

(2) マウスを用いた飼料混入投与による発がん性試験

毒性資料No. 原体-16

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験動物: ICR系SPFマウス (Crj: CD-1) 1群 雌雄各52匹、開始時 5週齢

試験期間: 78週間 (1993年10月18日～1995年4月25日)

投与方法: 検体を0、30、300及び3000ppmの濃度で飼料に混入し、78週間にわたって自由に摂食させた。検体を混入した飼料は、投与開始前に1回及び投与期間中は4週間に1回調製した。

投与量設定根拠;

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態及び生死を毎日観察した。

試験終了時の死亡率 (%) を次表に示す。

投与群 (ppm)	0	30	300	3000
雄	35	37	48	37
雌	25	23	29	27

(生命表解析法)

死亡率はいずれの投与群も対照群に比べて、有意差は認められなかった。対照群に比べ、統計学的に有意差の認められた一般状態の発生頻度を次表に示す。

性別	雄				雌			
投与群 (ppm)	0	30	300	3000	0	30	300	3000
症状								
動物数	52	52	52	52	52	52	52	52
触毛脱毛	0	14**	3	1	8	21**	3	6
皮膚脱毛					8	26**	11	14
皮膚退色					10	3*	4	1**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (Fisher's exact probability test)

3000ppm投与群では雌において皮膚退色の発生頻度が対照群に比べ有意に減少した。30ppm投与群では雌雄において触毛脱毛の発生頻度と雌において皮膚の脱毛の発生頻度が対照群に比べ有意に増加した。しかし、これらの変化はいずれも低用量群では増加しても高用量群では変化がないか、あるいは対照群に比べて発生頻度が減少するという毒性学的意味のない変化で、検体投与によるものとは考えられなかった。

体重変化；投与開始から13週間は毎週1回、その後は4週間に1回の頻度で全生存動物の体重を測定した。

検体投与群の平均体重は雌雄とも全投与期間を通じ対照群とほぼ同等であり統計学的に有意な変化も認めず、検体投与による影響は認められなかった。

摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量を投与開始後13週間は毎週1回、その後は4週間に1回の頻度で測定した。食餌効率は投与開始13週間について算出した。

摂餌量及び食餌効率において、検体投与群と対照群との間に差異はなく、検体投与による影響は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量 (mg/kg/日) は次表のとおりであった。

投与群 (ppm)		30	300	3000
平均検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	2.877	30.54	311.8
	雌	2.704	26.90	279.0

血液学的検査；投与後52及び78週時に対照群と3000ppm投与群の雌雄各10匹の動物について白血球分画を算出した。

検体投与による影響は認められなかった。

臓器重量；投与78週間後の剖検時に、血液学的検査に供した各投与群の雌雄各10匹について以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、肝、腎、副腎、精巣

対照群に比べ、統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

性別		雄			雌		
投与群 (ppm)		30	300	3000	30	300	3000
肝	実重量		118	181 ↑ ND			127 ↑ D
	対体重比		120	168			120 ↑ D

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)

矢印のない数値は有意差なし

↑ : P<0.05 (D : Dunnett test, ND : Non-parametric Dunnett test)

3000ppm投与群の雌雄において肝重量が対照群に比べ有意に増加し、対体重比でも雌では有意に増加し、雄では増加傾向を示した。

300ppm投与群でも雄の肝実重量及び対体重比が軽度ながら増加傾向を示し、検体投与による影響と考えられた。

肉眼的病理検査；途中死亡例及び切迫屠殺動物及び試験終了時の全生存動物について、剖検を行った。

対照群に比べ、統計学的有意差の認められた所見を次表に示す。

検査時期	性		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000
最終屠殺	検査動物数		34	33	27	33	39	40	37	38
	肺	腫瘍	17	11	10	14	9	8	11	9
		腫大	0	2	0	0	3	4	3	3
	肝臓	斑点	1	3	1	7*	2	3	2	2
		腫瘍	13	19	12	19	0	2	2	2
	腸間膜リンパ節	腫大	0	1	0	0	0	2	3	1
	子宮	壁肥厚	0	0	0	0	7	6	4	1*
		腫瘍	0	0	0	0	7	4	1*	5
死亡・切迫屠殺	検査動物数		18	19	25	19	13	12	15	14
	肺	腫瘍	6	2	2*	4	2	3	2	1
		腫大	0	3	2	4	6	4	5	6
	肝臓	斑点	2	1	1	2	0	0	1	2
		腫瘍	11	6	6*	8	0	1	1	0
	腸間膜リンパ節	腫大	0	4	0	4	3	3	5	6
	子宮	腫瘍	0	0	0	0	0	0	1	1
全動物	検査動物数		52	52	52	52	52	52	52	52
	肺	腫瘍	23	13*	12*	18	11	11	13	10
		腫大	0	5*	2	4	9	8	8	9
	肝臓	斑点	3	4	2	9	2	3	3	4
		腫瘍	24	25	18	27	0	3	3	2
	腸間膜リンパ節	腫大	0	5*	0	4	3	5	8	7
	子宮	壁肥厚	0	0	0	0	7	6	4	1*
腫瘍		0	0	0	0	7	4	2	6	

* : P<0.05 (Fisher's exact probability test)

3000ppm投与群の投与78週後の計画屠殺動物の雄において、肝の斑点の発生

頻度が対照群に比べ有意に増加した。肝の斑点は白斑 (White spot(s)) として認められ、この3000ppm群雄7例の肝斑点に対応する組織病変は肝細胞小増殖巣5例、塊状肝細胞壊死1例及び単核細胞浸潤1例であった。これらの組織所見は対照群と比して有意差がなく、検体投与と関連しない変化と考えられた。

その他3000ppm投与群の雌、300及び30ppm投与群雄において、肉眼的病変の発生頻度が対照群に比べ有意に増減したが、いずれも検体投与とは関連のない変化か発生頻度の減少という毒性学的に意味のない変化であった。

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

脳（大脳、小脳、橋及び延髄）、脊髄（頸部、胸部及び腰部）、坐骨神経（片側）、下垂体、胸腺、甲状腺（両側）、上皮小体（両側）、副腎（両側）、脾、骨・骨髓（胸骨及び片側大腿骨）、膝関節（片側）、リンパ節（頸部及び腸間膜）、心、大動脈、唾液腺（顎下腺及び舌下腺）、食道、胃（前胃及び腺胃）、肝（胆嚢を含む）、膵、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、気管、肺（気管支を含む）、腎（両側）、膀胱、精巣（両側）、精巣上体（両側）、前立腺、精嚢、凝固腺、包皮腺、卵巣（両側）、子宮（頸管部を含む）、膣、陰核腺、眼球（両側）、ハーダー腺（両側）、下腿三頭筋（片側）、皮膚（腰背部）、乳腺（雌のみ、腹部）、肉眼的異常部位

<非腫瘍性病変>

認められた主要な非腫瘍性病変を表-1（毒-76～78頁）に示す。

3000及び300ppm投与群の雌雄において肝の門脈周囲性肝細胞肥大の発生頻度が対照群に比べ有意に増加し、その発生頻度及び病変の程度が共に投与量に応じて増加したことから、検体投与に関連した変化と考えられた。

また、3000ppm投与群の雄では門脈周辺帯領域の肝細胞に単細胞壊死が散見され、その総発生頻度は対照群に比べ有意に増加した。この単細胞壊死の増加は、おそらく肥大した肝細胞の一部が変性・壊死に陥った結果を反映しているものと考えられ、検体投与に関連した変化と推察された。その他にも種々の非腫瘍性病変の発生頻度が検体投与群において統計学的に有意な変動を示したが、いずれも毒性学的に意味のない発生頻度の減少か、あるいは増加しても投与量依存性は認められず、検体投与とは関連性がない変化と考えられた。

<腫瘍性病変>

認められたすべての腫瘍性病変を表-2（毒-79～毒-82頁）に示す。

雌の全投与群及び雄の3000ppm投与群では、腫瘍性病変発生頻度において対照群との間に有意差は認められなかった。

300ppm投与群雄では、肺腺がんの発生頻度が投与78週後の計画屠殺動物及び計画屠殺動物と死亡・切迫屠殺動物の合計（総発生頻度）において対照群に比べ有意な減少を示した。また、肝細胞腺腫及び肝細胞がんの発生頻度が死亡・切迫屠殺動物で、肝細胞がんは総発生頻度において対照群に比べ有意な減少を示した。

30ppm投与群雄では、肺腺がんの発生頻度が投与78週後の計画屠殺動物及び総発生頻度においても対照群に比べ有意に減少した。また、肝細胞腺腫の発生頻度が死亡・切迫屠殺動物において対照群に比べ有意に減少した。

その他にも、種々の腫瘍性病変が投与群に観察されたが、その発生頻度において対照群に比べ統計学的有意差は認められなかった。

腫瘍数、良性、悪性及び担腫瘍動物数について、投与群と対照群で差は認められなかった。

以上の結果から、マウスに対する18ヵ月間飼料混入投与による発がん性試験における影響として、3000ppm投与群雌雄に肝重量の増加、門脈周囲性肝細胞肥大及び単細胞壊死が対照群に比べ有意に増加した。300ppm投与群雄で肝重量の増加傾向を示し、病理組織学的検査では雌雄とも肝の門脈周囲性肝細胞肥大の発生頻度が対照群に比べ有意に増加した。

30ppm投与群雌雄には検体投与による影響は認められなかったので、無毒性量は雌雄とも30ppm（雄 2.877mg/kg/日、雌 2.704mg/kg/日）であると判断される。

また、催腫瘍性は高用量の3000ppmでもないものと判断される。

表 1-1 主な非腫瘍性病変 (マウス)

検査時期	性		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000
	臓器	検査動物数	34	33	27	33	39	40	37	38
最終層	肝臓	所見								
		門脈周囲性肝細胞肥大	3	2	12**	21**	1	1	11**	35**
		びまん性肝細胞肥大	4	0	0	3	0	0	0	0
		単細胞壊死	2	1	2	7	0	0	0	0
		巣状肝細胞壊死	0	0	0	0	4	1	3	5
		塊状肝細胞壊死	0	0	0	1	0	1	0	0
		肝細胞小増殖巣 (好酸性細胞)	4	4	1	6	0	0	0	0
		肝細胞小増殖巣 (好塩基性細胞)	7	5	5	9	0	0	0	0
		肝細胞小増殖巣 (明細胞)	4	4	3	8	0	0	0	0
		肝細胞小増殖巣 (mixed cell)	1	3	1	2	0	0	0	0
		小肉芽腫	8	8	7	13	18	15	15	9*
		単核細胞浸潤	12	7	2**	6	6	6	4	4
	クッパー細胞褐色色素沈着	4	3	4	6	3	3	0	1	
	前胃	角化亢進	5	4	0*	0*	2	3	1	2
	腺胃	粘膜上皮過形成	21	17	12	13	13	11	14	9
		腺嚢胞化	7	12	4	6	11	6	15	6
	顎下腺	単核細胞浸潤	7	8	5	9	18	16	9*	10
	甲状腺	アミロイド沈着	1	4	5	3(32)	3	3	4	4
	腎臓	初期慢性糸球体腎炎	27	24	19	23	23	21	21	19
		腎盂拡張	9	5	4	4	0	0	0	0
副腎	被膜下細胞増生	14	15(32)	7	13	34	34	31	29	
頸部リンパ節	リンパ球増生	5	0**	3	3	1	2	0	1(37)	
坐骨神経	神経線維変性	5	1	3	1	7(38)	8(38)	8	6(34)	
子宮	腔拡張	0	0	0	0	7	3	1*	0**	

検査組織数：検査動物数と異なる場合のみ()内に示した。

* : P<0.05、** : P<0.01 (Fisher's exact probability test)

表 1-2 主な非腫瘍性病変 (マウス)

検査時期	性		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000
臓器	検査動物数		18	19	25	19	13	12	15	14
	所見									
途中死亡・ 切迫屠殺例	肝臓	門脈周囲性肝細胞肥大	0	0	3	0	1	0	0	3
		びまん性肝細胞肥大	3	0	3	5	0	0	0	0
		単細胞壊死	0	0	0	1	0	0	0	0
		巣状肝細胞壊死	2	2	2	2	4	0	0*	2
		塊状肝細胞壊死	1	0	2	1	0	0	1	1
		肝細胞小増殖巣 (好酸性細胞)	2	2	1	2	0	0	0	0
		肝細胞小増殖巣 (好塩基性細胞)	2	2	3	3	0	0	0	0
		肝細胞小増殖巣 (明細胞)	1	1	0	0	0	0	0	0
		肝細胞小増殖巣 (mixed cell)	1	1	0	0	0	0	0	0
		小肉芽腫	1	0	0	1	0	1	2	0
		単核細胞浸潤	0	0	1	0	2	1	1	3
	クッパー細胞褐色色素沈着	5	3	0**	1	1	0	0	0	
	前胃	角化亢進	1	2	1	0	4	0	2	3
腺胃	粘膜上皮過形成	3	1	2	1	5	1	1	2	
	腺嚢胞化	5	1	1*	1	4	0	1	2	
顎下腺	単核細胞浸潤	2	2	1	1	5	5	1	1	
甲状腺	アミロイド沈着	1	2	3	1	4	1	2	6	
腎臓	初期慢性糸球体腎炎	6	3	3	4	1	4	4	2	
	腎盂拡張	3	7	12*	5	0	0	0	0	
副腎	被膜下細胞増生	6	1*	8	3	5	4	7	5	
頸部リンパ節	リンパ球増生	1	0	1	1	0	2	0	0	
坐骨神経	神経線維変性	4	3	0(24)*	0*	2	1(11)	3(14)	2	

検査組織数：検査動物数と異なる場合のみ()内に示した。

*: P<0.05、**: P<0.01 (Fisher's exact probability test)

表 1-3 主な非腫瘍性病変 (マウス)

検査時期	性		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000
臓器	検査動物数		52	52	52	52	52	52	52	52
	所見									
全動物	肝臓	門脈周囲性肝細胞肥大	3	2	15**	21**	2	1	11**	38**
		びまん性肝細胞肥大	7	0**	3	8	0	0	0	0
		単細胞壊死	2	1	2	8*	0	0	0	0
		巣状肝細胞壊死	2	2	2	2	8	1*	3	7
		塊状肝細胞壊死	1	0	2	2	0	1	1	1
		肝細胞小増殖巣 (好酸性細胞)	6	6	2	8	0	0	0	0
		肝細胞小増殖巣 (好塩基性細胞)	9	7	8	12	0	0	0	0
		肝細胞小増殖巣 (明細胞)	5	5	3	8	0	0	0	0
		肝細胞小増殖巣 (mixed cell)	2	4	1	2	0	0	0	0
		小肉芽腫	9	8	7	14	18	16	17	9*
		単核細胞浸潤	12	7	3*	6	8	7	5	7
	クッパー細胞褐色色素沈着	9	6	4	7	4	3	0	1	
	前胃	角化亢進	6	6	1	0*	6	3	3	5
腺胃	粘膜上皮過形成	24	18	14*	14*	18	12	15	11	
	腺嚢胞化	12	13	5	7	15	6*	16	8	
顎下腺	単核細胞浸潤	9	10	6	10	23	21	10**	11*	
甲状腺	アミロイド沈着	2	6	8*	4	7	4	6	10	
腎臓	初期慢性糸球体腎炎	33	27	22*	27	24	25	25	21	
	腎盂拡張	12	12	16	9	0	0	0	0	
副腎	被膜下細胞増生	20	16(51)	15	16	39	38	38	34	
頸部リンパ節	リンパ球増生	6	0*	4	4	1	4	0	1(51)	
坐骨神経	神経線維変性	9	4	3(51)	1**	9(51)	9(49)	11(51)	8(48)	
子宮	腔拡張	0	0	0	0	7	3	1	0**	

検査組織数：検査動物数と異なる場合のみ()内に示した。

*: P<0.05, **: P<0.01 (Fisher's exact probability test)

表 2-1 腫瘍性病変の発生頻度

(マウス)

検査時期	性		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000
	臓器	検査動物数	34	33	27	33	39	40	37	38
最終屠殺	全身	悪性リンパ腫 (M)	1	1			3	3	4	3
	リンパ節	血管腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0(37)
	脾臓	血管肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	肺	腺腫 (B)	7	7	8	5(32)	1	5	5	6
		腺がん (M)	14	5*	4*	8(32)	6	3	6	3
	胃	扁平上皮がん (M)	0	0	0	0	1	0	0	0
	小腸	嚢胞腺がん (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
		腺がん (M)	0	0	0	0	1	0	0	0
	大腸	腺がん (M)	0	0	1	0	1	0	0	0
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)	12	16	9	17	0	1	0	1
		血管腫 (B)	0	0	1	0	0	0	1	0
		肝細胞がん (M)	4	3	1	7	0	0	0	0
		血管肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	1
	胆嚢	腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0
	膵臓	島細胞腺腫 (B)	1	0	0	0	0	1	0	0
	膀胱	乳頭腫 (B)	0	0	0	2	0	0	0	0
		平滑筋腫 (B)	0	0	0	1	0	0	0	0
	副睾丸	血管肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	前立腺	腺がん (M)	0	0	0	1	0	0	0	0
	卵巢	顆粒膜細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0
		腺腫 (B)	0	0	0	0	0	2	0	1
	子宮	子宮内膜間質 [*] リーフ (B)	0	0	0	0	3	1	2	5
		脱落膜腫 (B)	0	0	0	0	0	2	0	0
		平滑筋腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	2
		血管肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	下垂体	前葉腺腫 (B)	0	0	0	0	1	1(39)	1	2(37)
	脊髄	髄膜腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1
ハート腺	腺腫 (B)	1	5	2	2	2	4	3	4(37)	
皮膚	乳頭腫 (B)	0	0	0	1	0	0	1	0	
	血管腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0	
	シュワン細胞腫 (B)	1	0	0	0	0	0	1	0	
乳腺	腺がん (M)	—	—	—	—	0	1	0	0	
腹腔	血管肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	

検査組織数：検査動物数と異なる場合のみ()内に示した。

* : P<0.05 (Fisher's exact probability test)

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

— : 検査せず

表 2-2 腫瘍性病変の発生頻度

(マウス)

検査時期	性		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000
臓器	検査動物数		18	19	25	19	13	12	15	14
	所見									
途中死亡・ 切迫層殺	心臓	組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	全身	悪性リンパ腫 (M)	2	5	3	4	4	4	7	5
	脾臓	血管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0
	鼻腔	腺腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
	肺	腺腫 (B)	4	2	1	2	1	1	1	1
		腺がん (M)	2	0	1	3	0	2	0	0
		悪性線維性組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0
	横隔膜	悪性線維性組織球腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	小腸	腺がん (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	大腸	腺がん (M)	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)	8	2*	4*	4	0	0	0	0
		血管腫 (B)	0	0	0	0	0	1	1	0
		肝細胞がん (M)	7	3	2*	4	0	0	0	0
		血管肉腫 (M)	0	1	0	1	0	0	0	0
		組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
		悪性線維性組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0
	腎臓	悪性組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	膀胱	平滑筋腫 (B)	0	0	1	1	0	0	0	0
		組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0(12)	0	0	1
	卵巣	顆粒膜細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0
平滑筋腫 (B)		0	0	0	0	0	0	1	0	
子宮	子宮内膜間質ホリフ (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	
	平滑筋腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	
	組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	
脊髄	組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0	
ハダ腺	腺腫 (B)	2	0	1	2	1	0	1	1	
皮膚	線維腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0	
	乳頭腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	
	平滑筋腫 (B)	0	0	1	1	0	0	0	0	
	毛嚢上皮腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0	
	シュワン細胞腫 (B)	0	0	2	3	0	0	1	0	
	扁平上皮がん (M)	0	0	0	0	0	0	1	0	
	悪性線維性組織球腫 (M)	0	1	0	0	0	1	0	0	
乳腺	腺がん (M)	0	0	0	0	0	1	1	1	
頭蓋腔	シュワン細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	
胸腔	悪性線維性組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0	
腹腔	血管肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	
	組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0	
	悪性線維性組織球腫 (M)	0	1	0	0	0	1	0	0	

検査組織数：検査動物数と異なる場合のみ()内に示した。

* : P<0.05 (Fisher's exact probability test)

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

- : 検査せず

表 2-3 腫瘍性病変の発生頻度 (マウス)

検査時期	性		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000
臓器	検査動物数		52	52	52	52	52	52	52	52
	所見									
全動物	心臓	組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
	全身	悪性リンパ腫 (M)	3	6	3	4	7	7	11	8
	リンパ節	血管腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0
	脾臓	血管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0
		血管肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
	鼻腔	腺腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
		腺腫 (B)	11	9	9	7(51)	2	6	6	7
	肺	腺がん (M)	16	5*	5*	11(51)	6	5	6	3
		悪性線維性組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0
	横隔膜	悪性線維性組織球腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	胃	扁平上皮がん (M)	0	0	0	0	1	0	0	0
	小腸	腺がん (M)	1	0	0	0	0	1	0	0
		嚢胞腺がん (M)	0	1	0	0	0	0	0	0
	大腸	腺がん (M)	0	0	1	1	1	0	0	0
	肝臓	肝細胞腺腫 (B)	20	18	13	21	0	1	0	1
		血管腫 (B)	0	0	1	0	0	1	2	0
		肝細胞がん (M)	11	6	3*	11	0	0	0	0
		血管肉腫 (M)	1	1	0	1	0	0	0	1
		組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1
		悪性線維性組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0
胆嚢	腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	0	
膵臓	島細胞腺腫 (B)	1	0	0	0	0	1	0	0	
腎臓	悪性組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	
膀胱	乳頭腫 (B)	0	0	0	2	0	0	0	0	
	平滑筋腫 (B)	0	0	1	2	0	0	0	0	
	組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	
副睾丸	血管肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	
前立腺	腺がん (M)	0	0	0	1	0	0	0	0	
卵巣	顆粒膜細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	1	1	0	
	腺腫 (B)	0	0	0	0	0	2	0	1	
	平滑筋腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0	
子宮	子宮内膜間質ホリフ (B)	0	0	0	0	3	1	3	5	
	脱落膜腫 (B)	0	0	0	0	0	2	0	0	
	平滑筋腫 (B)	0	0	0	0	1	0	1	2	
	血管肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	
	組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	

検査組織数：検査動物数と異なる場合のみ()内に示した。

* : P<0.05 (Fisher's exact probability test)

(B)：良性腫瘍、(M)：悪性腫瘍

—：検査せず

表 2-3 (続き) 腫瘍性病変の発生頻度 (マウス)

検査時期	性		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000
臓器	検査動物数		52	52	52	52	52	52	52	52
	所見									
全動物	下垂体	前葉腺腫 (B)	0	0	0	0	1	1(51)	1(51)	2(50)
	脊髄	組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0
		髄膜腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1
	ハダゲ腺	腺腫 (B)	3	5	3	4	3	4	4	5(51)
	皮膚	乳頭腫 (B)	0	0	0	1	0	0	2	0
		線維腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0
		血管腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0
		平滑筋腫 (B)	0	0	1	1	0	0	0	0
		毛嚢上皮腫 (B)	0	0	0	0	1	0	0	0
		シユワソ細胞腫 (B)	1	0	2	3	0	0	2	0
		血管肉腫 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0
		扁平上皮がん (M)	0	0	0	0	0	0	1	0
		悪性線維性組織球腫 (M)	0	1	0	0	0	1	0	0
	乳腺	腺がん (M)	—	—	—	—	0	2	1	1
	頭蓋腔	シユワソ細胞腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	0
	胸腔	悪性線維性組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0
腹腔	組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0	
	血管肉腫 (M)	2	0	0	0	0	0	0	0	
	悪性線維性組織球腫 (M)	0	1	0	0	0	1	0	0	

検査組織数：検査動物数と異なる場合のみ()内に示した。

(Fisher's exact probability test)

(B)：良性腫瘍、(M)：悪性腫瘍

—：検査せず

腫瘍数のまとめ

検査時期	性		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000
臓器	検査動物数		52	52	52	52	52	52	52	52
	所見									
腫瘍数	腫瘍数	良 性	37	34	31	41	12	20	25	24
		悪 性	37	22	12	29	15	22	19	19
腫瘍数			74	56	43	70	27	42	44	43
担腫瘍動物数	担腫瘍動物数	良 性	31	25	25	29	12	17	20	18
		悪 性	27	19	11	25	14	15	17	14
担腫瘍動物数			38	36	33	39	24	27	31	27

(3) イヌを用いたカプセル投与による慢性毒性試験

毒性資料No. 原体-17

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1996年

検体の純度：

試験動物：純系ビーグル犬、1群雌雄各4匹、開始時週齢：18～20週齢、
体重：雄7.8～9.1kg、雌6.5～9.2kg

試験期間：52週間（1994年7月28日～1995年7月31日）

投与方法：検体を0、2、30及び300mg/kgの用量でゼラチンカプセルに入れ、毎日52週間にわたって強制経口投与した。投与用量は毎週1回測定した体重に基づき、個体別に計算し、1週間分のカプセルを一度に調製した。対照群にはカプセルのみを投与した。

投与量設定根拠；

試験項目及び結果：

一般症状及び死亡率；一般症状及び生死を毎日観察した。

下痢便が対照群を含む全群で認められたが、300mg/kg群のみが対照群よりその発生率が高く投与に関連性があると考えられた。また、嘔吐も対照群を含む全群で時々認められたが、90日間反復経口投与毒性試験（毒性資料No. 原体-10）において480mg/kg群で嘔吐が認められていることから判断し、雌の30及び300mg/kg群の第1週に、各々4例中1例及び4例中2例に認められた嘔吐のみ投与との関連が疑われるが、第2週以降の発生率には対照群との差は認められなかった。

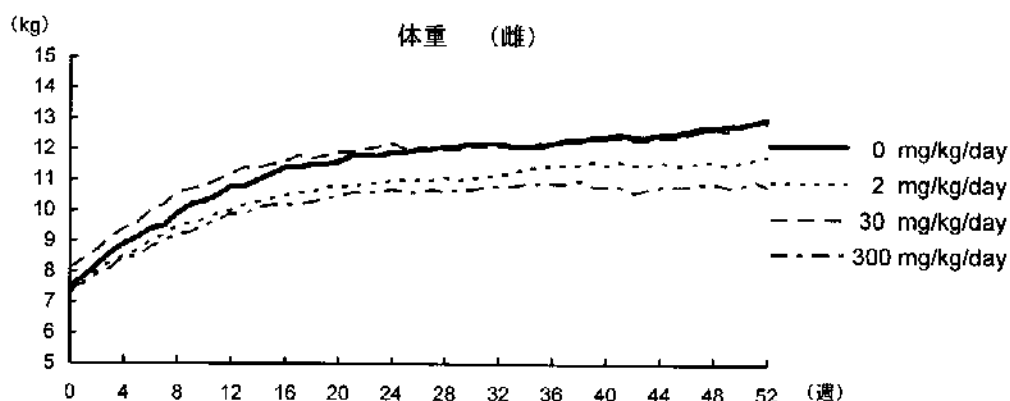
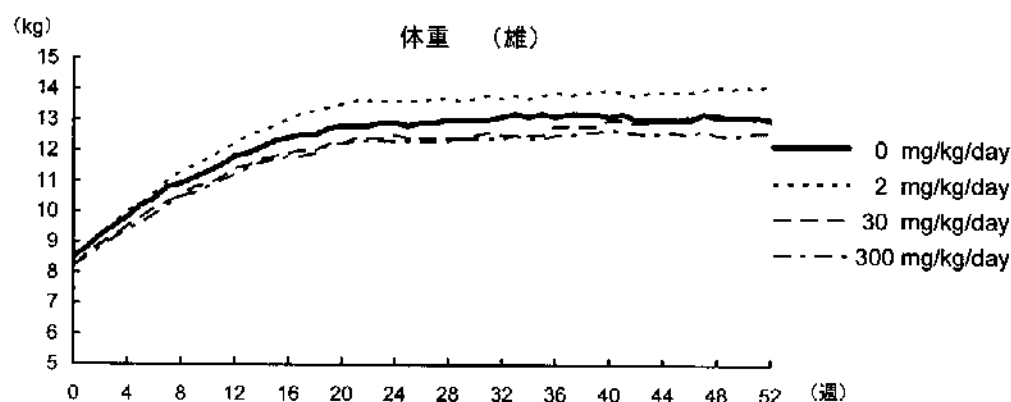
歯肉の蒼白化が300mg/kg群（雄4例中4例、雌4例中2例）にのみ35週から試験終了時まで認められたが、その発現、消失時期に投与時期との関連も認められず、発生も散発的で一定の傾向もなかった。また、行動、血液学的検査、病理組織学的検査結果との関連もなかったため、歯肉蒼白化の毒性学的意味はないものと考えられた。

死亡例は認められなかった。

体重変化；投与開始前から投与終了時まで毎週1回体重を測定した。

平均体重の推移において、対照群に比して雌雄共に統計学的に有意な差は認められなかった。しかし、平均体重増加量で見た場合、雌の300mg/kg群のみが3週目から試験終了まで対照群に比べ有意に低かった（52週までの累積体重増加量は対照群に比して、およそ62%）。特に、同群の1例の雌は38～40週の間約900gの体重減少が認められ、摂餌量の減少も伴っていた。

投与期間中の平均体重変化を図に示した。



摂餌量；毎日400g/動物ずつ給餌し、残餌量を測定した。

300mg/kg群の雌のみ、平均摂餌量が対照群に比べ有意 ($P < 0.05$ 、対照群に対しおよそ96%) に低かった。

血液学的検査；投与2週間前及び投与後13、26、39及び52週目に各群全例を対象として頸静脈から採血し、以下の項目について測定した。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、白血球数及び分画、血小板数、網赤血球数、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

血液学的検査

性別	雄											
	13			26			39			52		
検査時期 (週)	2	30	300	2	30	300	2	30	300	2	30	300
投与量 (mg/kg)	2	30	300	2	30	300	2	30	300	2	30	300
赤血球数	90 ↓						91 ↓					
MCV	111 ↑									106 ↑		
MCH	108 ↑						107 ↑			107 ↑		
血小板数	131 ↑			145 ↑			148 ↑			142 ↑		
好酸性球				256 ↑								

性別	雌											
	13			26			39			52		
検査時期 (週)	2	30	300	2	30	300	2	30	300	2	30	300
投与量 (mg/kg)	2	30	300	2	30	300	2	30	300	2	30	300
血小板数				136 ↑			150 ↑					
網赤血球数	33 ↓											
好中球				67 ↓								
リンパ球	132 ↑											
PT							129 ↑		107 ↑			

↑ ↓ : P < 0.05, ↑ ↓ : P < 0.01 (Williams' test)

表中の数値は変動の目安として群平均値の対照群に対する変動率(%)

血小板数の軽度増加が300mg/kg群雌雄で認められたが、個体別値にも、また投与前値との差も少ないこと、さらに、骨髄の変化あるいは病理組織学的検査結果でもこの変化に結びつく所見が認められないことより、毒性的意味はないと考えられた。その他、有意差の認められた項目については、投与用量、検査時期、性別にも一定の傾向もないことから投与との関連性はないものと考えられた。

血液生化学的検査；血液学的検査で使用した血液から得た血漿を用い、以下の項目について測定した。

総蛋白、アルブミン (ALB)、グロブリン (Glob)、A/G比、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、塩素 (Cl)、コレステロール、ALP、ビリルビン、糖、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、γ-グルタミルトランスぺプチターゼ (γ-GTP)、クレアチンホスフォキナーゼ (CPK)、尿酸、トリグリセリド (TG)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (OCT)、血漿コリンエステラーゼ (ChE-P)、赤血球コリンエステラーゼ (ChE-E) (但し、39週時のコリンエステラーゼは測定しなかった)

300mg/kg群では、ALPの増加が13週以降雌雄で認められ、時間の経過と共に著しく増加した。GPT、OCTも26週以降同様に増加したが、雌では26週

のOCT以外は有意差は認められなかった。これらの値は変動幅が大きく、対照群との差が認められない個体もあった。γ-GTPの増加も認められたが、対照群より増加したのは雄4例中2例、雌4例中1例のみであった。52週の雄でのみGOTが有意に増加した。アルブミンの減少が13週以降雌雄に認められ、総蛋白の軽度減少となってあらわれた。

30mg/kg群では26週以降、雌雄でALPの軽度増加が認められたが、雌では26週を除いて有意ではなかった。

2mg/kg群でも雄の39週でのみALPの有意な増加がみられたが、対照と比して数値の差が僅かであること、また、投与開始後の全ての検査時期で投与開始前のALP値に比して順次減少していることから検体の影響とは考えられなかった。

その他にも有意な変動が散見されたが、検査時期、投与用量、雌雄に一定の傾向もなく、また、投与前値との変動幅も小さいことから投与の影響はないと考えられた。

次の表に対照群に比べ統計学的有意差の認められた項目を示す。

血液生化学的検査

性別	雄											
	13			26			39			52		
検査時期 (週)												
投与量 (mg/kg)	2	30	300	2	30	300	2	30	300	2	30	300
総蛋白			90↓			87↓			90↓			86↓
ALB			88			85↓			82↓			81↓
Glob			88↓									
A/G									82↓			
ALP			521↑			134↑ 959↑			136↑ 161↑ 1295↑			167↑ 1104↑
GPT						230↑			345↑			540↑
GOT												164↑
γ-GTP*			3↑			4↑			5↑			9↑
OCT			49↓ 44↓ 65↓			462↑			518↑			1995↑
ChE-P												136↑
ChE-E												82↓
Na			101↑			102↑						
K									108↑			
Ca									95↓			
P			108↑						112↑ 112↑ 108↑			
Cl						103↑						
TG			190↑						204↑			181↑

性別	雌											
	13			26			39			52		
検査時期 (週)												
投与量 (mg/kg)	2	30	300	2	30	300	2	30	300	2	30	300
糖			91↓									
総蛋白			89↓			94↓ 87↓			94↓ 89↓			88↓
ALB						89↓			82↓			82↓

↑ ↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Williams' test) 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群平均値の対照群に対する変動率(%)

(続き)

性別	雌											
	13			26			39			52		
検査時期 (週)	2	30	300	2	30	300	2	30	300	2	30	300
Glob												
ALP			501↑			149↑ 1082↑			140 1223↑			180 1457↑
GPT						179			300			675
γ-GTP*						2↑			5↑			6↑
OCT			325			504↑			333			2569
ChE-P			123↑									133↑
BUN												73↓
クレアチニン			88↓						80↓			80↓
Na			101↑			101↑						
Ca								95↓	95↓			
Cl			102↑			103↑						102↑
TG												58↓ 76↓ 75↓

↑↓: P<0.05、↑↓: P<0.01 (Williams' test)

表中の数値は変動の日安として群平均値の対照群に対する変動率(%)

*: γ-GTPは実数 (mU/mL) を示した。対照群の値はいずれの検査時期も3 (mU/mL) 以下であった。

尿 検 査 ; 血液学的検査と同時期に採取した尿について以下の項目を検査した。

比重、尿量、外観、色調、pH、蛋白、尿素、還元性物質、糖、ケトン体、胆汁色素、ウロビリノーゲン、血色素、沈渣

対照群に比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

尿 検 査

性別	雄											
	13			26			39			52		
検査時期 (週)	2	30	300	2	30	300	2	30	300	2	30	300
尿素			136↑									

性別	雌											
	13			26			39			52		
検査時期 (週)	2	30	300	2	30	300	2	30	300	2	30	300
尿量									57↓			
尿素								58↓	42↓			48↓
蛋白			150↑									

↑↓: P<0.05、↓: P<0.01 (Williams' test)

表中の数値は変動の日安として群平均値の対照群に対する変動率(%)

対照群に比べ統計学的に有意な尿素の減少が雌で認められた。しかし、対照群の値が非常に高かったためであり、また、投与群の値は各々の投与前の値と大差がないことから投与の影響とは思われなかった。

眼科学的検査 ; 投与開始前及び投与後52週に各群の全例を対象として検査した。

検体投与に関連のある異常は認められなかった。

臓器重量；試験終了時の全例を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

副腎、肝、脾、脳、肺、胸腺、膵、甲状腺及び上皮小体、心、下垂体、腎、唾液腺、精巣又は卵巣、前立腺又は子宮（頸部を含む）、精巣上体
 対照群に比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

臓器重量

性		雄			雌		
投与群 (mg/kg)		2	30	300	2	30	300
下垂体	実重量				78↓	79↓	81↓
肝	実重量			154↑			124↑
	対体重比			156↑			149↑
膵	実重量				79↓	82↓	74↓
腎	対体重比						124↑
甲状腺	対体重比						135↑
副腎	対体重比						126↑
子宮	実重量						49↓

↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Williams' test)

表中の数値は変動の日安として群平均値の対照群に対する変動率(%)

肝重量が300mg/kg群雌雄で有意に増加した。個体別値も全例で増加しており、検体投与の影響と考えられる。

子宮重量が、300mg/kg群で有意な減少を示した。個体別子宮重量の変動幅は広く、今回みられた子宮重量の変化は次表のように発情周期と関連した正常の範囲内にあると考えられるので、検体投与の影響とは考えなかった。

試験期間中の発情時期と屠殺時子宮重量及び子宮の発情期像

投与群 (mg/kg)	動物番号	発情徴候を確認した時期 (週)	最終屠殺時の子宮重量 (g)	子宮の病理組織から判断される発情期像
対照群	106	20、47-48	26	発情後期
	108	—	30	発情後期末期
	110	22-24、47-48	32	発情後期
	112	46-48	32	発情後期
2	114	51-52	38	発情後期
	116	36	14	発情休止期
	118	34-35	21	発情後期末期
	120	26-27、51-52	36	発情後期
30	122	—	8	発情休止期
	124	18、40-45	14	発情後期末期
	126	39-41	15	発情休止期
	128	27-29、51-52	31	発情後期

—：発情徴候未確認

(続き)

300	130	28、51	30	発情後期
	132	29-30	12	発情休止期
	134	—	7	発情休止期
	136	29-31	9	発情休止期

—：発情徴候未確認

下垂体及び膵臓の実重量で、雌の全投与群で有意な減少が認められたが、対体重比には有意差は認められなかった。かつ最終体重で調整した下垂体重量には有意差は認められなかった。また、これらの個別別値は背景データ*の範囲内にあり、病理組織学的にも関連する変化は伴っておらず、検体投与の影響とは考えられなかった。

* 雌の下垂体及び膵臓の実重量の範囲と試験施設における背景値

投与群 (mg/kg)	対 照	2	30	300	背景値	
下垂体 (mg)	平均	96	75	76	78	79
	範囲	79~106	64~92	64~87	65~94	55~106
膵 臓 (g)	平均	35.1	27.8	28.9	26.0	29.1
	範囲	31.2~41.8	22.6~31.1	26.7~33.7	21.6~29.7	18.3~41.7

これら以外に有意差の認められた変化について個別別値をみると対照群との明らかな差は認められない。また、実重量と対体重比の間に相関もないので、検体投与の影響とは考えられなかった。

骨髄検査；試験終了時の屠殺前に全例を対象として、胸骨穿刺により骨髄を採取し、塗抹標本作製、染色し検鏡した。

検体投与による変化は認められなかった。

脳コリンエステラーゼの測定；試験終了時の全例について、脳の左半分を用い測定した。

検体投与による変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；試験終了時の全例について剖検を行った。

肝腫大が、300mg/kg群雌（1/4例）及び雄（3/4例）で認められ、検体投与の影響と考えられた。その他の所見はすべて偶発的発生であり、検体投与の影響ではないと考えられた。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織標本作成し、検鏡した。

副腎、消化器官（食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、直腸、結腸）、動脈（弓及び腹部）、脳（大脳皮質、視床核、中脳、脳幹、小脳）、精巢上体、眼（視神経を含む）、大腿骨（関節面を含む）、胆嚢、心、腎、涙腺、肝、肺（気管を含む）、リンパ節（頸部、腸間膜）、乳腺、卵巣、膵、末梢神経（頸骨神経）、下垂体、前立腺、唾液腺、坐骨神経、骨格筋、皮膚、脊髄（頸部、胸部、腰部）、脾、胸骨（骨髄を含む）、精巢、

胸腺、甲状腺及び上皮小体、舌、気管、膀胱、子宮（頸部を含む）、臍、肉眼的異常部位

認められた主要な病理組織所見を次表に示した。

病理組織学的検査

性別 投与群 (mg/kg)		雄				雌			
		0	2	30	300	0	2	30	300
臓器	検査動物数	4	4	4	4	4	4	4	4
	所見								
肝	小葉中心性～中間帯性肝細胞/すり硝子様細胞質	0	0	2	4*	0	0	0	3
	散在性風船様空胞細胞	0	0	0	0	0	0	0	3
	軽度胆管過形成	0	0	0	3	0	0	0	1
腎	腎盂周囲リンパ球集簇	0	0	0	0	0	0	0	2
	腎盂炎	0	0	0	0	0	0	0	1
膀胱	移行性上皮過形成	0	0	0	0	0	0	0	2
	著明な上皮リンパ様組織	0	0	0	0	0	0	1	2
卵巢	黄体－新鮮	0	0	0	0	3	2 [#]	2	1
	黄体－退行	0	0	0	0	1	1	2	2
	黄体－欠如	0	0	0	0	0	0	0	1
子宮	発情後期像	0	0	0	0	3	2	1	1
	発情後期末期像	0	0	0	0	1	1	1	0
	発情休止期像	0	0	0	0	0	1	2	3
乳腺	葉発育 軽度	0	0	0	0	1	3	2	1
	葉発育 中度	0	0	0	0	2	1	1	0
下垂体	嚢胞（前葉）	1	1	2	2	2	0	2	2
	嚢胞（中間部）	0	0	0	0	1	0	0	0
脾臓	腺胞上皮過形成を伴う炎症及び線維化（軽度）	0	0	0	0	0	0	1	0

*: $P < 0.05$ (Fisher's exact probability test)

[#]: 検査動物数3例

30mg/kgあるいは300mg/kg群で肝の小葉中心性～中間帯性肝細胞のすり硝子様細胞質、散在性風船様空胞細胞、軽度胆管過形成が認められた。これらの変化は300mg/kg群で認められた肝重量の増加、肝腫大、血漿中酵素活性値の増加と関連があり、検体投与の影響と考えられた。

300mg/kg群雌で腎盂周囲リンパ球集簇が2/4例（内1例は腎盂炎を伴う）に認められた。これに対応する変化が膀胱（上皮リンパ様組織及び移行性上皮過形成）に認められた。上皮リンパ様組織は30mg/kg群雌でも1/4例認められたが、最近の6試験における対照群の発生率は腎盂周囲リンパ球集簇が0/4～1/4で、膀胱の上皮リンパ様組織が0/4～2/4であること、さらに本試験でリンパ細網系に関連する変化が認められないことから検体投与による変化とは考えられなかった。

子宮の発情休止期像の用量依存性のある増加が認められたが、これは黄体の退行あるいは欠如及び乳腺の葉発育の程度と程度別発生率と相関があった。これは300mg/kg群雌における子宮重量が低いことと一致しているが、外陰出

血の観察に基づく発情周期を考慮すると、個体別動物の性成熟の時期を反映した性周期の違いに基づくものであり、検体投与による影響ではないと考えられた。

以上の結果から、本剤のイヌに対する52週間強制経口投与による慢性毒性試験における影響として、300mg/kg群で投与開始初期にみられた嘔吐、投与期間を通して認められた下痢、雌の体重増加量の減少、雌雄で血液生化学的検査値の変動（ALP、GPT、OCT及び γ -GTPの増加、アルブミン、総蛋白の減少）、肝重量の増加及びその病理組織学的変化（肝小葉中心性～中間帯性肝細胞のすり硝子様細胞質、風船様空胞細胞、胆管過形成）が、30mg/kg群では雌雄にALPの軽度増加、肝細胞のすり硝子様細胞質が認められた。

2mg/kg群には検体投与の影響は認められなかったため、無毒性量は雌雄とも2mg/kg/日と判断される。

11. 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

(1) ラットを用いた繁殖毒性試験

毒性資料No. 原体-18

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1996年

検体の純度：

試験動物：Crj:CD(SD)系ラット、1群雌雄各30匹*、投与開始時5週齢、

体重：雄138～153g、雌122～137g。（*F1親動物の選抜は1群雌雄各25匹）

試験期間：P世代：雄：投与開始から交配前13週間及びF1児離乳以降の剖検前日までの
合計23～27週間

雌：投与開始より交配前13週間及びF1児離乳以降の剖検前日までの
合計19～21週間

F1世代：雄：離乳時から交配前15週間及びF2児の離乳以降の剖検前日までの
合計27～35週間

雌：離乳時から交配前15週間及びF2児の離乳以降の剖検前日までの
合計21～31週間

なお、P世代母動物のF1児離乳時剖検で、最高投与群に性周期の乱れが示唆されたため、2産児日に対する影響を確認する目的で、F2aを分娩したF1母動物から群当り12匹を用い、追加してF2bを作出した。

F2a及びF2b世代：離乳後から生後28日までの1週間

投与方法：検体を0、30、300及び3000ppmを含有する飼料を自由に摂食させた。

投与量設定根拠；

交配・調整・選抜及び観察・検査項目：概要を次頁の表にまとめた。

試験の概要

世代	期間(週)	作業手順	試験項目
P	生育(13)		体重：週1回測定 餌、飲水：週2回測定（飲水は1群10匹） 発情周期：交配2週間前～交配確認まで膣スメア検査 交尾状況の観察
	交配(3)	雌雄1対1で交配。交配は膣スメア、膣栓で確認(妊娠妊娠0口)。未交配、不妊例は再交配	
	妊娠(3)		体重：妊娠0、7、14、21日に測定 餌、飲水：前回測定日からの累計として全期間測定（飲水は1群10匹）
	出産		出産状況の観察
	哺育(3)	生後4日目に各群児数を雌雄4匹に調整。 (不可能な場合、雌雄計8匹)	生児数、死産児数、外表異常、性別 母体重：分娩後0、7、14、21日に測定 母の餌、飲水：前回測定日からの累計として全期間測定（飲水は1群10匹） 児体重、児数：生後0、4、7、14、21日に測定 形態分化：耳介展開、腹部毛生、切歯萌出、眼瞼開裂、精巣下降、膣開口の検査 4日目淘汰児、死亡児：外表異常、耳介展開の観察、剖検
F1	離乳	親動物全例屠殺 (雄：離乳1週以内、雌：分娩22日目)	全生存親動物の病理組織学的検査 臓器重量の測定 子宮検査：着床痕数 精子検査：精子数、形態
	離乳1週	継代用として、腹当り雌雄各1匹（25匹に不足の場合はさらに1匹）ずつ無作為に選抜、さらに各群当り雌10匹を交配予備動物として腹当り1匹ずつ追加選抜	反射機能検査：正向、瞳孔、耳介、角膜、Preyer 継代用以外の児：腹当り雌雄各1匹の臓器重量を測定し、重量に用量依存性があれば病理組織学的検査
	生育(15)		
	交配(3)		
	妊娠(3)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	出産		
F2a	哺育(3)	F1親動物約1/2屠殺	発情周期：分娩後16～18口～交配確認まで(F2a離乳前後) (P世代に準ずる。但し、精子検査は運動性、生存性も実施)
	離乳	F2aの全例屠殺	(F1児に準ずる)
	離乳1週		
	交配(3)	(P世代に準ずる。但し、未交配、不妊例の再交配は未実施)	(P世代に準ずる。但し、餌、飲水は測定せず)
	出産		
F2b	哺育(3)	(P世代に準ずる)	(但し、形態分化は観察せず)
	離乳	F1親動物全例屠殺	(P世代に準ずる)
	離乳1週	F2bの全例屠殺	(F1児に準ずる)

一般状態及び死亡率：全動物について一般状態及び生死を毎日観察した。

発情周期：P及びF1世代雌について交配前2週間から交尾が認められるまで膣スメア標本を作製・鏡検して発情像発現回数及び性周期（発情期から次の発情期までの日数）を検査した。なお、後述するP世代雌の病理組織学的検査で生殖器に所見を認め、性周期の乱れが示唆されたため、2産児目への影響を確認するため各群12匹のF1雌についてF2bを作出した。この際、離乳後の親動物の性周期回復状態をみるためF2bを得るための交配前2週間から交配まで（F2a児離乳前後約1週）についてもF1雌の膣スメアを検査した。

交配及び妊娠の確認：交配は雌の発情を膣スメアで確認し、雌雄1対1で同居させ、翌朝膣栓形成及び膣スメア中の精子により交尾を確認した。交尾日を妊娠0日とした。同居は最長3週間とした。妊娠の確認は触診及び出産をもって行った。

3週間の同居期間中の未交尾例、不妊例は再交配させた。雄の場合P世代は無投与の予備雌動物と、F1世代の場合は投与を継続していた同一群内の予備雌動物と、雌の場合、同一群内の交尾又は授精成功雄と同居させた。

繁殖性に関する指標：

交配、妊娠及び分娩時期の観察に基づき、次の指標を算出した。

$$\text{交尾率} = \frac{\text{1回でも交尾した動物数}}{\text{交配に用いた動物数}} \times 100$$

$$\text{授精率} = \frac{\text{1回でも相手雌を妊娠させた雄動物数}}{\text{1回でも交尾した雄動物数}} \times 100$$

$$\text{妊娠率} = \frac{\text{妊娠した雌動物数}}{\text{1回でも交尾した雌動物数}} \times 100$$

$$\text{出産率} = \frac{\text{生児出産雌動物数}}{\text{妊娠雌動物数}} \times 100$$

生児数、死産児数、着床痕数に基づき次の指標を算出した。

$$\text{出生率} = \frac{\text{生後0日生児数}}{\text{着床痕数}} \times 100$$

$$\text{生後0日生存率} = \frac{\text{生後0日生児数}}{\text{生児数} + \text{死産児数}} \times 100$$

$$\text{生後4日生存率} = \frac{\text{生後4日生児数}}{\text{生後0日生児数}} \times 100$$

$$\text{離乳時生存率} = \frac{\text{生後21日生児数}}{\text{生後4日調整後の生児数}} \times 100$$

$$\text{性 比} = \frac{\text{総雄生児数}}{\text{総雌生児数}}$$

また、授精成功例のうち10例、未交尾及び授精失敗例についても右精巢上部尾部を用いて精子数、精子形態観察及び死滅精子数を計測し、次の指標についても算出した。

$$\text{精子数} = 3\text{回の平均値} \times 2.5 \times 40 \times \frac{1}{\text{精巢上部尾部重量 (g)}} \times 10^4$$

(精巢上部尾部1g当り)

$$\text{異常精子率} = \frac{\text{異常精子数}}{\text{観察精子数 (200)}} \times 100$$

$$\text{運動精子率} = \frac{3\text{回計測の平均精子数} - 3\text{回計測の平均非運動精子数}}{3\text{回計測の平均精子数}} \times 100$$

$$\text{生存精子率} = \frac{500 - \text{染色精子数}}{\text{観察精子数 (500)}} \times 100$$

生存児の形態分化：F1及びF2a児の生存例について耳介展開（生後4日と7日）、腹部毛生（生後4日と7日）、切歯萌出（生後11日と14日）、眼瞼開裂（生後14日と17日）及び精巢下降（生後21日と28日）について検査した。但し、F1児については生後11日の腹部毛生と生後17日の眼瞼開裂については検査しなかった。また、F1児の膈開口（生後35日と42日）も検査した。

反射機能検査：F1児、F2a児及びF2b児の生後28日生存例について正向反射、耳介反射、瞳孔反射、角膜反射及びpreyer反射について検査した。

臓器重量：P及びF1（F2a及びF2b作出に用いた動物は各々の児の離乳後）親世代の全生存例について、雄は児の離乳後1週間以内に、雌は分娩後22日目に屠殺し、以下の臓器重量を測定した。

脳、下垂体、肝、腎、副腎、脾、精巢、精巢上部、精囊、前立腺、子宮、卵巢

F1、F2a及びF2b児は28日齢時に屠殺し、10例の母動物から雌雄各1例ずつ選び、以下の臓器重量を測定した。

脳、下垂体、肝、腎、副腎、脾、心、肺、胸腺、精巢、卵巢、子宮

肉眼的病理検査：P及びF1世代親動物について、胸腹腔内の主要臓器を肉眼的に観察した。生後4日に淘汰した児（F1、F2a、F2b）、次世代として選抜しなかった28日齢のF1動物及び28日齢のF1aとF2b動物についても同様に観察した。

病理組織学的検査：対照群及び3000ppm群の投与終了時の全例を対象として膈、子宮、卵巢、精巢、精巢上部、精囊、前立腺及び下垂体を検査した。

なお、膈、子宮及び卵巢については検体投与による変化がみられたため、下垂体を含め、全投与群の全例について検査した。

また、標的臓器と考えられる肝及び腎についてはP世代、F1動物及びF2児の臓器を摘出した全例について検査した。

未交尾、授精失敗、不妊、異常出産、哺育児全例死亡例について、全例の生殖器、副生殖器及び下垂体、さらに哺育児全例が死亡した母動物の乳腺について検査した。F1及びF2児の重量測定臓器のうち、脾重量は減少傾向が認められたため、有意な減少の認められたF2a児についてのみ対照群と3000ppm群を検査した。

結果：試験結果の概要を表（毒-100～103頁）に示した。

一般状態及び死亡：

P及びF1動物の雌雄共に投与期間を通して検体投与によると考えられる異常症状や死亡は認められなかった。

体重：

3000ppm群では、P世代親動物の体重に対して、雄では検体投与の影響は認められなかった。雌では有意な体重増加抑制が交配前投与期間中に認められた。しかし、雌は妊娠及び哺育期間中も対照に比して低体重のまま推移したものの、この期間中の体重増加量に対照群との差は認められなかった。F1児においては出生時体重に対照群との差は認められなかったが、出生後日数の経過と共に体重増加抑制が増大した。また、交配前投与期間中も低体重が継続し、体重増加量は対照群に比べ雌雄とも有意に少なかった。妊娠及び哺育期間中の体重増加量についてはP世代と同様に対照群との差は認められなかった。F2a及びF2b児の体重はF1児と同様に出生時体重に差は認められなかったものの、出生後日数の経過と共に対照群との差が増大した。

300ppm群では体重に対照群との差は認められなかった。

30ppm群では、P世代雌の交配前期間中の体重増加量が有意に増加したが、300ppm群では認められないこと、また、F1世代で同様の変動も認められないことから検体投与の影響とは考えられなかった。

摂餌量：

摂餌量において、雄では対照群との差は認めなかった。雌では3000ppm群P世代の交配前投与期間中に、また、F1世代では3000ppm群交配前投与期間中、妊娠及び哺育期間中に対照群に比べ有意に減少が認められた。

発情周期：P及びF1世代の交配前2週間（F1ではF2a及びF2bのための交配前）膈スミア標本を作製して発情周期を検査したが、いずれの世代もこの間の平均性周期、発情回数に対照群との差は認めなかった。

一方、F1からF2bを得るための交配前2週間（F2a児離乳前後約1週）のスミア検査においては、児離乳後のF1雌親動物の性周期の回復（発情回帰）が300ppm以下の群では離乳1～3日前から発情回帰する動物が散見（各群12例中3

～4例) されたのに対し、3000ppm群は全例が離乳翌日以降に回帰し、若干の遅れが示唆された。しかし、前述のように、離乳後に回帰した平均性周期や発情回数に関して対照群との差は認められず、繁殖に対する影響を認めるものではなかった。

親動物の交配能力及び繁殖に関する指数：

交配、妊娠及び分娩時期の観察に基づき、交尾率、受精率、妊娠率及び出産率を、また、生児数、死産数、着床痕に基づき出生率、生後0及び4日生存率、離乳時生存率及び性比などの諸指数を求めた。しかし、いずれの指数にも2産目を含め検体投与に関連する対照群との差は認められなかった。

また、未交尾及び授精失敗例を含む動物の精子検査も実施し、精子数、異常及び運動精子率、生存精子率などを求めた。しかし、いずれの群も精子に関して異常は認められなかった。

児動物の形態分化及び反射機能検査：

児の形態分化において、3000ppm群でのみ眼瞼開裂がF1及びF2a児の生後14日目（F1：対照67.5%に対し38.3%、F2a：対照57.0%に対し31.3%）、腹部毛生がF2a児の生後7日目（対照3.8%に対し0.0%）で若干遅れていたが、いずれも体重の低値と関連した変化と推察され、2回日の観察で全例分化の遅れは認められなかったことから軽度な変化であった。その他の検査項目は世代間で一定の傾向もなく、検体投与による影響はないと考えられる。児の生存率、反射機能に検体投与による影響は認められなかった。

臓器重量：

3000ppm群において親（P、F1世代）動物では、肝重量及び腎重量の有意な増加（雄：対体重比、雌：実重量及び対体重比）が認められた。雌でのみ脾重量（実重量及び対体重比）も有意な減少がみられたが脾の病理組織学的検査では所見は認められず、低体重に関連したものと思われた。

F1児離乳翌日に屠殺したP世代3000ppm群の雌にのみ、卵巣及び子宮重量の有意な減少（実重量及び対体重比）が認められた。一方、F1世代ではF2a及びF2b離乳時のいずれにも卵巣、子宮重量に対照群との差は認められなかった。

児動物（28日齢）においては3000ppm群でF2a及びF2bの雌雄とも肝の対体重比に有意な増加が認められた。

30ppm以上の群では、雌で児F2aの脾実重量及び対体重比の有意な低下が認められたが、F2bには認められなかった、また、雄では児F2bでのみ脾の対体重比の低下がみられ3000ppmでのみ実重量の低下も認められた。しかし、いずれも投与用量との関連もなく、病理組織学的検査では基質的障害を示唆する所見も認められなかったことから検体投与の影響はないと考えられた。

その他、親及び児の臓器重量に変動の認められた臓器が散見されたが、用

量との関連性もなく、世代間に一定の傾向もないので、検体投与の影響とは考えられなかった。

病理学的検査：

3000ppm群親（P、F1世代）動物では、肝臓において雌雄で小葉中心性肝細胞肥大、雌で褐色色素の沈着が有意に高かった。また、腎ではP世代の雄でのみ赤血球円柱、間質細胞浸潤、尿細管上皮内好酸性滴状物、硝子円柱、尿細管好塩基性化の発生率が有意に認められた。

F1児離乳翌日に屠殺したP世代雌にのみ黄体数、二次卵胞数の減少を伴う萎縮性変化、子宮径の小型化、内腔の不整化が、膣では円柱上皮細胞の多層化が認められた。膣や不整化した子宮内腔の組織像は発情前期にほぼ相当した。一方、子宮自体は発情前期の特徴である子宮液の貯留、内腔の拡張、重量増加は認められず、性周期の乱れが示唆された。

300ppm群のP世代雄では腎で尿細管上皮内好酸性滴状物、硝子円柱及び尿細管好塩基性化の発生率が有意であった。

30 ppm群のP世代雄では、腎の尿細管上皮内好酸性滴状物の発生率が有意であった。

児動物（28日齢）においては3000ppm群でF2a及びF2bの雌雄とも肝に小葉中心性肝細胞肥大が認められた。

親および児の脾には基質的障害を示唆する所見は認められなかった。

前述の腎所見を一般毒性試験の結果と併せ考察すると、尿細管上皮内好酸性滴状物は雄ラットに特徴的とされる $\alpha 2u$ グロブリンに関係した尿細管上皮における漏出蛋白の再吸収像、硝子円柱は尿細管内における蛋白の凝集と考察される。従って、P世代30ppm群での腎所見は生体の適応範囲内の所見と考えられる。しかし、P世代300ppm以上の群では尿細管の再生像と考えられる好塩基性化が認められたことから、300ppm以上の群においては尿細管の障害が示唆された。一方、P世代よりも投与期間の長いF1世代では腎の病理組織所見に対照群との間に有意な差は認められなかった。

F1世代ではF2a児離乳時に子宮と膣の所見は各1例認められたのみでF2b児離乳時では認めなかった。また、P世代雌は正常な性周期を示して交尾、妊娠、分娩と続く一連の現象ならびに着床痕数や出生児数などに検体投与の影響がみられないことから、上記したP世代雌の生殖器の病理組織学的変化は繁殖機能に影響を及ぼさない軽度のもと考えられた。

以上の結果より、2世代にわたり本剤を飼料中に混入して投与した場合、3000ppm群では親動物の体重増加抑制、摂餌量の減少、肝重量の増加及び肝の小葉中心性肝細胞肥大、腎尿細管の好塩基性化等が、児動物では母動物の体重増加抑制及び摂餌量減少の二次的变化と考えられる哺育時の体重増加抑制及び親と同様の肝の変化が認められた。

3000ppm群のPあるいはF1雌親動物で児離乳後の性周期の乱れ、あるいは発情回帰の遅れが示唆されたものの繁殖能に対しては何ら影響は認められなかった。

300ppm群では、P世代雄動物で、尿細管の再生像と考えられる好塩基性化が認められ、尿細管の障害が示唆された。

30ppm群では検体投与の影響と考えられる変化は認めなかった。

以上のことより、無毒性量は親動物に対して30ppm(P：雄 2.2mg/kg/日、雌 2.5mg/kg/日、F1：雄 2.5mg/kg/日、雌 2.8mg/kg/日)、児動物に対し300ppm(雄 22.6mg/kg/日、雌 24.7mg/kg/日)と判断される。

繁殖性については、最高投与量の3000ppmでも影響は認めなかった。

親動物の一般状態、体重、摂餌量、検体摂取量、飲水量

世 代		親 : P				児 : F1				親 : F1				児 : F2a				親 : F1				児 : F2b											
投 与 群 (ppm)		0				30				300				3000				0				30				300				3000			
動 物 数	雄	30	30	30	30	25	25	25	25	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12				
	雌	30	30	30	30	25	25	25	25	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12				
親 動 物	一般状態	巣作り不良	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	死亡数	雄	交配前	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		雌	妊娠時	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	体重増加量 (g)	雄	交配前	450	456	465	435	506	497	500	462↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		雌	交配前	197	225↑	203	172↓	267	252	264	232↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			妊娠時	138	121	138	130	142	136	142	134	136	132	140	140	136	132	140	140	136	132	140	140	136	132	140	140	136	132	140	140		
			哺育時	-17	-32	-25	-9	-29	-24	-36	-14	11	8	5	1	11	8	5	1	11	8	5	1	11	8	5	1	11	8	5	1		
	摂餌量 (g/ラット)	雄	交配前	29.6	29.3	30.3	29.4	30.6	30.6	30.0	30.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		雌	交配前	20.8	21.7	20.9	19.6↓	22.8	21.8	22.3	20.9↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			妊娠時	22.3	23.0	23.0	21.6	26.4	24.8	25.4	23.5↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			哺育時	50.6	49.0	52.0	49.3	51.4	53.0	53.7	45.5↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	検体摂取量 (mg/kg)	雄	交配前	0	2.2	22.6	225.2	0	2.5	25.2	272.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		雌	交配前	0	2.5	24.7	243.9	0	2.8	27.7	289.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			妊娠時	0	1.8	18.1	187.5	0	2.0	20.1	206.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			哺育時	0	4.0	43.9	447.0	0	4.4	44.8	400.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	飲水量 (ml/ラット)	雄	交配前	43.4	44.3	47.4	48.0↑	49.1	52.3	50.1	49.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
雌		交配前	36.4	36.9	36.0	34.4	40.9	42.1	42.7	39.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		妊娠時	47.8	52.6	50.2	53.6	68.9	56.1↓	63.4	65.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		哺育時	111.8	106.7	99.8	93.9↓	94.6	93.2	94.5	82.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

— : 観察又は測定せず。

↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Dunnnett test、Dunnnett test-Steel)

親動物の繁殖性に関する成績及び臓器重量

世 代		親 : P				児 : F1				親 : F1				児 : F2a				親 : F1				児 : F2b				
投 与 群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000	0	30	300	3000	0	30	300	3000	0	30	300	3000	0	30	300	3000	
精子 検査	精子数	495	449	501	491	424	414	415	496																	
	異常精子率(%)	0.1	0.2	0.1	0.3	0.5	0.6	0.7	0.7																	
	運動精子率(%)	—	—	—	—	81.6	81.9	81.5	83.4																	
	生存精子率(%)	—	—	—	—	79.6	81.6	80.7	81.8																	
性周 期	平均発情回数	3.3	3.1	3.1	3.3	3.2	3.0	3.0	3.4	2.3	2.4	2.2	2.0													
	平均性周期(日)	4.3	4.6	4.4	4.4	4.5	4.4	4.3	4.3	4.3	4.0	4.4	4.3													
交尾 [#] 率 (%)	雄	100	100	100	100	100a)	100a)	100	100	100	100	100	100													
	雌	100	93.3	100	100	100	100	96.0	100	100	100	100	100													
授 精 率 [#]		100	100	100	100	88.0	92.0	92.0	92.0	—	—	—	—													
妊 娠 率 [#]		93.1	85.7	96.7	100	100	92.0	95.8	100	83.3	91.7	91.7	91.7													
出 産 率		100	100	100	96.7	100	95.7	100	96.0	90.0	90.9	90.9	100													
妊 娠 期 間 (日)		22.5	22.6	22.5	22.2	22.0	22.1	22.0	22.1	22.1	22.1	22.1	22.0													
着 床 率		15.1	13.7	14.9	15.7	13.5	13.6	15.3	14.3	—	—	—	—													
新 生 児 数		12.8	11.9	12.6	12.5	12.2	11.9	12.9	11.9	12.9	12.8	13.4	14.7													
死 産 児 数 (%)		1.2 (8.8)	0.3 (1.8)↓	0.9 (6.1)	0.9 (8.8)	0.7 (4.6)	0.8 (9.7)	0.7 (5.1)	1.0 (7.5)	1.0 (8.8)	0.5 (3.3)	0.8 (6.3)	0.3 (2.0)													
出 生 率 (%)		84.7	83.5	84.9	80.5	81.4	80.5	81.3	86.1	—	—	—	—													
動 物 臓器* 重量 (雄 /雌)	脳	実重量						105↑ /---																		
		対体重比						---						110↑ /---												94↓
	肝	実重量				---								128↑ ---												125↑ ---
		対体重比				111↑ /132↑								113↑ /138↑												141↑ ---
	腎	実重量				108↑ ---																				
		対体重比				105↑ /113↑								113↑ /112↑												120↑ ---
	脾	実重量				---								---												---
		対体重比				/ 86↓ ---				/ 83↓				/ 79↓												/ 81↓ ---
	副腎	実重量												116↑ /---												
		対体重比												113↑ /---				113↑ /---								
	精巣 上体	対体重比												116↑ /---												
	卵巢	実重量				---																				
		対体重比				/ 75↓ ---																				
	子宮	実重量				---																				
		対体重比				/ 75↓ ---																				

— : 観察又は測定せず。 空欄又は---は異常なし
 ↑ ↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01 (Dunnett test, Dunnett test-Steel, Wilcoxon rank sum test)
 a : 次世代動物選抜後、投与を継続していた余剰例を、交配前生育期の死亡例(各1)の代替として交配した。
 # : F0、F2a用F1は未交尾、不妊例について再交配の結果を含む、F2b用F1は再交配せず。
 * 対照群の値を100とした場合の割合

親動物の主要な病理組織学的所見（発生例数）

世 代		親：P				児：F1				親：F1				児：F2a				親：F1				児：F2b							
投 与 群 (ppm)		0	30	300	3000	0	30	300	3000	0	30	300	3000	0	30	300	3000	0	30	300	3000	0	30	300	3000				
親 動 物	肉眼的病理検査																												
	肝 腫大	雄																											
		雌									0/13	0/13	0/13	5/13 ↑															
	病理組織学的所見																												
	肝	小葉中心性 肝細胞肥大	雄	0/30	0/30	0/29	30/30 ↑	0/25	0/24	0/25	25/25 ↑	—	—	—	—														
			雌	0/29	0/29	0/30	29/30 ↑	0/13	0/13	0/13	11/11 ↑	0/12	0/11	0/11	12/12 ↑														
		褐色色素沈着	雄	0/30	0/30	0/29	0/30	0/25	0/24	0/25	0/25	—	—	—	—														
			雌	0/29	0/29	0/29	19/30 ↑	0/13	0/13	0/13	7/11 ↑	0/12	0/11	0/11	8/12 ↑														
	腎	赤血球円柱	雄	0/30	0/30	2/29	8/30 ↑	0/25	0/24	1/25	0/25	—	—	—	—														
			雌	0/29	1/29	1/30	0/30	0/13	0/13	0/13	0/11	0/12	0/11	0/11	0/12														
		間質細胞浸潤	雄	2/30	4/30	7/29	9/30 ↑	11/25	11/24	11/25	13/25	—	—	—	—														
			雌	0/29	1/29	1/29	0/30	0/13	0/13	0/13	0/11	0/12	1/11	1/11	0/12														
		尿細管上皮内 好酸性滴状物	雄	17/30	27/30 ↑	24/29 ↑	25/30 ↑	7/25	8/24	3/25	8/25	—	—	—	—														
			雌	0/29	0/29	1/30	0/30	0/13	0/13	0/13	0/11	0/12	0/11	0/11	0/12														
		硝子円柱	雄	1/30	7/30	11/29 ↑	11/30 ↑	11/25	11/24	9/25	11/25	—	—	—	—														
			雌	0/29	1/29	1/30	0/30	0/13	0/13	0/13	0/11	0/12	0/11	0/11	0/12														
		尿細管 好塩基性化	雄	5/30	9/30	13/29 ↑	13/30 ↑	12/25	12/24	12/25	15/25	—	—	—	—														
			雌	0/29	4/29	1/30	0/30	0/13	0/13	0/13	0/11	1/12	2/11	1/11	0/12														
		卵巣	萎 縮	4/29	4/29	7/30	24/30 ↑	0/13	0/13	0/13	0/12	0/11	0/11	0/11	0/12														
		子宮	径小型化	1/29	3/29	5/30	20/30 ↑	0/13	0/13	0/13	0/12	0/11	0/11	0/11	0/12														
	腔の不整化		1/29	8/29	7/30	11/30 ↑	0/13	0/13	0/13	1/12	0/11	0/11	0/11	0/12															
	膣	円柱上皮細胞多層 化	1/29	0/29	2/30	24/30 ↑	0/13	0/13	0/13	1/12	0/11	0/11	0/11	0/12															
	卵巣	黄体数	15.7	15.6	15.0	10.2 ↓	15.6	16.8	13.5	15.5	17.5	15.4	16.3	15.8															
		二次卵胞数	5.6	2.9 ↓	2.2 ↓	2.8 ↓	5.4	2.8	3.8	6.5	5.5	5.4	5.9	5.7															
	組織像から判断された発情期	子宮	発情前期	6	4	3	20	6	6	9	8	4	7	5	9														
			発情期	11	13	14	8	4	2	2	3	2	3	5	1														
			発情後期	6	4	8	0	1	0	0	0	3	0	0	1														
			発情休止期	6	7	4	1	2	5	2	0	2	1	1	1														
膣		発情前期	9	8	9	29	7	8	8	8	4	8	4	10															
		発情期	9	7	8	0	2	2	2	3	1	3	5	2															
		発情後期	6	8	7	0	2	1	1	0	4	0	2	0															
		発情休止期	5	3	5	0	1	2	2	0	2	0	0	0															

—：観察又は測定せず。 空欄は異常なし
所見数 / 検査数

↑：P<0.05、↑：P<0.01 (X² test)
↓：P<0.05 (Non parametric Dunnett test)

(2) ラットにおける催奇形性

毒性資料No. 原体-19

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1995年

検体の純度：

試験動物：Cr1:CD BR VAF/Plus系SPF妊娠ラット（8～10週齢；妊娠2日
体重203～265g）、1群25匹

試験期間：器官形成期10日間（1994年7月11日～7月26日）

投与方法：検体を1%メチルセルロース脱イオン蒸留水に懸濁させ、0、25、75及び
225mg/kgの投与用量で妊娠6から15日までの10日間毎日1回10mL/kgを強
制経口投与した。なお、対照群には溶媒のみ同様に投与した。膈スミア中
に精子を確認又は臍栓の認められた日を妊娠0日とした。

投与用量設定根拠：

試験項目：

親動物；一般状態及び生死を毎日観察し、体重を動物入手時（妊娠1日又は2日）
及び妊娠2、3、6、8、10、12、14、16、18及び20日に測定した。

摂餌量は妊娠3～20日まで、体重の測定日から次の測定日までの合計を測
定した。飲水量は妊娠3～20日まで毎日測定した。

妊娠20日に帝王切開し、黄体数、着床数、生存・死亡胎児数、胎盤重量、
妊娠子宮重量を検査した。また、肝重量を測定した。

生存胎児；性別、体重測定及び外表異常の観察を行った。各同腹児の約1/2の胎児
については骨格標本を作成し、骨格異常の有無を、残りの胎児については
内臓異常の有無を検査した。

結果：結果を表(毒-106～107頁)に示す。

親動物；225mg/kg群で、死亡が誤投与により1/25例、検体投与の影響と考えら
れる2/25例の合計3/25例認められた。同群の動物では投与直後の流涎が
大多数（23/25）例に、また、投与初期（妊娠6～8日）の体重増加量の有
意な減少が、摂餌量の減少を伴って認められた。飲水量は投与開始後屠殺
時まで有意な増加[#]が認められた。

*申請者注：ラットの混餌投与による他の試験（13週間亜急性毒性、二世世代繁殖試験）では飲水量に変化はなく、飲水量増加に結びつく腎や下垂体の異常も認めなかった。また一般薬理試験においても飲水量増加に関連する影響はみられなかった。一方、本試験では225mg/kgの強制経口投与直後に一過性の流涎がみられていることから、高濃度での強制経口投与による物理的刺激と投与検体懸濁液の味などが飲水量増加に影響したものと推察した。

75mg/kg群においては流涎を1/25例に認めた。

また、75mg/kg以上の群においては体重の影響を考慮して最終体重の共分散値から補正した肝補正重量と対体重比に極軽度ながら有意な増加（実重量には有意差なし）が認められた。肝は本剤の標的臓器であることを考慮すると、その増加は投与に起因している可能性があると考えられた。

25mg/kg群では母動物に投与の影響は認められなかった。

いずれの投与群でも同腹児の検査項目に検体投与の影響は認められなかった。

児動物；225mg/kg群で平均胎児体重の軽度の増加が認められた。

胎児奇形、内臓及び骨格異常あるいは骨格変異の発生率に投与群と対照群との差は認められなかった。

胎児のしゃがみ症候群*の発生数が対照群で2/292（1/22腹）、25mg/kg群で3/322（1/24腹）、75mg/kg群で0/322（0/23腹）、225mg/kg群で8/282（2/22腹）認められた。

最近の45試験の背景データでは対照群で最大7/289（2/24腹）まで認められていることから、この症候群は検体投与の影響ではなく、通常の生物学的変動の範囲内と考えられた。

*胎児しゃがみ症候群（squat foetus syndrome）：

多くの場合円背位を伴い両側前肢の下方彎曲をみる。これらの例では通常、企胸廓（脊柱の背面彎曲及び胸骨の腹面彎曲）を伴う肥厚肋骨が認められる。

妊娠ラットの器官形成期に強制経口投与した結果、225mg/kgでは母動物に明瞭な検体投与の影響（死亡、流涎、初期体重増加量の減少、摂餌量の減少、肝重量の増加）が認められた。また、75mg/kgでは1例にのみ流涎と、投与に関連の疑いのある極軽度の肝重量の増加が認められた。しかし、25mg/kgでは全く投与の影響は認められなかった。

児に対しては最高用量の225mg/kgにおいても検体投与の影響も催奇形性作用も認められなかった。

以上の結果より、本検体の無毒性量は母動物 25mg/kg、児動物 225mg/kgであった。

		投与量 (mg/kg/日)	0	25	75	225
児	内臓異常	検査胎児(腹)数	146(22)	160(24)	160(23)	140(22)
		異常胎児(腹)数	12(10)	17(11)	16(12)	16(12)
		皮下出血(躯幹部)	1(1)			1(1)
		出血(脳)	5(4)	6(5)	8(8)	5(4)
		出血(眼及びその周囲)		4(3)	2(2)	4(3)
		頸・胸部の動脈の異常	1(1)			
		心室中隔欠損(小)				1(1)
		肝臓突出を伴う 横隔膜の菲薄化	2(2)		2(2)	
		肝臓の分葉異常	2(2)	4(3)	2(1)	3(3)
		出血(腹腔内)				1(1)
		腎盂及び尿管の拡張	1(1)		2(2)	
		精巣位置異常	1(1)	3(3)		4(4)
		甲状腺矮小		1(1)		
		動物	骨格異常	検査胎児(腹)数	142(22)	157(24)
異常胎児(腹)数	10(6)			18(9)	15(9)	9(7)
骨化遅延—頭蓋骨	5(3)			11(4)	1(1)	2(1)
—頸椎弓				2(2)	2(2)	2(1)
—骨盤帯骨化中心	2(2)			7(6)	4(4)	
—指骨					1(1)	
—仙尾椎弓	3(2)			7(5)	9(5)	3(3)
縫合骨	1(1)					1(1)
頸肋骨				1(1)		
肋骨彎曲(軽微)						1(1)
椎体骨化不整	1(1)				4(3)	1(1)
胸骨分節変形					1(1)	
胸・腰椎骨過剰(1コ)						1(1)
骨格変異	検査胎児数			142	157	160
	胸骨分節変異総数	72	78	100	69	

()内の数値は腹数 統計学的有意差なし(P>0.05)
空欄は異常なし

(3) ウサギにおける催奇形性

毒性資料No. 原体-20

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1995年

検体の純度：

試験動物：ニュージーランド白色種妊娠ウサギ

(20～29週齢；妊娠0日 体重3100～4131g)、1群16羽

試験期間：器官形成期13日間（1994年9月12日～1994年10月13日）

投与方法：検体を1%メチルセルロース脱イオン蒸留水に懸濁し、0、30、150及び750mg/kgの投与量で妊娠6日から18日までの13日間、妊娠6、8、10及び14日の体重に基づいて2.5mL/kgの割合で毎日1回強制経口投与した。交尾口を妊娠0日とした。なお、対照群には溶媒のみ同様に投与した。

投与用量設定根拠：

試験項目：

親動物；一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠2、6、8、10、14、19、23及び29日に体重を測定した。

摂餌量は妊娠0～29日まで、体重の測定日から次の測定日までの合計を測定した。

妊娠29日に屠殺し解剖を行い、先天性異常及び母動物の生殖器の肉眼的病理変化を検査した。また、卵巣及び子宮に関する次の項目について検査を行った。

黄体数、生存胎児数とその位置、胚/胎児死亡数とその位置、肉眼的胎児異常、胎盤重量及び妊娠子宮重量

生存胎児；性別、体重ならびに外表及び内臓異常、脳及び骨格の検査を行った。

試験結果：結果を次頁より表に示す。

親動物；検体投与に関連した死亡あるいは一般症状はいずれの投与群にも認められなかった。750mg/kg/日投与群で、妊娠6日～8日に体重及び摂餌量の大幅な減少が認められた。また、全ての動物で投与初期に排便量の減少が認められた。

150mg/kg/日投与群で妊娠6～8日に一時的なわずかな体重減少が認められたが有意差は認められなかった。30mg/kg/日投与群の母動物への検体の影響は認められなかった。いずれの投与群でも、妊娠あるいは同腹児に関する検査項目で、検体投与による影響は認められなかった。

生存胎児；全投与群とも胎児奇形、内臓異常及び胸骨分節の変異の発生率に対照群との差は認められなかった。

骨格異常を有する胎児の発生率が対照群(8.6%)に比べ、投与群(15.8～17.3%)で高かったが、用量と関連性はなく背景データの範囲(6.8～20.9%)内にあることから、検体投与による影響ではないと考えられた。

また、過剰肋骨を有する胎児の発生率が対照群(41.7%)に比べ投与群(60.5～73.4%)で高かった。これの背景データは47.3～63.5%であり、30mg/kg/日では、背景データの範囲内、150mg/kg/日投与群では背景データの範囲をわずかに超える値であったが統計学的に有意では無かった。750mg/kg/日投与群はこの範囲を上回り、統計学的に有意に高かった。しかし、750mg/kg/日投与群の過剰肋骨の発生数の増加は胎児発育時の肋骨原節形成期間である妊娠6～8日で、体重及び摂餌量にかなりの影響を受けたことに関連する母体へのストレスが原因であり、検体投与の胎児への直接的な影響はなかったと考えられる。

本剤を妊娠ウサギの器官形成期に強制経口投与した結果、750mg/kg/日では初期の摂餌量の減少に伴う排便量の減少を示す動物が多く、それに伴い初期体重も減少した。胎児では母動物の体重・摂餌量の減少に関連すると考えられる過剰肋骨(変異)の発生数が多く認められたが催奇形性は認められなかった。

150mg/kg/日では統計学的に有意ではなかったが、母動物の初期体重の減少傾向が認められた。しかし、胎児に対する影響は認められなかった。

以上の結果より、無毒性量は母動物に対しては30mg/kg/日、児動物に対しては150mg/kg/日であった。

本試験において、最高用量750mg/kgでも検体による催奇形性作用は認められなかった。

試験結果：

投与量 (mg/kg/日)		0	30	150	750		
1群当たり動物数		16	16	16	16		
親	死亡数	1	0	0	0		
	不妊数	0	1	1	0		
	妊娠数 (%)	16(100)	15(93.8)	15(93.8)	16(100)		
	流産動物数	0	0	0	1		
	生存児保有数	15	15	15	15		
	一般状態：投与時食欲不振/排便量の減少	1	1	3	16		
	体重変化(g)：妊娠 6-8日		20	-4	-33	-181↓SH	
		妊娠 6-18日	247	210	205	94↓W	
	摂餌量：妊娠 6-7日 (g/動物/日)		179	174	153	40↓W	
		妊娠 6-19日 (g/動物)	2296	2174	2092	1688↓W	
妊娠子宮重量 (g)		540.9	561.6	533.6	519.1		
胎盤重量 (胎盤1個当り g)		5.72	5.51	5.55	5.72		
動物	着床所見 (腹当り)	検査親動物数	15	15	15	15	
		黄体数	10.6	10.3	9.5	10.1	
		着床数	8.9	8.9	8.6	8.5	
		生存胎児数	8.0	8.5	7.8	7.5	
		死亡胎児数	早期	0.2	0.1	0.2	0.5
			後期	0.7	0.3	0.6	0.5
			計	0.9	0.4	0.8	1.0
動物	体重 (g)	47.7	46.7	47.2	48.5		
	性比雄/全胎児 (%)	45.3	47.5	56.0	45.1		
	検査胎児(腹)数	120(15)	127(15)	117(15)	113(15)		
	奇形胎児数	4 (3)	6 (6)	3 (3)	3 (3)		
	外表奇形 前肢弯曲	1 (1)		1 (1)			
	内臓奇形	大動脈/肺動脈奇形	1 (1)	3 (3)	1 (1)	1 (1)	
		心臓拡張			1 (1)		
		心室中隔欠損		3 (3)	1 (1)	1 (1)	
		下大静脈形成不全	2 (1)				
		臍帯ヘルニア			1 (1)		
内臓逆位(胸部と腹部)		1 (1)					
骨格奇形	頭蓋骨化中心癒合				1 (1)		
	後頭骨部突出		1 (1)				
	気管軟骨帯欠損		1 (1)				
	多発性脊柱骨・肋骨奇形				1 (1)		
	二分脊椎		1 (1)				

↓ : P<0.01 (W: Williams' test, SH: Shirley's test)

a) ()内の数値は腹数

空欄は異常なし

		投与量 (mg/kg/日)	0	30	150	750
児 動	内臓異常	検査胎児数	116(15)	121(15)	114(15)	110(15)
		異常胎児数	5 (4)	6 (4)	9 (7)	7 (5)
		頸・胸部動脈の異常	1 (1)	4 (2)	2 (2)	4 (3)
		大動脈/肺動脈異常	1 (1)			
		無気肺		2 (2)		
		肺中間葉欠損	1 (1)		1 (1)	
		肝臓 - 分葉異常	1 (1)			
		皮膜下嚢胞				2 (2)
		胆嚢 二葉/分岐	1 (1)		5 (3)	
		出血 (副腎)				1 (1)
		遠位尾部・腹側彎曲			1 (1)	
		物 a)	骨格異常	検査胎児数	116(15)	121(15)
異常胎児数 (発生率 %)	10 (6) {8.6}			20 (9) {16.5}	18(10) {15.8}	19 (8) {17.3}
頭頂骨接合					1 (1)	
縫合骨				2 (2)	4 (3)	5 (3)
頰骨・上顎骨接合	1 (1)			11 (6)	4 (4)	7 (3)
頭蓋骨骨化不整					3 (3)	
頸椎骨骨化不整	5 (3)			2 (1)	1 (1)	5 (3)
頸椎骨骨化中心過剰						1 (1)
頸肋骨	4 (3)			2 (1)	1 (1)	1 (1)
肋骨：骨化不全	1 (1)					
胸骨：過剰胸骨分節					1 (1)	
癒合/接合胸骨分節				1 (1)	4 (4)	2 (1)
胸骨背・腹側方向の彎曲 (軽微)						1 (1)
指骨骨化遅延	2 (2)			2 (1)	3 (2)	1 (1)
骨格変異	検査胎児数			116 (15)	121 (15)	114 (15)
	13肋骨	55 [41.7]	73 [60.5]	75 [65.0]	79 [73.4] ↑	
	未骨化胸骨分節	15 [12.8]	11 [7.7]	17 [13.8]	7 [7.6]	
	胸骨分節減少	7 [6.3]	8 [5.5]	10 [9.7]	7 [7.5]	
	非対称/二分胸骨分節	1 [2.2]	6 [5.0]	4 [4.6]	6 [4.8]	
	胸骨分節変異総数	21 [18.4]	23 [16.9]	28 [24.1]	19 [19.2]	

↑ : P<0.01 (Shirley's test)

a) ()内の数値は腹数

[]内の数値は骨格変異発生率 (%)

12. 変異原性

(1) 細菌を用いた復帰変異試験

毒性資料No. 原体-21

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1993年

検体の純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及び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薬物代謝酵素系(S-9Mix)の存在下及び非存在下で、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、予備試験の結果、

5000 μ g/プレートを最高用量とした。

試験濃度は313~5000 μ g/プレートの範囲で5用量とした。

試験は各用量3枚のプレートで実施し、2回行った。

試験結果：結果を表1及び2に示した。

2回の試験において検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、菌に生育阻害を起こさない用量(最高用量 5000 μ g/プレート)範囲において、いずれの菌株でも復帰変異コロニー数の増加はなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、2-アミノアントラセン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン塩酸塩では、全ての検体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、本剤は代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

表1 復帰変異試験成績 (1回目試験)

(表中の数値は3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩 基 対 置 換 型			フレームシフト型		
			WP2 <u>uvrA</u>	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0		19 \pm 6	96 \pm 9	9 \pm 1	18 \pm 8	4 \pm 2	
検 体	313	-	19 \pm 8	89 \pm 10	8 \pm 2	18 \pm 6	7 \pm 1	
	625		17 \pm 4	99 \pm 11	6 \pm 1	21 \pm 2	5 \pm 1	
	1250		17 \pm 2	98 \pm 9	8 \pm 1	18 \pm 6	6 \pm 1	
	2500		18 \pm 2	79 \pm 6	5 \pm 1	18 \pm 7	5 \pm 2	
	5000		18 \pm 7*	79 \pm 15*	6 \pm 2*	17 \pm 6*	4 \pm 2*	
溶媒対照 (DMSO)	0		18 \pm 3	92 \pm 5	7 \pm 2	27 \pm 6	8 \pm 1	
検 体	313	+	18 \pm 5	85 \pm 7	8 \pm 5	25 \pm 3	7 \pm 2	
	625		19 \pm 4	74 \pm 10	7 \pm 3	27 \pm 6	7 \pm 3	
	1250		20 \pm 8	86 \pm 9	7 \pm 2	23 \pm 1	7 \pm 2	
	2500		17 \pm 7	74 \pm 12	7 \pm 4	28 \pm 4	6 \pm 4	
	5000		17 \pm 3*	75 \pm 8*	7 \pm 4*	26 \pm 2*	4 \pm 2*	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	322 \pm 35	638 \pm 20			
		0.1				686 \pm 26		
	SA	0.5				493 \pm 44		
	9AA	80					632 \pm 23	
	2AA	0.5					353 \pm 19	
		1				1032 \pm 54		
		2					277 \pm 7	100 \pm 6
		10		595 \pm 12				

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

SA : アジ化ナトリウム

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2AA : 2-アミノアントラセン

* : 検体の析出を認めた。

空欄は該当なし

表 2 復帰変異試験成績 (2回目試験)

(表中の数値は3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 (μ g/プレート)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2 <u>uvrA</u>	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	15 \pm 2	90 \pm 10	7 \pm 1	15 \pm 2	5 \pm 2	
検 体	313		16 \pm 1	83 \pm 7	6 \pm 2	17 \pm 2	3 \pm 3	
	625		19 \pm 7	95 \pm 7	6 \pm 1	23 \pm 3	6 \pm 3	
	1250		16 \pm 3	77 \pm 8	5 \pm 0	21 \pm 7	5 \pm 1	
	2500		19 \pm 6	71 \pm 1	6 \pm 2	14 \pm 4	4 \pm 1	
	5000		21 \pm 4*	84 \pm 4*	3 \pm 2*	22 \pm 4*	5 \pm 6*	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	28 \pm 1	79 \pm 5	8 \pm 4	31 \pm 5	9 \pm 2	
検 体	313		19 \pm 2	81 \pm 7	7 \pm 2	31 \pm 10	9 \pm 5	
	625		21 \pm 3	83 \pm 6	9 \pm 2	29 \pm 4	7 \pm 3	
	1250		23 \pm 6	82 \pm 10	7 \pm 1	28 \pm 6	5 \pm 2	
	2500		26 \pm 3	77 \pm 5	8 \pm 4	24 \pm 7	4 \pm 1	
	5000		17 \pm 2*	86 \pm 3*	10 \pm 0*	26 \pm 3*	5 \pm 1*	
陽 性 対 照	AF-2	0.01	-	325 \pm 19	520 \pm 14			
		0.1				690 \pm 27		
	SA	0.5				583 \pm 41		
	9AA	80						870 \pm 82
	2AA	0.5					238 \pm 6	
		1				670 \pm 51		
		2					232 \pm 35	93 \pm 9
		10		479 \pm 229				

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

SA : アジ化ナトリウム

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2AA : 2-アミノアントラセン

* : 検体の析出を認めた。

空欄は該当なし

(2)細菌を用いたDNA 修復試験

毒性資料No. 原体-22

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1993年

検体の純度：

試験方法：枯草菌(Bacillus Subtilis)の組換え修復保持株(H-17、rec⁺)及び欠損株(M-45、rccE⁻)を用い、代謝活性化法及び非活性化法によって、DNA損傷の誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して用いた。

予備試験の結果、

試験菌株に対して生育阻止帯を誘発しなかったため、本試験は10000 μ g/ディスクを最高用量とする6用量(200~10000 μ g/ディスク)とした。試験は各用量2枚のプレートで実施し、2回行った。

結果：結果を次頁の表に示した。

検体は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両菌株に生育阻止帯を認めなかった。

一方、陽性対照として用いた3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド[4,3-b]インドール(S-9Mix存在下)及びマイトマイシンC(S-9Mix非存在下)では両菌株間に明らかな生育阻止帯の差が生じた。

また、陰性対照として用いたカナマイシン(S-9 Mix非存在下)では両菌株に同程度の生育阻止帯が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、DNA損傷の誘発性を有さないものと判断される。

試験結果：

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	S-9Mix の有無	阻止帯の径 (mm)		差 (mm)
			M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	0	0	0
			0	0	0
検体	200		0	0	0
	500		0	0	0
	1000		0	0	0
	2000		0	0	0
	5000		0	0	0
	10000		0	0	0
陰性対照 (カナマイシン)	0.2		9	7	2
			9	7	2
陽性対照 (マイマイシンC)	0.01	21	1	20	
		20	1	19	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	0	0	0
			0	0	0
検体	200		0	0	0
	500		0	0	0
	1000		0	0	0
	2000		0	0	0
	5000		0	0	0
	10000		0	0	0
陽性対照 (Trp-P-1)	5		9	0	9
			9	0	9

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

(3) 染色体異常誘発性

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

毒性資料No. 原体-23

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1993年

検体の純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの継代培養した肺由来のCHL細胞を用い、代謝活性化法及び非活性化法によって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。

用量設定のために実施した細胞分裂抑制試験の結果より、本試験の濃度は非活性化法の24時間処理においては10、20、40、80及び160 μ g/mLの5用量、48時間処理においては1.5、3、6、12及び24 μ g/mLの5用量、代謝活性化法においては6時間処理で15、30、60、120及び240 μ g/mLの5用量とした。観察は1濃度当り細胞100個に占める中期分裂像について行い、試験は2回行った。

染色体異常誘発性の統計学的解析は χ^2 検定を用いた。

試験結果：表1及び2に示した。

2回の試験において検体は代謝活性化系の有無にかかわらず溶媒対照群に比し構造的染色体異常を持つ細胞の有意な増加は認められなかった。倍数性細胞についても溶媒対照群に比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ベンツ(a)ピレンの代謝活性化法及びマイトマイシンCの非活性化法では明らかな染色体異常を示した。

以上の結果より、本剤は代謝活性化系の有無にかかわらず、染色体異常誘発性を有しないものと判断される。

表1 染色体異常試験成績 (直接法)

被験物質	濃度*	処理時間	観察細胞数	S-9 Mixの有無	分裂頻度 (%)	倍数性細胞数 (%)	染色体構造異常細胞と出現頻度 (%)								
							ギャップ	染色分体型		染色体型		断片化	その他	合計	
								切断	交換	切断	交換			ギャップを含む	ギャップを除く
溶媒対照 (DMSO)		24	100		4.8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100 (m)	4.8 (4.8)	2 (1.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.0)	1 (0.5)	
検体	10		100		3.5	1	0	0	0	1	0	0	0	1	
			100 (m)	3.7 (3.6)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0.5)	0 (0.5)	
	20		100		3.0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	
			100 (m)	2.7 (2.9)	0 (0)	0 (1.0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	1 (0.5)	
	40	24	100		1.4	2	0	1	0	0	1	0	0	2	
			100 (m)	1.3 (1.4)	0 (1.0)	0 (0)	0 (0.5)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	1 (1.5)	
	80		100		1.2	0	1	1	0	0	0	0	0	2	
			100 (m)	0.7 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.5)	1 (1.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	1 (1.0)	
	160		100		1.8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100 (m)	1.7 (1.8)	0 (0.5)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
	陰性対照 (無処置)	0	24	100		6.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
				100 (m)	6.7 (6.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)
陽性対照 (MMC)	0.1	24	100		2.6	2	7	37	34	0	3	0	0	62	
			100 (m)	3.8 (3.2)	0 (1.0)	5 (6.0)	29 (33.0)	42 (38.0)	0 (0)	1 (1.5)	1 (0.5)	0 (0)	59 (60.5)	58 (58.5)	
溶媒対照 (DMSO)		48	100		2.1	0	0	0	0	0	0	0	0		
			100 (m)	2.9 (2.5)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
検体	1.5		100		1.7	0	1	1	0	0	0	0	0		
			100 (m)	2.1 (1.9)	1 (0.5)	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (2.0)	2 (1.0)	
	3		100		1.9	0	0	1	0	0	0	0	0		
			100 (m)	1.9 (1.9)	1 (0.5)	0 (0)	1 (1.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.0)	2 (1.0)	
	6	48	100		2.8	0	1	2	0	0	0	0	0		
			100 (m)	2.5 (2.7)	1 (0.5)	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (1.5)	2 (1.0)		
	12		100		2.1	0	1	2	0	0	0	0	0		
			100 (m)	2.5 (2.3)	0 (0)	2 (1.0)	4 (2.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (3.0)	4 (2.0)		
	24		100		1.7	0	2	0	0	0	0	0	0		
			100 (m)	2.2 (2.0)	0 (0)	4 (2.0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (2.5)	1 (0.5)		
	陰性対照 (無処置)	0	48	100		2.7	1	0	2	0	0	0	0	2	
				100 (m)	2.4 (2.6)	1 (1.0)	0 (0)	2 (1.0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	1 (1.5)	1 (1.5)	
陽性対照 (MMC)	0.1	48	100		2.7	1	3	44	60	2	5	3	0		
			100 (m)	3.3 (3.0)	4 (2.5)	7 (5.0)	45 (44.5)	61 (60.5)	7 (4.5)	2 (3.5)	5 (4.0)	82 (83.5)	81 (81.5)		

* (μg/mL)

(m): 平均値

DMSO: ジメチルスルホキシド

MMC: マイトマイシンC

表2 染色体異常試験成績 (代謝活性化法)

被験物質	濃度*	処理時間	観察細胞数	S-9 Mixの有無	分裂頻度 (%)	倍数性細胞数 (%)	染色体構造異常細胞と出現頻度 (%)								
							ギャップ	染色分体型		染色体型		断片化	その他	合計	
								切断	交換	切断	交換			ギャップを含む	ギャップを含む
溶媒対照 (DMSO)		6 ^{a)}	100		8.9	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
			100 (m)		8.7 (8.8)	0 (0.5)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0.5)	0 (0)
検体	15	6 ^{a)}	100	+	8.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100 (m)		10.2 (9.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)
			100		9.3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
			100 (m)		8.2 (8.8)	4 (2.0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.0)	1 (1.0)
			100		7.6	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
			100 (m)		9.5 (8.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.0)	1 (1.0)
	60	6 ^{a)}	100		8.6	0	1	2	0	0	0	0	0	3	2
			100 (m)		9.1 (8.9)	2 (1.0)	2 (1.5)	0 (1.0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3.0)	1 (1.5)
			100		11.9	0	0	0	1	0	1	0	0	2	2
			100 (m)		10.5 (11.2)	2 (1.0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	1 (1.5)
			100		7.4	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
			100 (m)		9.1 (8.3)	0 (0.5)	0 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.5)	2 (1.0)
陽性対照 [B(a)P]	40	6 ^{a)}	100	6.1	0	1	10	5	1	2	0	0	17	16	
			100 (m)	7.8 (7.0)	2 (1.0)	3 (2.0)	9 (9.5)	14 (9.5)	3 (2.0)	3 (2.5)	0 (0)	0 (0)	29 (23.0)	27 (21.5)	
溶媒対照 (DMSO)		6 ^{a)}	100	10.1	1	2	0	0	0	1	0	0	3	1	
			100 (m)	9.1 (9.6)	0 (0.5)	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0)	1 (2.0)	0 (0.5)	
検体	15	6 ^{a)}	100	8.9	1	0	1	1	0	0	0	0	2	2	
			100 (m)	9.9 (9.4)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0.5)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1.0)	0 (1.0)	
			100	11.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100 (m)	8.9 (10.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
			100	7.1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
			100 (m)	8.7 (7.9)	1 (0.5)	0 (0.5)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.0)	1 (0.5)	
	60	6 ^{a)}	100	9.9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100 (m)	11.6 (10.8)	2 (2.0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
			100	10.6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100 (m)	11.4 (11.0)	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
			100	9.8	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
			100 (m)	9.4 (9.6)	0 (0)	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0)	0 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2.0)	2 (1.5)	
陽性対照 [B(a)P]	40	6 ^{a)}	100	10.2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
			100 (m)	7.0 (8.6)	0 (0.5)	0 (0.5)	2 (1.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.5)	2 (1.0)	

* (μg/mL) (m):平均値

a) 被験物質をS-9Mix存在下/又は非存在下で6時間処理し、培地交換後さらに18時間培養した。

b) 検体溶液添加後、検体の析出がみられた。

DMSO: ジメチルスルホキシド

[B(a)P]: ベンツ(a)ピレン

(4) マウスを用いた小核試験

毒性資料No. 原体-24

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1994年

検体の純度：

試験動物：ICR系マウス (Crj:CD-1)、7週齢、1群雌雄各5匹

体重：雄 27.4g~36.8g、雌 22.4g~29.1g

試験方法：ICR系マウスを用い、骨髓細胞における小核の誘発性を検定した。検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁し、投与量は125、250、500及び1000mg/kgを単回強制経口投与した。

投与量は予備試験の結果より、1000mg/kgは死亡が起こる用量、500mg/kgは死亡する可能性がある用量と考え、小核試験において、少なくとも3用量での評価が行えるよう125、250、500及び1000mg/kgの4用量とした。対照群は陽性対照群としてマイトマイシンC、陰性対照群として5%アラビアゴム水溶液を各々強制経口投与した。

標本作製時間は投与24、48及び72時間後に骨髓を採取し、各投与量当り雌雄各5匹のマウスから骨髓塗沫標本を作製し、染色して小核を有する多染性赤血球の頻度を調べた。

小核を有する多染性赤血球(MNPCE)の頻度(F)は多染性赤血球(PCE)の1000個中における小核を有する多染性赤血球の比率、多染性赤血球の割合(R)は全赤血球(多染性赤血球と正染性赤血球の和)1000個に占める多染性赤血球の割合として求め、それを%で表示した。

$$F(\%) = \frac{\text{MNPCE数}}{\text{PCE数}} \times 100$$

$$R(\%) = \frac{\text{PCE数}}{\text{PCE数} + \text{NCE数}} \times 100$$

統計学的解析にはFはKastenbaum-Bowmanの数表を用い、RはWilcoxonの順位和検定で行った。

試験結果：結果を下表に示した。

性別	標本作製時間	薬物	投与量 (mg/kg)	動物数	MNPCE (%) 平均値±SD	PCE (%) 平均値±SD
雄	24	溶媒対照 (5%AG)		5	0.08±0.08	57.0±5.4
		検体	125	5	0.16±0.05	57.2±4.2
			250	5	0.12±0.13	58.4±5.9
			500	5	0.26±0.11	58.8±2.2
			1000	1	0.30	59.6
	陽性対照 (マイトマイシンC)	10	5	5.40±1.85	57.7±7.1	
	48	溶媒対照 (5%AG)		5	0.12±0.08	61.2±2.9
		検体	125	5	0.14±0.09	61.1±6.7
			250	5	0.14±0.11	59.0±3.7
			500	5	0.14±0.11	54.4±3.2
			1000	3	0.13±0.15	49.2±18.2
	72	溶媒対照 (5%AG)		5	0.24±0.09	62.5±5.0
検体		125	5	0.08±0.04	56.9±6.1	
		250	5	0.02±0.04	58.5±3.5	
		500	5	0.16±0.11	62.2±6.6	
		1000	3	0.07±0.06	56.7±12.7	
雌	24	溶媒対照 (5%AG)		5	0.12±0.08	52.4±5.8
		検体	125	5	0.08±0.08	56.6±2.9
			250	5	0.20±0.07	52.5±4.0
			500	5	0.12±0.13	56.7±6.1
			1000	4	0.03±0.05	57.0±2.2
	陽性対照 (マイトマイシンC)	10	5	3.32±1.73	51.5±2.8	
	48	溶媒対照 (5%AG)		5	0.12±0.13	54.4±2.4
		検体	125	5	0.10±0.10	54.2±3.8
			250	5	0.12±0.08	60.2±5.1
			500	5	0.16±0.17	55.1±6.8
			1000	4	0.10±0.08	51.2±5.4
	72	溶媒対照 (5%AG)		5	0.10±0.10	58.3±4.4
検体		125	5	0.22±0.13	61.0±2.8	
		250	5	0.10±0.00	61.4±2.0	
		500	5	0.14±0.05	61.1±6.0	
		1000	4	0.15±0.10	64.2±7.0	

5%AG : 5%アラビアゴム水溶液

MNPCE (%) : 多染性赤血球1000個における小核を有する多染性赤血球の比率

PCE (%) : 全赤血球1000個に占める多染性赤血球の割合

1000mg/kg投与群においては動物の死亡により雌雄各5匹の骨髓塗抹標本が得られなかったため、評価の対象から外した。

125、250及び500mg/kg投与群においては、いずれの標本作製時間においても、小核を有する多染性赤血球の割合に有意な増加は認められなかった。また、いずれの標本作製時間においても、各用量群の全赤血球に対する多染性赤血球の割合に有意な減少は認められなかった。

一方、陽性対照のマイトマイシンCでは小核を有する多染性赤血球の割合に著しい増加が認められた ($P < 0.05$)。

多染性赤血球の全血球に対する割合に有意な減少は認められず骨髓細胞の増殖に対する抑制作用は認められなかった。

以上の結果より、本実験条件下でICR系 (Crj:CD-1) マウスの骨髓細胞における本剤の小核誘発性は陰性であると判断される。

13. 生体機能への影響に関する試験

毒性資料No. 原体-25

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1995年

検体の純度：

(1) 中枢神経系に対する作用

1) マウスにおける一般症状

供試動物：ICR系マウス（SPF）、8週齢、1群 雌雄各3匹

体重：雄 29.4～37.5g、雌25.1～30.0g、

方法：検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁させて、0、78.1、313、1250及び5000mg/kgの投与量で経口投与し、投与後7日間 Irwinの多次元観察法に従って一般症状を観察した。

結果：雄マウスに313mg/kg以上、雌マウスに1250mg/kg以上の用量を投与すると軽度の中枢興奮や非特異的な抑制を示唆する症状、すなわち、認知力の低下、運動性の低下、中枢神経系の興奮、姿勢の異常、運動失調、筋緊張の低下、反射の低下、自律神経系の症状が投与後10分以降に認められた。1250mg/kg以上では投与後1日以内に全例が死亡した。雄マウスの78.1mg/kg投与群及び雌マウスの313mg/kg以下の投与群では、検体投与によると思われる症状は認められなかった。

2) ウサギにおける一般症状

供試動物：日本白色種ウサギ（SPF）、11週齢、1群 雄各3羽、体重 2.31～2.55kg

方法：検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁させて、0、78.1、313、1250及び5000mg/kgの投与量で経口投与し、投与後7日間一般症状を観察した。

結果：313mg/kg以上の投与群の行動、体性神経系項目、自律神経系項目に非特異的な抑制性の症状が認められた。すなわち、自発運動の低下、腹臥位、四肢筋緊張の低下、腹筋緊張の低下、瞳孔反射の低下、角膜反射の低下、皮膚反射の低下、跳び反射の低下、異常歩調、平衡失調、呼吸数減少、心拍数減少、粘膜色の低下が投与後15分以降に観察された。313mg/kg投与群の3例中1例、1250mg/kg投与群の3例中2例、5000mg/kg投与群の3例全例が投与後3時間以内に死亡した。313、1250mg/kg投与群の生存動物にみられた症状は3時間以内に消失した。78.1mg/kg以下の投与群には検体投与によると思われる症状は認められなかった。

3) マウスにおける睡眠延長作用

供試動物：ICR系マウス（SPF）、8週齢、1群 雄各10匹 体重 30.3～40.8g

方 法：検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁させて、0、1.22、4.88、19.5、78.1、313及び1250mg/kgの投与量で経口投与し、30分後に100mg/kgのヘキシバルビタールを皮下投与し、睡眠時間を測定した。

結 果：19.5mg/kg以上の投与群に有意な睡眠時間の延長が認められた。
313mg/kg投与群の10例中4例、1250mg/kg投与群の10例中7例は死亡した。
4.88mg/kg以下の投与群には明確な変化は認められなかった。

4) ウサギの脳波に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ（SPF）、12週齢、1群 雄各3羽、体重 2.45～2.78kg

方 法：ハロセン吸入麻酔下で雄ウサギに電極装着手術を行い、約1週間後に検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁させて0、8.1、78.1、313及び1250mg/kgの投与量で経口投与し、脳波を7日間測定した。

結 果：313mg/kg以上の投与群に、投与後15分から1時間にかけて徐波を発現する個体が認められた。1250mg/kg投与群の3例中2例の投与後1時間目には間代性痙攣発現時に高周波数の脳波の発現が認められ、投与後3時間目に電気活性の低下を発現し、死亡した。78.1mg/kg以下の投与群には異常は認められなかった。

5) ウサギの体温に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ（SPF）、11週齢、1群 雄各3羽、体重 2.29～2.72kg

方 法：検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁させて0、8.1、78.1、313及び1250mg/kgの用量で経口投与した。

体温は直腸温を投与前、投与後15分、30分、1、3、6時間目に、翌日以降は1日1回7日目まで測定した。

結 果：1250mg/kg投与群の3例中2例が投与後6時間以内に死亡したが、そのうちの1例において投与後3時間目に体温の低下が認められた。
また、1250mg/kg投与群の生存した1例においても投与後3、6時間目に体温の低下が認められた。313mg/kg以下の投与群には検体投与によると思われる明確な変化は認められなかった。

(2)呼吸、循環器系に対する作用

1) ウサギの呼吸、血圧、心電図、心拍数に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ（SPF）11～12週齢 1群 雄各3羽、体重 2.43～2.80kg

方 法：ウレタン麻酔下の雄ウサギに、検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁させて、0、78.1、313、1250及び5000mg/kgの投与量で経口投与し、呼吸、血

圧、心電図、心拍数を測定した。

結果：1250mg/kg投与群の3例中1例と5000mg/kg投与群の3例中2例において、投与後約15分で軽度な血圧低下、続いて投与後20分以降に著明な一過性の血圧上昇、心拍数減少、呼吸数減少が認められた。

心拍数減少時の心電図にはTP時間の延長が認められた。この著明な一過性の変化は数分間持続し、その後回復傾向を示した後、再び同様の変化を繰り返した。この変化は、1250mg/kg投与群では投与1時間以降に消失した。しかし、5000mg/kg投与群では著明な一過性の変化を繰り返した後、自発呼吸の停止後、血圧及び脈圧の減少とともに急激な心拍数減少を示し、投与後3時間以内に死亡した。

一方、313mg/kg以下の投与群においては検体投与によると思われる明確な変化は認められなかった。

(3) 自律神経系に対する作用

1) モルモットの摘出輸精管に対する作用

供試動物：Hartley系モルモット（SPF）、8週齢、1群 雄各4匹、体重 552～586g

方法：① 雄モルモットから輸精管を摘出し、Krebs Ringer氏液を満たしたマグヌス管に懸垂して、最初にノルアドレナリン（濃度 5×10^{-5} g/mL）を適用し標本が収縮することを確認後、検体を適用し、検体単独の影響を調べた。検体はマグヌス管での濃度が0、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 及び 10^{-5} g/mLとなるように5分間適用した。

② 雄モルモットから輸精管を摘出し、Krebs Ringer氏液を満たしたマグヌス管に懸垂して、アゴニストを10分毎に適用し収縮が安定後、検体を5分間適用したときのアゴニスト収縮を調べた。検体はマグヌス管での濃度が0、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 及び 10^{-5} g/mLとなるように適用した。アゴニストとしてノルアドレナリン（濃度 5×10^{-5} g/mL）とカリウム（濃度100mM）を使用した。

結果：① 検体を 10^{-5} g/mLの濃度まで検討したが、摘出輸精管に対する直接作用は認められなかった。

② カリウムで惹起した収縮は検体の 10^{-5} g/mLの濃度でのみ有意に抑制された。しかし、ノルアドレナリンによる収縮には検体のいずれの濃度でも明確な抑制は認められなかった。

(4) 消化器系に対する作用

1) マウスの小腸炭末輸送能に対する作用

供試動物：ICR系マウス（SPF）、8週齢、1群 雄各10匹、体重 27.5～35.2g

方法：検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁させて、0、19.5、78.1、313

及び1250mg/kgの投与量で約17時間絶食させた（水は自由摂取）マウスに経口投与した。検体投与30分後に炭末懸濁液を10mL/kgの容量で経口投与した。炭末投与30分後にマウスをエーテルで屠殺し、小腸を摘出した。小腸起始部から炭末先端までの長さを測り、全小腸に対する炭末移動距離の比率（%）を求めた。

結果：78.1mg/kg以上の投与群に小腸炭末輸送の有意な抑制が認められた。313mg/kg投与群の10例中3例と1250mg/kg投与群の10例中8例は小腸摘出前に死亡した。19.5mg/kg以下の投与群には検体によると思われる変化は認められなかった。

2) モルモットの摘出回腸に対する作用

供試動物：Hartley系モルモット（SPF）、8週齢、1群 雄各4匹、体重 550～586g

方法：① 雄モルモットから回腸を摘出し、Krebs Ringer氏液を満たしたマグヌス管に懸垂して、最初にアセチルコリン（濃度 5×10^{-8} g/mL）を適用し、標本が収縮することを確認後、検体を適用し、検体単独の影響を調べた。検体はマグヌス管の濃度が0、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 及び 10^{-5} g/mLとなるように5分間適用した。

② 雄モルモットから回腸を摘出し、Krebs Ringer氏液を満たしたマグヌス管に懸垂して、アゴニストを10分毎に適用し、収縮が安定後、検体を5分間適用したときのアゴニスト収縮を調べた。検体はマグヌス管の濃度が0、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 及び 10^{-5} g/mLとなるように適用した。アゴニストとしてアセチルコリン、ヒスタミン（濃度 5×10^{-8} g/mL）及びカリウム（濃度50mM）を使用した。

結果：① 検体を 10^{-5} g/mLの濃度まで検討したが、摘出回腸の自動運動に対する検体の直接作用は認められなかった。

② カリウムで惹起した収縮は検体の 10^{-5} g/mLの濃度で有意に抑制された。また、カリウムによる収縮は検体の 10^{-7} g/mLと 10^{-6} の濃度でも統計学的に有意な抑制が認められたが、変化が小さいことから検体による作用か否か明確ではなかった。

一方アセチルコリン、ヒスタミンによる収縮には明確な抑制は認められなかった。

(5) ラットの骨格筋に及ぼす作用

供試動物：SD系ラット（SPF）、9週齢、1群 雄各4匹、体重 326～332g

方法：ラットの横隔膜神経筋標本を作成し、神経刺激、筋刺激用の刺激電極を取り付け、Krebs Ringer氏液を満たしたマグヌス管に懸垂し、神経刺激と筋刺激によって惹起した筋収縮に対する検体の影響を調べた。

検体はマグヌス管の濃度が0、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 及び 10^{-5} g/mLとなるように

漸増適用した。

結 果：検体を 10^{-5} g/mLの濃度まで検討したが、検体による明確な作用は認められなかった。

(6) ウサギの血液(溶血と凝固)に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ (SPF)、11週齢、1群 雄各3羽、体重 2.26~2.67kg

方 法：検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁し、0、313、1250 及び5000mg/kgの投与量で経口投与し、検体投与30分後に血液を心臓から採取し、血液に対する影響(溶血と凝固)を調べた。溶血の指標として血漿ヘモグロビン濃度を、凝固の指標としてプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

結 果：最高5000mg/kgまで投与したが、血漿ヘモグロビン濃度、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間には、検体投与による明確な変化は認められなかった。

以上の結果、高用量の検体を投与した場合には、中枢興奮や非特異的な抑制を示唆する異常症状、死亡の発現が観察された。急性死の原因として中枢性の呼吸・循環機能障害が推測された。

メトミノストロピンの生体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)	動物種	投与 経路	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法]	マウス	経口 (ara)	0, 78.1, 313, 1250, 5000	♂♀ 3	♂ 313 ♀ 1250	♂ 78.1 ♀ 313	♂：313mg/kgで運動性の低下 ♂♀：1250mg/kg以上で軽度の中枢興奮や非特異的な抑制。 1250mg/kg以上で全3例が死亡
中枢神経系： 一般症状	ウサギ	経口 (ara)	0, 78.1, 313, 1250, 5000	♂ 3	♂ 313	♂ 78.1	313mg/kg以上で行動、体性神経、自立神経系非特異的な抑制。 313, 1250, 5000mg/kgで各1, 2, 3例が死亡
中枢神経系： 睡眠延長作用	マウス	経口 (ara)	0, 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250	♂ 10	♂ 19.5	♂ 4.88	♂：19.5mg/kg以上睡眠時間延長。 313及び1250mg/kgで各4及び7例死亡
中枢神経系： 脳波	ウサギ	経口 (ara)	0, 78.1, 313, 1250	♂ 3	♂ 313	♂ 78.1	♂：313mg/kg以上で徐波が認められた。 1250mg/kgで2例死亡
中枢神経系： 体温	ウサギ	経口 (ara)	0, 78.1, 313, 1250	♂ 3	♂ 1250	♂ 313	1250mg/kgで体温低下 1250mg/kgで2例死亡
呼吸・循環器系： 呼吸、 血圧、 心電図、 心拍数	ウサギ	経口 (ara)	0, 78.1, 313, 1250, 5000	♂ 3	♂ 1250	♂ 313	1250mg/kg以上で呼吸・循環反応 5000mg/kgで2例死亡
自律神経系： 摘出輸精管	モルモット	試験 管内	0, 10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵	♂ 4	カリウム収縮 10 ⁻⁶ g/mL	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ g/mLで抑制
消化器系： 小腸炭末輸送能	マウス	経口 (ara)	0, 19.5, 78.1, 313, 1250	♂ 10	♂ 78.1	♂ 19.5	78.1mg/kg以上で抑制 313mg/kg以上で死亡例
消化器系： 摘出回腸	モルモット	試験 管内	0, 10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵	♂ 4	カリウム収縮 10 ⁻⁶ g/mL	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ g/mLで抑制
骨格筋： 横隔膜神経筋	ラット	試験 液内	0, 10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵	♂ 4	-	♂ >10 ⁻⁵	影響なし
血液： 溶血・凝固	ウサギ	経口 (ara)	0, 313, 1250, 5000	♂ 3	-	♂ 5000	影響なし

(ara)：5%アラビアゴム水溶液

14. その他

(1) ラットを用いた肝発がん中期検索試験

毒性資料No. 原体-26

試験機関：

報告書作成年：1997年

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

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

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

以上の結果、F344/DuCrj系雄ラットでの肝発癌中期検索試験法を用いて、検体の肝に対する発がん性の有無を検討した結果、検体はF-344 ラットに対して、肝発がん促進作用を示すことが明らかとなった。しかし、陽性対照のフェノバルビタールナトリウム500ppm群でみられたGST-P陽性細胞巢の発生程度と、10倍量である本検体5000ppm投与でほぼ同等であり、その用量差からフェノバルビタールナトリウムと比較して肝発がん促進作用の程度は弱いものであると考えられる。

本試験における検体の5000及び500ppm群でGST-P陽性細胞巢の個数及び面積に統計学的に有意な高値を認めたので、検体の無毒性量は50ppm (3.25mg/kg/日) であると判断される。

(2) ラット肝薬物代謝酵素誘導作用に関する試験

毒性資料No. 原体-27

試験機関：

報告書作成年：1996年

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

以上の結果から、本検体はラットの肝薬物代謝酵素の誘導作用を有することが確認された。その無毒性量は35ppm (2.9mg/kg/日)であった。

また、PB投与においてはテストステロン6 β -ヒドロキシラーゼと3種のアлкоキシクマリン0-デアアルキラーゼ活性の全てが増加したが、 β -NF投与により増加したのはエトキシ及びプロポキシクマリンの2種の脱アルキル化活性のみで、メトキシクマリン0-デメチラーゼとテストステロン6 β -ヒドロキシラーゼについては対照群と同程度の活性であった。

本検体投与においては上記したPB投与と同様、テストステロン6 β -ヒドロキシラーゼと3種のアлкоキシクマリン0-デアアルキラーゼ活性のすべてを増加させたこと及びP-450 2BがPB投与と同様に顕著に増加したことから、本検体投与により、代表的な肝薬物代謝酵素誘導物質の一つであるフェノバルビタール(PB)と相似して、肝薬物代謝酵素が誘導されるものと判断された。

(3) ラットを用いたLGL白血病プロモーション作用に関する試験

毒性資料No. 原体-28

試験機関:

報告書作成年: 1997年

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

Confidential

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

Confidential

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

Confidential

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

Confidential

以上の結果から、ENU二段階発がんモデルを用いた本試験条件下において本検体は、3500ppm(217.8mg/kg/日)の用量においても悪性リンパ腫・白血病に対するプロモーション作用はないと結論された。したがって、LGL白血病に対するプロモーション作用もないと示唆された。

(4) ウサギにおける解毒試験

毒性資料No. 原体-29

試験機関：

報告書作成年：1996年

以上の結果より、本剤により呼吸抑制が著しく、呼吸停止と脳波の平坦化が見られた例に人工呼吸と呼吸促進剤の注射を行うことにより、改善効果が認められたことは、本剤による中毒の治療には呼吸の確保が最も重要であることを示している。

したがって、本剤の高用量摂取時の中毒症状、特に呼吸抑制に対しては、活性炭、D-ソルビトール液、呼吸促進剤(塩酸ロベリン)の投与及び人工呼吸の組み合わせが解毒・治療効果があることが示唆された。

(5) 血漿中AST、ALT及びALP活性に及ぼす影響—*in vitro* 試験

毒性資料No. 原体-30

試験機関：

報告書作成年：1998年

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

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

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

以上、経口投与されたメトミノストロビン及び生体内で生成したメトミノストロビン由来の代謝物が血漿中酵素に対して直接的な活性阻害作用を示す可能性は極めて低いと判断された。

(6) *in vitro* 性ホルモン受容体結合試験

毒性資料No. 原体-31

試験機関：

報告書作成年：1998年

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

以上、検体は*in vitro* 試験系において、ラットのエストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体に対し、結合親和性を示さなかった。

(7) 甲状腺関連ホルモン及びUDP-グルクロン酸転移酵素(UDP-GT)活性に及ぼす影響

毒性資料No. 原体-32

試験機関:

報告書作成年: 1998年

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

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

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

以上のように、検体の3500ppm及び10000ppm投与による甲状腺及び肝臓重量、甲状腺の軽度濾胞上皮肥大、甲状腺関連ホルモン及びUDP-GT活性に及ぼす影響は、陽性対照であるPB投与群とほぼ同様の傾向であることから、PBとほぼ同様の作用機序で誘発されたものと考えられた。

すなわち、UDP-GTを誘導することにより、血清甲状腺ホルモン濃度の減少、代償性的下垂体TSH分泌亢進をもたらし、結果として甲状腺の機能亢進が発現したものと考えられる。

(8) 免疫毒性試験

毒性資料No. 原体-33

試験機関：

報告書作成年：1998年

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

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

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

特異抗体産生の亢進が雄で認められたが、これは投与用量に関連のない変化であった。また、脾臓リンパ球サブセット、特異抗体産生能、胸腺及び脾臓の相対重量、脾臓の白血球数には検体の 投与による影響が全く認められなかった。したがって、検体の免疫毒性は陰性であると判断される。

原体中の混在物及び代謝物の毒性

1. 急性毒性

(1) マウスにおける急性経口毒性試験/ 126Z()

毒性資料No. 代謝・混在-1

試験機関:

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験動物: Crj: CD-1(ICR)系マウス、6週齢、

体重: 雄 29.1-33.6g、雌 23.2-27.3g 1群雌雄各6匹

試験期間: 14日間観察

方法: 検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁して強制経口投与した。
投与約2時間前から投与後3時間までの5時間絶食させた。

試験項目: 中毒症状及び生死を14日間観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について、組織の肉眼的病理検査を行った。また、肉眼的異常部位は病理組織学的に検査した。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 0、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 >5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	投与後15分 (発現) 投与後1日 (消失)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄 5000

中毒症状として、雌雄に関係なく自発運動の低下、歩行異常、回転、うずくまり、横臥位及び立毛が認められた。

剖検では投与群に前胃の肥厚が雌雄それぞれ3/6例に認められ、病理組織学的には、雌雄それぞれ限局性過角化が2例に、粘膜下織に多核巨細胞からなる腺様組織が1例ずつ認められた。

(2) マウスにおける急性経口毒性試験/ 126オキシムE()

毒性資料No. 代謝・混在-2

試験機関:

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験動物: Crj: CD-1(ICR)系マウス、6週齢、

体重: 雄 28.6-33.2g、雌 23.3-26.8g 1群雌雄各6匹

試験期間: 14日間観察

方法: 検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁して強制経口投与した。
投与約2時間前から投与後3時間までの5時間絶食させた。

試験項目: 中毒症状及び生死を14日間観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について、組織の肉眼的病理検査を行った。また、肉眼的異常部位は病理組織学的に検査した。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 0、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 >5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	投与後30分 (発現) 投与後2時間 (消失)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄 5000

中毒症状として、雌雄に関係なく自発運動の低下、腹臥位及び歩行異常が認められた。

剖検では投与群で雌雄とも全例に肝の暗褐色、雌1例に前胃の肥厚が認められたが、病理組織学的には肝と前胃に異常は認められなかった。

(3) マウスにおける急性経口毒性試験/ 126ニトロンE()

毒性資料No. 代謝・混在-3

試験機関:

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験動物: Crj: CD-1 (ICR)系マウス、6週齢、1群雌雄各6匹

体重: 雄 27.3-34.9g、雌 22.3-26.8g

試験期間: 14日間観察

方法: 検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁して強制経口投与した。
投与約2時間前から投与後3時間までの5時間絶食させた。

試験項目: 中毒症状及び生死を14日間観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について、組織の肉眼的病理検査を行った。また、肉眼的異常部位は病理組織学的に検査した。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 0、930、1302、1822、 2551、3571、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 2868 (2273~3867) 雌 3502 (2504~7817)
死亡開始時間及び終了時間	投与後1時間 (開始) 投与後1日 (終了)
症状発現及び消失時間	投与後15分 (発現) 投与後2日 (消失)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 1302 雌 1822

中毒症状として、雌雄に関係なく自発運動の低下、歩行不能、呼吸粗大及び困難、腹臥位、横臥位、うずくまり、立毛、歩行異常、後肢麻痺、回転、脱力、チアノーゼ、呼吸数減少、摂餌量の減少が認められた。

剖検では、投与群の途中死亡例に肝、腎、脾及び肺のうっ血が認められた。投与群の生存例では、雌雄に前胃の肥厚が認められ、病理組織学的には、限局性の過角化あるいは粘膜下織に多核巨細胞からなる腺様組織が認められた。

(4) マウスにおける急性経口毒性試験/ 126ニトロンZ()

毒性資料No. 代謝・混在-4

試験機関:

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験動物: Crj: CD-1(ICR)系マウス、6週齢、1群雌雄各6匹

体重: 雄 29.4-34.9g、雌 23.4-27.6g

試験期間: 14日間観察

方法: 検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁して強制経口投与した。
投与約2時間前から投与後3時間までの5時間絶食させた。

試験項目: 中毒症状及び生死を14日間観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について、組織の肉眼的病理検査を行った。また、肉眼的異常部位は病理組織学的に検査した。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 0、492 (雌のみ)、614、768、960、1200、1500、1875 (雄のみ)
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1072 (918~1250) 雌 1034 (920~1171)
死亡開始時間及び終了時間	投与後1時間 (開始) 投与後1日 (終了)
症状発現及び消失時間	投与後5分 (発現) 投与後3H (消失)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄 768

中毒症状として、雌雄に関係なく自発運動の低下、運動失調、歩行異常あるいは不能、脱力、体温低下、呼吸数減少、不規則呼吸、呼吸粗大、呼吸音、チアノーゼ、後肢麻痺、立毛、うずくまり、腹臥位、横臥位等が認められた。

剖検では、投与群の途中死亡例に雌雄とも肝、腎、脾及び肺のうっ血及び小腸内にタール様内容物の貯留が認められた。投与群の生存例では、雌雄とも前胃の肥厚が認められ、病理組織学的には雌雄に限局性の過角化あるいは雌に粘膜下織に多核巨細胞からなる腺様組織が認められた。

(5) マウスにおける急性経口毒性試験

/ 126 α ヒドロキシメチルアミド()

毒性資料No. 代謝・混在-5

試験機関:

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験動物: Crj: CD-1(ICR)系マウス、6週齢、1群雌雄各6匹

体重: 雄 29.1-34.5g、雌 22.6-26.7g

試験期間: 14日間観察

方法: 検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁して強制経口投与した。

投与約2時間前から投与後3時間までの5時間絶食させた。

試験項目: 中毒症状及び生死を14日間観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について、組織の肉眼的病理検査を行った。また、肉眼的異常部位は病理組織学的に検査した。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 0、826、1115、1505、2032、 2743、3703、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 3919 (3234-5366)
死亡開始時間及び終了時間	投与後8時間半 (開始) 投与後5日 (終了)
症状発現及び消失時間	投与後11分 (発現) 投与後5日 (消失)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄 2032

中毒症状として、雌雄に関係なく自発運動の低下、運動失調、歩行異常あるいは不能、脱力、呼吸不整、回転、立毛、音等の刺激に対する反応消失、腹臥位、横臥位、背臥位等が認められた。

剖検では、投与群の途中死亡例に雌雄とも肝、腎及び肺のう

っ血が認められた。投与群の生存例では、雌雄とも前胃盲嚢の先端部粘膜に白斑を伴う限局性の軽度肥厚が認められた。

2. 変異原性

(1) 細菌を用いた復帰変異試験/ 126Z ()その1

毒性資料No. 代謝・混在-6

試験機関:

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及び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薬物代謝酵素系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。

2500 μ g/

プレートを最高用量とし、検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験濃度 78~2500 μ g/プレートの範囲で6用量とした。

試験は各用量2枚のプレートで実施し、2回行った。

試験結果: 結果を次頁の表に示した。

2回の試験において検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、菌の生育阻害を起こさない最高用量 (1250 μ g/プレート) においても、いずれの菌株も復帰変異コロニー数を増加させなかった。

2500 μ g/プレートの濃度において、大腸菌 WP2 *uvrA*を除くサルモネラ菌4株で、代謝活性の有無にかかわらず観察された生育阻害コロニーや微小コロニーは顕微鏡観察及びアミノ酸要求性の確認により復帰変異コロニーでないことを確認した。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、2-アミノアントラセン、9-アミノアクリジン塩酸塩、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンではすべ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、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

復帰変異試験成績

(表中の数値は2プレートの平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート									
			塩基対置換型						フレームシフト型			
			TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537	
			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
溶媒対照 (DMSO)	0		91	92	8	9	18	19	21	21	6	9
検 体	78	-	94	85	5	8	19	20	16	24	4	8
	156		87	89	6	7	17	13	26	22	5	8
	313		101	96	7	8	19	20	24	20	6	5
	625		100	72	10	7	20	25	26	13	8	4
	1250		76	88	7	9	15	22	14	17	5	4
	2500		177 [#]	176 [#]	747 [#]	658 [#]	10	24	171 [#]	164 [#]	2 [*]	2 [*]
溶媒対照 (DMSO)	0		106	104	11	12	19	20	25	25	8	10
検 体	78	+	97	99	8	12	22	24	30	22	8	11
	156		108	105	8	9	26	23	31	28	8	9
	313		98	95	11	8	26	28	24	27	7	9
	625		107	100	11	8	21	22	29	26	7	7
	1250		111	88	10	10	26	21	24	21	7	7
	2500		440 [#]	789 [#]	143 [#]	142 [#]	17	18	242 [#]	489 [#]	1 [*]	1 [*]
陽性 対照	AF-2	-	263	262								
								193	189			
	ENNG				137	95						
							552	492				
	9AA		80.0								570	660
	2AA		0.5	+	250	268				322	320	
2.0			93		114					145	133	
20.0						1157	1139					

(1) 1回目試験

(2) 2回目試験

* : 菌株の生育阻害を認める

: 菌株の微少コロニーの生育を認めたが復帰変異コロニーでないことを確認した。

空欄は該当なし

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

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2AA : 2-アミノアントラセン

(2) 細菌を用いた復帰変異試験/ 1267 () その2[#]

毒性資料No. 代謝・混在-7

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1998年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。

5000 μ g/プレートを最高用量とした。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

試験濃度は試験 I では大腸菌 WP2 *uvrA* に対し 200~5000 μ g/プレートで5用量、サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537) に対しては 100~5000 μ g/プレートとし6用量を設定した。

試験 II では大腸菌 WP2 *uvrA* に対し 313~5000 μ g/プレートで5用量、サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537) に対しては 156~5000 μ g/プレートの範囲で6用量とした。試験は各用量3枚のプレートで実施した。

試験結果: 結果を表1及び2に示した。

試験 I 及び II の2回の試験において、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株でも溶媒対照に比べて2倍以上の復帰変異コロニー数の増加を示さなかった。

なお、大腸菌 WP2 *uvrA* に対し全く生育阻害を認めなかったが、サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537) に対し代謝活性化系非存在下では 2500 μ g/プレート以上の用量で、代謝活性化系存在下では 2000 μ g/プレート以上の用量で生育阻害が認められた。

また、すべての菌株に対して代謝活性化系非存在下では 5000 μ g/プレートの用量でプレート上に検体の析出を認めた。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、2-アミノアントラセン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン塩酸塩ではすべて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、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

[#] 毒性資料No. 代謝・混在-6の最高用量において復帰変異コロニーではない微小コロニーが認められたため、再試験として本試験を実施した。

表一 1 復帰変異試験成績 (試験 I)

(表中の数値は3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩 基 対 置 換 型			フレームシフト型	
			WP2 <u>uvrA</u>	TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)			25 \pm 6	99 \pm 16	7 \pm 2	20 \pm 8	3 \pm 1
検 体	100	-		108 \pm 7	11 \pm 4	19 \pm 1	2 \pm 1
	200		18 \pm 3	93 \pm 12	10 \pm 4	20 \pm 6	2 \pm 1
	500		19 \pm 3	99 \pm 6	7 \pm 2	17 \pm 2	4 \pm 2
	1000		19 \pm 7	104 \pm 4	8 \pm 2	14 \pm 4	2 \pm 1
	2000		21 \pm 7	85 \pm 8	7 \pm 4	15 \pm 1	1 \pm 1
	5000		15 \pm 4**	* #	* #	* #	* #
溶媒対照 (DMSO)	0	+	20 \pm 5	112 \pm 14	12 \pm 1	19 \pm 3	4 \pm 3
検 体	100		82 \pm 7	6 \pm 3	22 \pm 3	3 \pm 2	
	200		24 \pm 8	94 \pm 3	13 \pm 4	19 \pm 4	6 \pm 3
	500		24 \pm 7	97 \pm 8	8 \pm 4	20 \pm 7	4 \pm 3
	1000		25 \pm 1	79 \pm 17	11 \pm 5	21 \pm 4	4 \pm 2
	2000		21 \pm 5	64 \pm 6*	8 \pm 2*	13 \pm 6*	5 \pm 1*
	5000	18 \pm 2*	*	*	*	*	
陽 性 対 照	AF-2	0.01	140 \pm 14	413 \pm 15			
		0.1				562 \pm 14	
	SA	0.5			407 \pm 39		
	9AA	80					617 \pm 31
	2AA	0.5				565 \pm 25	
		1		599 \pm 25			
		2			196 \pm 16		122 \pm 15
		10	486 \pm 16				

* : 菌株に生育阻害を認めた

: 検体の析出を認めた

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

SA : アジ化ナトリウム

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2AA : 2-アミノアントラセン

空欄は試験せず

表-2 復帰変異試験成績 (試験II)

(表中の数値は3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2 <u>uvrA</u>	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)			16 \pm 4	94 \pm 11	9 \pm 3	16 \pm 5	2 \pm 2	
検 体	156	—		81 \pm 6	8 \pm 1	18 \pm 3	2 \pm 1	
	313		19 \pm 3	104 \pm 28	8 \pm 4	17 \pm 5	2 \pm 2	
	625		20 \pm 4	99 \pm 10	12 \pm 3	19 \pm 3	2 \pm 1	
	1250		14 \pm 2	100 \pm 5	11 \pm 5	15 \pm 3	3 \pm 2	
	2500		14 \pm 4	*	*	*	*	
	5000		13 \pm 4 [#]	* [#]	* [#]	* [#]	* [#]	
溶媒対照 (DMSO)	0		20 \pm 2	95 \pm 10	6 \pm 1	27 \pm 3	7 \pm 1	
検 体	156	+		89 \pm 9	8 \pm 3	22 \pm 5	6 \pm 1	
	313		16 \pm 3	85 \pm 19	8 \pm 4	26 \pm 12	9 \pm 0	
	625		19 \pm 5	103 \pm 10	11 \pm 1	27 \pm 9	4 \pm 2	
	1250		20 \pm 3	7 \pm 12	6 \pm 3	26 \pm 6	4 \pm 2	
	2500		16 \pm 2	*	*	*	*	
	5000		18 \pm 2	*	*	*	*	
陽 性 対 照	AF-2	0.01	—	122 \pm 4	522 \pm 9			
		0.1				615 \pm 19		
	SA	0.5				556 \pm 51		
	9AA	80					731 \pm 88	
	2AA	0.5		+			579 \pm 30	
		1				599 \pm 3		
		2					200 \pm 14	90 \pm 21
		10			512 \pm 23			

* : 菌株に生育阻害を認めた

: 検体の析出を認めた

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

SA : アジ化ナトリウム

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2AA : 2-アミノアントラセン

空欄は試験せず

(3) 細菌を用いた復帰変異試験/ 126オキシムE () その1

毒性資料No. 代謝・混在-8

試験機関:

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及び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薬物代謝酵素系(S-9Mix)の存在下及び非存在下で、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、1250 μ g/プレートを最高用量とし、試験濃度を39~1250 μ g/プレートの範囲で6用量とした。

試験は各用量2枚のプレートで実施し、2回行った。

試験結果: 結果を次頁の表に示した。

2回の試験において検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、菌の生育阻害を起こさない最高用量(1250 μ g/プレート)においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、2-アミノアントラセン、9-アミノアクリジン塩酸塩、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンではすべ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、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

復帰変異試験成績

(表中の数値は2プレートの平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート									
			塩 基 対 置 換 型						フ レ ー ム シ フ ト 型			
			TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537	
			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
溶媒対照 (DMSO)	0		95	92	9	9	20	16	24	17	3	5
検 体	39	-	102	88	4	5	21	22	19	15	4	5
	78		95	95	6	8	26	12	15	21	4	4
	156		94	94	8	5	18	14	20	17	4	2
	313		100	74	10	8	24	17	19	18	4	2
	625		102	101	9	9	23	16	18	16	4	5
	1250		79	89	8	7	23	12	14	14	5	3
溶媒対照 (DMSO)	0		102	114	8	9	27	20	31	25	9	6
検 体	39	+	88	102	6	9	24	19	24	24	8	8
	78		104	108	7	7	30	20	24	26	6	6
	156		105	106	9	9	18	19	27	26	9	8
	313		105	101	7	7	26	27	32	17	7	9
	625		99	91	6	6	26	18	26	17	6	10
	1250		91	94	5	8	30	22	28	17	8	7
陽 性 対 照	AF-2	0.01	235	268								
		0.1						167	149			
	ENNG	0.5			133	149						
		2.0					504	628				
	9AA	80.0								640	614	
	2AA	0.5	233	279					385	348		
		2.0			103	120					113	132
		20.0					1153	1169				

(1) 1回目試験

(2) 2回目試験

空欄は該当なし

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

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2AA : 2-アミノアントラセン

(4) 細菌を用いた復帰変異試験/ 126オキシムE () その2[#]

毒性資料No. 代謝・混在-9

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1998年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及び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薬物代謝酵素系(S-9Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。

、5000 μ g/プレートを最高用量とした。

試験は2回行い、検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、試験濃度は試験Ⅰでは100~5000 μ g/プレート、試験Ⅱでは156~5000 μ g/プレートの範囲で各6用量とした。

試験は各用量3枚のプレートで実施した。

試験結果: 結果を表1、2に示した。

2回の試験において検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株でも溶媒対照に比べて2倍以上の復帰変異コロニー数の増加を示さなかった。

なお、2500 μ g/プレートの用量ではTA100、TA1535、TA1537 (代謝活性化系非存在下)、あるいはTA98、TA100、TA1535、TA1537 (代謝活性化系存在下)において生育阻害が認められ、最高用量5000 μ g/プレートの用量では代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての菌株に生育阻害が認められた。

また、2500 μ g/プレート以上の用量ではプレート上に検体の析出を認めた。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、2-アミノアントラセン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン塩酸塩ではすべて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、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

[#] 毒性資料No. 代謝・混在-8では

μ g/プレートとした。このため、最高用量5000 μ g/プレートとする本試験を実施した。

本試験では最高用量1250

表一 復帰変異試験成績 (試験 I)

(表中の数値は3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 <u>uvrA</u>	TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	-	13 \pm 3	92 \pm 8	8 \pm 2	16 \pm 2	4 \pm 1
検 体	100		17 \pm 6	83 \pm 7	6 \pm 3	15 \pm 3	4 \pm 3
	200		14 \pm 7	93 \pm 17	7 \pm 3	16 \pm 2	3 \pm 3
	500		20 \pm 9	90 \pm 10	9 \pm 2	17 \pm 4	4 \pm 3
	1000		18 \pm 3	110 \pm 13	10 \pm 6	21 \pm 3	5 \pm 2
	2000		14 \pm 4	86 \pm 11	10 \pm 4	16 \pm 3	6 \pm 1
5000	* #	* #	* #	* #	* #		
溶媒対照 (DMSO)	0	+	22 \pm 3	90 \pm 13	9 \pm 2	28 \pm 4	8 \pm 3
検 体	100		24 \pm 4	78 \pm 11	11 \pm 2	28 \pm 4	6 \pm 3
	200		19 \pm 4	89 \pm 14	8 \pm 4	23 \pm 2	7 \pm 2
	500		17 \pm 4	83 \pm 12	8 \pm 4	24 \pm 7	6 \pm 1
	1000		19 \pm 1	78 \pm 7	8 \pm 3	25 \pm 9	4 \pm 3
	2000		16 \pm 3	55 \pm 4	10 \pm 2	23 \pm 4	5 \pm 3
5000	* #	* #	* #	* #	* #		
陽 性 対 照	AF-2	0.01	120 \pm 7	476 \pm 11			
		0.1				632 \pm 46	
	SA	0.5			464 \pm 24		
	9AA	80					902 \pm 107
	2AA	0.5				516 \pm 40	
		1		627 \pm 60			
		2			168 \pm 12		90 \pm 4
		10	446 \pm 24				

* : 菌株の生育阻害を認めた

: 検体の析出を認めた

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

SA : アジ化ナトリウム

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2AA : 2-アミノアントラセン

空欄は試験せず

表一 2 復帰変異試験成績 (試験 II)

(表中の数値は3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 (μ g/プレート)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩 基 対 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型			
			WP2 <u>uvrA</u>	TA100	TA1535	TA98	TA1537		
溶媒対照 (DMSO)	0		22 \pm 4	107 \pm 7	8 \pm 2	19 \pm 3	4 \pm 2		
検 体	156	-	16 \pm 4	106 \pm 29	10 \pm 4	22 \pm 6	3 \pm 2		
	313		16 \pm 3	108 \pm 25	6 \pm 1	21 \pm 7	3 \pm 1		
	625		17 \pm 1	110 \pm 9	8 \pm 2	20 \pm 2	4 \pm 2		
	1250		15 \pm 6	110 \pm 20	11 \pm 2	18 \pm 3	3 \pm 2		
	2500		14 \pm 2 [#]	63 \pm 14 ^{* #}	* #	14 \pm 5	3 \pm 1		
	5000		* #	* #	* #	* #	* #		
溶媒対照 (DMSO)	0		18 \pm 4	116 \pm 17	10 \pm 4	23 \pm 4	7 \pm 4		
検 体	156	+	17 \pm 3	109 \pm 13	8 \pm 3	33 \pm 7	7 \pm 2		
	313		13 \pm 2	101 \pm 16	7 \pm 2	30 \pm 1	5 \pm 1		
	625		17 \pm 5	95 \pm 5	10 \pm 5	23 \pm 4	8 \pm 3		
	1250		17 \pm 3	91 \pm 10	6 \pm 4	23 \pm 7	5 \pm 4		
	2500		15 \pm 3	* #	* #	15 \pm 3 ^{* #}	* #		
	5000		* #	* #	* #	* #	* #		
陽 性 対 照	AF-2	0.01	-	149 \pm 3	489 \pm 28				
		0.1				620 \pm 6			
	SA	0.5				451 \pm 20			
	9AA	80						745 \pm 39	
	2AA	0.5		+				522 \pm 35	
		1				619 \pm 18			
		2					170 \pm 8		120 \pm 16
		10			466 \pm 13				

* : 菌株の生育阻害を認めた
 # : 検体の析出を認めた
 AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
 SA : アジ化ナトリウム
 9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩
 2AA : 2-アミノアントラセン
 空欄は試験せず

(5) 細菌を用いた復帰変異試験/ 126ニトロンE ()

毒性資料No. 代謝・混在-10

試験機関:

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及び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薬物代謝酵素系(S-9Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。

5000

μg /プレートを最高用量とし、検体をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、試験濃度を156~5000 μg /プレートの範囲で6用量とした。

試験は各用量2枚のプレートで実施し、2回行った。

試験結果: 結果を次頁の表に示した。

2回の試験において検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、菌の生育阻害を起こさない最高用量(5000 μg /プレート)でも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、2-アミノアントラセン、9-アミノアクリジン塩酸塩、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンではすべ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、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

復帰変異試験成績

(表中の数値は2プレートの平均値)

薬 剤	濃 度 (μ g/プレート)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート										
			塩基対置換型						フレームシフト型				
			TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	
溶媒対照 (DMSO)	0		99	99	10	10	22	22	22	28	5	6	
検 体	156	-	97	81	9	9	20	20	19	21	2	7	
	313		87	82	9	8	10	24	15	21	4	7	
	625		94	99	9	4	15	18	21	14	4	7	
	1250		85	93	5	9	21	21	25	26	7	7	
	2500		87	87	10	7	20	25	18	20	5	5	
	5000		91	87	5	8	23	26	18	21	4	5	
溶媒対照 (DMSO)	0		106	108	9	7	24	30	20	23	11	10	
検 体	156	+	112	103	9	8	25	27	24	29	6	10	
	313		111	102	8	9	25	28	24	33	7	10	
	625		116	111	9	10	22	26	27	32	7	5	
	1250		110	101	10	9	16	25	25	31	6	8	
	2500		120	115	10	9	25	30	31	33	8	9	
	5000		120	103	11	7	17	24	29	34	12	11	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	257	280								
		0.1					162	163					
	ENNG	0.5			145	137							
		2.0					711	505					
	9AA	80.0									614	885	
	2AA	0.5		+	260	268				325	357		
		2.0				108	105					154	133
		20.0						1130	1186				

(1) 1回目試験

(2) 2回目試験

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

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2AA : 2-アミノアントラセン

空欄は該当なし

(6) 細菌を用いた復帰変異試験/ 126ニトロンZ ()

毒性資料No. 代謝・混在-11

試験機関:

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及び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薬物代謝酵素系(S-9Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法で変異原性を検定した。

5000 μ g/プレートを最高用量とし、検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、試験濃度を156~5000 μ g/プレートの範囲で6用量とした。
試験は各用量2枚のプレートで実施し、2回行った。

試験結果: 結果を次頁の表に示した。

2回の試験において検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、菌の生育阻害を起こさない最高用量(2500 μ g/プレート)でも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

5000 μ g/プレートの濃度において全ての菌株で、代謝活性の有無にかかわらず観察された生育阻害コロニーや微小コロニーに関しては顕微鏡観察及びアミノ酸要求性の確認により復帰変異コロニーでないことを確認した。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、2-アミノアントラセン、9-アミノアクリジン塩酸塩、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンではすべ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、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

復帰変異試験成績

(表中の数値は2プレートの平均値)

薬 剤	濃 度 (μ g/プレート)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート									
			塩基対置換型						フレームシフト型			
			TA100		TA1535		WP2 <u>uvrA</u>		TA98		TA1537	
			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
溶媒対照 (DMSO)	0		87	90	9	6	21	22	21	17	7	6
検 体	156	-	92	87	9	7	27	15	19	20	6	3
	313		88	89	11	9	21	24	20	21	5	8
	625		84	97	10	4	21	18	18	19	4	4
	1250		83	101	8	7	22	18	17	20	6	5
	2500		79	92	6	6	24	13	22	23	8	7
	5000		6*	2*	3*	1*	11*	4*	54 [#]	150 [#]	107*	109*
溶媒対照 (DMSO)	0	+	128	98	13	6	26	22	31	35	14	16
検 体	156		108	103	9	7	27	26	33	31	14	8
	313		106	114	8	6	29	19	31	34	7	13
	625		104	103	14	6	29	27	31	30	11	7
	1250		115	118	11	7	20	24	24	36	10	9
	2500		106	97	5	7	24	22	29	36	7	8
	5000	435 [#]	2*	130 [#]	132 [#]	13*	7*	1564 [#]	1394 [#]	3*	2*	
陽性 対照	AF-2	0.01	208	311								
		0.1						130	142			
	ENNG	0.5			126	130						
		2.0					637	694				
	9AA	80.0								715	691	
	2AA	0.5	283	212					338	330		
		2.0			110	92					165	153
		20.0					1202	1140				

(1) 1回目試験

(2) 2回目試験

* : 菌株の生育阻害を認める

: 菌株の微小コロニーの生育を認める。

空欄は該当なし

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

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2AA : 2-アミノアントラセン

(7) 細菌を用いた復帰変異試験

/ 126 α ヒドロキシメチルアミド ()

毒性資料No. 代謝・混在-12

試験機関:

報告書作成年: 1996年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及び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薬物代謝酵素系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、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、5000 μ g/プレート を最高用量とし、試験濃度を156~5000 μ g/プレートの範囲で6用量とした。

試験は各用量2枚のプレートで実施し、2回行った。

試験結果: 結果を次頁の表に示した。

2回の試験において検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、菌の生育阻害を起こさない最高用量 (2500または5000 μ g/プレート) でも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、2-アミノアントラセン、9-アミノアクリジン塩酸塩、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンではすべ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、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

復帰変異試験成績

(表中の数値は2プレートの平均値)

薬 剤	濃 度 (μ g/プレート)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート											
			塩 基 対 置 換 型						フ レ ー ム シ フ ト 型					
			TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537			
			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)		
溶媒対照 (DMSO)	0		97	103	8	9	15	23	29	25	5	7		
検 体	156	-	97	92	8	7	21	21	34	21	5	6		
	313		97	103	7	6	22	24	28	24	4	7		
	625		103	85	8	6	17	24	22	17	7	6		
	1250		89	89	8	5	23	25	28	26	4	6		
	2500		94	87	6	5	12	26	25	19	6	5		
	5000		72*	58*	2*	2*	19	17	13*	11*	2*	1*		
溶媒対照 (DMSO)	0		103	105	9	7	19	30	32	36	15	13		
検 体	156	+	94	86	8	8	23	25	41	37	10	13		
	313		101	104	5	8	25	34	38	33	18	14		
	625		99	87	14	6	24	33	34	31	12	14		
	1250		98	106	11	8	27	27	35	37	10	10		
	2500		82	74	11	8	21	30	38	34	14	9		
	5000		78*	58*	2*	2*	19	23	38	28	6*	2*		
陽 性 対 照	AF-2	-	0.01	314	260									
			0.1						135	180				
			0.5			194	209							
	ENNG		2.0					489	384					
			80.0									488	259	
	2AA		+	0.5	260	315				180	449			
				2.0			209	97					259	185
				20.0					384	1145				

(1) 1回目試験

(2) 2回目試験

* : 菌株の生育阻害を認める

空欄は該当なし

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

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

2AA : 2-アミノアントラセン