

(13) 変異原性

1) 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 No.T-37、(TR-04))

試験機関：

報告書作成年：1978年

報告書番号：なし

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株)およびトリプトファン要求性の *Escherichia coli* (WP2_{her} 株)を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9Mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法 (申請者注：プレート法) を用いて変異原性を検定した。検体は蒸留水に溶解し、0.5~500 μ g/ プレートの範囲の7濃度で実施した。試験は2連制とした。なお、陽性対照として2-アミノアントラセン (2-AA)、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (AF-2)、 β -プロピオラクトン (β -PL)、9-アミノアクリジン (9-AA) および2-ニトロフルオレン (2-NF) を用いた。

〈判定基準〉検体処理群において、陰性対照群の2倍以上の復帰変異コロニー数を示し、かつ、復帰変異コロニー数の増加に用量相関性が認められる場合を陽性と判定した。

試験結果：結果を次頁の表に示した。

パラコートは、S9Mixの有無にかかわらず、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-AAはS9Mixの存在下で、また、AF-2、 β -PL、9-AA および2-NFは、S9Mixの非存在下で復帰変異コロニー数を有意に増加させた。

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

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2 hcr	TA100	TA1535	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (蒸留水)		-	34.0	134.5	6.5	23.0	4.0	9.5
検体	0.5	-	23.0	126.5	9.5	16.0	7.0	7.5
	1	-	16.0	124.0	8.0	25.5	3.0	13.0
	5	-	5.5	129.5	2.0	22.5	0.0	10.0
	10	-	*	133.5	*	21.0	0.5	4.5
	50	-	*	*	*	9.0	*	1.0
	100	-	*	*	*	*	*	*
	500	-	*	*	*	*	*	*
陽性 対照	AF-2	0.25	-	2722.0				
		0.1	-			405.0		
		0.05	-		1199.0			
	β -PL	50	-			1172.0		
	9-AA	200	-				>10000	
	2NF	50	-					>3000
	2AA	10	-		150.5	4.5	28.5	10.5
2AA	10	+		>3000	234.0	>3000	362.0	>3000
溶媒対照 (蒸留水)		+	26.5	139.0	11.0	22.5	7.5	14.5
検体	0.5	+	26.0	134.5	7.5	22.0	7.0	11.5
	1	+	23.5	118.0	7.0	20.5	6.5	12.0
	5	+	28.5	130.5	8.5	21.5	2.5	6.5
	10	+	22.0	137.0	7.5	17.5	1.5	13.0
	50	+	0.5	7.5	1.0	13.5	1.0	11.5
	100	+	0.0	0.0	*	*	0.0	0.0
	500	+	*	*	*	*	*	*

表中の数値は2連の平均値 (申請者が算出)

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

β -PL : β -プロピオラクトン

9AA : 9-アミノアクリジン

2NF : 2-ニトロフルオレン

2AA : 2-アミノアントラセン

* : 細菌の増殖阻害がみられたもの

2) 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 No.T-38)

試験機関：

報告書作成年：1977年

報告書番号：CTL/P/243

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1538 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9) の存在下および非存在下で、Ames らの方法 (申請者注：プレート法) を用いて変異原性を検定した。
 検体は水に、また陽性対照薬剤はジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解した。用量は 0.16~5000 µg/プレートの 8 用量とした。試験は 2 または 3 連制で行った。試験の概要を表 1 に示す。

〈判定基準〉 復帰変異コロニー数/プレートが溶媒対照の 2 倍以上である場合に陽性とした。

表 1. 試験の概要

試験番号	実施日	供試菌株	連数	S9の有無	結果 (表)
1	1975年5月2日	TA1535、TA1538	3	-/+	表 2
2	1975年8月27日	TA1535、TA1538	2	+	
3	1975年10月8日	TA1535、TA1538	3	+	
4	1975年10月29日	TA1535、TA1538	3	+	
5	1975年10月30日	TA1535、TA1538	3	+	
6	1975年10月31日	TA1535、TA1538	3	+	
7	1975年11月21日	TA1535、TA1538	3	+	
8	1976年5月	TA1535、TA1538、 TA98、TA100	2	+	表 3
9	1976年4月28日	TA1535、TA1538、 TA98、TA100	2	+a)/-	表 4
10	1976年4月29日	TA1535、TA1538、 TA98、TA100	2	+a)/-	
11	1976年4月30日	TA1535、TA1538、 TA98、TA100	2	+a)/-	

a)S9+コファクター及び S9+KCl

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。

試験結果： 結果を次頁以降の表に示した。

検体は、S9の有無にかかわらず、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 Nitrogen Mustards (HN₂)、N-2acetylaminofluorine (AAF)、2-(1-chloro-2-isopropylaminoethyl)naphthalene (CPE)、および 2 nitrofluorene (2NF) では、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、本剤は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

表 2. 試験番号 1~7 の平均値±SE^{a)}

薬物		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 の有 無	復帰変異コロニー数/プレート (平均値)		
				塩基対置換型 TA1535	フレームシフト型 TA1538	
溶媒対照	水		+	20±6	22±5	
検体		100	+	+	26±6	
		500	+	+	21±5	
		2500	+	15±7	19±6	
陽性対照 ^{c)}		DMSO	+	17±6	22±3	
		CPE ^{b)}	100	+	44	
			500	+	80±15	
			2500	+	135±26	
		AAF	500	+		113±28
			2500	+		127±24

CPE : 2-(1-chloro-2-isopropylaminoethyl)naphthalene

AAF : N-2 acetylaminofluorine

a)試験番号 1 における S9 - の結果を除く

b)試験番号 1 では、陽性対照として nitrogen mustards (HN₂) を用いたため、平均値には含まれない。

c)表 2a~2g において、陽性対照として CPE 及び AAF 用いた試験の平均値

表 2a. 試験番号 1 の平均値 (3 連制)

薬物		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 の有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均値)		
				塩基対置換型 TA1535	フレームシフト型 TA1538	
溶媒対照	水		-	16.0	7.7	
検体		100	-	13.3	6.3	
		500	-	5.7	5.7	
		2500	-	0.3	35.0	
溶媒対照	水		+	14.7	9.0	
検体		100	+	17.3	15.0	
		500	+	5.0	14.0	
		2500	+	2.3	19.7	
陽性対照		DMSO	-	18.7		
		HN ₂	100	-	165.0	
			500	-	382.0	
		DMSO		-		9.0
		AAF	100	-		179.0
			500	-		161.7
			2500	-		
		DMSO		+	11.7	
		HN ₂	100	+	175.3	
			500	+	377.0	
		DMSO		+		16.7
		AAF	100	+		123.0
500	+			243.7		
2500	+					

HN₂ : Nitrogen Mustards

AAF : N-2 acetylaminofluorine

表 2b. 試験番号 2 の平均値 (2 連制)

薬物		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 の有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均値)	
				塩基対置換型	フレームシフト型
				TA1535	TA1538
溶媒対照	水		+	13.5	14.5
検体		100	+	2.5	6.0
		500	+	0.5	0.0
		2500	+	0.5	1.0

陽性対照：実施せず

表 2c. 試験番号 3 の平均値 (3 連制)

薬物		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 の有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均値)	
				塩基対置換型	フレームシフト型
				TA1535	TA1538
溶媒対照	水		+	5.7	25.7
検体		100	+	2.7	25.7
		500	+	4.3	30.0
		2500	+	6.3	8.3
陽性対照	DMSO		+	3.7	
	CPE	100	+	43.7	
		500	+	118.7	

CPE : 2-(1-chloro-2-isopropylaminoethyl)naphthalene

表 2d. 試験番号 4 の平均値 (3 連制)

薬物		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 の有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均値)	
				塩基対置換型	フレームシフト型
				TA1535	TA1538
溶媒対照	水		+	16.3	10.0
検体		100	+	13.0	32.0
		500	+	12.3	15.7
		2500	+	9.7	17.3
陽性対照	DMSO		+	7.3	18.0
	CPE	500	+	81.7	
	DMSO		+		18 ^{a)}
	AAF	500	+		56.7
		2500	+		192.7

CPE : 2-(1-chloro-2-isopropylaminoethyl)naphthalene

AAF : N-2 acetylamino fluorine

a) 1 連の値

表 2e. 試験番号 5 の平均値 (3 連制)

薬物		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 の有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均値)	
				塩基対置換型	フレームシフト型
				TA1535	TA1538
溶媒対照	水		+	11.5	12.0
検体		100	+	7.0	16.0
		500	+	9.7	14.0
		2500	+	8.7	7.7
陽性対照	DMSO		+		10.0 ^{a)}
	AAF	100	+		76.7
		500	+		95.3

AAF : N-2 acetylaminofluorine

a)2 連の平均値

表 2f. 試験番号 6 の平均値 (3 連制)

薬物		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 の有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均値)	
				塩基対置換型	フレームシフト型
				TA1535	TA1538
溶媒対照	水		+	36.7	41.3
検体		100	+	31.7	35.0
		500	+	26.3	33.0
		2500	+	25.0	35.3
陽性対照	DMSO		+	30.0	
	CPE	500	+	45.0	
		2500	+	109.3	
	DMSO		+		27.0
	AAF	500	+		144.0
		2500	+		98.7

CPE : 2-(1-chloro-2-isopropylaminoethyl)naphthalene

AAF : N-2 acetylaminofluorine

表 2g. 試験番号 7 の平均値 (3 連制)

薬物		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均値)	
				塩基対置換型	フレームシフト型
				TA1535	TA1538
溶媒対照	水		+	46.7	35.7
検体		100	+	45.7	51.3
		500	+	42.0	38.0
		2500	+	48.7	44.7
陽性対照	DMSO		+	42.0	
	CPE	500	+	75.0	
		2500	+	162.0	
	DMSO		+		33.3
	AAF	500	+		177.7
		2500	+		133.3

CPE : 2-(1-chloro-2-isopropylaminoethyl)naphthalene

AAF : N-2 acetylaminofluorine

表 3. 試験 8 の平均値 (2 連制)

薬物		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 の有無	復帰変異コロニー数/プレート (平均値)				
				塩基対置換型		フレームシフト型		
				TA1535	TA100	TA1538	TA98	
溶媒対照 ^{a)}	水		+	40.0	137.0	44.7	70.0	
検体		4	+	17.5	123.0	52.5	79.5	
		20	+	36.5	78.5	53.5	52.5	
		100	+	40.5	39.0	11.5	12.0	
		500	+	1.0	0.0	0.0	1.0	
		5000	+	0.0	0.0	0.0	0.0	
陽性対照		DMSO ^{a)}	+	36.0	110.3			
		CPE	100	+	118.0	550.5		
			500	+	470.5	471.0		
		DMSO ^{a)}	+			39.0	60.0	
		2NF	100	+			115.0	294.0
			500	+			214.5	526.5

CPE : 2-(1-chloro-2-isopropylaminoethyl)naphthalene

2NF : 2 nitrofluorene

a)3 連の平均値

表 4. 試験番号 9~11 (各試験 2 連制) の平均値 \pm SE^{a)}

[TA1535 (塩基対置換型)]

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 (平均値)			
			S9+ コファクター	S9+KCl ^{a)}	S9Mix なし	
溶媒対照	水		17.66 \pm 3.63	20 ^{b)}	22.6 \pm 3.84	
検体		0.16	13.00 \pm 3.05	16.50 \pm 11.02 ^{a)}	12.00 \pm 9.54	
		0.8	14.33 \pm 1.47	22.5 \pm 6.50 ^{a)}	16.66 \pm 4.26	
		4	14.00 \pm 2.00	16.00 \pm 2.00 ^{a)}	19.00 \pm 5.03	
		20	13.66 \pm 4.48	11.00 \pm 1.10 ^{a)}	15.66 \pm 6.69	
		100	12.33 \pm 2.40	0.50 \pm 0.50 ^{a)}	15.33 \pm 11.15	
		500	5.33 \pm 1.63	0.50 \pm 0.50 ^{a)}	9.33 \pm 6.18	
		2500	7.66 \pm 4.63	56.00 \pm 6.01 ^{a)}	18.33 \pm 5.69	
陽性対照		DMSO	22.00 \pm 5.50	17 ^{b)}	22.00 \pm 5.50	
		CPE	100	118.50 \pm 12.53 ^{a)}		
			500	187.00 \pm 87.0 ^{a)}		
			2500	140 ^{b)}		

CPE : 2-(1-chloro-2-isopropylaminoethyl)naphthalene

a)2 試験の平均値

b)1 試験の値

[TA1538 (フレームシフト型)]

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 (平均値)		
			S9+ コファクター	S9+KCl ^{a)}	S9Mix なし
溶媒対照	水		20 ^{a) b)}	14 ^{c)}	17.50 \pm 6.56 ^{b)}
検体		0.16	16.66 \pm 6.36	28.00 \pm 20.05 ^{b)}	12.66 \pm 2.94
		0.8	22.33 \pm 8.17	19 ^{c)}	26.00 \pm 13.54
		4	18.00 \pm 5.80	40 ^{c)}	9.66 \pm 1.46
		20	24.30 \pm 9.91	21 ^{c)}	7.00 \pm 3.46
		100	45.3 \pm 28.0	1.50 \pm 1.50 ^{b)}	16.33 \pm 7.84
		500	11.60 \pm 4.30	0.50 \pm 0.50 ^{b)}	36.33 \pm 16.57
陽性対照	2NF	2500	6.00 \pm 2.00	56.00 \pm 6.01 ^{b)}	7.00 \pm 4.0
		DMSO		12 ^{c)}	18.50 \pm 10.52 ^{b)}
		100	194.00 \pm 51.10 ^{b)}		
		500	335.50 \pm 33.54 ^{b)}		
		2500	332 ^{c)}		

2NF : 2 nitrofluorene

a)申請者が算出

b)2 試験の平均値

c)1 試験の値

[TA98 (フレームシフト型)]

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 (平均値)		
			S9+ コファクター	S9+KCl	S9Mix なし
溶媒対照	水		59.00 \pm 50.14 ^{a)}	49 ^{b)}	15.5 \pm 3.50 ^{a)}
検体		0.16	49.00 \pm 24.09	22 ^{b)}	9.33 \pm 4.05
		0.8	34.00 \pm 19.60	32 ^{b)}	14.5 \pm 8.52 ^{a)}
		4	41.66 \pm 23.94	52.5 \pm 8.52 ^{a)}	17.5 \pm 11.53 ^{a)}
		20	32.00 \pm 13.02	46.00 \pm 18.01 ^{a)}	19.00 \pm 12.03 ^{a)}
		100	23.00 \pm 4.04	10.00 \pm 8.09 ^{a)}	10.00 \pm 8.09
		500	20.66 \pm 9.82	15.00 \pm 14.96 ^{a)}	8.33 \pm 5.61
		2500	3.33 \pm 2.40	10.5 \pm 8.52 ^{a)}	7.6 \pm 1.76
陽性対照	2NF	DMSO	42.50 \pm 28.50 ^{a)}		19 ^{b)}
		100	385.66 \pm 175.17		
		500	297.33 \pm 173.84		
		2500	671.50 \pm 72.05 ^{a)}		

2NF : 2 nitrofluorene

a)2 試験の平均値

b)1 試験の値

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。

[TA100 (塩基対置換型)]

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 (平均値)		
			S9+ コファクター	S9+KCl	S9Mix なし
溶媒対照	水		19.66 \pm 3.93	16.50 \pm 1.50 ^{a)}	23.00 \pm 6.50
検体		0.16	20.33 \pm 3.38	13.50 \pm 11.53 ^{a)}	18.66 \pm 6.69
		0.8	20.66 \pm 4.67	16.5 \pm 0.50 ^{a)}	19.33 \pm 4.67
		4	15.00 \pm 1.00	20.5 \pm 3.60 ^{a)}	22.00 \pm 6.56
		20	17.00 \pm 6.36	17.00 \pm 6.01 ^{a)}	20.00 \pm 7.51
		100	9.66 \pm 4.84	15.00 \pm 1.00 ^{a)}	22.00 \pm 7.64
		500	10.33 \pm 6.36	17.00 \pm 4.00 ^{a)}	21.66 \pm 10.11
	2500	30.00 \pm 27.00	6.00 \pm 5.00 ^{a)}	11.66 ^{c)}	
陽性対照	DMSO		23.00 \pm 7.64	18 ^{b)}	29.00 \pm 0 ^{a)}
	CPE	100	222.33 \pm 52.63		
		500	44 ^{b)c)}		
		2500	32 ^{a)}		

CPE : 2-(1-chloro-2-isopropylaminoethyl)naphthalene

a)2 試験の平均値

b)1 試験の値

c)SE 記載なし

3) マウスの L5178Y リンパ腫細胞を用いた *in vitro* 突然変異試験

(資料 No.T-39)

試験機関：

報告書作成年： 1985 年[GLP 対応]

報告書番号：CTL/P/1374

検体純度：

試験方法： チミジンキナーゼ遺伝子座がヘテロ (TK+/-) の L5178Y マウスリンパ腫細胞を用いて、ラットの肝臓より調製した代謝活性化系 (S9Mix) の存在下 (+) および非存在下 (-) で、*in vitro* における変異原性の有無を検定した。突然変異は、トリフルオロチミジン添加培養液中で増殖できる TK-/- 遺伝子型の出現を指標として判定した。

検体は、ジメチルスルホキシド (DMSO) (試験 1) あるいは生理食塩水 (試験 2~6) に溶解した。試験は S9Mix の存在下 (+) および非存在下 (-) で 6 回実施し (検体濃度は 7.87~1004 μ g/mL)、発現時間は 48 および 72 時間とした。なお、陽性対照として、エチルメタンサルホン酸塩 (EMS ; S9Mix 非存在下)、ベンツ(α) ピレン (BaP ; S9Mix 存在下) およびジメチルニトロソアミン (DMN ; S9Mix 存在下) を DMSO で溶解し用いた。

〈陽性判定基準〉 以下に示す 5 点を満たしていた場合に陽性と判断した。また、以下の 1~3 を満たし、尚且つ、溶媒対照群と比較して最高用量 (生存率が 20%を上回る群) で再現性のある有意な突然変異発生頻度の増加がみられた場合にも陽性と判断した。

1. 溶媒対照群における TFT 添加下の自然発生性突然変異発生頻度が正常の範囲内であること。
2. 陽性対照群では突然変異発生頻度の増加がみられていること。
3. 溶媒対照群のコロニー形成率 (生存率観察用のプレートより算出) が 50%を上回ること。
4. いずれかの濃度範囲で用量に依存した有意な突然変異発生頻度の増加がみられること。
5. 突然変異コロニーの形成がみられないウェル数が用量に依存して減少していること。
すなわち、突然変異コロニーの絶対数が溶媒対照より増加している。

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。

結果：結果を次頁以降の表に示す。

検体は、用量相関性のある細胞毒性を示した。S9Mix の存在下では、非存在下と比較して、細胞毒性が強く現われた。

細胞生存率（コロニー形成率）が 29%を上回る濃度では、突然変異頻度の上昇は認められなかった。しかしながら、29%以下の低い細胞生存率を示した濃度では、突然変異頻度の上昇が散見された。一方、ジメチルニトロソアミン（DMN）などの陽性対照物質では、細胞生存率の高低にかかわらず、再現性があり、用量相関性のある突然変異頻度の上昇が認められた。検体処理により認められた突然変異頻度の増加は、顕著な細胞毒性がみられた濃度のみであったことから、偶発的であると考えられた。

以上の結果より、本剤は代謝活性化を含む本試験条件下でマウスリンパ腫細胞における突然変異誘発性は有しないものと判断される。

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

試験 1

発現時間 (時間)			48	
薬物	濃度 (µg/mL)	S9Mixの有無	細胞生存率 (%)	突然変異頻度(×10 ⁻⁴)
溶媒対照 ¹⁾	/	-	100	2.7
検体	62.8	-	37	2.5
	126		18	4.5
	251		4	6.4
	502		2	/
	1004		0	/
EMS ²⁾	1000	-	9	20.5
溶媒対照 ¹⁾	/	+	100	4.3
検体	62.8		55	4.2
	126		8	3.1
	251		0	3.8
	502		0	/
	1004		0	/
BaP ³⁾	6	-	0	15.4

1) DMSO

2)EMS : エチルメタンサルホン酸塩

3) BaP : ベンツ(α) ピレン

試験 2

発現時間 (時間)			72	
薬物	濃度 (µg/mL)	S9Mixの有無	細胞生存率 (%)	突然変異頻度(×10 ⁻⁴)
溶媒対照 ¹⁾	/	-	100	5.7
検体	31.5	-	33	6.2
	62.9		19	7.3
	126		5	16.2
	252		0	/
EMS ²⁾	1000	-	11	46.7
溶媒対照 ¹⁾	/	+	100	4.7
検体	31.5		27	7.4
	62.9		7	7.7
	126		0	21.0
	252		0	/
BaP ³⁾	6	-	15	22.4

1) 生理食塩水 2) EMS エチルメタンサルホン酸塩

3) BaP ベンツ(α) ピレン

4)コロニー形成率が低く試験として成立していないが、参考として示す。

試験 3

発現時間 (時間)			48	
薬物	濃度 (µg/mL)	S9Mixの有無	細胞生存率 (%)	突然変異頻度(×10 ⁻⁴)
溶媒対照 ¹⁾	/		100	1.7
検体	15.7	-	115	0.8
	31.5		74	0.6
	62.9		89	1.1
	126		53	1.6
EMS ²⁾	1000		33	23.3
溶媒対照 ¹⁾	/		100	1.6
検体	7.87	+	106	1.6
	15.7		89	2.2
	31.5		97	1.1
	62.9		92	2.1
BaP ³⁾	6		35	2.9

1) 生理食塩水

2) EMS : エチルメタンサルホン酸塩

3) BaP : ベンツ(α)ピレン

試験 4

発現時間 (時間)			48	
薬物	濃度 (µg/mL)	S9Mixの有無	細胞生存率 (%)	突然変異頻度(×10 ⁻⁴)
溶媒対照 ¹⁾	/		100	1.6
検体	62.5	-	26	0.9
	125		38	2.1
	250		11	7.3
	500		1	/
EMS ²⁾	1000		3	24.3
溶媒対照 ¹⁾	/		100	1.7
検体	31.3	+	78	1.6
	62.5		59	2.2
	125		14	2.3
	250		6	11.0
BaP ³⁾	6		0	11.2

1) 生理食塩水

2) EMS : エチルメタンサルホン酸塩

3) BaP : ベンツ(α)ピレン

試験 5

試験			5	
発現時間 (時間)			72	
薬物	濃度 (µg/mL)	S9Mixの有無	細胞生存率 (%)	突然変異頻度(×10 ⁻⁴)
溶媒対照 ¹⁾			100	2.5
検体	23.3	-	82	1.1
	46.5		84	2.1
	93.0		53	1.2
	186		13	3.9
	372		0	
EMS ²⁾	1000		43	12.1
溶媒対照 ¹⁾			100	2.1
検体	11.6	+	100	1.9
	23.3		89	1.0
	46.5		89	1.8
	93.0		58	2.2
	186		9	2.3
BaP ³⁾	6		4	6.8

1) 生理食塩水

2) EMS : エチルメタンスルホン酸塩

3) BaP : ベンツ(α)ピレン

試験 6

試験			6 ⁵⁾	
発現時間 (時間)			72	
薬物	濃度 (µg/mL)	S9Mixの有無	細胞生存率 (%)	突然変異頻度(×10 ⁻⁴)
溶媒対照 ¹⁾			100	1.3
検体	20.9	-	100	2.1
	41.9		82	3.2
	83.7		61	1.7
	167		11	5.4
	335		0	
EMS ²⁾	750		73	12.4
	1000		47	19.8
溶媒対照 ¹⁾			100	2.5
検体	10.5	+	130	2.2
	20.9		71	2.9
	41.9		80	2.3
	83.7		29	7.6
	167		2	-
BaP ³⁾	4		97	5.7
	5		34	
	6		8	8.4
DMN ⁴⁾	0.6 µL/mL		43	22.7
	0.9 µL/mL		37	42.8
	1.2 µL/mL		23	36.4

1) 生理食塩水 2) EMS : エチルメタンスルホン酸塩

3) BaP : ベンツ(α)ピレン 4) DMN : ジメチルニトロソアミン

5) コロニー形成率が低く試験として成立していないが、参考として示す。

4) マウスの L5178Y リンパ腫細胞を用いた *in vitro* 突然変異試験 (資料 No.T-40)

試験機関：

報告書作成年： 1985 年[GLP 対応]

報告書番号： CTL/P/1398

検体純度：

試験方法： チミジンキナーゼ遺伝子座がヘテロ(TK+/-)の L5178Y マウスリンパ腫細胞を用いて、ラットの肝臓より調製した代謝活性化系(S9Mix)の存在下(+) および非存在下(-)に、*in vitro* で突然変異の有無を検定した。

観察は、48 時間培養した細胞についてトリフルオロチミジン添加培養液中で増殖できる TK-/-遺伝子型の出現を指標として判定した。

検体は生理食塩水に、陽性対照物質はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。

検体の濃度は、31.25~1000 µg/mL の 6 用量とした。

〈陽性判定基準〉以下に示す 5 点を満たしていた場合に陽性と判断した。また、以下の 1~3 を満たし、尚且つ、溶媒対照群と比較して最高用量（生存率が 20%を上回る群）で再現性のある有意な突然変異発生頻度の増加がみられた場合にも陽性と判断した。

1. 溶媒対照群における TFT 添加下の自然発生的突然変異発生頻度が正常の範囲内であること。
2. 陽性対照群では突然変異発生頻度の増加がみられていること。
3. 溶媒対照群のコロニー形成率（生存率観察用のプレートより算出）が 50%を上回ること。
4. いずれかの濃度範囲で用量に依存した有意な突然変異発生頻度の増加がみられること。
5. 突然変異コロニーの形成がみられないウェル数が用量に依存して減少していること。
すなわち、突然変異コロニーの絶対数が溶媒対照より増加している。

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。

結果：結果を次頁の表に示す。

検体は、用量相関性のある細胞毒性を示した S9Mix の存在下では、非存在下と比較して、細胞毒性が強く現われた。

S9Mix 非存在下では、溶媒対照より高い突然変異発生頻度が試験 2 の 250 μ g/mL (細胞生存率 12%) で観察されたが、それ以外に突然変異発生頻度の上昇は認められなかった。

S9Mix 存在下では、試験 1 の検体投与群に用量相関性のある突然変異頻度の軽度の上昇が認められた。試験 2 の 250 μ g/mL 処理群に、また試験 5 の 500 μ g/mL および 125 μ g/mL 処理群に S9Mix 存在下でそれぞれ突然変異頻度の上昇が認められた。しかしながら、観察された陽性反応の強さおよび型に再現性および一貫性がなく、試験 3 および 4 では同様の変化がみられなかったことから、これらの陽性反応は検体に誘発されたものではないと考えられた。

一方、陽性対照として用いたエチルメタンサルホン酸 (EMS) およびベンツ (α) ピレン (BaP) は、それぞれ S9Mix 存在下および非存在下で、常に突然変異細胞の数を増加させた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において、マウスリンパ腫細胞に対する突然変異誘発性は有しないものと判断される。

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

試験			1		2		3		4		5		
発現時間 (時間)			48		48		48		48		48		
薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9Mix の有無	細胞生存率 (%)	突然変異 頻度($\times 10^{-4}$)	細胞生存率 (%)	突然変異 頻度($\times 10^{-4}$)	細胞生存率 (%)	突然変異 頻度($\times 10^{-4}$)	細胞生存率 (%)	突然変異 頻度($\times 10^{-4}$)	細胞生存率 (%)	突然変異 頻度($\times 10^{-4}$)	
溶媒対照 ¹⁾		-	100	32.3	100	7.5	100	2.2	100	1.3	100	1.3	
検体	31.25		122	5.0			65	1.0	52	1.3	84	1.2	
	62.5		65	8.4	60	5.8	49	1.3	80	1.9	77	0.8	
	125		92	5.6	35	6.8	43	1.8	63	2.4	56	0.9	
	250		25	10.2	12	18.6	6	3.9	58	1.5	26	2.0	
	500		21	18.5	0		0		63	2.2	3	2.3	
	1000				0								
EMS	1000		15	83.1	35	33.4	8	22.8	38	9.5	16	9.1	
溶媒対照 ¹⁾			+	100	7.4	100	4.6	100	1.9	100	1.1	100	0.6
検体	31.25			62	5.3			134	2.1	61	1.2	82	1.2
	62.5	58		9.6	44	9.9	83	1.7	59	1.7	57	0.8	
	125	52		11.9	24	14.5	60	1.6	72	0.8	30	1.5	
	250	18		15.8	3	45.1	7	2.6	65	1.1	15	1.2	
	500	2			0		2		26	1.6	5	2.1	
	1000				0								
BaP ³⁾	6	9		20.1	0	14.2	2	7.4	61	2.6	5	5.6	

1) : 生理食塩水

EMS : エチルメタンスルホン酸塩

BaP : ベンツ (α) ピレン

5) ヒトのリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 No.T-41)

試験機関：

報告書作成年：1985年[GLP 対応]

報告書番号：CTL/P/1351

検体純度：

試験方法：健康な男女各1名（供血者 A および B）より採血して得られたリンパ球を用い、代謝活性化系（S9Mix）の存在下及び非存在下における染色体異常誘発性を検定した。試験は0.75～3500 μ g/mLの10用量で実施し、そのうち2500、1250 および250 μ g/mLの3用量を選択し観察した（ただし、供血者 A の代謝活性化系存在下では3500、1750 および350 μ g/mL 処理群について観察した。）。検体処理群および陰性対照群は2連、陽性対照群は1連で培養した。

検体は、生理食塩水で溶解し、溶媒対照群には生理食塩水を処理した。

観察は各培養当たり100個（陽性対照群は25個）の分裂中期像について行った。

試験結果：結果を次頁の表に示した。

試験した最高用量の検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、両供血者の培養血液とも、染色体異常の発生率が陰性対照群の値と比較して統計学的に有意に増加した。供血者（A）の血液では、S9 Mix 存在下で、1750 μ g/mL 処理群でも統計学的に有意な増加が認められた。低用量の検体を処理した培養血液では、陰性対照群と比較して軽度の増加が認められたが、統計学的に有意な増加ではなかった。

一方、陽性対照群として用いたマイトマイシン C およびシクロホスファミドでは、染色体異常を示す分裂中期細胞数が、陰性対照群と比較して、統計学的に有意な増加を示した。

以上の結果より、検体は *in vitro* において顕著な細胞毒性を発現する高用量で、ヒトリンパ球に染色体異常を誘発した。しかしながら、細胞毒性が発現しない用量では染色体異常誘発性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。

供血者	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 Mix の有無	観察 細胞数 ^{a)}	異常を有する細胞の数 ^{a)}						異常を 有する 細胞の割合 (%)	有糸分裂 指数 (平均)
					ギャップ	切断	断片 / 微小	複合	交換	その他	ギャップ 以外の異常	
A	溶媒対照		-	200	3	1	1	0	0	0	1.0	9.5
	検体	2500		184	28	19	15	0	0	0	15.2 **	3.0
		1250		200	6	7	2	0	0	0	3.5	3.0
		125		200	1	1	2	0	0	0	1.0	5.0
	陽性対照	0.5		25	2	2	5	0	4	0	40.0 **	6.0
	溶媒対照		+	226	3	0	1	0	0	0	0.4	12.5
	検体	3500		200	32	21	22	4	0	0	22.0 **	4.0
		1750		200	8	5	5	0	0	0	5.0 **	4.0
		350		200	6	2	3	0	0	0	2.0	5.0
	陽性対照	100		20	3	7	2	0	1	3	40.0 **	5.0
B	溶媒対照		-	200	3	1	2	0	0	0	1.0	11.0
	検体	2500		200	25	18	9	0	0	0	10.5 **	5.0
		1250		201	11	2	0	1	1	0	2.0	5.0
		125		200	0	2	0	0	0	0	1.0	8.5
	陽性対照	0.5		25	8	9	6	0	0	5	60.0 **	8.0
	溶媒対照		+	200	4	0	1	0	0	0	0.5	7.5
	検体	2500		201	15	13	5	1	1	0	8.5 **	3.0
		1250		200	9	2	0	0	0	0	1.0	6.0
		125		200	2	1	1	0	0	0	1.0	5.5
	陽性対照	100		26	10	10	14	0	0	7	69.2 **	2.0

統計解析法：Fisher's exact test (** : $p < 0.01$)

溶媒対照：生理食塩水

陽性対照：S9- マイトマイシンC、S9+ シクロホスファミド

a) 溶媒対照および検体処理群では 2 連の合計、陽性対照群では 1 連の数値

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。

6) ラットの骨髄細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験

(資料 No.T-42)

試験機関：

報告書作成年：1987年[GLP対応]

報告書番号：CTL/P/1560

検体純度：

供試動物：Wistar ラット (Alpk : AP)、開始時体重 雄 210~258g、雌 195~254g、

検体投与群 各群雌雄各 8 匹、陰性および陽性対照群 雌雄各 12 匹、約 6~8 週齢

試験方法：検体を脱イオン水で溶解し、パラコートイオンとして 15、75 および 150 mg/kg の用量でラットに単回強制経口投与した。溶媒対照には脱イオン水を、陽性対照にはシクロホスファミドの生理食塩溶液 (3mg/mL) を用いた。すべての溶液は体重 100 g 当たり 1mL の割合で投与した。

屠殺 2 時間前にコルヒチン 2~3 mg/kg を腹腔内投与した。溶媒対照群およびパラコート 150 mg/kg 投与群は投与後 12、24 および 48 時間後に屠殺し、その他の群は投与 24 時間後に屠殺した。屠殺後、大腿骨骨髄を採取し、染色体異常を示す分裂中期細胞数を検査した。観察細胞数は各動物あたり最高 50 個とした。

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

試験結果：動物数ごとに取りまとめた結果を表1に、細胞数ごとに取りまとめた結果を表2に示す。

投与12時間後屠殺動物；150 mg/kg 投与群では、溶媒対照群と比較して、統計学的に有意な染色体異常の発生頻度の上昇は認められなかった。

投与24時間後屠殺動物；150 mg/kg 投与群の雌および75 mg/kg 投与群の雌雄では、対照群と比較して、統計学的に有意な染色体異常の発生頻度の軽度の上昇が認められた。これは溶媒対照群の値が異常に低かったことに起因するものと考えられた。

投与48時間後屠殺動物；いずれの投与群においても、溶媒対照群と比較して、統計学的に有意な染色体異常の増加は認められなかった。

陽性対照群；陽性対照群では、統計学的有意な染色体異常の増加が認められた。

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有しないものと判断される。

表 1. 結果 (動物数)

性別	屠殺時間	薬物	投与量 (mg/kg)	観察動物数	染色体異常を有する動物数					
					ギャップ	切断	断片/微小	その他	ギャップ以外の異常	全異常
雄	12	溶媒対照		12	5	0	2	0	2	6
		検体	150	8	5	2	0	0	2	6
	24	溶媒対照		7	0	0	0	0	0	0
		検体	15	8	0	0	0	0	0	0
			75	8	3	1	2	0	3	5*
			150	8	0	0	0	0	0	0
	陽性対照	30	12	6*	9**	11**	8**	12**	12**	
	48	溶媒対照		11	2	0	2	0	2	3
検体		150	7	3	0	0	0	0	3	
雌	12	溶媒対照		12	7	3	0	0	3	10
		検体	150	8	0	0	0	0	0	0
	24	溶媒対照		11	2	0	1	0	1	3
		検体	15	8	2	1	0	0	1	2
			75	8	2	1	4	0	5	5
			150	8	1	2	2	0	3	3
	陽性対照	30	12	8*	12**	12**	9**	12**	12**	
	48	溶媒対照		12	3	0	0	0	0	3
検体		150	6	0	0	0	0	0	0	

溶媒対照：脱イオン水、陽性対照：シクロホスファミド
 統計解析法：Fisher's exact test (* : p<0.05、** : p<0.01)

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 2. 結果 (細胞数)

性別	屠殺時間	薬物	投与量 (mg/kg)	観察細胞数 ^{c)}	染色体異常を有する細胞数 ^{c)}				異常を有する細胞の割合 ^{1)b)(%)}		異常を有する細胞の割合 ^{2)b)(%)}		染色体数の分布 ^{a)}			有糸分裂指数 (平均)
					ギャップ	切断	断片/微小	その他	全異常	ギャップ以外の異常	全異常	ギャップ以外の異常	<40	40~42	>42	
雄	12	溶媒対照		600	12	0	2	0	2.333	0.333			0	600	0	17.5
		検体	150	400	6	2	0	0	2.000	0.500			0	400	0	18.0
	24	溶媒対照		260	0	0	0	0	0.000	0.000	0.000	0.000	3	257	0	9.5
		検体	15	329	0	0	0	0	0.000	0.000	0.000	0.000	1	327	1	11.5
			75	416	5	1	2	0	1.939	0.689	1.976**	0.694	6	410	0	12.0
			150	281	0	0	0	0	0.000	0.000	0.000	0.000	2	279	0	7.7
	陽性対照	30	513	12	28	54	16	19.788**	18.122**	19.060**	17.078**	24	488	1	3.3*	
	48	溶媒対照		550	2	0	2	0	0.727	0.364			7	543	0	15.1
検体		150	350	4	0	0	0	1.143	0.000			0	350	0	12.9	
雌	12	溶媒対照		600	10	4	0	0	2.333	0.667			0	600	0	18.1
		検体	150	400	0	0	0	0	0.000	0.000			0	400	0	16.4
	24	溶媒対照		552	2	0	1	0	0.545	0.182	0.549	0.182	6	546	0	17.0
		検体	15	400	2	1	0	0	0.500	0.250	0.510	0.250	3	397	0	15.8
			75	400	2	1	5	0	2.000	1.500*	2.015*	1.510**	6	394	0	14.8
			150	400	1	2	2	0	1.250	1.000	1.314	1.048*	3	394	3	13.7
	陽性対照	30	586	11	47	58	35	19.454**	17.787**	18.406**	16.707**	12	574	0	6.8**	
	48	溶媒対照		574	3	0	0	0	0.503	0.000			6	568	0	13.3
検体		150	252	0	0	0	0	0.000	0.000			2	250	0	9.9	

溶媒対照：脱イオン水、陽性対照：シクロホスファミド

統計解析法：Student's t-test (* : p<0.05、** : p<0.01)

a) : <42, 42 あるいは >42 の染色体を有する細胞の数

b) : 1 : 観察された全細胞における結果、2 : 20 細胞以上観察できた個体における、染色体数が 40~42 であった細胞のみにおける結果

c) : 合計値は申請者が算出

7) ラットにおける *in vivo* 染色体異常試験

(資料 No.T-43)

試験機関：

報告書作成年：1978年、1979年（補足資料）

報告書番号：CTL/P/367、CTL/P/442（補足資料）

検体純度：

供試動物：Wistar ラット、8～10 週齢、1 群雄 8 匹

試験方法：検体を 0.5% Tween80 水溶液に溶解し、パラコートイオンとして 6.5、12.5 および 19.0 mg/kg/日の用量で 5 日間ラットに強制経口投与した。投与量は 10mL/kg とした。溶媒対照には 0.5% Tween80 水溶液のみを、陽性対照にはエチルメタンスルホネート(EMS) 200 mg/kg/日を投与した。

最終投与 4 時間後にコルヒチン 3 mg/kg を腹腔内投与し、その 2 時間後に動物を屠殺した。屠殺後、大腿骨髄を採取し、染色体異常誘発性を検定した。観察は各動物当たり最高 50 個の分裂中期像について検査した。結果の解析は、各群及び各供試動物において観察された細胞数が異なったことから、得られた全データについて並びに 20 個以上の分裂中期像が観察できた個体のデータのみを用いての二通りで行った。

試験結果：全データについての解析結果を表 1 に、20 個以上の分裂中期像が観察できた個体のデータのみを用いての解析結果を表 2 に示す。

表 1. 全データ

薬物	濃度 (mg/kg 体重)	染色体異常を有する 細胞の平均割合(%) ^{a)}	切断を有する細胞 の平均割合(%) ^{a)}	検査 動物数 ^{b)}
溶媒対照		5.8	1.0	8
検体	6.5	8.8	2.2	6
	12.5	4.7	1.0	6
	19.0	5.1	2.4	7
陽性対照 (EMS)	200	18.5 ***	5.0 *	8

EMS：エチルメタンスルホネート

統計解析法：Student's t-test (* ; P<0.05, *** ; P<0.001)；データを変換後 (double arcsine function) の値に対して実施。

a)各動物における割合を平均したもの

b)途中死亡動物、観察可能な分裂中期像が得られなかった個体、1細胞しか観察できなかった個体について除外した。

表 2. 20 個以上の分裂中期像が観察できた個体のデータのみ

薬物	濃度 (mg/kg 体重)	染色体異常を有する 細胞の平均割合(%) ^{a)}	切断を有する細胞 の平均割合(%) ^{a)}	検査 動物数
溶媒対照		6.6	1.1	7
検体	6.5	10.6 *	2.6	5
	12.5	6.0	2.0	3
	19.0	4.1	1.8	6
陽性対照 (EMS)	200	18.5 ***	5.0 *	8

EMS : エチルメタンスルホネート

統計解析法 : Student's t-test (* ; P<0.05, *** ; P<0.001) ; データを変換後 (double arcsine function) の値に対して実施。

a)各動物における割合を平均したもの

20 個以上の分裂中期像が観察できた個体のデータのみを解析した結果、検体投与群では 6.5mg/kg 投与群で染色体異常を有する細胞の割合に統計学的有意な増加がみられたが、より高用量で同様の変化はみられなかった。その他の群、並びに、切断を有する細胞の割合に増加はみられなかった。

検体投与群の染色体には染色性を欠く部分があり、不鮮明であったため、ギャップおよび切断の読み取りがきわめて困難であった。しかしながら、認められた異常はギャップおよび切断のみであり、その他の異常はみられなかったこと、用量に相関した増加がみられなかったことから、染色体異常を有する細胞の割合の増加は染色体の不均一な染色によるアーチファクトであると考えられた。

この染色性の不均一さについて調べるために試験を実施したところ、細胞を固定後に検体を処理した細胞においても同様の形態が観察されたことから、検体は染色体の染色過程を直接的に阻害すると考えられた。また、細胞の洗浄回数を増やすことにより、染色性の不均一さが軽減されたことから、本試験でみられた染色体の不鮮明さがアーチファクトであることが確認され、遺伝毒性によるものではないと考えられた。

なお、検体投与群でみられた染色体の不鮮明さは、溶媒対照群および陽性対照群ではみられなかった。

一方、陽性対照として用いた EMS では顕著な染色体異常を示す分裂中期細胞数の明らかな増加を示し、また、ギャップおよび切断以外の染色体異常も認められた。

以上の結果より、本剤は本試験条件下においてラットの骨髄細胞に対し有意な染色体異常誘発性は有しないものと考えられる。

8) マウスを用いた小核試験

(資料 No.T-44)

試験機関：

報告書作成年：1985年[GLP 対応]

報告書番号：CTL/P/1369

検体純度：

供試動物：C57/BL/6J/Alpk 系マウス（8～12 週齢、体重の記載なし）、1 群雌雄各 5 匹

試験方法：検体を脱イオン水に溶解し、パラコートイオンとして 51.75 および 82.8 mg/kg を単回経口投与した。溶媒対照として脱イオン水を、陽性対照としてシクロホスファミドを用いた。

投与 24、48 および 72 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髓を採取し塗抹標本作製した。

各標本について、細胞毒性を調べるため 1000 個の多染性赤血球を観察し、正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した後、引き続き 1000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。

結果： 骨髄標本の観察結果を次表に示す。

検体投与群ではいずれの投与量においても、またいずれの骨髄採取時期においても、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

また、82.8 mg/kg 投与群では、いずれの標本採取時期においても、正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意ではないが、わずかな低下が認められた。

一方、陽性対照群では、投与後 48 および 72 時間後の骨髄採取時期に、多染性赤血球の正染性赤血球に対する割合が対照群の値と比べて、統計学的に有意に減少した。

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

結果

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性別	観察動物数	MNPCE ‰	PCE/NCE %
投与後 24 時間	陰性対照		雄 ^{a)}	5	3.2	29
			雌 ^{a)}	5	2	36.3
			雌雄	10	2.6	32.7
	検体	51.75	雄 ^{a)}	5	2.8	33
			雌 ^{a)}	5	1.4	43.4
			雌雄	10	2.1	38.2
		82.8	雄 ^{a)}	5	3.8	29.4
			雌 ^{a)}	5	1.4	35.3
			雌雄	10	2.6	32.4
	陽性対照	65	雄 ^{a)}	5	35.2	23.3
			雌 ^{a)}	5	27.2	31.7
			雌雄	10	31.2 **	27.5
投与後 48 時間	陰性対照		雄 ^{a)}	5	4	38.9
			雌 ^{a)}	5	1.8	37.5
			雌雄	10	2.9	38.2
	検体	51.75	雄 ^{a)}	5	3.6	36.6
			雌 ^{a)}	5	2.4	37.5
			雌雄	10	3.0	37.1
		82.8	雄 ^{a)}	5	3.4	30.8
			雌 ^{a)}	5	1.2	41.8
			雌雄	10	2.3	36.3
	陽性対照	65	雄 ^{a)}	5	21	19.5
			雌 ^{a)}	5	10.6	27.5
			雌雄	10	15.8 **	23.5 **
投与後 72 時間	陰性対照		雄 ^{a)}	5	3	37.5
			雌 ^{a)}	5	1.2	31.2
			雌雄	10	2.1	34.4
	検体	51.75	雄 ^{a)}	5	3.2	34.2
			雌 ^{a)}	5	1.8	34.7
			雌雄	10	2.5	34.5
		82.8	雄 ^{a)}	5	1.6	29.8
			雌 ^{a)}	5	0.6	32
			雌雄	10	1.1	30.9
	陽性対照	65	雄 ^{a)}	5	5.6	19.9
			雌 ^{a)}	5	3.4	27.5
			雌雄	10	4.5 *	23.7 **

統計解析法 (雌雄合計値のみ実施) : Student's t-test (* ; p<0.05、** ; p<0.01)

PCE : 多染性赤血球数、 NCE : 正染性赤血球数、

MNPCE : 多染性赤血球 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

溶媒対照 : 脱イオン水、陽性対照 : シクロホスファミド

a)申請者が算出

9) ラット培養肝細胞における不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (資料 No.T-45)

試験機関 :

報告書作成年 : 1985 年[GLP 対応]

報告書番号 : CTL/P/1339

検体純度 :

供試細胞 : Alderley Park ラット (Alpk:AP ; 雄 6~8 週齢 ; 体重 250~350 g) の肝臓からコラゲナーゼ灌流法を用いて採取した単離肝細胞

試験方法 : 肝細胞浮遊液 (1.5×10^5 細胞/mL) を調製し、細胞をプラスチック製カバースリップに付着させた。これに ^3H で標識したチミジンおよび検体 ($10^{-2} \sim 10^{-9}$ モル濃度 (申請者注 : $1.8625 \times 10^{-4} \sim 1862.5 \mu\text{g/mL}$)) を含む培養液を加え、19 時間培養した。

陽性対照として、ジエチルニトロソアミンを用い、陰性 (溶媒) 対照には培養液のみを用いた。19 時間処理後、培養液を取り除き、3 回洗浄し、非標識チミジンを含む培養液で約 18 時間培養した。その後、細胞を固定後乾燥し、スライドグラス上にのせた。

1 用量当たり 3 枚のスライドグラスをオートラジオグラフィで観察した。スライド当たり少なくとも 25 (通常 50) の形態学的に変化していない細胞核および細胞質上の銀粒子数を計数した。

試験は 2 回行った。

〈陽性判定基準〉いずれかの用量で、正味核内粒子数が 3 以上であり、再現性が認められた場合に陽性と判断した。さらに、統計解析 (ANOVA) を実施し、検体処理により正味核内粒子数に違いがでるか検討した。

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

結果：結果を次表に示す。

2回の試験とも検体を加えて培養した肝細胞の核上の銀粒子数は、細胞質上の銀粒子数より少なく、また、陰性対照と同等であった。

一方、陽性対照のジエチルニトロソアミンでは、核上の銀粒子数は細胞質上の銀粒子数よりはるかに多く、また、陰性対照と比較して明らかな増加を示した。

以上の結果より、本剤は不定期 DNA 合成を誘発しないと考えられる。

結果：

試験	薬剤	投与量		平均核内 粒子数(A)	平均細胞質内 粒子数(B)	正味核内 粒子数(A-B)
		モル濃度	μg/mL ^{a)}			
1	溶媒対照 (培養液)			22.15	27.13	-4.98
	検体	10 ⁻²	1862.5	16.39	17.45	-1.06
		10 ⁻³	186.25	- *	-	-
		10 ⁻⁴	18.625	27.00	31.60	-4.60
		10 ⁻⁵	1.8625	26.27	28.27	-2.00
		10 ⁻⁶	1.8625 × 10 ⁻¹	33.84	36.79	-2.95
		10 ⁻⁷	1.8625 × 10 ⁻²	29.35	35.52	-6.17
		10 ⁻⁸	1.8625 × 10 ⁻³	25.65	29.41	-3.76
	陽性対照(DEN)	10 ⁻³	102.14	42.63	19.04	23.59
2	陰性対照 (培養液)			23.54	28.96	-5.42
	検体	10 ⁻²	1862.5	15.52	19.54	-4.02
		10 ⁻³	186.25	31.12	39.58	-8.46
		10 ⁻⁴	18.625	28.67	35.79	-7.12
		10 ⁻⁵	1.8625	32.84	37.10	-4.26
		10 ⁻⁶	1.8625 × 10 ⁻¹	28.18	34.55	-6.37
		10 ⁻⁷	1.8625 × 10 ⁻²	27.30	32.32	-5.02
		10 ⁻⁸	1.8625 × 10 ⁻³	24.88	33.00	-8.12
	陽性対照(DEN)	10 ⁻³	102.14	55.34	24.31	31.03

統計解析法：ANOVA (検体処理に伴った正味核内粒子数の変化は認められない。(帰無仮説の棄却))

* : 観察可能な細胞が十分得られなかった。

DEN : ジエチルニトロソアミン

a)申請者が換算した。

10) ラットの肝細胞を用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (資料 No.T-46)

試験機関 :

報告書作成年 : 1987 年[GLP 対応]

報告書番号 : CTL/P/1550

検体純度 :

供試動物 : Alderley Park ラット (Alpk : AP)、雄、体重 242~440 g

検体処理群 : 試験 1 各 2 匹、試験 2 各 3 匹

溶媒対照群 : 各試験 1~2 匹

陽性対照群 : 各試験 1 匹

試験方法 : 検体を水で調製し、45、75 および 120 mg/kg の用量でラットに投与し、投与 4 および 12 時間後に屠殺して肝細胞浮遊液を調製した。溶媒対照群には水のみを、陽性対照群には 6-P-ジメチルアミノフェニルアゾベンチアゾール (6BT) 40mg/kg (溶媒 : コーン油) を同様に投与した。この浮遊液を 1.5×10^5 細胞/mL に希釈してプラスチック製カバースリップに付着させ、 $[^3\text{H}]$ -チミジン溶液を含む培養液で 37°C、4 時間培養した。次に、非標識チミジンを含む培養液で一夜培養し、洗浄、固定および乾燥後プラスチック製カバースリップをスライドグラスにマウントし、オートラジオグラムを作製して染色した。スライドグラスごとに少なくとも 25 (通常 50) 個の細胞を観察し、細胞ごとに核内の銀粒子数および細胞質内の銀粒子数を、自動画像解析装置を用いて計数した。試験は 2 回繰り返して実施した。

〈陽性判定基準〉いずれかの用量で、正味核内粒子数が 3 以上であり、再現性が認められた場合に陽性と判断した。

結 果 : 結果を次頁の表に示す。

検体は 120 mg/kg の用量で明らかな細胞毒性を示したため、不定期 DNA 合成誘発性の評価は行わなかった。45 および 75 mg/kg 投与群においては、平均正味核内粒子数は 0 以下であった。陽性対照として用いた 6BT は実質核内粒子数を顕著に増加させた。

以上の結果より、本剤は不定期 DNA 合成を誘発しないと判断される。

結果：

試験	投与後 時間 (時間)	薬 剤	投与量 (mg/kg)	平均核 内粒子数 (A)	平均細胞質 内粒子数 (B)	正味核内 粒子数 (A - B)	DNA 修復中の 細胞の比率 ¹⁾ (%)
1	4	溶媒対照		6.38	10.65	-4.28	1
		検体	45	3.64	6.68	-3.04	2
			75	9.59	15.95	-6.36	2
			120 ³⁾	5.46	12.43	-6.97	0
	陽性対照	40	15.42	9.54	5.88	55	
	12	溶媒対照		9.29	15.35	-6.06	5
		検体	45	6.85	11.96	-5.11	1
			75	6.96	13.30	-6.34	0.5
			120 ³⁾	9.65	16.16	-6.51	3.5
	陽性対照	40	66.20	27.87	38.33	96	
2	4	溶媒対照		4.94	8.15	-3.21	1
		検体	45	5.86	9.65	-3.79	0.5
			75	7.05	11.46	-4.41	1.3
			120 ³⁾	5.89	10.24	-4.36	1.3
	陽性対照	40	14.16	8.44	5.72	46	
	12	溶媒対照		8.41	11.86	-3.45	2
		検体	45	6.60	8.96	-2.37	2.3
			75	8.52	13.59	-5.07	1.3
			120 ³⁾	8.48	12.47	-3.98	1.7
	陽性対照	40	50.85	17.99	32.87	92	
平均 ²⁾	4	溶媒対照		5.9	9.82	-3.92	1
		検体	45	5.12	8.62	-3.54	1.0
			75	8.07	13.26	-5.19	1.6
			120 ³⁾	5.71	11.11	-5.40	0.8
	陽性対照	40	14.79	8.99	5.80	50.5	
	12	溶媒対照		8.85	13.61	-4.76	3.5
		検体	45	6.7	10.16	-3.46	1.8
			75	7.89	13.47	-5.58	1.0
			120 ³⁾	9.15	13.94	-4.99	4.0
	陽性対照	40	58.53	22.93	35.60	94.0	

溶媒対照：水、陽性対照：6BT : 6-P-ジメチルアミノフェニルアゾベンチアゾール

1) 正味核内粒子数が 5 以上の細胞数

2) 2 試験の平均値

3) 120mg/kg 群のデータは肝細胞が顕著な毒性影響を示したため、UDS の評価には用いなかったが、参考として示す。

(資料 No.T-47)

11) チャイニーズハムスターの肺線維芽細胞 (Don 細胞) を用いた *in vitro* における姉妹染色分体交換 (SCE) 試験

試験機関：

報告書作成年：1985年[GLP対応]

報告書番号：CTL/P/1392

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 (Don 細胞) を用いて、代謝活性化系の存在下および非存在下における姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発能を検定した。

生理食塩水に溶解した検体を代謝活性化系 (S9Mix) 非存在下では 0.86~1779.12 μg パラコートイオン/mL の 8 用量で、S9Mix 存在下では 0.86~1764.71 μg パラコートイオン/mL の 8 用量で培養液に加えた。処理 3 時間後に検体を除去し、プロモデオキシウリジン

(BrDU) を培養フラスコ 1 本に対して 0.3 mg 加え、検体処理 22 時間後にコルヒチンを 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように培養液に加えた。さらに 2 時間培養した後、細胞浮遊液を調製してスライド標本を作成した。一部のスライド標本をギムザ染色して有糸分裂指数を求め、残りの標本を蛍光およびギムザ重染色して染色分体の交換を観察した。陽性対照として、S9Mix 非存在下ではマイトマイシン C を、S9Mix 存在下ではシクロホスファミドをそれぞれ用いた。

なお、S9Mix 非存在下では、処理に用いた 8 用量から細胞毒性が認められる用量 (例：有糸分裂指数が対照群の 50~80%) である 89.32 μg パラコートイオン/mL を最高用量とし、以下 4 用量 (17.79、8.93、1.80 および 0.86 μg パラコートイオン/mL) を選択し観察に供した。S9Mix 存在下では、溶媒対照群と比較して高い染色体異常の発生頻度が認められた 176.47 μg パラコートイオン/mL を最高用量とし、以下 5 用量 (88.60、17.65、8.86、1.80 および 0.86 μg パラコートイオン/mL) を選択し、観察に供した。

〈陽性判定基準〉統計学的有意 ($p < 0.01$) な増加が 1 以上の用量で認められ、用量相関性が認められる場合に陽性と判断した。ただし、最終的な判断の際には、統計学的有意差及び生物学的意義を考慮することとした。

結果： 結果を次頁の表に示す。

分裂中期細胞の割合は、検体処理群（S9Mix 存在下および非存在下）と溶媒対照群で同等であった。

S9Mix 非存在下では、パラコート処理群のすべての用量で対照群と比較して統計学的に有意な SCE 発生頻度の上昇が認められた。また、S9Mix の存在下では、高用量処理群に明らかな統計学的にも有意な SCE 発生頻度の上昇が認められた。8.86 および 0.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理群にも対照群と比較して統計学的に有意な SCE 発生頻度の上昇が認められた。代謝活性化系の非存在下では、その影響がより顕著であった。

以上の結果より、検体は本試験条件下において、SCE の発生頻度を上昇させると判断される。

薬物	濃度 ^{d)} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9-Mix の有無	分裂中期細胞の 割合 (%)			姉妹染色分体交換 (SCE) 出現頻度		有糸分裂 指数
			M1	M2	M3	SCE/細胞	SCE/染色体	
溶媒対照 ^{a)}		-	3	96	1	8.45	0.397	10.5
検体	0.86	-	9	91	0	11.51 **	0.548	13.0
	1.80	-	9.75	84	6.25	11.28 **	0.555	11.0
	8.93	-	16	81.5	2.5	14.96 **	0.672	7.0
	17.79	-	7.5	91.5	1	13.99 **	0.648	9.0
	89.32	-	14	85	1	22.56 **	1.074	2.5
陽性対照 ^{b)}	0.1	-	15	85	1	41.82 **	1.975	8.5
溶媒対照 ^{a)}		+	2	93	5	7.62	0.383	17.0
検体	0.86	+	17.5	96.5	2.5	8.55 *	0.425	10.5
	1.80	+	10	94.5	3	7.48	0.371	10.5
	8.86	+	6	93.5	3	8.33 *	0.410	16.0
	17.65	+	3.5	94	0	9.01 **	0.437	7.5
	88.60	+	2.5	85	5	11.93 **	0.585	11.0
	176.47	+	1	80	2.5	18.84 **	0.929	10.5
陽性対照 ^{c)}	5	+	9	91	0	77.72 **	3.736	11.0

統計解析法 (SCE/細胞にのみ実施) : Student's t-test (* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)

M1、M2、M3 : それぞれ 1、2 および 3 回目の分裂中期にある細胞

a) : 生理食塩水

b) : S9Mix 無し : マイトマイシン C

c) : S9Mix 有り : シクロホスファミド

d) : パラコートイオンとして

(14) 生体機能影響

1) 一般薬理試験

(資料 No.T-48)

試験機関：

報告書作成年：1981年

報告書番号：なし

検体純度：

1. 中枢神経系に対する作用

a) マウスを用いた行動試験

供試動物：ICR系マウス、5週齢、体重雄25～27g、雌23～26g、1群雌雄各3匹

投与方法：検体を生理食塩水で希釈し、0、8.89、13.33、20および30mg/kgの用量を10mL/kgの液量で腹腔内に単回投与した。投与前、投与15、30、45および60分後、投与2、4および6時間後および投与1、2、3、4、10、20および30日後に動物の一般状態をIrwinの多元観察法に従い観察した。

結果：20および30mg/kg投与群雌雄で、自発運動の低下、立ち直り反射の低下、腹ばい姿勢、呼吸粗大、粗毛、削瘦、反応性の低下、躯体緊張の低下、腹筋緊張の低下、警戒性の低下、よろめき歩調および貧血等の症状が認められた。30mg/kg投与群の雄全例および雌2例が投与2～5日後に死亡した。

b) ウサギを用いた急性脳波測定試験

供試動物：日本白色種ウサギ、体重 2.5 kg 前後、雄 5 匹

投与方法：検体を生理食塩水で調製し、1、3 および 10 mg/kg の用量でそれぞれを順次 60 分間隔で静脈内に投与した。投与後、大脳皮質運動領、知覚領、視覚領および扁桃核、海馬、中脳網様体の脳波に及ぼす作用を 60 分間観察した。皮質脳波は前頭部（運動領）、頭頂部（知覚領）および後頭部（視覚領）に装置した誘導電極を介し、また深部脳波は Sawyer らの map に従って、右側扁桃核、左側海馬および右側中脳網様体に刺入した単針電極を介して脳波計に記録した。

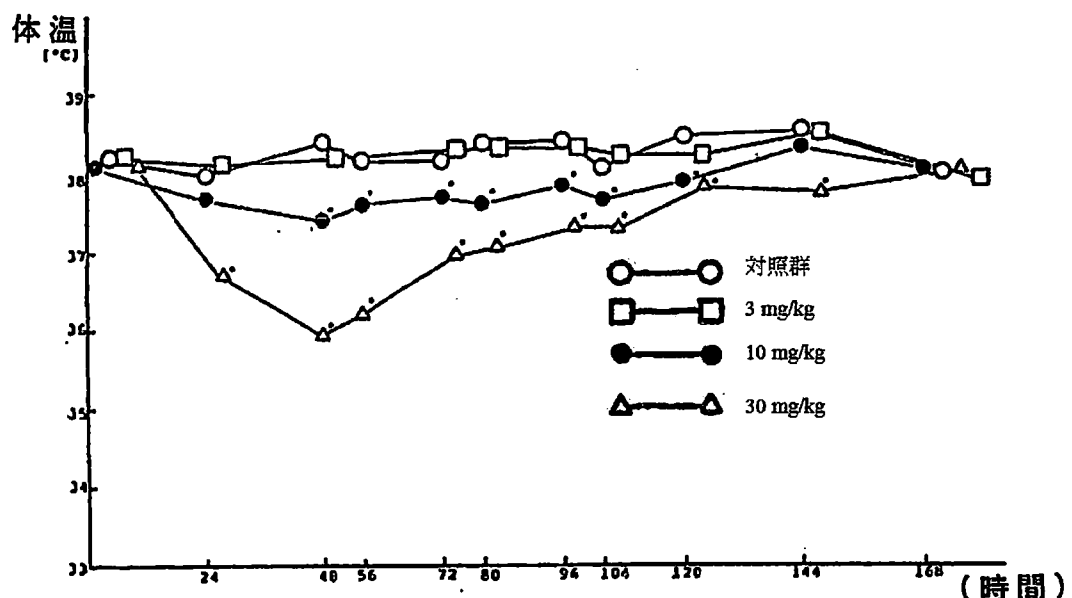
結果：全用量で投与後数分以内に用量依存性のある覚醒波化（低振幅速波化）作用が認められた。この作用は 1 mg/kg 投与時では投与 1 時間後にほぼ回復し、3 mg/kg 投与時では投与 1 時間後に回復傾向が認められた。10 mg/kg 投与時では投与 1 時間後には正常に近い脳波が認められた。しかしながら、10mg/kg 投与後、正常に近い脳波に戻った際に再度 10mg/kg を静脈投与した結果、覚醒化反応はみられなかった。したがって、低用量投与時には興奮作用が、高用量投与時には抑制作用を示す可能性が示唆された。

c) マウスを用いた体温測定試験

供試動物：ICR 系マウス、5 週齢、体重 25~27 g、1 群雄 10 匹

投与方法：検体を生理食塩水で希釈し、0、3、10 および 30 mg/kg の用量（10mL/kg の液量）で腹腔内に単回投与した。投与前、投与 24、48、56、72、80、96、104、120、144 および 168 時間後にマウスの直腸温を測定した。

結果：結果を次の図に示した。



30 および 10 mg/kg 投与群で、投与 48 時間後に体温の低下(それぞれ 2.4 および 1.0 °C 下降) が認められたが、それぞれ 168 および 144 時間後に正常に回復した。

2. 呼吸・循環器系に対する作用

a) イヌを用いた呼吸、血圧、心拍数の測定試験

供試動物： 雑種犬、体重 10 kg 前後、雌雄計 5 匹

投与方法： 検体を生理食塩水で調製し、0.5、1.0、2.0 および 4.0 mg/kg の用量 (0.1mL/kg の液量) で静脈内に単回投与した。呼吸運動はトランスデューサーを介して測定し、末梢血流量は電磁流量計を用いて大腿動脈の血流量を測定した。心拍数は心電図を用いて連続的に記録した。

結果： 4 mg/kg 投与群で、心拍数の軽度の減少および呼吸数の軽度の増加が認められた。いずれの群でも呼吸深度、血圧および末梢血流量に影響はみられず、2.0mg/kg 以下の投与群で影響は認められなかった。

b) イヌを用いた心電図測定試験

供試動物： 雑種犬、体重 10 kg 前後、雌雄計 5 匹

投与方法： 検体を生理食塩水で調製し、0.5、1.0、2.0 および 4.0 mg/kg の用量 (0.1mL/kg の液量) で静脈内に投与した。心電図は第二誘導法を用いて投与後 60 分間記録した。

結果： 4 mg/kg 投与時に、5 例中 3 例に投与 45 分後頃より Q 波の上昇、T 波の振幅の減少が認められ、投与 60 分後も正常に回復しなかった。しかしながら、各投与量の全経過中でその他の変化は認められず、不整脈も認められなかった。
2.0mg/kg 以下の投与群で影響は認められなかった。

3. 運動神経系に対する作用

ウサギの骨格筋（前脛骨筋）収縮作用試験

供試動物： 日本白色種ウサギ、体重 2.5 kg 前後、雄 4 匹

投与方法： ウサギの右側坐骨神経を大腿部で露出し、総腓骨神経を分離した。検体を生理食塩水で調製し 1、3 および 10 mg/kg の用量で静脈内にそれぞれ順次 60 分間隔で投与し、前脛骨筋を直接的あるいは間接的（総腓骨神経を介して）に刺激し、筋収縮に及ぼす検体の影響を観察した。各投与量につき、60 分間連続記録観察した。

結果： いずれの投与群においても検体投与に関連する筋収縮の変化は認められなかった。

4. 末梢自律神経系に対する作用

a) ウサギの瞳孔径に対する試験

供試動物： 日本白色種ウサギ、各群雄 3 匹

投与方法： 検体を生理食塩水で調製し、0、10、20 および 30 mg/kg の用量（10mL/kg の液量）で静脈内に単回投与した。投与前、投与 5、15、30 および 60 分後に両眼の瞳孔の直径を測定した。

結果：

投与量 (mg/kg)	投与前 (分)		投与後 (分)			
	45	15	5	15	30	60
対照 (生理食塩水)	6.7	6.6	6.6	6.7	6.7	6.6
10	6.2	6.1	6.2	6.2	6.2	6.3
20	7.2	7.3	7.2	7.3	7.2	7.2
30	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.3

数値は 3 匹の平均値（申請者が算出、mm）、測定値は左右瞳孔径の平均値

30 mg/kg 投与群で、投与 30 分後から軽度の縮瞳が始まり、60 分後にも同程度の縮瞳の傾向が認められた。

b) ウサギの生体位子宮運動の測定試験

供試動物： 日本白色種ウサギ、体重 2.5～3.0 kg、雌 3 匹

投与方法： 検体を生理食塩水で調製し 2、4、8 および 16 mg/kg の用量で耳静脈から 1mL/10 秒の速度で投与し、生体位子宮運動を Trendelenburg 法に従ってトランスデューサーを介して 60 分間記録した。

結果： いずれの投与群においても検体投与に関連する子宮筋収縮運動の変化は認められなかった。

c) モルモットの摘出回腸を用いた腸管平滑筋に対する試験

供試臓器： Hartley 系モルモット、雄 5 匹、体重 300~500 g

上記の動物から摘出した回腸を用いて標本を作製した。

投与方法： 摘出回腸標本を Tyrode 液槽中 (37°C、95%O₂ : 5%CO₂ で飽和) に懸垂し、約 1.0g の負荷をかけて安定化させた後、検体を液槽中に累積的に加え、回腸標本の運動をトランスデューサーを介して記録した。

結果： 2×10⁻⁵ g/mL の濃度で、投与直後に一過性の収縮が認められたが、Tyrode 液で数回洗浄後に回復した。2×10⁻⁶ g/mL 以下の濃度では影響は認められなかった。

d) ラット摘出輸精管に対する試験

供試臓器： Wistar ラット、雄 3 匹、体重約 300 g

上記の動物から摘出した輸精管を用いて標本を作製した。

投与方法： 摘出輸精管を Tyrode 液槽中 (37°C、95%O₂ : 5%CO₂ で飽和) に懸垂し、約 1.0g の負荷をかけて安定化させた後、検体を液槽中に累積的に加えた。また、あらかじめヒスタミン (2×10⁻⁷ g/mL) を液槽中に加え、次いで検体を累積的に加えて収縮に及ぼす検体の影響を調べた。

結果： 輸精管標本に対する検体の直接作用は認められなかったが、検体は 2×10⁻⁵ g/mL 以上の濃度でヒスタミンによる収縮に対して増強作用を示した。

e) マウスの腸管輸送能に対する試験

供試動物： ICR 系マウス、体重 20~25 g、1 群雄 10 匹

投与方法： 検体を生理食塩水で調製し、0、10、30 および 60 mg/kg の用量 (10mL/kg の液量) で単回皮下投与した。投与 30 分後に 10%アラビアゴムに懸濁した 10%炭末液を 10 mL/kg の液量で単回経口投与した。30 分後に動物を屠殺し、幽門部から炭末先端部までの長さを測定し、小腸の長さに対する割合 (移行率) を求めた。

結 果：

投与量 (mg/kg)	炭末の移行率 (%) (平均値±標準偏差)
対照 (生理食塩水)	66.7 ± 7.83
10	70.8 ± 7.80
30	70.2 ± 6.47
60	68.2 ± 3.96

いずれの投与群においても対照群との間に差は認められなかった。

5. 腎機能に対する作用

ラットの尿排泄に対する試験

供試動物： Wistar ラット、6 週齢、体重 170～190 g、1 群雄 5 匹

投与方法： 検体を生理食塩水で調製し、0、1.25、2.5、5.0 および 10.0 mg/kg の用量 (0.1mL/100g の液量) で、動物に腹腔内単回投与した。投与後に動物を代謝ケージに個別別に収容し、尿を 4 時間にわたって採取し、グルコース、タンパク、潜血、pH、ウロビリノーゲン、ナトリウムイオン (Na⁺)、カリウムイオン (K⁺)、尿量および比重について検査した。なお、動物を一夜絶食させ実験開始 3 時間前に絶水し、生理食塩水を投与した。

結 果： 結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	pH	尿量 (mL/4hr/匹)	尿量 (mL/4hr/ 100 g 体重)	比重	Na ⁺ (mEq/L)	K ⁺ (mEq/L)
対照 (生理食塩水)	5.9	1.84 ±0.75	0.95 ±0.45	1.031 ±0.006	129.2 ±36.8	139.9 ±24.2
1.25	6.2	1.30 ±0.32	0.73 ±0.17	1.042 ±0.006	162.8 ±34.6	142.6 ±29.5
2.5	6.1	1.74 ±0.97	0.98 ±0.55	1.037 ±0.009	125.2 ±46.3	117.3 ±29.4
5.0	6.1	1.72 ±1.05	0.97 ±0.61	1.033 ±0.005	116.4 ±33.8	105.9 ±35.2
10.0	6.0	2.18 ±0.88	1.21 ±0.46	1.032 ±0.012	118.6 ±39.8	110.2 ±51.4

統計解析法：不明 (有意差なし)
数値は 5 匹の平均値±標準偏差

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

pH、ナトリウムイオン (Na⁺)、カリウムイオン (K⁺)、尿量および比重について、いずれの投与群においても対照群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。グルコース、タンパク、潜血およびウロビリノーゲンについても、対照群と同様であり、投与の影響は認められなかった。

6. 血液に対する作用

a) 血液凝固に対する試験

供試動物： 日本白色種ウサギ、雄計 25 匹

投与方法： 検体を生理食塩水で 0.005～1.0%の濃度に調製し、試験管（1 濃度各 20 本）に入れ、37℃の恒温槽に置いた。ウサギの心臓より血液を採取し、上記の試験管に分注して静置した。分注後 30 秒毎に試験管を傾斜して凝固の有無を観察し、凝固時間を測定した。

結 果： 結果を次の表に示した。

パラコート濃度 (%)	凝固時間 ^{a)} (分)
対照 (生理食塩水)	6.13 ± 0.22 (100.0)
0.005	5.80 ± 0.28 (94.7)
0.01	5.98 ± 0.23 (97.6)
0.05	6.13 ± 0.21 (100.0)
0.1	7.90 ± 0.38 ** (129.0)
0.5	10.73 ± 0.77 ** (175.1)
1.0	11.18 ± 0.55 ** (182.5)

統計解析法：不明 (** : p<0.01)

a)： 数値は 20 本の平均値±標準誤差

括弧内の数値は対照群を 100 とした場合の割合。

0.1%の濃度で凝固時間の軽度の延長が認められ、0.5 および 1.0%の濃度では凝固時間の顕著な延長が認められた。

b) 溶血作用

供試動物： 日本白色種ウサギ、雄 4 匹

投与方法： ウサギの耳静脈から血液を目盛付遠沈管に採取し、遠心分離して上清を除去し、生理食塩水を加えて 10%赤血球浮遊液を調製した。検体を生理食塩水で 0.005~1.0%の濃度に調製し、赤血球浮遊液を 0.5 mL 加えて 25 あるいは 38℃の恒温槽で 2 時間インキュベーション後、遠心分離して上清を肉眼で観察した。採取したヒトの血液についても同様の方法で処理を行い試験した。陽性対照として 0.5%サポニンを用いてヒトおよびウサギの血液に対する溶血作用を確認した。

結果： 検体はいずれの温度においてもウサギおよびヒトの血液に対する溶血性を示さなかった。一方、陽性対照として用いたサポニンでは明確な溶血性が認められた。

以上の試験結果より、パラコートは、中枢神経系に対する作用としては 20 mg/kg 以上の高用量を腹腔内投与したマウスに対して非特異的な中毒症状を示した。また、ウサギを用いた急性脳波試験では、1 mg/kg の用量で抑制、10 mg/kg の用量で興奮作用を示した。その他に体温測定試験では、マウスに対し 10 mg/kg 以上の用量で投与 24 時間以降に体温低下作用を示した。

呼吸器系および循環器系に対する作用としては、イヌに対して 4 mg/kg の用量で心拍数の軽度の減少および呼吸数の軽度の増加を示したが、血圧に対する影響は認められなかった。また、イヌの心電図測定試験では、4 mg/kg の用量で Q 波の上昇および T 波の振幅の減少が認められた。

運動神経系（骨格筋）に対する影響は認められなかった。

末梢自律神経系に対する作用としては、30 mg/kg 以上の用量で瞳孔の収縮傾向が認められた。また、摘出したモルモットの腸管平滑筋に対して、 2×10^{-5} g/mL の濃度で一過性の収縮作用を示した。

その他に摘出したラットの輸精管に対して、 2×10^{-5} g/mL の濃度で、ヒスタミン (2×10^{-7} g/mL) の収縮作用を増強したが、パラコート単独では収縮作用を示さなかった。腸管輸送能および生体位子宮運動に影響は認められなかった。

腎機能に対する作用は何ら認められなかった。

血液に対する作用としては、0.1%の濃度で血液凝固時間の軽度の延長が認められ、0.5 および 1.0%の濃度で凝固時間の顕著な延長が認められたが、溶血に対する影響は認められなかった。

総括表

試験項目		動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢 神経系	一般状態： Irwin 法	マウス	腹腔内 (生理食塩水)	0、8.89、 13.33、20、 30	雄 3 雌 3	20	13.33	自発運動低下、粗毛、反応性低下、 躯体緊張の低下、腹筋緊張の低下な ど；30 mg/kg 投与群雄全例、雌 2 例 が死亡
	脳波	ウサギ	静脈内 (生理食塩水)	1、3、10	雄 計 5	1	なし	投与後数分で覚醒波化 1 mg/kg 投与で興奮、10 mg/kg 投与 で抑制作用
	体温	マウス	腹腔内 (生理食塩水)	0、3、10、 30	雄 10	10	3	投与 48 時間後に 30 mg/kg 投与群で 2.4°C、10 mg/kg 投与群で 1.0°C 低下
呼吸・ 循環 器系	呼吸、血圧、 心拍数	イヌ	静脈内 (生理食塩水)	0.5、1.0、 2.0、4.0	雌雄 計 5	呼吸 4.0 血圧 - 心拍数 4.0	呼吸 2.0 血圧 4.0 心拍数 2.0	4.0 mg/kg 投与で呼吸数の軽度の増 加および心拍数の軽度の減少
	心電図		静脈内 (生理食塩水)	0.5、1.0、 2.0、4.0	雌雄 計 5	4.0	2.0	4.0 mg/kg 投与で Q 波の上昇および T 波の振幅の減少
運動 神経系	骨格筋（前脛骨 筋）の収縮	ウサギ	静脈内 (生理食塩水)	1、3、10	雄 4	なし	10	変化なし
末梢 自律 神経系	瞳孔径	ウサギ	静脈内 (生理食塩水)	0、10、20、 30	各雄 3	30	20	30 mg/kg 投与群で縮瞳
	生体位子宮運動： Trendelenburg 法	ウサギ	耳静脈内 (生理食塩水)	2、4、8、 16	雌 3	なし	16	変化なし
	腸管平滑筋	モルモ ット摘 出回腸	<i>in vitro</i> Tyrode 液に 添加	累積 投与 ^{a)}	雄 5	2×10 ⁻⁵ (g/mL)	2×10 ⁻⁶ (g/mL)	2×10 ⁻⁵ g/mL 投与直後に一過性の収 縮
	輸精管	ラット	<i>in vitro</i> Tyrode 液に 添加	累積 投与 ^{a)}	雄 3	2×10 ⁻⁵ (g/mL)	2×10 ⁻⁴ (g/mL)	ヒスタミンによる収縮作用を増強 直接作用なし
	腸管輸送能	マウス	皮下 (生理食塩水)	0、10、30、 60	雄 10	なし	60	いずれの用量でも対照群との間に 有意差なし
腎 機能	尿排泄	ラット	腹腔内 (生理食塩水)	0、1.25、 2.5、5.0、 10.0	雄 5	なし	10.0	いずれの用量でも対照群との間に 有意差なし
血液	血液凝固	ウサギ	<i>in vitro</i> (生理食塩水)	0、0.005、 0.01、0.05、 0.1、0.5、 1.0 (%)	雄 計 25	0.1%	0.05%	0.1%で凝固時間の軽度の延長、0.5 および 1.0%で凝固時間の顕著な延 長
	溶血性 (ウサギ、ヒト)	ウサギ ヒト	<i>in vitro</i> (生理食塩水)	0.005 ~ 1.0 (%)	ウサギ 雄 4 ヒト 不明	なし	1.0%	溶血作用なし

a)：投与量の範囲についての記載なし

(15) 解毒及び治療

1) ポリスチレンスルホン酸塩を用いたラットにおける解毒試験

(資料 No.T-49)

試験機関：

文献発表年：1984年 (*Acta Pharmacol. et toxicol* 55、158-160)

著者：Nokata *et al.*

目的：パラコート中毒には特異的に有効な解毒剤がないため、中毒の治療には、吸着剤を用いて未吸収のパラコートを消化管より除去することが行われる。しかし、従来の吸着剤では十分な効果が得られていない。高カリウム血症に対し臨床的に使用されている陽イオン交換樹脂、ケイキサレート® (ポリスチレンスルホン酸ナトリウム) およびカリメート® (ポリスチレンスルホン酸カルシウム) がパラコートイオンに対してきわめて高い吸着能を持ち、パラコート投与直後のラットでの致死が抑制されることが明らかにされている (Yamashita *et al.*, 1983^{引用}) ことから、これを確認するために本試験を行った。

引用：Yamashita, M., S. Takagi, H. Suga and H. Naito: The effectiveness of cation exchange resin as an adsorbent of paraquat both *in vitro* and *in vivo*. ACT/AAPCC/ABMT, Annual Scientific Meeting (Boston, U.S.A.) 1983, pp.14

①急性経口毒性試験

検体純度：24%液剤

組成；	パラコート原体	24%
	水、界面活性剤、催吐性物質、色素、臭気性物質等	76%

供試動物：SDラット、6週齢、1群雄9～10匹、開始時体重記載なし

観察期間：14日間

投与方法：検体を200 mg/kgの用量で絶食動物に経口投与し、0、1、6および24時間後に蒸留水に懸濁したポリスチレンスルホン酸ナトリウム (ケイキサレート) あるいはポリスチレンスルホン酸カルシウム (カリメート) を2000 mg/kgの用量で経口投与し、生死を毎日観察した。対照群には、検体のみを投与した。

観察項目：一般状態、生死について14日間観察した。

結果：結果を次頁の図に示す。

検体投与後、対照群では全例が投与後4日までに死亡したが、検体投与後にポリスチレンスルホン酸塩を投与した群では死亡率の低下がみられた。

本試験における検体のLD₅₀値は、97 mg/kgであったが、ポリスチレンスルホン酸ナトリウムあるいはポリスチレンスルホン酸カルシウムを検体投与6時間後に投与した場合のLD₅₀値は、それぞれ170あるいは144 mg/kgであった。

以上の結果から、ポリスチレンスルホン酸塩はパラコートの急性毒性を軽減すると考えられる。

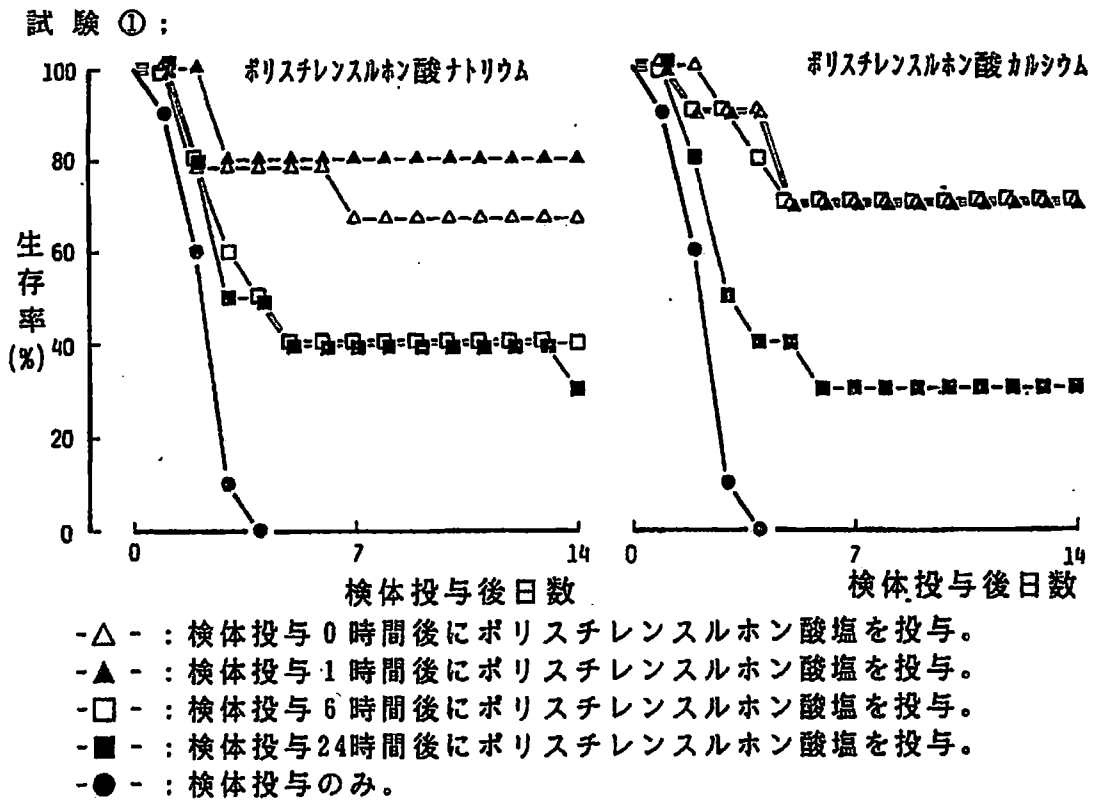


図. ポリスチレンスルホン酸塩を投与した場合の急性経口毒性試験結果

②血液および肺における放射能測定

供試標識化合物： で標識した1,1'-ジメチル-4,4'-ビピリジリウムジクロリド ()
(以下、 標識パラコートジクロリド)

比放射能

放射化学的純度：

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。

供試動物： SD ラット、6 週齢、1 群雄 5 匹、開始時体重記載なし

観察期間： 24 時間

投与方法： 標識パラコートジクロリド（ ）を投与し、その直後および 6 時間後に蒸留水に懸濁したポリスチレンスルホン酸ナトリウムあるいはポリスチレンスルホン酸カルシウムを 2000 mg/kg の用量で経口投与した。

観察項目： 標識パラコート投与 24 時間後に、血液および肺の放射能を測定した。

結果： 対照群の放射能に対する吸着剤投与群の放射能の割合を次表に示す。

吸着剤	ポリスチレンスルホン酸ナトリウム		ポリスチレンスルホン酸カルシウム	
	0	6	0	6
投与時間 (時間)	0	6	0	6
血中放射能 (%)	37	20	51	29
肺の放射能 (%)	15	67	15	68

数値は対照群を 100 とした場合の値。

標識パラコートジクロリド投与直後および 6 時間後にポリスチレンスルホン酸塩を投与した場合、血液および肺中の放射能濃度は減少した。また、標識パラコート投与直後に吸着剤を投与した動物の血液を、検体の T_{cmax} である検体投与 1 時間後にも採取し血中放射能 (%) を測定した結果、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム投与群では対照群の 35%、ポリスチレンスルホン酸カルシウム投与群では対照群の 38%であった。

以上の結果から、ポリスチレンスルホン酸塩は検体の吸収を軽減すると考えられる。

検体投与後にポリスチレンスルホン酸塩を投与し検体の急性毒性および吸収を観察した結果、ポリスチレンスルホン酸塩は検体の吸収を減少させることにより、急性毒性を軽減させると考えられた。

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

2) イヌにおける催吐剤 化合物の効果検討試験 (資料 No.T-50)
試験機関：
文献発表年：1983年(日農医誌 32巻4号 887-892)
著者：河合正計ら

目的：ICI社で開発した催吐剤の効果を、ビーグル犬より催吐剤による嘔吐発現率が高いとされる雑種成犬を用いて検討した。

検体純度：24%液剤

組成； パラコート 24%
水、界面活性剤、催吐性物質、色素、臭気性物質等 76%

供試動物：雑種成犬、体重7~12kg、雄6匹 雌4匹

観察期間：20日間

投与方法：下の表に示す用量で検体と催吐剤を同時に強制経口投与した。投与後24時間は絶食させたが、絶食時も水は自由に摂取させた。

群	動物数	投与前の 絶食の有無	投与量 (mg/kg)	
			検体	催吐剤
I	2 (雄1、雌1)	有 (12時間)	40	0
II	2 (雄2)	無	40	0
III	3 (雄1、雌2)	有 (12時間)	40	2
IV	3 (雄2、雌1)	無	40	2

観察項目：

一般状態および生死；一般状態及び生死を20日間観察した。

結果を表1に示す。

表 1. 一般状態及び生死

群	投与前の 絶食の有無	投与量 (mg/kg)		投与後の 経過時間	一般状態
		検体	催吐剤		
I	有 (12時間)	40	0	4-6 時間後	嘔気、嘔吐、元気消失
				1 日後	横臥、食欲不振、元気消失
				2-3 日後	流涙、呼吸促進、喘鳴、瞳孔散大
				3-4 日後	ふらつき、歩行困難、漿液性鼻汁分泌過多、血便
				7-9 日後	粘性または膿性鼻汁、膿性眼脂、結膜および口
				9-10 日後	腔内粘膜蒼白、貧血
					立位維持不能、横臥、呼吸困難
					13 日後に雄 1 例、17 日後に雌 1 例死亡 (平均生存日数 15 日)
II	無	40	0	1-2 日後	横臥、歩行不能
				2-3 日後	漿液性鼻汁分泌、流涎、呼吸促進
				7-8 日後	貧血、呼吸困難
					2 日後に雄 1 例、10 日後に雄 1 例死亡 (平均生存日数 6 日)
III	有 (12時間)	40	2	3-10 分後	嘔気、嘔吐 (6~9 回の嘔吐、嘔吐物は泡沫性)、固型便あるいは下痢便の排泄
				7-9 日後	漿液性鼻汁分泌、水様便
					20 日後に全例屠殺 (平均生存日数 20 日以上)
IV	無	40	2	7-20 分後	嘔気、嘔吐 (3~4 回の嘔吐)、流涎、排便
				1-2 日後	元気消失、横臥、漿液性または膿性鼻汁、嘔吐促進、呼吸困難、貧血
					8、12、18 日後に各 1 例死亡 (平均生存日数 12.7 日)

血漿中パラコート濃度； 投与後 1、2、3、4、7 および 10 時間後に股動脈より採血し、血漿中パラコートを Column-比色法により測定した。各群の血漿中のパラコート濃度の経時的変化を図 1 に示した。

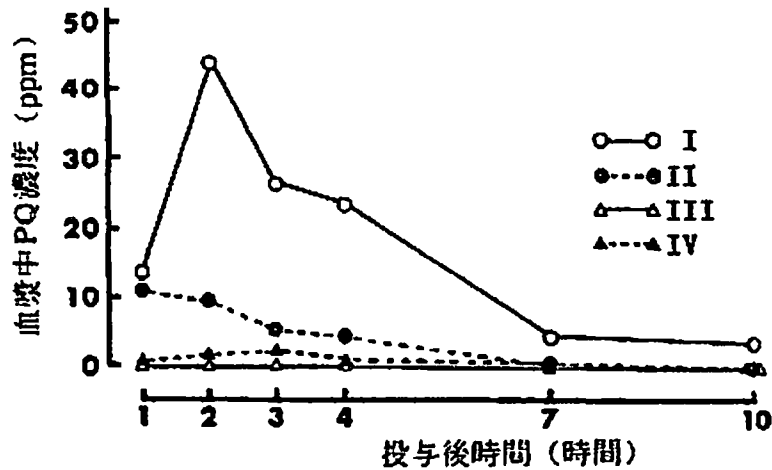


図 1. 血漿中 PQ 濃度

群	投与前の 絶食の有無	投与量 (mg/kg)	
		検体	催吐剤
I	有 (12 時間)	40	0
II	無	40	0
III	有 (12 時間)	40	2
IV	無	40	2

検体吐油量および吐出率； 投与後、III および IV 群における吐物量を測定し、吐物中のパラコート量を測定し、吐出率を算出した。

結果を表 2 に示す。

平均吐物量は、III 群で 113 mL、IV 群で 160 mL と IV 群の方が多かった。しかしながら、平均パラコート吐出量は III 群で 305 mg、IV 群で 246 mg と逆に III 群の方が多く、平均パラコート吐出率も III 群で 86.4%、IV 群で 61.2% と III 群の方が高かった。

表 2. 検体吐油量および吐出率

群	絶食の有無	投与量 (mg/kg)		動物番号	吐物量 (mL)	検体吐油量 (mg)	検体吐出率 (%)
		検体	催吐剤				
III	有 (12 時間)	40	2	5	150	302	94.3
				6	140	358	89.6
				7	50	256	75.3
				平均	113	305	86.4
IV	無	40	2	8	230	294	73.3
				9	50	119	42.5
				10	200	325	67.7
				平均	160	246	61.2

臓器重量；途中死亡動物および観察期間終了時の全生存動物を対象として、肝臓、肺および腎臓の臓器重量を測定し、臓器重量対体重比を算出した。

肺重量の対体重比はⅢ群がほぼ正常範囲内であったのに対し、他の3群では、肺の腫大が認められた。腎臓重量の対体重比においても、Ⅲ群以外の他の3群では、腎臓の腫大が認められた。肝臓重量の対体重比は群間に大差は認められなかったが、Ⅲ群はやや低い値であった。

表 3. 臓器重量 (対体重比 (%))

群	絶食の有無	投与量 (mg/kg)		動物番号	肺	腎臓	肝臓
		検体	催吐剤				
I	有 (12時間)	40	0	1	2.82	0.57	3.26
				2	2.24	1.07	4.28
				平均	2.53	0.82	3.77
II	無	40	0	3	3.25	0.69	4.37
				4	2.28	0.75	3.70
				平均	2.77	0.72	4.04
III	有 (12時間)	40	2	5	0.53	0.43	2.76
				6	0.81	0.44	3.22
				7	1.40	0.73	4.54
				平均	0.91	0.53	3.51
IV	無	40	2	8	2.27	0.79	3.76
				9	3.16	1.00	4.07
				10	2.97	0.75	3.88
				平均	2.81	0.85	3.90

統計解析：実施せず

以上の結果から、特に各群の平均生存日数から、催吐剤は、パラコートのイヌにおける毒性作用に対して毒性を軽減すると考えられる。自殺例のように、大量のパラコート摂取時には、嘔吐が発現しても致死量が残存する可能性があるが、嘔吐の発現により早期発見が可能となり、早期受療が期待できる。また、嘔吐によりパラコートを排出し、体内吸収を減少させることを併せて考えると、催吐剤添加はパラコート中毒防止に有効であると判断される。

3) パラコート中毒臨床例

(資料 No.T-51)

1) パラコート中毒における直接血液灌流法の効果検討

日腎誌：22(8), 13-23(1980)

自治医科大学 透析センター・循環器内科

パラコート中毒症 18 例のうち 10 症例に直接血液灌流 (DHP 療法) を施行し、その有用性を *in vitro* の試験結果と併せて検討した。その結果、10 症例中 4 例を救命した。しかしながら、パラコート中毒の性質上、すでに服用後長時間を経過したもの、大量服用後でショック状態にあるもの、呼吸不全の出現しているものは DHP 療法で救命することは困難と考えられる。パラコート中毒の治療に際しては、中毒初期よりの積極的治療により、かなりの救命が期待されると考えられた。

2) パラコート中毒に DHP 療法を行いビタミン E を大量投与し救命し得た一例

基礎と臨床：17(4), 37-42(1983)

千葉大学医学部 第二内科・呼吸器内科・第二外科

パラコートには過酸化反応を促進する作用のあることが知られているため、パラコート中毒患者に DHP 療法を行うとともに、抗酸化剤ビタミン E の大量投与を行った。患者は一過性の肝臓・腎臓・肺障害を来し、この間に血清中の過酸化脂質の増加が認められたが、過酸化脂質は 2 週間後から低下し、肺線維症等の合併症もなく治癒した。

以上のことから、パラコート中毒の治療および予防には DHP 療法によるパラコートの体外除去とともに、抗酸化剤ビタミン E の大量投与が有効である可能性が示唆された。

3) パラコート中毒治療法の検討

救急医学：8(7), 865-868 (1984)

熊本赤十字病院・内科

パラコート中毒 54 例について、徹底した腸洗浄およびステロイドパルス療法 (メチルプレドニゾン 1g の点滴による投与) を試みたところ、行わない場合と比較して救命率は 7.7% から 50.0% へと改善された。

DHP 療法、腸洗浄およびパルス療法を併せて施行した場合の救命率は 60.0% であり、DHP のみの場合の救命率 14.3% に比較して統計学的に有意な差 ($P < 0.01$) が認められた。

したがって、腸洗浄およびステロイドパルス療法は、パラコート中毒の治療法として有効であり、DHP 療法と併せて施行することにより救命率の改善が期待できる。

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。

(16) その他

1)ラットを用いた3週間(週5日)反復吸入毒性試験

(資料 No.T-52)

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。

0.01mg/m³群では、いずれの臓器にも病理組織学的変化は認められなかったことから、本試験の病理組織学的検査結果に基づく無影響量は雌雄ともにパラコートイオンとして 0.01mg/m³/日（実際濃度 0.012 mg/m³/日）であると判断された。

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)ラットを用いた3週間(週5日)反復吸入毒性試験(追加試験)

(資料 No.T-53)

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。

パラコートイオンとして 0.01 mg/m^3 のエアロゾル濃度に 1 日 6 時間、15 日間暴露した動物では、本試験で測定したいずれの項目にも影響は見られなかった。

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。

3)ラットを用いた3週間(週5日)反復吸入試験(肺への蓄積性の検討)

(資料 No.T-54)

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。

以上の結果から、ラットを用いた3週間（週5日）反復吸入試験（肺への蓄積性の検討）において、0.1 mg/m³群（実際濃度 0.106 mg/m³）で肺のパラコート濃度は定常状態（1.3µg/g wet weight）に達した。なお、この濃度では、以前実施した試験において（資料 No.T-52、CTL/C/729）、肺に病理組織学的変化が認められなかったことから、肺中のパラコート濃度 1.3µg/g wet weight では、肺に毒性影響はないものと考えられた。また、肺におけるパラコート濃度に性差は認められず、半減期は約2日であった。

4) マウス 28 日間経口 (混餌) 投与免疫毒性試験

試験機関^{a)}:

報告書作成年: 2011 年 [GLP 対応]

(試験番号 WIL-639105)

検体純度:

試験動物: B6C3F1 マウス、1 群雌 10 匹、開始時約 8 週齢

体重範囲; AFC (抗体産生細胞) アッセイ群 18.0~21.3g、NKC (ナチュラルキラー細胞) アッセイ群 18.4~22.0g

試験期間: 28 日間投与 (2011 年 2 月 15/16 日開始、投与開始日を試験 0 日と起算)

投与方法: 検体をパラコート原体として 25、75 および 100ppm (パラコートイオンとして 18、54、72ppm) の濃度で混入した飼料を自由摂取させた。陰性対照群および陽性対照群には基礎飼料のみを与えた。

AFC アッセイ群については、試験 24 日に全動物に抗原としてヒツジ赤血球 0.2mL (7.5×10^7 個) を静脈内投与し、陽性対照群には試験 24~27 日の 4 日間に、免疫抑制剤であるシクロホスファミドを 50mg/kg 用量で毎日 1 回、10mL/kg の液量で腹腔内投与した。

NKC アッセイ群については、陽性対照群を対象として試験 27 日に、NKC 除去のために抗アシアロ GM1 抗体 0.2mL を静脈内投与した。

試験設計を次表にまとめる。

<AFC アッセイ群>

群	検体の投与量 (ppm)	陽性対照物質の投与量 (シクロホスファミド) (mg/kg/日)	抗原の投与量 (ヒツジ赤血球、 7.5×10^7 個) (mL/マウス)	雌動物数
陰性対照	0	0	0.2	10
パラコート原体	25	0	0.2	10
	75	0	0.2	10
	100	0	0.2	10
	0	50	0.2	10

<NKC アッセイ群>

群	検体の 投与量 (ppm)	陽性対照物質の投与量 (抗アジアロ GM1 抗体) (mL/マウス)	雌動物数
陰性対照	0	0	10
パラコート原体	25	0	10
	75	0	10
	100	0	10
陽性対照	0	0.2	10

試験項目および結果：

一般状態および生死；投与期間中毎日観察し、およそ週1回の頻度で詳細な身体検査を実施した。AFC および NKC アッセイ群ともに死亡は発現せず、一般状態の変化もみられなかった。なお、AFC アッセイ群の 75ppm 群 1 匹は、試験 20 日に行方不明となり、給餌および症状観察を実施できなかったため、発見後に屠殺した。

体重変化；試験-7 日から解剖時まで週 2 回記録した。

結果を表 1-1 (AFC アッセイ群) および表 1-2 (NKC アッセイ群) に示す。

表 1-1. 体重変化 (AFC アッセイ群)

群		検体			陽性対照 ^{a)}
投与量		25ppm	75ppm	100ppm	50mg/kg
体重	試験 7 日	101	100	99	100
	試験 14 日	103	101	99	100
	試験 21 日	104	101	99	100
	試験 28 日	104	100	101	99
体重 増加量	試験 0~3 日	100	100	60	100
	試験 14~17 日	*157	86	100	129
	試験 17~21 日	*(-0.4) ^{b)}	(-0.1) ^{b)}	(-0.2) ^{b)}	**(-0.4) ^{b)}
	試験 24~28 日	(0.2) ^{b)}	(0.2) ^{b)}	(0.4) ^{b)}	*(-0.5) ^{b)}
累積 体重 増加量	試験 0~7 日	75	75	(-0.1) ^{c)}	100
	試験 0~14 日	138	113	63	113
	試験 0~21 日	129	100	64	100
	試験 0~28 日	122	96	100	96

a)：シクロホスファミド

表中の数字は、対照群を 100 とした場合の変動の目安 (%) を示す。算出できない場合は、括弧内に群平均値を示す。対照群の平均値は次の通り：b)：-0.1g、c)：0.4g

統計解析：陰性対照群と検体投与群の比較：ANOVA および Dunnett の検定 (*p<0.05)

陰性対照群と陽性対照群の比較：ANOVA および Student の t-検定 (*p<0.05、**p<0.01)

表 1-2. 体重変化 (NKC アッセイ群)

群		検体			陽性対照 ^{a)}
投与量		25ppm	75ppm	100ppm	50mg/kg
体重	試験 0 日	101	101	97	102
	試験 7 日	101	100	100	102
	試験 14 日	100	100	100	100
	試験 21 日	102	100	100	100
	試験 28 日	101	100	100	*96
体重 増加量	試験-2~0 日	133	100	**(-0.4) ^{b)}	167
	試験 0~3 日	400	100	**700	(0.0) ^{c)}
	試験 10~14 日	100	200	50	**(-0.4) ^{d)}
	試験 24~28 日	25	75	75	**(-0.3) ^{e)}
累積 体重 増加量	試験 0~3 日	400	100	**700	(0.0) ^{e)}
	試験 0~10 日	88	63	*175	113
	試験 0~17 日	110	120	*190	90
	試験 0~28 日	100	91	130	**52

a) : 抗アシアロ GM1 抗体

表中の数字は、対照群を 100 とした場合の変動の目安 (%) を示す。算出できない場合は、括弧内に群平均値を示す。対照群の平均値は次の通り : b) : 0.3g、c) : 0.1g、d) : 0.2g、e) : 0.4g

統計解析 : 陰性対照群と検体投与群の比較 : ANOVA および Dunnett の検定 (*p<0.05、**p<0.01)

陰性対照群と陽性対照群の比較 : ANOVA および Student の t-検定 (*p<0.05、**p<0.01)

AFC および NKC アッセイ群ともに、検体投与による変化はみられなかった。

摂餌量 ; 試験-7 日から解剖時まで週 1 回測定した。

結果を表 2-1 (AFC アッセイ群) および表 2-2 (NKC アッセイ群) に示す。

表 2-1. 摂餌量 (AFC アッセイ群)

群	検体			陽性対照 ^{a)}
投与量	25ppm	75ppm	100ppm	50mg/kg
試験 0~7 日	104	109	107	109
試験 7~14 日	100	110	104	104
試験 14~21 日	109	109	93	96
試験 21~28 日	**160	113	**140	113

表中の数字は、対照群を 100 とした場合の変動の目安 (%) を示す。

a) : シクロホスファミド

統計解析 : 陰性対照群と検体投与群の比較 : ANOVA および Dunnett の検定 (**p<0.01)

陰性対照群と陽性対照群の比較 : ANOVA および Student の t-検定 (有意差なし)

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

表 2-2. 摂餌量 (NKC アッセイ群)

群	検体			陽性対照 ^{a)}
	25ppm	75ppm	100ppm	50mg/kg
試験 0~7 日	92	96	90	94
試験 7~14 日	106	98	102	102
試験 14~21 日	91	103	95	83
試験 21~28 日	**146	115	**150	112

表中の数字は、対照群を 100 とした場合の変動の目安 (%) を示す。

a) : 抗アシアロ GM1 抗体

統計解析 : 陰性対照群と検体投与群の比較 : ANOVA および Dunnett の検定 (**p<0.01)

陰性対照群と陽性対照群の比較 : ANOVA および Student の t-検定 (*p<0.05)

AFC および NKC アッセイ群ともに、検体投与による変化はみられなかった。

検体摂取量 ; 投与期間中の平均検体摂取量を次表に示す。

投与量 (ppm)		25 (18)	75 (54)	100 (72)
検体摂取量 (mg/kg/日)	AFC アッセイ群	6.8 (4.9)	19.6 (14.2)	26.4 (19.1)
	NKC アッセイ群	6.9 (5)	20.1 (14.6)	28.1 (20.4)
	計	6.9 (5)	19.9 (14.4)	27.3 (19.8)

括弧内はパラコートイオン換算値を示す。

AFC アッセイ ; 試験 28 日 (ヒツジ赤血球抗原投与後 4 日) に、二酸化炭素吸入による屠殺後に脾臓を摘出し、脾臓細胞懸濁液を調製し、Plaque Forming Cell アッセイにより、ヒツジ赤血球抗原に対する IgM 抗体産生細胞数を計測した。

結果を表 3 に示す。

表 3. 抗体測定結果

群	陰性対照	検体			陽性対照 ^{a)}
		25ppm	75ppm	100ppm	b) 50mg/kg
脾臓細胞数 ($\times 10^7$ 個)	13.07 \pm 1.22	14.04 \pm 3.11	11.56 \pm 2.32	13.60 \pm 3.18	**4.90 \pm 0.93
IgM 抗体産生細胞数 / 脾臓細胞 10^6 個	1117 \pm 337	908 \pm 270	1041 \pm 281	1057 \pm 197	**0 \pm 0
IgM 抗体産生細胞数 / 脾臓 ($\times 10^3$ 個)	147 \pm 51	125 \pm 37	118 \pm 28	142 \pm 34	**0 \pm 0

表中の数字は群平均値 \pm SD を示す。

a) : シクロホスファミド

統計解析 : 陰性対照群と検体投与群の比較 : ANOVA および Dunnett の検定 (有意差なし)

陰性対照群と陽性対照群の比較 : ANOVA および Student の t-検定 (**p<0.01)

b) : Jonckheere の検定 (有意差なし)

検体投与による抗体反応の低下はみられなかった。

陽性対照物質では、予め予測された通りに、抗体反応がみられず、この試験法により免疫抑制作用が検出されたことが明らかであった。

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。

NKC アッセイ ; 試験 28 日に、二酸化炭素吸入による屠殺後に脾臓を摘出して脾臓細胞懸濁液を調製し、500 μ Ci の 51 Cr で標識した YAC-1 細胞 (マウスリンパ腫) を添加して培養した後、放射活性を測定して NKc 活性を求めた。
結果を表 4 に示す。結果は、脾臓細胞と YAC-1 細胞の比率 (E/T 比) ごとに示した。

表 4. NKc 活性測定結果

群	陰性対照	検体				陽性対照 ^{a)}
		投与量	25ppm	75ppm	100ppm	
NKc 活性	E/T 比=200/1	11.9 \pm 2.2	13.5 \pm 2.0	13.5 \pm 3.4	12.6 \pm 3.4	**1.2 \pm 0.8
	E/T 比=100/1	7.7 \pm 1.2	8.5 \pm 1.2	9.0 \pm 2.4	8.0 \pm 2.0	**<1
	E/T 比=50/1	5.5 \pm 0.9	5.7 \pm 0.8	6.1 \pm 1.5	5.4 \pm 2.0	**<1
	E/T 比=25/1	3.7 \pm 0.5	4.2 \pm 0.6	4.3 \pm 1.3	3.8 \pm 1.0	**<1
	E/T 比=12.5/1	2.9 \pm 0.6	3.0 \pm 0.5	3.1 \pm 0.9	2.5 \pm 1.2	**<1
	E/T 比=6.25/1	2.3 \pm 0.6	2.2 \pm 0.6	2.3 \pm 0.9	2.1 \pm 1.2	**<1

表中の数字は群平均値 \pm SD (NKc 活性の単位は%) を示す。

a) : 抗アジアロ GM1 抗体

統計解析 : 陰性対照群と検体投与群の比較 : ANOVA および Dunnett の検定 (有意差なし)

陰性対照群と陽性対照群の比較 : ANOVA および Student の t-検定 (**p<0.01)

b) : Jonckheere の検定 (有意差なし)

検体投与による NKc 活性の低下はみられなかった。

陽性対照物質では、予め予測された通りに、NKc 活性の明確な低下がみられ、この試験法により免疫抑制作用が検出されたことが明らかであった。

臓器重量 ; 試験 28 日に、全例を対象として二酸化炭素吸入により屠殺し、肺、脾臓および腎臓 (AFC および NKc アッセイ群)、並びに胸腺 (NKc アッセイ群) の重量を測定した。
結果を表 5-1 (AFC アッセイ群) および表 5-2 (NKc アッセイ群) に示す。

表 5-1. 臓器重量の測定結果 (AFC アッセイ群)

群	投与量	検体			陽性対照 ^{a)}
		25ppm	75ppm	100ppm	
最終体重 ^{b)}		104	100	101	99
腎臓	絶対重量 ^{b)}	*108	103	103	104
	調整値 ^{c)}	104	102	102	105
	体重比 ^{d)}	104	102	102	105
肺	絶対重量 ^{b)}	106	102	98	**114
	調整値 ^{c)}	104	102	98	**115
	体重比 ^{d)}	102	102	98	115
脾臓	絶対重量 ^{b)}	103	100	96	**53
	調整値 ^{c)}	104	100	96	**53
	体重比 ^{d)}	99	100	95	54

表中の数字は、対照群を 100 とした場合の変動の目安 (%) を示す。

a) : シクロホスファミド

統計解析 :

b) : 陰性対照群と検体投与群の比較 : ANOVA および Dunnett の検定 (*p<0.05)

陰性対照群と陽性対照群の比較 : ANOVA および Student の t-検定 (**p<0.01)

c) : 最終体重を共変数とした共分散分析 (**p<0.01)

d) : 検定実施せず。

表 5-2. 臓器重量の測定結果 (NKC アッセイ群)

群		検体			陽性対照 ^{a)}
投与量		25ppm	75ppm	100ppm	0.2mL
最終体重 ^{b)}		101	100	100	*96
腎臓	絶対重量 ^{b)}	101	100	102	101
	調整値 ^{c)}	100	101	101	*105
	体重比 ^{d)}	100	101	101	105
肺	絶対重量 ^{b)}	111	99	101	97
	調整値 ^{c)}	110	100	100	102
	体重比 ^{d)}	110	100	101	100
脾臓	絶対重量 ^{b)}	97	96	97	101
	調整値 ^{c)}	96	97	97	*109
	体重比 ^{d)}	96	96	97	105
胸腺	絶対重量 ^{b)}	110	113	116	99
	調整値 ^{c)}	110	113	115	101
	体重比 ^{d)}	109	113	116	103

表中の数字は、対照群を 100 とした場合の変動の目安 (%) を示す。

a) : 抗アシアロ GM1 抗体

統計解析:

b) : 陰性対照群と検体投与群の比較: ANOVA および Dunnett の検定 (有意差なし)

陰性対照群と陽性対照群の比較: ANOVA および Student の t-検定 (*p<0.05)

c) : 最終体重を共変数とした共分散分析 (*p<0.05)

d) : 検定実施せず。

AFC および NKC アッセイ群ともに、検体投与による変化はみられなかった。

AFC アッセイ群の陽性対照群では、予測された通りに、脾臓重量に顕著な低値がみられた。

肉眼的病理検査; 全例を対象として実施した。

検体または陽性対照物質投与による変化はみられなかった。

以上より、本剤を雌マウスに 28 日間混餌投与した結果、免疫系への影響は認められず、無影響量 (NOEL) は AFC および NKC アッセイともに 100ppm (最小値 26.4mg/kg/日) [パラコートイオン換算値として 72ppm (最小値 19.1mg/kg/日)] と判断された。