対照群では 50 個の分裂中期像について行った。

以下の基準にしたがい、陽性判定を行った。

1) 溶媒対照群と比較して、特異的染色体異常数が顕著に増加した場合、または切断および断片のような他の特異的染色体異常数が高値であるとともに交換の

数が増加した場合、

2) 染色体異常を有する細胞数の増加に用量相関性がみられた場合

結 果：結果を表 1 に示した。

S-9mix 非存在下における 3 時間処理では、125 および 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で溶媒対照と比較して特異的染色体異常を有する細胞の割合に増加はみられなかった。250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度では細胞毒性（有糸分裂指数が溶媒対照群の 56.4%低下）により分裂中期像細胞の質が劣っており、異常染色体を有する細胞の割合が 4%であった。しかし、これらの所見は、溶媒対照背景データの範囲内（特異的染色体異常を有する細胞の割合 0~5%：1989 年 5 月~8 月に試験を開始した 15 試験）にあった。

S-9mix 存在下における 3 時間処理および S-9mix 非存在下における 24 時間処理では、異常染色体を有する細胞の割合(%)および異常染色体数は溶媒対照と同等であった。

一方、陽性対照のシクロホスファミドは S-9mix 存在下で、マイトマイシン C は S-9mix 非存在下で、染色体異常を有する細胞が高頻度で認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系を含む本試験条件下で、染色体異常誘発性を有さないものと判断された。

表1 試験の結果

S-9 mix	処理期間 (回復期間)	供試化合物	濃度 (µg/mL)	観察細胞数	有糸分裂指数 (%)	染色体異常																										
						異常を有する細胞率(%)	染色体切断	染色体切断	染色体欠失	染色体欠失	染色体交換	二動原体/多動原体	環状断片	染色体断片	染色体断片	異常を有する細胞率(%)	非特異的染色体キアプ	特異的染色体キアプ	染色体崩壊	早期染色体凝縮												
-	3h (21h)	陰性対照 ¹⁾	-	200	5.05	2	3							1			2	4														
		メトフラコロール	62.5	200	3.75	0.5	1											0.5	1													
		メトフラコロール	125	200	3.5	0.5	1											2														
		メトフラコロール	250	200	2.2	4	4	1										18	2	1												
		陽性対照 ²⁾	0.8	50	-	56	13																									
+	3h (21h)	陰性対照 ¹⁾	-	200	5.3	1.5	1																									
		メトフラコロール	31.25	200	3.6	2												1	1													
		メトフラコロール	62.5	200	3.5	1																										
		メトフラコロール	125.0	200	3.4	1																										
		陽性対照 ³⁾	40	50	-	24	1	1										6	3													
-	24h (0h)	陰性対照 ¹⁾	-	200	6.6	2																										
		メトフラコロール	15.63	200	14.9	1	1																									
		メトフラコロール	31.25	200	8.0	1.5																										
		メトフラコロール	62.5	200	2.1	1	1																									
		陽性対照 ²⁾	0.1	50	-	46	10	3										7	4													

1) ジメチルスルフォキシド
 2) マイトマイシンC
 3) シクロホスファמיד

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

4) チャイニーズハムスター骨髄細胞における核異常試験 (資料 No.T-42)

試験機関: Ciba-Geigy Ltd. (スイス国)

報告書作成年: 1984年 [GLP 対応]

検体の純度: %

試験動物: 交雑系チャイニーズハムスター、1群雌雄各3匹、
(雄4~9週齢、雌6~10週齢、体重雄24~31g、雌22~27g)

試験期間: 1984年5月21日~1984年10月2日

試験方法: 試験前に投与量設定のために実施した耐量試験から本試験における最高投与量を5000 mg/kgとした。検体を蒸留水に懸濁し、1250, 2500, 5000 mg/kgを1日1回、連続2日間強制経口投与した。第2回投与24時間後に屠殺し、大腿骨より骨髄を採取した。なお、陽性対照群にはシクロホスファミドを、陰性対照群には蒸留水を経口投与した。

試験項目: 雌雄各3匹の骨髄塗抹標本について単一ジョリー小体、赤血球の核片、赤芽球の小核、白血球芽球の小核及び倍数体細胞について検査した。

試験結果: 試験結果を下表に示した。

薬物	投与量 (mg/kg)	異常を有する細胞の割合 (%)					合計
		単一ジョリー 小体	赤血球 の核片	赤芽球 の小核	白血球芽 球の小核	倍数体 細胞	
メトクロール	0	0.02	0.02	0	0	0	0.04
	1250	0.12	0	0	0	0	0.12
	2500	0.05	0	0	0	0	0.05
	5000	0.10	0	0	0	0	0.10
シクロホスファミド	128	9.2	2.2	1.2	0.12	0.08	12.8

表中の数値は、雌雄計6匹の平均値

検体投与群では、5000 mg/kg群の雄1匹が死亡した。全投与群において、核の異常を示す骨髄細胞の増加は認められなかった。

一方、陽性対照のシクロホスファミド投与群には核の異常を示す細胞の著しい増加が観察された。

以上の結果より、メトクロールはチャイニーズハムスターの骨髄細胞に染色体異常を示す核の異常を誘発しないものと判断された。

5) マウスにおける優性致死試験

(資料 No.T-43)

試験機関: Ciba-Geigy Ltd. (スイス国)

報告書作成年: 1976 年

検体の純度: %

試験動物: NMRI系アルビノマウス、雄1群20匹、雌1群40匹/週

試験期間: 42日間(交配期間)

試験方法: 検体をカルボキシメチルセルローズ (CMC) 溶液に懸濁し、100及び300 mg/kgを雄に1回経口投与した。

対照群には CMC 溶液のみを投与し、雌は検体無処理とした。交配は投与直後から雄1匹に対し雌2匹を同居させ、1週間毎に新しい雌と入れかえて6週間行なった。雌は毎日膣栓によって交尾の完了を検査し、膣栓の観察された日を妊娠0日とした。

試験項目: 雄のみ投与後1週間、一般状態を観察した。雌は妊娠14日目に剖検し、交尾率、妊娠率、着床数、生存胚数及び死亡胚数を検査した。

試験結果: 交尾率、妊娠率、着床数、生存胚率及び死亡胚率に検体投与による影響は認められなかった。検査結果は以下の通り。

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

投与量 (mg/kg)	交配週	交尾率 (%)	妊娠率 (%)	平均着床数	生存胚率 (%)	死亡胚率 (%)
0	1	97.5	79.5	12.16	93.6	6.4
	2	90.0	100	12.44	94.2	5.8
	3	95.0	86.8	12.00	91.7	8.3
	4	100	82.5	12.55	94.4	5.6
	5	95.0	92.1	11.46	92.5	7.5
	6	95.0	94.7	12.58	93.2	6.8
100	1	92.5	83.8	12.10	94.1	5.9
	2	95.0	73.7	11.64	94.8	5.2
	3	90.0	88.9	12.34	95.2	4.8
	4	92.5	91.9	11.09	93.4	6.6
	5	92.5	91.9	11.44	91.3	8.7
	6	95.0	86.8	11.73	92.8	7.2
300	1	75.0	83.3	12.92	91.3	8.7
	2	82.5	97.0	12.00	95.6	4.4
	3	70.0	75.0	12.14	91.8	8.2
	4	85.0	91.2	11.65	93.9	6.1
	5	82.5	81.8	12.56	93.5	6.5
	6	75.0	90.0	11.11	93.7	6.3

注)

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{交尾を認めた雌動物数}}{\text{全雌動物数}} \times 100$$

$$\text{妊娠率 (\%)} = \frac{\text{妊娠雌動物数}}{\text{交尾を認めた雌動物数}} \times 100$$

$$\text{生存胚率 (\%)} = \frac{\text{生存胚数}}{\text{総着床数}} \times 100$$

$$\text{死亡胚率 (\%)} = \frac{\text{死亡胚数}}{\text{総着床数}} \times 100$$

以上より、メトラクロールを雄マウスに投与した場合、優性致死性は認められず、本試験における変異原性は陰性であると判断された。

6) DNA 損傷誘発性試験 (*in vitro*)

① 細菌を用いた DNA 損傷誘発試験

(資料 No.T-35)

試験機関：野村生物科学研究所

報告書作成年：1986年 「GLP 対応」

検体の純度： %

試験方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換え修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で DNA 損傷性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。判定は両株の阻止域の差が 2 mm 以下を陰性、2~3 mm を疑陽性、3 mm を越える場合を陽性とした。なお、陰性対照としてカナマイシン (KM) を、陽性対照として代謝活性化系存在下では 2-amino-anthracene (2-AA)、非存在下では 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) を処理した。

試験結果：結果を下表に示した。

S-9 mix	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
			M-45	H-17	
-	溶媒対照 (DMSO)		0 (0) 0	0 (0) 0	0
	メトラクロール	50	0 (0) 0	0 (0) 0	0
		100	0 (0) 0	0 (0) 0	0
		500	0.7 (0.8) 0.8	1.2 (1.2) 1.2	-0.4
		1000	2.4 (2.0) 1.6	2.7 (2.6) 2.5	-0.6
		5000	2.9 (2.4) 1.9	3.6 (3.6) 3.6	-1.2
	陰性対照 (KM) *	60	14.0	13.1	0.9
陽性対照 (AF-2) *	0.15	33.7	18.1	15.6	

() 内の数値は平均値

* : 表中の数値は 12 プレーートの平均値

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

S-9 mix	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
			M-45	H-17	
+	溶媒対照 (DMSO)		0 (0) 0	0 (0) 0	0
	メトクロロール	50	0 (0) 0	0 (0) 0	0
		100	0 (0) 0	0 (0) 0	0
		500	0 (0) 0	0 (0) 0	0
		1000	2.2 (1.5) 0.8	0 (0) 0	1.5
		5000	0.8 (0.8) 0.7	0 (0) 0	0.8
	陰性対照 (KM) *	60	15.7	13.9	1.8
陽性対照 (2-AA) *	15	7.5	0	7.5	

() 内の数値は平均値

* : 表中の数値は 12 プレートの平均値

検体処理群では、代謝活性化系を含めた本試験条件下で、いずれの濃度においても両株の間に明らかな生育阻止の差は認められず、陰性と判定された。

一方、陽性対照の AF-2 及び 2-AA は明らかに陽性であった。

以上の結果より、メトクロロールには DNA 損傷性がないものと判断された。

② 細菌を用いた DNA 損傷誘発性試験

(資料 No.T-36)

試験機関：日本食品分析センター

報告書作成年：1985 年

検体の純度： %

試験方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、DNA 損傷性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。なお、陰性対照としてカナマイシン (KM) を、陽性対照としてマイトマイシン C (MMC) を処理した。代謝活性化系存在下での検定は行なわなかった。

試験結果：結果を下表に示した。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)		0 (0)	0 (0)	0 (0)
メトラクロール	150	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	300	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	600	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1250	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	2500	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	5000	<1 (<1)	<1 (<1)	<1 (<1)
	10000	<1 (<1)	<1 (<1)	<1 (<1)
陰性対照 (KM)	1.0	2.7	2.4	<1
陽性対照 (MMC)	0.1	9.6	1.3	8.3

() 内の数値は平均値

検体処理群では、5000 及び 10000 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ の濃度において、両株に極めて僅かな生育阻止域を形成したが、両株の間に差は認められなかった。

一方、陽性対照の MMC では両株の間に明らかな生育阻止の差が生じた。

以上の結果より、メトラクロールには DNA 損傷性がないものと判断された。

③ 細菌を用いた DNA 損傷誘発試験

(資料 No.T-37)

試験機関：野村総合研究所

報告書作成年：1979 年

検体の純度： %

試験方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換え修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、DNA 損傷性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。なお、陰性対照としてカナマイシン (KM) を、陽性対照として 2- (2-furyl) -3- (5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) を処理した。代謝活性化系存在下での検定は行なわなかった。

試験結果：結果を下表に示した。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{well}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)		0 0 (0)	0 0 (0)	0
メトラクロール	500	0 0 (0)	0 0 (0)	0
	1000	0 0 (0)	0 0 (0)	0
	2500	0 0 (0)	0 0 (0)	0
	5000	0 0 (0)	0 0 (0)	0
	12500	0 0.5 (0.25)	0 0 (0)	0.25
	25000	0.5 0.5 (0.5)	0 0 (0)	0.5
陰性対照 (KM)	100	9 9 (9)	8 9 (9)	0
陽性対照 (AF-2)	10	20.5 24 (22)	9 11 (10)	12

() 内の数値は平均値

検体処理群では、いずれの濃度においても両株の間に明らかな生育阻止の差は認められなかった。

一方、陽性対照の AF-2 では明らかな生育阻止の差がみられた。

以上の結果より、メトラクロールには DNA 損傷性がないものと判断された。

④ ラット肝細胞における DNA 修復試験 (*in vitro*) (資料 No.T-44)

試験機関: Ciba-Geigy Ltd. (スイス国)

報告書作成年: 1984 年 [GLP 対応]

検体の純度: %

試験期間: 1984 年 6 月 18 日～1984 年 8 月 3 日

試験方法: 雄ラットより新たに分離、培養した肝細胞 (ART PH 1D RAT) を用い、オートラジオグラフ法により試験を行なった。試験前に濃度設定のために実施した細胞毒性試験から本試験の濃度は 0.28、1.40、6.98、34.9 μ g/mL とした。

検体を加えた直後に 3 H-チミジンを加え、5 時間培養した。1 群 3 枚のスライドから合計 150 個の核を調べ、DNA 損傷の修復時における 3 H-チミジンの取り込みを平均銀粒子数で評価した。平均銀粒子数が両陰性対照群の 2 倍以上であれば陽性と判定した。

なお、陽性対照としてジメチルニトロサミン (DMN) 100mM 処理群を、陰性対照としてジメチルスルホキシド (DMSO) 処理群および無処理対照群を設けた。

試験結果: 結果を下表に示した。

試験群	核あたりの平均銀粒子数
陰性対照群: 無処理	0.99
陰性対照群: 溶媒 (DMSO) のみ添加	1.53
検体処理群*: メトラクロール 34.9 μ g/mL	1.37
メトラクロール 6.98 μ g/mL	1.58
メトラクロール 1.40 μ g/mL	1.62
メトラクロール 0.28 μ g/mL	1.67
陽性対照群: DMN 100mM	15.8

*: 検体処理濃度は、比重 1.117 を用いて申請者が nL から μ g に換算

メトラクロールの各濃度 (0.28、1.40、6.98、34.9 μ g/mL) における核あたりの平均銀粒子数は陰性対照と比較して顕著な差はなかった。

一方、陽性対照として用いた DMN では核あたりの平均銀粒子数に著しい増加が認められた。

以上の結果より、メトラクロールはラット肝細胞に対して 3 H-チミジンの取り込みの増加を誘発せず、DNA 損傷性は陰性であると判断された。

7) *in vivo* DNA 合成試験

① ラット肝細胞を用いた *in vivo* 不定期および複製 DNA 合成試験

(資料 No.T-46)

試験機関 : Hazleton Biotech. Comp. (米国)

報告書作成年 : 1988 年 [GLP 対応]

検体の純度 : %

試験動物 : Sprague-Dawley 系ラット、1 群雌雄各 3 匹

週齢 ; 6~10 週齢、体重 ; 150~375g

試験方法 : 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験および複製 DNA 合成 (RDS) 試験

検体を PEG200 : エタノール : 水 (5 : 3 : 2) に懸濁し、3、30、300 および 450mg/kg の用量で単回経口投与した。溶媒対照としては PEG200 : エタノール : 水 (5 : 3 : 2) を単回経口投与し、陽性対照物質としては、ジメチルニトロソアミン (DMN) 腹腔内投与した。投与 2 および 15 時間後に各動物から肝細胞を単離し、プラスチック製カバースリップ上に定着させ培養液中で培養した。定着後は 18~19 時間 ³H-標識チミジンを含む培地で培養して、オートラジオグラフィを用いて UDS 試験を行った。また、24 および 48 時間後に肝細胞を採取して、オートラジオグラフィを用いて DNA の複製 (S 期) 合成を受けている細胞を測定し、RDS 試験を行った。尚、2 および 15 時間後の試料に関しても、S 期の DNA 複製を測定した。

[判定基準] ; 以下の条件のうち少なくとも 1 つを満たした場合に陽性とした。

- ① 核当りの平均正味粒子数が溶媒対照の平均正味粒子数より 6 個あるいはそれ以上に増加した場合。
- ② 6 個あるいはそれ以上の正味粒子数を有する核の割合が溶媒対照より 10% あるいはそれ以上に増加した場合。
- ③ 20 個あるいはそれ以上の粒子数を有する核の割合が分析した核の 10% あるいはそれ以上の場合。

結果 : UDS 試験の結果を表 1 および表 2、RDS 試験の結果を表 3 および表 4 に示した。UDS 試験では、雌雄ともいずれの投与量においても陽性反応は認められなかった。一方、陽性対照では、陽性基準のいずれの条件も満たしていた。また、RDS 試験では、雌の 500mg/kg 投与群で S 期細胞の増殖が認められた。

これらの結果から、メトラクロールはラット肝細胞に対して遺伝毒性はないと判断された。また、S 期肝細胞の増殖を促進することが示され、雌で特に作用が顕著であった。

表1 UDS 試験結果<雄>

	投与濃度 (mg/kg)	2時間後試料			15時間後試料		
		基準1	基準2	基準3	基準1	基準2	基準3
溶媒対照	—				0.80	0.0	0.0
					0.49	0.7	0.7
					0.75	0.0	0.0
検体	3 (2.88)	0.85	3.3	0.0	0.53	0.7	0.0
		0.57	0.0	0.0	0.50	0.0	0.0
		0.49	0.0	0.0	0.24	0.0	0.0
	30 (31.91)	1.29	5.3	0.0	0.44	0.0	0.0
		0.91	2.0	0.0	0.29	0.0	0.0
		0.80	0.0	0.0	0.40	0.0	0.0
	300 (301.03)	0.69	0.0	0.0	0.29	0.0	0.0
		0.51	0.0	0.0	0.43	0.0	0.0
		0.59	0.0	0.0	1.23	0.7	0.0
	450 (474.5)	0.31	0.0	0.0	0.67	0.0	0.0
		0.33	0.0	0.0	0.35	0.0	0.0
		0.52	0.0	0.0	0.36	0.0	0.0
陽性対照 (DMN)	20	6.61	50.0	4.0			
		11.49	82.0	11.3			
		6.46	38.0	6.0			

()内は実測濃度

基準1: 150細胞中の核当り平均正味粒子数

基準2: 核当り正味粒子数が6あるいはそれ以上の細胞の割合 (%)

基準3: 核当り正味粒子数が20あるいはそれ以上の細胞の割合 (%)

表2 UDS 試験結果<雌>

	投与濃度 (mg/kg)	2時間後試料			15時間後試料		
		基準1	基準2	基準3	基準1	基準2	基準3
溶媒対照	—				0.67	0.7	0.7
					0.56	0.7	0.0
					0.63	0.0	0.0
検体	3 (3.07)	0.53	0.0	0.0	0.72	0.0	0.0
		0.76	1.3	0.0	0.87	0.7	0.0
		0.77	0.0	0.0	0.58	0.0	0.0
	30 (31.49)	0.49	0.7	0.0	0.79	0.0	0.0
		0.47	0.7	0.0	0.74	0.0	0.0
		0.67	0.0	0.0	0.49	0.0	0.0
	300 (291.9)	0.73	0.7	0.0	0.69	1.3	0.0
		0.88	0.8	0.0	0.84	0.7	0.0
		0.75	0.4	0.0	0.97	1.3	0.7
	450 (519.5)	1.05	1.3	0.0	0.85	0.7	0.0
		0.99	0.7	0.0	0.57	0.0	0.0
		0.78	0.7	0.0	0.72	0.0	0.0
陽性対照 (DMN)	10	9.20	65.3	9.3			
		7.50	57.3	0.7			
		9.05	66.0	5.3			

()内は実測濃度

基準1: 150細胞中の核当り平均正味粒子数

基準2: 核当り正味粒子数が6あるいはそれ以上の細胞の割合 (%)

基準3: 核当り正味粒子数が20あるいはそれ以上の細胞の割合 (%)

表3 雄のRDS試験結果 (S期増殖細胞の割合、%)

	投与濃度 (mg/kg)	2時間後 試料	15時間後 試料	24時間後 試料	48時間後 試料
溶媒対照	—		0.0		0.27
			0.0		0.23
			0.1		0.0
検 体	3 (2.88)	0.0	0.06	0.0	0.03
		0.0	0.1	0.03	0.1
		0.0	0.1	0.0	0.27
	30 (31.91)	0.0	0.0	0.03	0.0
		0.0	0.0	0.03	0.17
		0.0	0.1	0.0	0.07
	300 (301.03)	0.1	0.0	0.03	0.07
		0.0	0.2	0.37	0.6
		0.06	0.1	0.4	0.43
	450 (474.5)	0.0	0.6	0.57	0.23
		0.1	0.0	0.03	0.53
		0.05	0.0	0.63	0.6
陽性対照 (DMN)	20	0.2		0.8	3.5
		0.0		1.13	4.0
		0.0		2.9	4.65

() 内は実投与量

表4 雌のRDS試験結果 (S期増殖細胞の割合、%)

区	投与濃度 (mg/kg)	2時間後 試料	15時間後 試料	24時間後 試料	48時間後 試料
溶媒対照	—		0.3		0.6
			0.6		0.4
			0.3		0.2
検 体	3 (3.07)	0.1	0.2	0.5	0.5
		0.2	0.1	0.5	0.9
		0.2	0.2	0.2	0.5
	30 (31.49)	0.3	0.1	1.06	1.0
		0.3	0.3	0.9	0.3
		0.7	0.2	1.3	0.3
	300 (291.9)	0.1	0.0	1.0	1.4
		0.4	0.4	0.5	0.9
		0.1	0.1	0.7	1.6
	450 (519.5)	2.8	1.1	2.6	1.5
		0.7	0.2	1.2	0.9
		1.8	2.3	4.3	1.8
陽性対照 (DMN)	10			1.2	1.3
				3.0	1.1
				1.8	3.3
	20			1.5	2.2
				1.6	2.5
			5.8	4.0	

() 内は実投与量

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

- ② ラット肝細胞を用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成試験 (資料 NoT-47)
試験機関 : Hazleton Washington Inc. (米国)
報告書作成年 : 1994 年 [GLP 対応]

検体の純度 : %

試験動物 : Sprague-Dawley 系ラット (CRL:CD®BR)
1 群雌雄各 3 匹 (雄の最高投与量では 5 匹)
試験開始時体重 ; 雄 259.0~285.9g、雌 190.5~227.4g

試験方法 : 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

検体をコーン油に懸濁し、雄では 500、1250、2500 および 4000mg/kg、雌では 500、1000 および 1500mg/kg の用量で単回経口投与した。溶媒対照としてはコーン油を単回経口投与し、陽性対照物質としては、ジメチルニトロソアミン (DMN) を腹腔内投与した。投与後 2 および 15 時間に各動物から肝細胞を単離し、プラスチック製カバースリップ上に定着させ培養液中で培養した。定着後は 4 時間 ³H-標識チミジンを含む培地で培養して、オートラジオグラフィを用いて UDS 試験を行った。

[用量設定根拠] :

[判定基準] ; 以下の条件を 1 つでも満たした場合、陽性とした。

- ① 核当りの平均正味粒子数が溶媒対照の平均正味粒子数より 5 個あるいはそれ以上に増加した場合。
- ② 5 個あるいはそれ以上の正味粒子数を有する核の割合が溶媒対照より 10% あるいはそれ以上に増加した場合。

試験結果 : 結果を表 1~4 に示した。

UDS 分析用に採取した肝細胞の生存率は投与後 2 および 15 時間で、それぞれ 75.4~93.0% および 62.9~94.0% であった。培養皿への付着効率は、低濃度では溶媒対照とほぼ同等であったが、高用量になるに従って効率が低くなった。さらに、

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

定着細胞の生存率はいずれの濃度でも溶媒対照と同等であった。付着効率低下は細胞毒性の影響と考えられた。

雌に 500mg/kg を投与した 15 時間後では、S-期の細胞の有意な増加がみられた。いずれの時点および濃度でも、雌雄とも不定期 DNA 合成の誘発は認められなかったが、陽性対照は明確な誘発を示した。

以上の結果から、検体は本試験条件下での *in vivo* ラット肝細胞において DNA 損傷は誘発しないものと判断された。

表1 UDS 分析結果 (雄、試料採取時間; 投与後 2 時間)

投与化合物	濃度	付着効率 (%)	付着後生存率 (%)	平均核粒数	標準偏差	≥5%細胞の平均%*	S-期細胞数
溶媒対照	10ml/kg	70.8	89.8	0.13	0.32	6.67	0.93
		76.6	91.5	-0.67	0.40	2.00	0.87
		81.5	98.0	0.46	0.19	7.33	0.27
検体	500 mg/kg	55.3	90.9	—	—	—	—
		86.9	94.7	—	—	—	—
		68.2	92.8	—	—	—	—
	1250 mg/kg	56.4	86.6	0.41	0.47	5.33	1.13
		54.4	95.7	0.30	0.30	6.00	0.87
		51.5	94.8	0.33	0.12	7.33	0.80
	2500 mg/kg	32.1	89.5	0.43	0.29	8.67	0.67
		48.6	96.5	0.17	0.39	4.67	0.67
		34.3	92.6	-0.03	0.17	5.33	0.80
	4000 mg/kg	34.1	96.3	0.02	0.67	4.00	0.87
		38.4	96.5	-0.23	0.62	3.33	1.20
		33.8	95.9	0.24	0.17	5.33	0.60
陽性対照 (DMN)	10mg/kg	72.9	90.9	18.83	3.34	98.0	0.87
		76.8	94.8	20.52	1.72	100.0	0.67
		56.3	91.3	**	**	**	**

— : 測定せず

* : 核粒子数 ≥5.0 の核の平均割合 (%)

** : スライド上に細胞が分布せず 1 動物測定せず

表2 UDS 分析結果 (雌、試料採取時間; 投与後 2 時間)

投与化合物	濃度	付着効率 (%)	付着後生存率 (%)	平均核粒数	標準偏差	≥5%細胞の平均%*	S-期細胞数
溶媒対照	10ml/kg	49.1	93.8	-0.56	0.46	0.00	0.80
		69.1	93.5	-0.03	0.30	0.00	0.80
		53.6	95.3	**	**	**	**
検体	500 mg/kg	40.5	95.4	-0.07	0.74	1.33	0.67
		55.7	97.0	-0.15	0.43	2.00	1.00
		27.6	97.6	**	**	**	**
	1000 mg/kg	45.0	93.3	0.09	0.23	1.33	0.13
		55.9	90.1	-0.20	0.43	2.00	1.13
		42.5	91.8	0.36	0.37	4.00	0.80
1500 mg/kg	35.3	97.0	0.26	0.47	1.33	1.73	
	44.0	94.0	0.03	0.15	2.00	0.87	
	45.5	95.7	0.01	0.25	1.33	0.33	
陽性対照 (DMN)	10mg/kg	93.9	97.6	20.48	3.55	97.33	0.67
		75.3	92.3	24.58	1.36	92.67	0.40
		80.0	95.2	21.98	2.18	97.33	1.20

* : 核粒子数 ≥5.0 の核の平均割合 (%)

** : コンタミあるいはスライド上に細胞が分布せず 1 動物測定せず

表3 UDS 試験、15時間、雄

投与化合物	濃度	付着効率 (%)	付着後生存率 (%)	平均核粒数	標準偏差	≥5%細胞の平均% *	S-期細胞数
溶媒対照	10ml/kg	67.8	92.7	-0.15	0.34	0.67	0.07
		74.7	94.3	0.44	0.49	5.33	0.20
		74.2	94.9	-0.56	0.48	2.67	0.00
検体	500 mg/kg	65.9	91.3	—	—	—	—
		67.4	92.7				
		75.6	89.4				
	1250 mg/kg	42.9	97.3	0.21	0.08	1.33	0.47
		24.1	88.9	-0.33	0.26	0.00	0.07
		37.2	91.3	-0.36	0.21	1.33	0.13
	2500 mg/kg	9.4	91.3	1.00	0.29	6.67	0.00
		44.7	97.7	-0.04	0.00	8.00	0.30
		13.6	93.8	**	**	**	**
	4000 mg/kg	53.8	83.8	0.09	0.27	1.33	0.13
		16.5	93.4	-0.40	0.59	3.33	0.20
		21.2	90.9	0.65	0.48	6.67	0.20
陽性対照 (DMN)	15mg/kg	62.2	98.3	13.83	2.90	95.33	0.07
		25.8	87.0	13.98	1.08	96.67	0.13
		4.7	100.0	**	**	**	**

— : 3濃度区あり測定せず

* : 核粒子数≥5.0の核の平均割合 (%)

** : スライド上に細胞が分布せず1動物測定せず

表4 UDS 試験、15時間、雌

投与化合物	濃度	付着効率 (%)	付着後生存率 (%)	平均核粒数	標準偏差	≥5%細胞の平均% *	S-期細胞数
溶媒対照	10ml/kg	76.2	95.4	0.59	0.43	2.00	0.80
		69.7	93.5	0.01	0.58	4.00	0.53
		51.0	95.7	0.23	0.56	0.67	0.47
検体	500 mg/kg	33.1	97.0	-0.07	0.63	1.33	2.20
		84.6	94.0	0.35	0.43	4.00	2.47
		69.6	96.8	-0.55	0.63	1.33	4.80
	1000 mg/kg	37.2	97.4	-0.23	0.15	0.67	0.73
		30.0	92.4	0.34	0.67	3.33	0.93
		23.1	94.6	**	**	**	**
1500 mg/kg	51.8	93.4	0.35	0.32	2.67	0.47	
	12.0	99.4	0.30	0.79	4.00	0.47	
	43.3	93.0	0.33	0.61	3.33	0.07	
陽性対照 (DMN)	15mg/kg	59.0	98.9	11.85	2.38	87.33	0.47
		52.7	96.3	15.90	1.93	96.67	0.73
		55.2	96.8	12.66	4.54	86.00	0.47

* : 核粒子数≥5の核の平均割合 (%)

** : スライド上に細胞が分布せず1動物測定せず

(14) 生体機能への影響

メトラクロールを用いた薬理試験

(資料 No.T-48)

試験機関：東邦大学医学部/薬効開発研究会

報告書作成年：1980年

検体の純度： %

(1) マウスの中樞神経系への影響 (Irwin 法等)

(a) 一般症状

試験動物：ICR系マウス雄（体重約25g）、1群7匹

試験方法：1%CMC生理食塩水に懸濁し、0、200、600および1000mg/kgを20mL/kgの液量で経口投与した。投与後、中枢神経症状および自律神経症状をIrwinの症状行動観察表により24時間観察した。

試験結果：下表に示す。

600および1000mg/kgの投与で各1例の死亡がみられた。

投与量 (mg/kg)	0	200	600	1000
一般症状	変化なし	自発運動の軽度抑制が15分～1時間後に少数例に認められた。	死亡例1例（15分後、痙攣から呼吸困難を示して死亡） 1000mg/kg群と同様の症状を示したが軽度であった。症状は3時間後には消失した。	投与後15分頃より洗顔運動、外刺激に対する敏感な反応、挙尾反応等を示す。その後、腹臥位をとり、外刺激に対する反応の低下。間歇的な痙攣をくりかえす例のうち1例が20分後に死亡。症状は3時間後には消失した。

(b) 自発運動量への影響

試験動物：ICR系マウス雄（体重約25g）、1群10匹

試験方法：1%CMC生理食塩水に懸濁し、0、200、400および600mg/kgを20mL/kgの液量で経口投与した。投与後、マウスを回転カゴに乗せ、10分間隔で計360分間、カゴの回転数を測定した。

試験結果：下表に示す。

200 mg/kgの投与で自発運動の軽度抑制、また400および600 mg/kgの投与で顕著な抑制が認められた。

自発運動量 (カゴの回転数)	投与量 (mg/kg)	0	200	400	600
	10分間の運動量		投与直後に最大(212回転)となり、その後徐々に減少し、300分以後は約23回転。	投与後70分まで低く、20から30分、70分に有意な減少(p<0.05)。80分以降は対照群と同等	投与後80分まで顕著に低く、10~40分、60~80分に有意な減少(p<0.05、p<0.01)。90分以後は対照群と同等。
総運動量		投与後、時間の経過に伴い減少。	対照群に対して低く、60および70分でのみ有意な減少(p<0.05)。	対照群に対して低く、10~150分で有意な減少(p<0.05、p<0.01)。	対照群に対し低く、10分、40~220分後に有意な減少(p<0.05、p<0.01)。180分以降は対照群との差は縮まる傾向がみられた。

統計処理法：t検定

(2) 末梢神経系への影響

(a) ラット摘出横隔膜神経筋に及ぼす影響 (Buelbringおよび久我法)

試験動物：Wistar系ラット雄(体重約300g)

試験方法：50ml Magnus管中に1gの負荷をかけ懸垂した摘出横隔膜神経筋標本に検体を添加し、各用量につき4例検討した。

試験結果：下表に示す。

神経刺激による筋収縮をメトラクロールは 10^{-5} g/mlで僅かに、 10^{-4} g/mlで163~262%増強するが、その増強作用はd-tubocurarine(2×10^{-6} g/ml)で遮断された。しかしながら、メトラクロールの作用はPAMでは影響を受けなかった。また、メトラクロールには、d-tubocurarineおよびphysostigmineの筋収縮に対する作用への影響はなかった。

単 独 作 用	投与量 (g/ml)	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
		収縮作用	—	—	僅かに増強
メ ト ラ ク ロ ー ル の 前 処 理	試験項目	メトラクロール(10^{-4} g/ml)の筋収縮作用に対するd-tubocurarine(2×10^{-6} g/ml)の効果			
	結 果	d-tubocurarineにより遮断			
	試験項目	メトラクロール(3×10^{-6} g/ml)の前処理がd-tubocurarine(2×10^{-6} g/ml)の筋収縮遮断作用およびphysostigmine(2×10^{-6} g/ml)の筋収縮増強作用に及ぼす影響			
	結 果	d-tubocurarine 影響なし		physostigmine 影響なし	
メ ト ラ ク ロ ー ル の 後 処 理	試験項目	PAM(10^{-4} g/ml)の前処理がメトラクロール(10^{-4} g/ml)の筋収縮増強作用に及ぼす影響			
	結 果	影響なし			

(b) 瞳孔への影響

試験動物：ICR系マウス雄（体重約25g）、1群7匹

試験方法：1%CMC生理食塩水に懸濁し、0、100、200および400mg/kgを20mL/kgの液量で経口投与した。投与後、瞳孔径を経時的に24時間観察した。

試験結果：下表に示す。

400 mg/kgで散瞳の傾向が認められた。

投与量 (mg/kg)	0	100	200	400
瞳孔径	投与前の 78.3~97.8%	対照群と差なし	対照群と差なし	投与15~30分後3/7例に痙攣が発現、1例は30分後に死亡。 投与5、15および30分後に対照群と比較して散瞳の傾向あり。 60分以降は対照群と差なし。

(3) 平滑筋への影響

(a) モルモットの摘出回腸に及ぼす影響（Magnus法）

試験動物：Hartley系モルモット雄（体重約300g）

試験方法：次表濃度のメトラクロール調製液（栄養液：低Ca Locke-Ringer液）に標本を浸漬し、各用量につき6例検討した。

試験結果：次表に示す。

10^{-8} ~ 10^{-4} g/mlの濃度でモルモット摘出回腸に影響はなかった。

10^{-6} g/ml以上の濃度でAChの収縮作用、 10^{-5} g/ml以上の濃度でhistamineの収縮作用を有意に抑制した。

投与量 (g/mL)	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
単独作用 (収縮誘発)	—	—	—	—	—
収縮減退作用 (ACh累積投与)	NT	—	有意に 抑制	有意に 抑制	有意に 抑制
収縮減退作用 (histamine累積投与)	NT	NT	—	有意に 抑制	有意に 抑制

註) NT=Not tested
—：作用を認めず。

(b) ラットの摘出子宮に及ぼす影響

試験動物：Wistar系ラット雌（体重約200g）

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

試験方法：次表濃度の調製液（栄養液 低 Ca Locke-Ringer 液）に標本を浸漬し、各用量につき 6 例検討した。

試験結果：次表に示した。

10^{-8} ~ 10^{-4} g/ml の濃度でラット摘出子宮の収縮に影響はなかった。

10^{-6} g/ml 以上の濃度で ACh および oxytocin の収縮作用を有意に抑制した。

投与量 (g/ml)	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
単独作用 (収縮誘発)	—	—	—	—	—
収縮減退作用 (ACh 累積投与)	NT	—	有意に 抑制	有意に 抑制	有意に 抑制
収縮減退作用 (oxytocin 累積投与)	NT	—	有意に 抑制	有意に 抑制	有意に 抑制

註) NT = Not tested

— : 作用を認めず。

(4) ウサギおよびモルモットの循環器系および呼吸に及ぼす影響

(a) ウサギの血圧、心拍数および呼吸に及ぼす影響

試験動物：日本白色種ウサギ雄（体重約 2.5kg）

試験方法：1%CMC 生理食塩水に懸濁し、0.1~30mg/kg の用量を液量 20mL/kg で大腿静脈投与し、各用量について 4~5 例検討した。

試験結果：下表に示す。

メトラクロールの静注により 10 mg/kg 以上で血圧下降、心拍数の抑制、呼吸振幅の増大、1 mg/kg 以上で呼吸数の増加がみられた。

投与量 (mg/kg)	血 圧	心 拍 数	呼 吸 数	呼 吸 振 幅	
単独作用	30	急速に下降、死亡	徐々に減少、死亡	急速に増加後、減少し、呼吸停止	増大したのち減少呼吸停止
	10	一過性の血圧下降	一過性の徐脈	持続的に増加	徐々に増大
	1	影響なし	影響なし	持続的に増加	影響なし
	0.1	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし
ACh*との相互作用	1	若干増強されたが	影響なし	増強傾向	ほとんど影響なし
	0.1	有意差なし		影響なし	
Adr*との相互作用	1	ほとんど影響なし	ほとんど影響なし	ほとんど影響なし	ほとんど影響なし
	0.1				

註) * : メトラクロール前処理後 ACh 3 μ g/kg、Adr (Adrenaline) 5 μ g/kg 投与

(b) ウサギの摘出心に及ぼす影響 (Langendorff 法)

試験動物：日本白色種ウサギ雄（体重約 2.5kg）

試験方法：動脈カニューレを介して検体を懸濁した Krebs-Henseleit 液 0.1ml を注入し、各用量につき 5 例検討した。

試験結果：次表に示す。

10^{-4} g/mL 以上で摘出心の冠血管灌流量の減少および収縮力の抑制、 10^{-3} g/mL で拍動数の減少が認められた。

メトラクロール 10^{-6} g/mL の前処理による ACh および Adr への影響は認められなかった。

投 与 量		拍 動 数	灌流量 (冠血管)	心 収 縮 力
単 独 作 用	10^{-5} g/mL	有意差なし	有意差なし	有意差なし
	10^{-4} g/mL	有意差なし	減少傾向 (ただし、2 分後のみ有意)	0.5 分後に有意な減少、その後回復
	10^{-3} g/mL	投与直後より経時的に減少し、約 6% 減少 (有意) を維持	有意な減少 (0.5~4 分間のみ)	投与直後より経時的に減少。全期間にわたり有意な減少
ACh* と相互作用		影響なし	影響なし	影響なし
Adr* と相互作用		影響なし	影響なし	影響なし

註) * : メトラクロール 10^{-5} g 処理後 ACh 5×10^{-6} g あるいは Adr 5×10^{-6} g 添加

(c)モルモットの摘出心房に及ぼす影響 (Magnus 法)

試験動物：Hartley 系モルモット雄 (体重約 500g)

試験方法：下表濃度に調製した Locke-Ringer 液で灌流し、各用量につき 3 例検討した。

試験結果：下表に示す。

10^{-5} g/mL 以上で摘出心房の収縮幅、収縮回数抑制が認められた。

メトラクロール 10^{-6} g/ml の前処理による ACh および Adr への影響は認められなかった。

投 与 量		収 縮 幅	収 縮 回 数
単 独 作 用	10^{-6} g/ml	有意差なし	有意差なし
	10^{-5} g/ml	徐々に減少、有意差はなかったが 5 例中 2 例で顕著	減少傾向、但し有意差なし
	10^{-4} g/ml	急速に減少、10 分以降も拍動を続けたのは 1 例のみ	10 分後まで急速に減少、6 および 10 分後に各 1 例が拍動停止
ACh* との相互作用		影響なし	影響なし
Adr* との相互作用		影響なし	影響なし

註) 30ml の Magnus 管使用

* : メトラクロール 10^{-6} g/ml 前処理、ACh 5×10^{-9} M あるいは Adr 10^{-8} M 添加

(5) ウサギの血液系に及ぼす影響

(a) 出血時間および血液凝固時間への影響 (Duke 法および Lee-White 法)

試験動物：日本白色種ウサギ雄 (体重約 3.0 kg)、1 群 3 匹

試験方法：1%CMC 生理食塩水に懸濁し、1.5 および 10mg/kg の用量を液量 10mL/kg で大腿静脈投与し、投与 1 時間後に後耳介動脈より採血した。採血終了時に創面を開放して出血させ、出血時間 (Duke 法) を測定した。凝固時間は Lee-White 法で測定した。

試験結果：ウサギの血液の出血時間および凝固時間に影響は認められなかった。

(b) 溶血作用

試験動物：日本白色種ウサギ雄 (体重 3.0 kg)、採血量 5~10ml

試験方法：ヘパリン (100U) 添加の注射筒で血液 5~10ml を採血し、3000rpm で 5 分間遠心分離し、赤血球を得た。この赤血球を上清が無色透明になるまで、生理食塩水で十分に洗い、2%赤血球浮遊液を調製した。

1%CMC 生理食塩水を溶媒として 0.01 μ g/mL~1mg/mL の濃度の検体と 2%赤血球浮遊液を 1:1 で混和し、37 $^{\circ}$ C でインキュベートし 24 時間後まで経時的に観察した。

試験結果：1mg/mL では 2 時間以後中程度、4 時間以後完全溶血がみられた。0.1mg/mL では 8 時間以後軽度溶血がみられた。

0.01 μ g~0.01 mg/mL では溶血作用は全く認められなかった。

時 間	インキュベーション時間 (37 $^{\circ}$ C)						
	0.5	2	4	8	10	20	24
生理食塩水	0	0	0	0	0	0	0
水	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
1%CMC	0	0	0	0	0	0	0
投 与 量	1 mg/mL	0	+2	+3	+3	+3	+3
	0.1 mg/mL	0	0	0	+1	+1	+1
	0.01 mg/mL	0	0	0	0	0	0
	1 μ g/mL	0	0	0	0	0	0
	0.1 μ g/mL	0	0	0	0	0	0
	0.01 μ g/mL	0	0	0	0	0	0

註) +3：完全溶血、+2：中等度溶血、+1：軽度溶血、0：溶血せず

以上の結果より、メトラクロールの比較的中毒量に近い量を投与したとき、次の変化が認められた。中枢神経に対しては興奮ののち抑制傾向を示し、自発運動量の低下がみられ、末梢神経系に関しては、横隔膜神経筋での収縮増強および散瞳傾向がみられた。循環器系においては血圧下降の心拍数減少、冠血管灌流量および心収縮力の抑制がみられ、平滑筋および心筋に対する非特異的な抑制により降圧、徐脈が生じたものと思われ、また、呼吸数の増加も降圧によるものと考えられた。

横隔膜神経筋の収縮増強作用は d-tubocurarine で遮断され、PAM では影響を受けなかったところから、シナプス前への影響が大きく作用していると考えられた。

溶血が高濃度でみられたが、本試験では *in vitro* 条件下であり、メトラクロールの代謝物による影響は考えられないことから、認められた溶血作用は物理化学的作用の影響であると考えられた。

「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 (動物)		投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	無影響量 (mg/kg)	影響量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系	一般症状 (マウス)	経口 (CMC)	0, 200, 600, 1000	雄 7	—	200	痙攣、洗顔運動、 敏感反応、挙尾の興 奮症状およびその 後の抑制傾向
	自発運動量 (マウス)		0, 200, 400, 600	雄 10	—	200	自発運動量の低下
末梢神経系	摘出横隔膜 神経筋懸垂動作 (ラット)	Tyrode 液 添加	10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/mL	雄 4	10^{-6} g/mL	10^{-5} g/mL	神経刺激による筋収 縮を増強し、増強作 用は d-tubocurarine で 遮断。PAM では影響 なし。
	瞳孔径 (マウス)	経口 (CMC)	0, 100, 200, 400	雄 7	200	400	散瞳傾向
平滑筋	摘出回腸 (モルモット)	Locke-Ringer 液に添加	10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/mL	雄 6	10^{-7}	10^{-6}	10^{-6} g/mL 以上で Ach, 10-5g/ml. 以上で histamine による収縮 を抑制
	摘出子宮 (ラット)	Locke-Ringer 液に添加	10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/mL	雌 6	10^{-7}	10^{-6}	10^{-6} g/mL 以上で Ach および oxytocin, 10^{-5} g/mL 以上で histamine の収縮作 用を抑制
呼吸・ 循環器系	呼吸数 (ウサギ、麻酔)	静注 (CMC)	0.1, 1, 10, 30	雄 4~5	0.1	1	呼吸数増加 Ach 相互作用増強 傾向
	1				10	血压下降 Ach, Adr 相互作用 なし	
	1				10	心拍数減少 Ach, Adr 相互作用 なし	
	1				10	呼吸振幅の増大 Ach, Adr 相互作用 なし	
	拍動数 (ウサギ、摘出心)	Krebs-henclit 液 0.1ml. 注入	10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} g/mL	雄 5	10^{-4}	10^{-3}	拍動数減少 Ach, Adr との相互 作用なし
	冠血管灌流量 (ウサギ、摘出心)				10^{-5}	10^{-4}	灌流量減少 Ach, Adr との相互 作用なし
	心収縮力 (ウサギ、摘出心)				10^{-5}	10^{-4}	心収縮力減少 Ach, Adr との相互 作用なし
	収縮幅 (モルモット、摘出心房)	Locke-Ringer 液 灌流	10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/mL	雄 3	10^{-6}	10^{-5}	収縮幅減少 Ach, Adr との相互 作用なし
	収縮回数 (モルモット、摘出心房)				10^{-6}	10^{-5}	収縮回数減少 Ach, Adr との相互 作用なし
血液系	出血時間 (ウサギ)	静注 (CMC)	1, 5, 10	雄 3	10		影響なし
	血液凝固時間 (ウサギ)		1, 5, 10	雄 3	10		影響なし
	溶血作用 (ウサギ)	—	0.01µg~ 1mg/mL	雄 1	0.01	0.1	0.1mg/mL 以上で溶 血作用

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

(15) 作用機序試験

① ラットを用いた肝細胞増殖、アポトーシスおよび肝酵素誘導の検討

(資料 No.T-49)

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

- ② ラット肝細胞を用いた *in vivo* / *in vitro* 複製 DNA 合成試験 (資料 No.T-50)

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

2. 原体中混在物および代謝物

(1) の変異原性試験

1) 細菌を用いた復帰変異試験

(資料 No.IT-01)

試験機関：日本食品分析センター

報告書作成年：1985年

検体： (代謝物)

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA100、TA1537、TA1538、TA98 株)、トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9 mix) の存在下および非存在下で Ames らの方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) に溶解させた。

試験結果：本試験の結果を下表に示した。

S-9 mix	薬物	濃度 (µg/プレート)	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	TA1538	TA98
-	溶媒対照 (DMSO)		15 18 (17)	6 4 (5)	113 142 (128)	3 5 (4)	11 7 (9)	18 22 (20)
	10		30 21 (26)	7 8 (8)	126 130 (128)	1 4 (3)	5 3 (4)	19 18 (19)
	50		10 14 (12)	5 6 (6)	114 117 (116)	4 4 (4)	6 7 (7)	32 17 (25)
	100		13 14 (14)	5 9 (7)	109 139 (124)	5 5 (5)	7 4 (6)	11 20 (16)
	500		18 9 (14)	6 9 (8)	156 203 (180)	3 2 (3)	8 5 (7)	24 10 (17)
	1000		17 12 (15)	14 7 (11)	271 273 (272)	4 3 (4)	10 7 (9)	10 9 (10)
	5000		8 8 (8)	1 5 (3)	374 328 (351)	2 0 (1)	6 1 (4)	14 13 (14)
	陽性対照	名称		AF-2	ENNG	AF-2	9-AA	2-NF
濃度			0.01	5	0.01	80	2	0.1
コロニー数 /プレート			874 842 (858)	2375 2854 (2615)	886 793 (840)	704 755 (730)	361 368 (365)	309 180 (245)

() 内の数値は平均値

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

ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

9-AA : 9-aminoacridine

2-NF : 2-nitrofluorene

* : µg/プレート

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

S-9 mix	薬物	濃度 (μ /プレート)	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	TA1538	TA98	
+	溶媒対照 (DMSO)		23 18 (21)	7 7 (7)	125 113 (119)	5 6 (6)	8 19 (8)	26 18 (22)	
		10	22 10 (16)	9 6 (8)	125 110 (118)	3 7 (5)	13 13 (13)	20 9 (15)	
		50	14 18 (16)	10 5 (8)	157 115 (136)	6 7 (7)	10 17 (14)	27 16 (22)	
		100	9 20 (15)	9 3 (6)	111 127 (119)	4 4 (4)	7 7 (7)	26 16 (21)	
		500	12 8 (10)	7 4 (6)	155 131 (143)	8 2 (5)	10 7 (9)	14 20 (17)	
		1000	16 14 (15)	10 6 (8)	172 222 (197)	6 5 (6)	10 5 (8)	15 21 (18)	
		5000	11 13 (12)	1 1 (1)	409 415 (412)	2 2 (2)	9 11 (10)	12 10 (11)	
		名称		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		濃度*		80	2	0.5	2	0.5	0.5
		コロニー数 /プレート		219 289 (254)	101 125 (113)	340 273 (307)	71 68 (70)	339 358 (349)	338 325 (332)

() 内の数値は平均値

2-AA : 2-aminoanthracene

* : μ g/プレート

TA100 株以外では、検体処理群の、代謝活性化系も含めた本試験条件下でいずれの検定菌株においても復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。しかし、TA100 株の高濃度区で、代謝活性化系の有無に関わらず、溶媒対照区の 2~3 倍の復帰変異コロニー数の増加が認められた。又、濃度依存性も認められた。

一方、陽性対照として用いた AF-2、ENNG、9-AA、2-NF 及び 2-AA では各々の検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、は復帰変異誘発性に関して弱陽性と判断された。

2) 細菌を用いた DNA 損傷誘発性試験 (Rec 試験)

(資料 No.IT-01)

試験機関：日本食品分析センター

報告書作成年：1985 年

検体： (、代謝物)

試験方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換え修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、DNA 損傷性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。なお、陰性対照としてカナマイシン (KM) を、陽性対照としてマイトマイシン C (MMC) を処理した。

試験結果：結果を下表に示した。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)		0 (0)	0 (0)	0 (0)
	150	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	300	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	600	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1250	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	2500	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	5000	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	10000	0 (0)	0 (0)	0 (0)
陰性対照 (KM)	1.0	4.4	4.2	<1
陽性対照 (MMC)	0.1	10.5	1.7	8.8

() 内の数値は平均値

検体処理群では、いずれの濃度においても、両株に生育阻止域を形成しなかった。一方、陽性対照の MMC では両株の間に明らかな生育阻止の差が生じた。

以上の結果より、 () には DNA 損傷性がないものと判断された。

3) マウス骨髄細胞を用いた小核試験

(資料 No.IT-02)

試験機関 : Ciba-Geigy Ltd. (スイス国)

報告書作成年 : 1995 年 [GLP 対応]

検体 : (、代謝物)、 %

試験動物 : Slc:ddY (SPF) マウス

用量設定試験 : 1 群雌雄各 8 匹 (5 週齢、体重 ; 雄 17~19g、雌 15~17g)

小核試験 : 1 群雄 6 匹 (8 週齢、体重 ; 35.4~40.9g)

試験方法 : 検体を 0.5%CMC-Na 液に懸濁し、250、500 および 1000mg/kg の用量で 6 匹×3 群のマウスに単回経口投与した。いずれの投与群も 24、48 および 72 時間後に屠殺し、各動物から大腿骨の骨髄を採取して骨髄塗抹標本を作製した。
陽性対照としてマイトマイシン C (MMC) を用いた。

[用量設定根拠] :

観察項目 : 各動物あたり 1000 個の正染性赤血球および多染性赤血球を観察した。

試験結果の評価については、被験物質投与群の小核を有する多染性赤血球の出現頻度が陰性対照値に比べ、1%または 5%水準で有意に増加した場合に陽性とした。

試験結果 : 結果を表 1 に示す。

小核を有する多染性赤血球の出現頻度は、いずれの検体投与群においても、溶媒対照と比較して有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C (MMC) では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度は明らかに増加し、溶媒対照に比較して統計学的に有意差が認められた。

以上の結果より、本剤は本試験条件下において染色体異常誘発性は陰性と判断された。

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

表1 小核試験結果 (1群6匹の平均値)

処理時間	検体	投与量 (mg/kg)	p/n 比*	小核を有する赤血球数/1000個	
				正染赤血球	多染赤血球
24	溶媒対照	—	0.9	1.0	1.7
	陽性対照 (MMC)	2	0.7	0.8	57.7**
24		250	1.1	1.5	1.0
		500	0.8	1.0	0.7
		1000	0.8	0.0	0.4
48		250	1.0	0.0	2.0
		500	0.8	0.3	0.8
		1000	0.7	0.5	1.5
72		250	1.0	1.5	0.8
		500	1.1	1.0	1.3
		1000	1.1	0.3	3.0

* : p : 多染性赤血球数、n : 正染性赤血球数

** : 有意差、 $p < 0.01$

3. 製剤

3-1. 45%メトラクロール乳剤

(1) 急性毒性

1) 急性経口および経皮毒性

① ラットにおける急性経口及び経皮毒性試験

(資料 No. FT-01、FT-02)

試験機関：臨床医科学研究所

報告書作成年：1986年[GLP 対応]

検体の純度：45%乳剤

[組成]	メトラクロール	: 45%
	乳化剤	: 5%
	溶剤等	: 50%

試験動物：Slc：Wistar/KY系ラット（6～7週齢）、1群雌雄各10匹

試験期間：14日間観察

試験方法：経口投与では、検体を蒸留水に乳濁させ胃ゾンデを用いて投与した。
経皮投与の場合は、検体をそのまま適用した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。試験開始時及び3、7、10および14日目に体重を測定し、死亡動物及び試験終了時の全生存動物について適用部位を含む全身の組織、器官の肉眼的病理検査を行なった。

試験結果：

投与方法	経口	経皮
投与量 (mg/kg)	♂♀：1821、2367、3077、 4000、5200、6760	♂♀：2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂：3725 (3291～4287) ♀：3231 (2861～3661)	♂♀：2000以上
死亡開始時間 及び終了時間	3時間 72時間	死亡例なし
症状発現 及び消失時期	10分 96時間	症状発現例なし
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	-	♂♀：2000
死亡例の認められな かった最高投与量 (mg/kg)	♂♀：1821	♂♀：2000

経口投与で認められた中毒症状は、雌雄ともに自発運動の低下、流涎、流涙、鎮

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

静及び痺れんであった。また経口投与の雌雄で体重減少あるいは体重増加抑制が散見された。

剖検所見では、経口投与での死亡動物に肺の出血またはうっ血、胃粘膜のびらんが認められ、胃粘膜の出血及び腸重積が散見された以外、特記すべき変化は認められなかった。

② マウスにおける急性経口毒性試験

(資料 No.FT-03)

試験機関：臨床医科学研究所

報告書作成年：1986年[GLP対応]

検体の純度：45%乳剤

[組成] メトラクロール：45%
 乳化剤：5%
 溶剤等：50%

試験動物：Slc：ICR系マウス（6週齢）、1群雌雄各10匹

試験期間：14日間観察

試験方法：検体を蒸留水に乳濁させ、胃ゾンデを用いて経口投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。試験開始時及び3、7、10および14日に体重を測定し、死亡動物及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なった。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂：1050、1365、1775、2308、3000、3900、 ♀：808、1050、1365、1775、2308、3000、 3900
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂：2327 (2001~2747) ♀：1974 (1688~2325)
死亡開始時間 及び終了時間	30分 48時間
症状発現 及び消失時期	10分 24時間
死亡例の認められな かった最高投与量 (mg/kg)	♂：1050、♀：808

中毒症状としては雌雄ともに、自発運動の低下、鎮静及び痺れんがみられた。体重変化においては、対照群と投与群との間に差は認められなかった。剖検所見では、死亡動物に肺のうっ血、胃粘膜のびらんが認められ、肺の出血、胃粘膜の出血及び腸重積が散見された以外、特記すべき変化は認められなかった。

2) ラットにおける急性吸入毒性試験

(資料 No.FT-04)

試験機関: Ciba-Geigy Ltd. (スイス国)

報告書作成年: 1974 年

検体の純度: 45%乳剤

[組成] メトラクロール: 45%
乳化剤: 5%
溶剤等: 50%

試験動物: Tif: RAI 系ラット (体重 170~175g、7~8 週齢) 雌雄各 9 匹

試験期間: 7 日間観察

試験方法: 気中濃度; メトラクロール乳剤として $1961 \pm 70 \text{mg/m}^3$

曝露条件: 鼻端部曝露装置

噴射圧 2 気圧、噴射量 60ml/時間、通気量 10L/分、4 時間曝露、
乳剤をそのまま使用。

粒子径; $7\mu\text{m}$ 以上: 69%、 $7\sim 3\mu\text{m}$ 12%、 $3\sim 1\mu\text{m}$ 15%、 $1\mu\text{m}$ 以下 4%

試験項目: 曝露中及び曝露後 7 日間、中毒症状及び死亡の有無を観察した。

試験終了時に全例の肉眼的病理検査を行なった。

試験結果:

動物種	性	LC ₅₀ 値 (mg/m ³) *	死亡開始時間 及び終了時間	症状発現 及び消失時期
ラット	雄	2000 以上	死亡例なし	4 時間
	雌			24 時間

*: メトラクロール乳剤としての濃度

中毒症状としては、雌雄とも頻呼吸、鈍麻及び立毛が観察された。剖検所見においては、特記すべき変化は認められなかった。

(2) 皮膚および眼に対する刺激性

1) ウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料 No.FT-05)

試験機関:Ciba-Geigy Ltd.(スイス国)

報告書作成年:1974年

検体の純度:45%乳剤

[組成] メトラクロール:45%
乳化剤:5%
溶剤等:50%

試験動物:ロシア種ウサギ(体重1.5~2kg、12週齢)、雌雄各3匹

試験期間:72時間観察

試験方法:検体0.5mlを2.5×2.5cm²のガーゼにしみ込ませて、剃毛した動物の両腹側部に貼付し、24時間後に除去した。ただし、左腹側部は擦過皮膚接触部、右腹側部は非擦過皮膚接触部とした。

観察項目:投与開始24時間後(ガーゼパッチ除去時)及び72時間後に投与部分の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)を観察した。なお、採点はDraize法に従った。

試験結果:観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

24時間後には、非常に軽度あるいは明瞭な紅斑、擦過皮膚ではさらに非常に軽度の浮腫が認められた。これらの刺激性変化は72時間後には消失した。

以上の結果より、メトラクロール45%乳剤はウサギの皮膚に対して軽度の刺激性を有すると判断される。

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

動物 番号	項 目	最高 評点	暴 露 後 時 間			
			24 時間後		72 時間後	
			非擦過	擦過	非擦過	擦過
1	紅斑・痂皮	4	2	2	0	0
	浮腫	4	0	1	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	2	0	0
	浮腫	4	0	1	0	0
3	紅斑・痂皮	4	0	1	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮	4	0	2	0	0
	浮腫	4	0	1	0	0
5	紅斑・痂皮	4	2	2	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	1	1	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	24	5	10	0	0
	浮腫	24	0	3	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0.8	1.7	0	0
	浮腫	4	0	0.5	0	0

2) ウサギにおける眼刺激性試験

(資料 No.FT-06)

試験機関:Ciba-Geigy Ltd.(スイス国)

報告書作成年:1974年

検体の純度:45%乳剤

[組成] メトラクロール:45%
 乳化剤 :5%
 溶剤等 :50%

試験動物:ロシア種ウサギ(12週齢)、雌雄各3匹

試験期間:7日間観察

試験方法:検体0.1mlを左眼に点眼し、3匹は30秒後に洗眼した。残り3匹については洗眼しなかった。なお、右眼を無処理対照とした。

観察項目:投与後24時間、2、3、4及び7日経過時に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察した。なお、採点はDraize法に従った。

試験結果:観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

虹彩の刺激性変化は洗眼群、非洗眼群ともに認められなかった。

非洗眼群にみられた角膜及び結膜の刺激性変化は7日後には消失し、洗眼群にみられた結膜の刺激性変化は4日後には消失した。尚、洗眼により刺激性は軽減された。

以上の結果より、メトラクロール45%乳剤はウサギの眼粘膜に対して、軽度の刺激性を有すると判断される。

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

処置	項目	最高 評点	適用後時間および評点*					
			1日後	2日後	3日後	4日後	7日後	
非 洗 眼 群	動物 4	角膜	80	20	20	15	5	0
		虹彩	10	0	0	0	0	0
		結膜	20	12	10	10	6	0
	動物 5	角膜	80	20	15	15	10	0
		虹彩	10	0	0	0	0	0
		結膜	20	12	8	6	6	0
	動物 6	角膜	80	10	5	0	0	0
		虹彩	10	0	0	0	0	0
		結膜	20	8	6	6	0	0
	合計		330	82	64	52	27	0
	平均		110	27.3	21.3	17.3	9	0
	洗眼群 動物 1~3 (3匹平均)	角膜	80	0	0	0	0	0
虹彩		10	0	0	0	0	0	
結膜		20	8.0	4.7	4.0	0	0	
平均		110	8.0	4.7	4.0	0	0	

*：角膜の評価 (混濁程度×混濁範囲)×5

虹彩の評価 虹彩評価×5

結膜の評価 (発赤+浮腫+分泌物) ×2

(3) 皮膚感作性

モルモットにおける皮膚感作性

(資料 No.FT-07)

試験機関：臨床医科学研究所

報告書作成年：1986年 [GLP 対応]

検体の純度：45%乳剤

[組成] メトラクロール：45%
乳化剤：5%
溶剤等：50%

試験動物：Hartley系モルモット（体重285～358g）、I群雄25匹（ただし、陽性対照群は1群5匹）

試験方法：Magnusson及びKligmanのMaximization test法

感作 I；モルモットの上背部を剃毛し検体処理群（I群）では Freund's Complete Adjuvant（FCA）、0.1%検体溶液（蒸留水中）及び0.2%検体溶液（同）とFCAの等量混合液を各々2カ所（計6カ所）に0.05mlずつ皮内投与した。陽性対照の2,4-dinitro-chlorobenzene（DNCB）処理群（III群）ではFCA、0.1%DNCB溶液（40%エタノール中）及び0.2%DNCB溶液（同）とFCAの等量混合液を各々2カ所に0.05mlずつ皮内投与した。また、各々の処理群に溶媒対照群（検体対照群をII群、DNCB対照群をIV群）を設けた。

感作 II；感作Iの7日後、剃毛した動物の上背部にI群では50%検体溶液（蒸留水中）、II群では蒸留水、III群では1%DNCB溶液（白色ワセリン中）、IV群では白色ワセリンをいずれも0.5mlあるいは0.5gずつ48時間経皮投与した。

誘発；感作IIの2週間後、剃毛した動物の右腹側部にI、II群では5%検体溶液（蒸留水中）を、III、IV群では0.1%DNCB溶液（40%エタノール中）を24時間経皮投与した。投与量はいずれも0.5mlとした。なお、誘発終了後24及び48時間経過時に、皮膚所見の評価（MagnussonとKligmanの判定法による）を行った。

試験結果：結果を次表に示す。

検体処理群では軽度ないし中等度の紅斑を25例中23例に認めた。

一方、DNCB処理群では中等度ないし強度の紅斑を全例に認めた。

以上より、メトラクロール45%乳剤はモルモットの皮膚に対し皮膚感作性を有するものと判断される。

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

試験群		動物数	陽性反応 動物数	皮膚反応評点										陽性率 (%)
				24 時間					48 時間					
				0.0	1.0	2.0	3.0	平均	0.0	1.0	2.0	3.0	平均	
検 体	感作群	25	23	4	13	8	0	1.16	2	11	12	0	1.4	92
	非感作群	25	0	25	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0
陽性対照 (DNCB)	感作群	5	5	0	0	3	2	2.4	0	0	2	3	2.6	100
	非感作群	5	1	4	1	0	0	0.2	4	0	1	0	0.4	20

3-2 アトラジン・メトラクロール水和剤

(1) 急性毒性

1) 急性経口および経皮毒性

① ラットにおける急性経口試験

(資料 No.FT-01)

試験機関：臨床医科学研究所

報告書作成年：1986年[GLP対応]

検体の純度：15%アトラジン・25%メトラクロール水和剤

[組成] アトラジン： 15.0%、
メトラクロール： 25.0%
水、界面活性剤等： 60%

試験動物：Slc：Wistar/KY系ラット（6週齢）、1群雌雄各10匹

体重：雄 171.0±5.2g 雌 136.5±4.0g

試験期間：14日間観察

試験方法：経口投与では、検体を蒸留水で希釈後、胃ゾンデを用いて投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。試験開始時及び3、7、10および14日に体重を測定し、死亡動物及び試験終了時の全生存動物について適用部位を含む全身の組織、器官の肉眼的病理検査を行なった。

試験結果：結果を以下に示す。

項目	雄	雌
投与量 (mg/kg)	1050、1365、1775 2308、3000、3900	1050、1365、1775 2308、3000、3900
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	1883 (1637.5~2152.1)	1512 (1331.1~1703.8)
死亡開始時間 及び終了時間	24時間後~2日後	30分後~2日後
症状発現 及び消失時期	10分後~3日後	10分後~4日後
死亡例の認められな かった最高投与量 (mg/kg)	1050	1050

認められた中毒症状は、雌雄ともに自発運動の低下、流涎、流涙および鎮静であった。3日後には体重減少又は体重増加抑制が認められ、その後回復したが、雄では試験終了時に対照群と差が認められた。

剖検所見では、死亡動物に雌雄共に肺の出血および胃粘膜の出血がみられ、腸重積および胃粘膜の白濁が散見された。又、雌に胃粘膜の糜爛および肺のうっ血が各1例認められた。生存例の剖検では、異常は認められなかった。

② ラットにおける急性経皮試験

(資料 No.FT-02)

試験機関：臨床医科学研究所

報告書作成年：1986年[GLP 対応]

検体の純度：15%アトラジン・25%メトラクロール水和剤

[組成] アトラジン： 15.0%、
メトラクロール： 25.0%
水、界面活性剤等： 60%

試験動物：Slc：Wistar/KY系ラット（7週齢）、1群雌雄各10匹

体重：雄 210.7±4.4g 雌 154.9±4.0g

試験期間：14日間観察

試験方法：剪毛した背部皮膚に検体を塗布した綿布（4×5cm）を24時間適用した。用量は2000mg/kgとした。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。試験開始時及び3、7、10および14日に体重を測定し、死亡動物及び試験終了時の全生存動物について適用部位を含む全身の組織、器官の肉眼的病理検査を行なった。

試験結果：結果を以下に示す。

項目	雄	雌
投与量 (mg/kg)	2000	2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	>2000	>2000
死亡開始時間 及び終了時間	—	
症状発現 及び消失時期		—
最大無影響量(mg/kg)	2000	2000

中毒症状、体重変化への影響、適用部位皮膚への影響は認められず、剖検結果にも異常は認められなかった。

③ マウスにおける急性経口試験

(資料 No.FT-03)

試験機関：臨床医科学研究所

報告書作成年：1986年[GLP 対応]

検体の純度：15%アトラジン・25%メトラクロール水和剤

[組成] アトラジン： 15.0%、
メトラクロール： 25.0%
水、界面活性剤等： 60%

試験動物：Slc：ICR マウス（6週齢）、1群雌雄各10匹

体重：雄 33.1±1.3g 雌 25.7±1.2g

試験期間：14日間観察

試験方法：経口投与では、検体を蒸留水で希釈後、胃ゾンデを用いて投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。試験開始時及び3、7、10および14日目に体重を測定し、死亡動物及び試験終了時の全生存動物について適用部位を含む全身の組織、器官の肉眼的病理検査を行なった。

試験結果：結果を以下に示す。

項目	雄	雌
投与量 (mg/kg)	1365、1775、2308 3000、3900、5070	1365、1775、2308 3000、3900、5070
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	3420 (2877.6~4343.3)	2700 (2317.6~3154.3)
死亡開始時間 及び終了時間	20分後~2日後	20分後~2日後
症状発現 及び消失時期	10分後~3日後	10分後~2日後
死亡例の認められな かった最高投与量 (mg/kg)	1365	1365

認められた中毒症状は、雌雄ともに自発運動の低下、鎮静および痙攣であった。雄で、10日後より投与群で体重増加抑制が認められた。

剖検所見では、死亡動物に肺の鬱血および胃粘膜のびらんが認められ、肺の出血、胃粘膜の出血、腸重積および小腸粘膜の出血が散見された。生存例の剖検では、異常は認められなかった。

2) ラットにおける急性吸入毒性試験

(資料 No.FT-04)

試験機関：Ciba-Geigy Ltd. (スイス国)

報告書作成年：1974年

検体の純度：15%アトラジン・25%メトラクロール水和剤

[組成] アトラジン： 15.0%、
メトラクロール： 25.0%
水、界面活性剤等： 60%

試験動物：Tif：RAI系ラット（体重170～180g、7～8週齢）雌雄各9匹

試験期間：7日間観察

試験方法：気中濃度；として0.651±0.062mg/l.（重量測定）

曝露条件；鼻端部曝露装置

噴射圧 2気圧、噴射量 60mL/時間、通気量 10L/分、4時間曝露、
フロアブル製剤をそのまま使用。

粒子径；7μm以上 93%、7～3μm 3%、3～1μm 4%、1μm以下 1%

試験項目：曝露中及び曝露後7日間、中毒症状及び死亡の有無を観察した。

試験終了時に全例の肉眼的病理検査を行なった。

試験結果：結果を以下に示す。

項目	雄	雌
投与量 (mg/L)	0.651	0.651
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	>0.651	>0.651
死亡開始時間 及び終了時間	—	—
症状発現 及び消失時期	—	—
最大無影響量(mg/kg)	0.651	0.651

中毒症状および剖検所見において、特記すべき変化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シンジェンタジャパン株式会社にある。

(2) 皮膚および眼に対する刺激性

1) ウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料 No.FT-05)

試験機関: Ciba-Geigy Ltd. (スイス国)

報告書作成年: 1982 年

検体の純度: 15%アトラジン・25%メトラクロール水和剤

〔組成〕 アトラジン: 15.0%、
メトラクロール: 25.0%
水、界面活性剤等: 60%

試験動物: ニュージーランド白色ウサギ (体重2~3kg)、雌雄各3匹

試験期間: 7日間観察 (結果は、24 および72 時間後のみ記載)

試験方法: 検体 0.5ml を $2.5 \times 2.5 \text{cm}^2$ のガーゼにしみ込ませて、剃毛した動物の両腹側部に貼付し、24 時間後に除去した。ただし、腹側部は片側を擦過皮膚、他側を非擦過皮膚とした。

観察項目: 投与開始 24 時間後 (ガーゼパッチ除去時) 及び72 時間後の投与部分の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) を示す。なお、採点は Draize 法に従った。

試験結果: 観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

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

動物 番号	項 目	最高 評点	非擦過皮膚		擦過皮膚	
			24 時間	72 時間	24 時間	72 時間
1 雄	紅斑・痂皮	4	2	1	2	2
	浮 腫	4	1	0	1	0
2 雄	紅斑・痂皮	4	2	0	2	0
	浮 腫	4	1	0	2	0
3 雄	紅斑・痂皮	4	2	2	2	2
	浮 腫	4	2	2	2	2
4 雌	紅斑・痂皮	4	2	0	2	1
	浮 腫	4	1	0	1	1
5 雌	紅斑・痂皮	4	2	0	2	1
	浮 腫	4	1	0	1	0
6 雌	紅斑・痂皮	4	2	0	2	0
	浮 腫	4	1	0	1	0
合計	紅斑・痂皮	24	12	3	12	6
	浮 腫	24	7	2	8	3
平均	紅斑・痂皮	4	2	0.5	2	1
	浮 腫	4	1.2	0.3	1.3	0.5

非擦過皮膚、擦過皮膚共に 24 時間後に全例で明瞭（経度）な紅斑、極経度～経度の浮腫が認められ、72 時間後には、非擦過皮膚で 2 例、擦過皮膚で 4 例に刺激性変化が認められた。以上の結果より、検体はウサギの皮膚に対して刺激性を有すると判断される。

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

2) ウサギにおける眼刺激性試験

(資料 No.FT-06)

試験機関:Ciba-Geigy Ltd.(スイス国)

報告書作成年:1982年

検体の純度:15%アトラジン・25%メトラクロール水和剤

〔組成〕 アトラジン: 15.0%、
メトラクロール: 25.0%
水、界面活性剤等: 60%

試験動物: ニュージーランド白色ウサギ (2~3kg)、雄3匹 雌6匹

試験期間: 7日間観察

試験方法: 検体 0.1ml を左眼に点眼し、3匹は30秒後に洗眼した。残り6匹については洗眼しなかった。なお、右眼を無処理対照とした。

観察項目: 投与後24時間、2, 3, 4及び7日経過時に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察した。なお、採点は Draize 法に従った。

試験結果: 観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

非洗眼群にみられた角膜及び結膜の刺激性変化は7日後あるいは4日後には消失した。洗眼群では眼刺激性は認められなかった。

以上の結果より、検体はウサギの眼粘膜に対して、軽度の刺激性を有すると判断される。

処 置	項 目	最高 評点	投与後時間および評点						
			1日後	2日後	3日後	4日後	7日後		
非洗眼群	動物 番号 199	角膜	混濁程度	4	0	0	0	0	0
			混濁範囲	4	0	0	0	0	0
		結膜	虹彩	2	0	0	0	0	0
			発 赤	3	1	0	0	0	0
			浮 腫	4	0	0	0	0	0
			分泌物	3	0	0	0	0	0
	動物 番号 200	角膜	混濁程度	4	0	0	0	0	0
			混濁範囲	4	0	0	0	0	0
		虹彩	2	0	0	0	0	0	
		結膜	発 赤	3	1	0	0	0	0
			浮 腫	4	1	0	0	0	0
			分泌物	3	1	0	0	0	0
	動物 番号 201	角膜	混濁程度	4	1	1	0	0	0
			混濁範囲	4	4	2	0	0	0
		虹彩	2	1	0	0	0	0	
		結膜	発 赤	3	1	1	0	0	0
			浮 腫	4	1	1	0	0	0
			分泌物	3	0	0	0	0	0
	動物 番号 202	角膜	混濁程度	4	0	0	0	0	0
			混濁範囲	4	0	0	0	0	0
		虹彩	2	0	0	0	0	0	
		結膜	発 赤	3	1	0	0	0	0
			浮 腫	4	1	0	0	0	0
			分泌物	3	1	0	0	0	0
	動物 番号 203	角膜	混濁程度	4	0	0	0	0	0
			混濁範囲	4	0	0	0	0	0
		虹彩	2	0	0	0	0	0	
		結膜	発 赤	3	1	0	0	0	0
浮 腫			4	1	0	0	0	0	
分泌物			3	0	0	0	0	0	
動物 番号 204	角膜	混濁程度	4	1	1	1	1	0	
		混濁範囲	4	1	1	4	2	0	
	虹彩	2	0	0	0	0	0		
	結膜	発 赤	3	2	2	1	0	0	
		浮 腫	4	1	2	2	0	0	
		分泌物	3	1	2	1	0	0	
合 計*			660	60	31	28	10	0	
平 均			110	10	5.2	4.7	1.7	0	

*: [(混濁程度 x 混濁範囲) x 5] + [虹彩評点 x 5] + [(発赤 + 浮腫 + 分泌物) x 2]

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

処 置	項 目		最高 評点	投与後時間および評点				
				1日後	2日後	3日後	4日後	7日後
洗眼群 (3 匹平均)	角膜	混濁程度	4	0	0	0	0	0
		混濁範囲	4	0	0	0	0	0
		虹彩	2	0	0	0	0	0
	結膜	発 赤	3	0	0	0	0	0
		浮 腫	4	0	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0	0
		合 計*	330	0	0	0	0	0
		平 均	110	0	0	0	0	0

— : 実施せず

* : [(混濁程度 x 混濁範囲) x 5] + [虹彩評点 x 5] + [(発赤 + 浮腫 + 分泌物) x 2]

(3) 皮膚感作性

モルモットにおける皮膚感作性試験

(資料 No.FT-07)

試験機関：臨床医科学研究所

報告書作成年：1986年 [GLP 対応]

検体の純度：15%アトラジン・25%メトラクロール水和剤

[組成] アトラジン： 15.0%、
メトラクロール： 25.0%
水、界面活性剤等： 60%

試験動物：Hartley系モルモット（4週齢、体重308～358g）、1群雄25匹（ただし、陽性対
照群は1群5匹）

試験方法：Magnusson及びKligmanのMaximization test法

感 作 I；モルモットの上背部を剃毛し検体処理群(I群)では Freund's Complete Adjuvant
(FCA)、0.1%検体溶液(蒸留水中)及び0.2%検体溶液(同)とFCAの等
量混合液を各々2カ所(計6カ所)に0.05mlずつ皮内投与した。陽性対照の
2,4-dinitro-chlorobenzene (DNCB) 処理群(III群)ではFCA、0.1%DNCB溶液
(40%エタノール中)及び0.2%DNCB溶液(同)とFCAの等量混合液を各々
2カ所に0.05mlずつ皮内投与した。また、各々の処理群に溶媒対照群(検体
対照群をII群、DNCB対照群をIV群)を設けた。

感 作 II；感作Iの7日後、剃毛した動物の上背部にI群では50%検体溶液(蒸留水中)、
II群では蒸留水、III群では1%DNCB溶液(白色ワセリン中)、IV群では白
色ワセリンをいずれも0.5mlあるいは0.5gずつ48時間経皮投与した。

誘 発；感作IIの2週間後、剃毛した動物の右腹側部にI、II群では5%検体溶液(蒸
留水中)を、III、IV群では0.1%DNCB溶液(40%エタノール中)を24時間
経皮投与した。投与量はいずれも0.5mlとした。なお、誘発終了後24及び48
時間経過時に、皮膚所見の評価(MagnussonとKligmanの判定法による)を行
なった。

試験結果：結果を次表に示す。

検体処理群では軽度ないし中等度の紅斑を25例中7例に認めた。

一方、DNCB処理群では中等度ないし強度の紅斑を全例に認めた。

以上より、検体はモルモットの皮膚に対し皮膚感作性を有するものと判断される。

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

試験群		動物数	陽性反応 動物数	皮膚反応評点										陽性率 (%)
				24 時間					48 時間					
				0.0	1.0	2.0	3.0	平均	0.0	1.0	2.0	3.0	平均	
検 体	感作群	25	7	21	4	0	0	0.16	18	6	1	0	0.32	28
	非感作群	25	1	24	1	0	0	0.04	24	1	0	0	0.04	4
陽性対照 (DNCB)	感作群	5	5	0	0	2	3	2.6	0	0	0	5	3.0	100
	非感作群	5	1	4	1	0	0	0.2	4	1	0	0	0.2	20