

ウサギに対する催奇形性試験（1）

毒性資料 No. 原体-38

試験機関：

報告書作成年：1978年

検体の純度：

供試動物：New Zealand White 系妊娠ウサギ（NZW: Scheele Werl）、体重（妊娠0日）2.7～3.8kg、1群 雌15匹

投与期間：妊娠6～18日の13日間 [1989年5～7月]

投与方法：超微粉化した検体を溶媒（NaCl 0.9%, Myrj* 0.085%水溶液）に懸濁させ、0、5、50及び500mg/kgの投与量で妊娠6日から18日まで毎日1回、強制単回経口投与した（投与容量：10mL/kg）。対照群には溶媒を同量投与した。

*（ステアリン酸ポリオキシエチレン 50）

交配方法：交配には同系統の雄を用い、1：1で同居させた。膣スメア検査で交尾を確認し、確認できた日を妊娠0日とした。

観察・検査項目：

母動物：一般状態及び生死を毎日観察した。体重は妊娠0、6、18及び28日に測定した。妊娠28日に全ての母動物を屠殺し、剖検後に帝王切開した。そして黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数、初期・後期死胚数を検査した。また、以下の指標を算出した。

受胎率(%) = (着床確認雌数 / 交尾雌数) × 100

妊娠率(%) = (担生存胎児雌数 / 着床確認雌数) × 100

着床前死胚率(%) = ((黄体数 - 着床数) / 黄体数) × 100

着床後死胚率(%) = ((着床数 - 生存胎児数) / 着床数) × 100

生存胎児：性別及び体重を記録し、外表異常の有無を検査した。約2/3の胎児については内臓除去後にアルコール固定してアリザリンレッドS染色骨格標本作製し、骨格異常の有無、骨格変異を検査した。残りの胎児についてはWilson法に従い内臓検査を行った。

結果：表1に母動物、表2に胎児に対する検査の概要を示した。

1. 母動物への影響

試験期間中を通じて検体投与に起因したと思われる一般症状は認められなかった。対照群と50mg/kg群の各1例に死亡、5mg/kg群の1例に流産を観察したがいずれも検体投与との関連性はないと考えられた。また各投与群共、投与(6-18日)及び妊娠期間中(0-28日)の体重増加量において対照群との間に明らかな差はみられず、母動物の体重への影響は認められなかった。さらに剖検では特筆すべき肉眼的異常所見は観察されなかった。

繁殖成績において受胎率、妊娠率に検体投与の明らかな影響はみられなかった。

着床所見では黄体数、着床数、着床前死胚数及び生存胎児数には統計学的有意な変動はみられなかった。着床後死胚率については50mg/kg群で初期死胚の増加に伴った統計学的有意な増加が認められた。しかし、用量に依存した増加がみられないことから検体投与と関連したものとは考えられなかった。

以上、500mg/kgの検体投与でも母動物に対する毒性影響は認められなかった。

2. 胎児への影響

胎児の性比及び胎児重量については各投与群で統計学的有意な変動を認めなかった。

外表検査においてはすべての胎児に異常を認めなかった。

内臓検査では、内臓異常の頻度の有意な増加は観察されなかった。一方、内臓変異(軽度腎盂拡張及び腹/胸腔内出血)を有する胎児の増加が500mg/kg群で統計学的有意にみられたが、各所見で見ると、軽度の腎盂拡張の頻度の有意な増加は最低用量5mg/kgと最高用量500mg/kg群で見られ、中間用量では有意な変化がなく、用量に依存した明らかな増加ではなかった。また、腹腔あるいは胸腔内出血は用量に依存した明らかな増加はみられなかった。これらの内臓変異所見が用量に依存していないことに加えて、内臓変異の背景対照値()と比較して本試験での対照群の頻度(36.6%)が比較的低かったことより、検体投与による影響とは捉えられなかった。

骨格検査において、骨格異常所見が散見されたがいずれも自然発生的なものであり投与と関連しないものと判断された。

骨格変異所見として13肋骨の頻度の増加が50及び500mg/kg群で統計学的有意に認められた。しかし本所見の背景対照値()と比較して本試験での対照群の頻度(26.4%)が明らかに低かったことから、本所見の頻度の増加については検体投与には関連がないものと判断した。

* 試験実施施設における背景値

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

以上、ウサギに対する催奇形性試験において、母動物に対しては 500mg/kg でも影響はみられなかった。また胎児に対しても 500mg/kg で明らかな影響は観察されなかった。よって本試験における無毒性量は母動物、胎児共に 500mg/kg/日と判断した。また、催奇形性を示唆する所見はみられなかった。

表 1. 母動物への影響

投与群 (mg/kg/日)		0	5	50	500
母動物	1群あたりの動物数	15	15	15	15
	一般症状	-	-	-	-
	死亡動物数	1	0	1	0
	体重増加量 [実測値、kg]				
	投与期間(6-18日)	0.2	0.1	0.2	0.2
	妊娠期間(0-28日)	0.5	0.4	0.5	0.3
	肉眼的病理検査	-	-	-	-
	交尾雌数	15	15	15	15
	着床確認雌数	13	15	13	14
	担生存胎児雌数	12	14	12	14
	流産動物数	0	1	0	0
	全吸収胚動物数	0	0	0	0
	受胎率 (%)	87	100	87	93
	妊娠率 (%)	100	93	92	100
	着床所見 (腹あたり)	黄体数	9.3	8.1	9.1
着床数		8.3	7.5	8.1	7.8
着床前死胚数		1.0	0.6	1.0	1.4
着床前死胚率 (%)		10.8	7.4	11.0	15.2
胎児数		7.8	6.9	7.0	7.6
生存胎児数		7.8	6.9	6.8	7.5
死亡胎児数		0	0.1	0.3	0.1
着床後死胚数		0.5	0.6	1.1	0.1
初期死胚数		0.5	0.5	1.0	0.1
後期死胚数		0	0.1	0.1	0.1
着床後死胚率 (%)	6.0	8.6	↑16.5	3.7	

↓↑ : p<0.05 (計量値 : Dunnett 多重検定または Wilcoxon 検定)
(計数値 : Fisher 直接確率計算法)

^{a)} 対照を 100 とした場合の値

- : 検体投与に関連した所見を認めず/有意差なし

表 2. 胎児への影響

投与群 (mg/kg/日)	0	5	50	500
対象となる母動物数	12	14	12	14
合計生存胎児数	94	97	84	107
性比 (雄の割合、%)	54	46	46	55
平均体重 (g) (両性)	34.3	34.9	33.1	28.5
外表検査				
検査動物数	94	97	84	107
異常	-	-	-	-
内臓検査：() は腹数, [%]				
検査動物数	41 (5)	36 (6)	55 (6)	42 (6)
内臓異常				
腎盂拡張 (重度)	1 (1) [2.4]	2 (1) [5.6]	2 (2) [3.6]	6 (3) [14.3]
内臓変異	15 (5) [36.6]	18 (4) [50.0]	16 (4) [29.1]	↑ 26 (6) [61.9]
腎盂拡張 (軽度)	2 (2) [4.9]	↑ 10 (3) [27.8]	8 (4) [14.5]	↑ 13 (6) [31.0]
腹腔あるいは 胸腔内出血	13 (4) [31.7]	9 (4) [25.0]	10 (4) [18.2]	13 (5) [31.0]
骨格検査：() は腹数, [%]				
検査動物数	53 (7)	61 (9)	29 (6)	65 (8)
骨格異常				
胸骨核異形	2 (2) [3.8]	1 (1) [1.6]	-	1 (1) [1.5]
肋骨癒着 (一部)	-	1 (1) [1.6]	-	-
骨格変異				
胸骨核の 非対称/不完全骨化	39 (7) (73.6%)	30 (9) [49.2]	16 (5) [55.2]	32 (8) [49.2]
13 肋骨	14 (6) [26.4]	16 (9) [26.2]	↑ 15 (5) [51.7]	↑ 42 (8) [64.6]

↓ ↑ : p<0.05 (計量値 : Dunnett 多重検定または Wilcoxon 検定)
(計数値 : Fisher 直接確率計算法)

- : 検体投与に関連した所見を認めず

ウサギに対する催奇形性試験 (2)

毒性資料 No. 原体-39

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1986 年

検体の純度 :

供試動物 : New Zealand White 系妊娠ウサギ (NZW: Interfauna, UK)、体重(妊娠 0 日 ; 群平均の範囲) 3.92~3.99kg、1 群 雌 15 匹

投与期間 : 妊娠 6~18 日の 13 日間 [1985 年 6~8 月]

投与方法 : 検体を溶媒に懸濁させ、0、50、225 及び 1000mg/kg の投与量で妊娠 6 日から 18 日まで毎日 1 回、強制経口投与した (投与容量 : 4mL/kg)。対照群には溶媒を同量投与した。

交配方法 : 3 日間の交配期間を設けた。交配には同系統の雄を用い、1 : 1 で同居させ、最高 3 匹の雄と同居させた。交配を確認した日を妊娠 0 日とした。
(交配の確認方法については報告書に記載なし。)

観察・検査項目 :

母動物 : 一般状態及び生死を毎日観察した。体重は妊娠 0、6、9、12、15、19、22、26 及び 29 日に測定した。摂餌量は妊娠 3~29 日の毎日測定した。

妊娠 29 日に全ての母動物を屠殺し、子宮を摘出、重量を測定した。そして、黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数、初期・後期死胚数を検査した。また、以下の指標を算出した。

受胎率(%) = (着床確認雌数 / 交尾雌数) × 100

妊娠率(%) = (担生存胎児雌数 / 着床確認雌数) × 100

着床前死胚率(%) = ((黄体数 - 着床数) / 黄体数) × 100

着床後死胚率(%) = ((着床数 - 生存胎児数) / 着床数) × 100

生存胎児 : 性別及び体重を記録し、外表異常の有無を検査した。約 2/3 の胎児についてはエタノール固定後に胸腔及び腹腔内の臓器を調べ、内臓除去後アリザリンレッド S 染色骨格標本を作製し、骨格異常の有無、骨格変異を検査した。残りの胎児については Wilson 法に従い内臓検査を行った。

結 果：表 1 に母動物、表 2 に胎児に対する検査の概要を示した。

1. 母動物への影響

試験期間中を通じて検体投与に起因したと思われる一般症状は認められなかった。妊娠 17 日に対照群の 1 例が投与ミスにより切迫殺、また 50mg/kg 群で 2 例に流産がみられたため屠殺した。いずれも検体投与との関連性はないと判断した。

妊娠期間を通じて統計学的有意な体重の低値や体重増加量の減少は認められなかった。

摂餌量については 1000mg/kg 群で減少がみられ、妊娠 3 日から 29 日までの総量は対照群の 77%と明らかな減少が観察された。

繁殖成績において受胎率、妊娠率に検体投与の明らかな影響はみられなかった。

また着床所見でも、黄体数、着床数、着床前及び着床後死胚数、さらに生存胎児数には統計学的有意な変動はみられなかった。

以上、1000mg/kg の検体投与で母動物における摂餌量の減少がみられたが、繁殖成績や着床所見に変動は認められなかった。

2. 胎児への影響

胎児の性比については各投与群で統計学的有意な変動を認めなかった。

胎児重量では 1000mg/kg 群で統計学的有意な減少が認められた。

外表及び内臓検査で対照群を含む各試験群で種々の所見が散見されたが、統計学的有意な頻度の増加、あるいは用量に依存した頻度の増加を示す所見は認められなかった。

骨格検査において種々の骨格異常所見が散見されたが、統計学的有意な頻度の増加、あるいは用量に依存した頻度の増加を示す所見は認められなかった。骨格変異所見としては 12 肋骨のみの所見頻度の増加が 1000mg/kg 群で統計学的有意に認められた。またこれに関連して 13 肋骨の痕跡あるいは完全骨を有する所見の減少傾向が 1000mg/kg 群で窺われた。しかし 12 肋骨のみの所見増加における毒性学的意義は低く、毒性影響とは捉えられなかった。また冠状あるいは矢状縫合の不整所見の減少が統計学的有意に全投与群でみられたが、対照群での偶発的な所見の増加によるものであり、検体投与との関連はないものと判断した。

骨化遅延に関して、1000mg/kg 群で頭蓋骨の骨化遅延を示す胎児の増加が統計学的有意に観察された。これについては同群で胎児重量の減少が認められており、胎児重量減少と関連した二次的な影響が示唆された。他に四肢の骨

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

端部の未骨化や腰椎骨側突起の骨化遅延などの所見がみられたが、これらの所見については用量に依存した頻度の増加が明らかではなく検体投与によるものとは思われなかった。

以上、ウサギに対する催奇形性試験において、1000mg/kg で母動物に対し摂餌量の減少がみられた。また胎児に対しては体重減少が認められ、体重低下に関連した二次的な影響と考えられる頭蓋骨の骨化遅延が観察された。母動物の摂餌量と胎児体重に影響を認めない用量では骨化遅延所見の有意な増加は見られなかった。

本試験における無毒性量は母動物、胎児共に 225mg/kg/日と判断された。

表 1. 母動物への影響

投与群 (mg/kg/日)		0	50	225	1000	
母動物	1群あたりの動物数	15	15	15	15	
	一般症状	-	-	-	-	
	死亡動物数	1*	0	0	0	
	体重増加量 (kg)					
	投与期間 (6-19日)	0.27	0.25	0.30	0.22	
	補正体重増加量 (kg) #1					
	妊娠期間 (0-29日)	0.13	0.10	0.13	0.03	
	総摂餌量 ^{a)}					
	妊娠期間 (3-28日)	-	95	96	77	
	交尾雌数	15	15	15	15	
	着床確認雌数	14	15	15	15	
	担生存胎児雌数	13	13	15	15	
	流産動物数	0	2	0	0	
	死亡動物数	1	0	0	0	
	全吸収胚動物数	0	0	0	0	
	受胎率 (%)	93	100	100	100	
	妊娠率 (%)	93	87	100	100	
	着床所見 (腹あたり)	黄体数	10.9	10.5	10.9	11.8
		着床数	9.5	9.2	9.7	10.1
着床前死胚数		1.4	1.3	1.2	1.7	
着床前死胚率 (%) #2		13.4	12.5	10.4	14.1	
生存胎児数		7.9	7.5	8.1	8.1	
初期死胚数		0.6	0.2	0.6	1.0	
後期死胚数		0.5	1.1	0.6	0.3	
死亡胎児数		0.5	0.5	0.5	0.7	
着床後死胚数		1.5	1.7	1.7	2.0	
着床後死胚率 (%) #2		16.2	18.5	17.1	19.7	

(計量値：順位和検定、一部申請者実施、総摂餌量は検定できず)

(計数値：Fisher 直接確率計算法、一部申請者実施)

-：検体投与に関連した所見なし

^{a)} 対照を 100 とした場合の値

* 投与による死亡

^{#1} 補正体重増加量：妊娠 29 日体重 - 妊娠 0 日体重 - 子宮重量

^{#2} 着床前及び後死胚率：群合計から算出

表 2. 胎児への影響

投与群 (mg/kg/日)	0	50	225	1000
対象となる母動物数	13	13	15	15
生存胎児数	103	97	121	122
性比 (雄の割合、%)	52	54	53	51
平均体重 ^{a)} (両性)	-	-	-	↓ 86
外表及び内臓検査: () は腹数, [%]				
検査動物数	103 {35}	97 {32}	121 {39}	122 {41}
異常	3 (3) [2.9]	2 (2) [2.1]	2 (2) [1.7]	1 (1) [0.8]
重複奇形	2 ¹⁾²⁾ (2) [2.0]	-	1 ³⁾ (1) [0.8]	1 ⁴⁾ (1) [0.8]
肺動脈弁閉鎖	1 (1) [1.0]	-	-	-
水腎症 (片側)	-	2 (2) [2.1]	-	-
尿管水腫 (片側)	-	1 (1) [1.0]	-	-
扁平頭蓋	-	-	1 (1) [0.8]	-
変異				
側脳室拡張 (軽度)	-	-	1 (1) [0.8]	-
左頸動脈起始異常	6 (6) [5.8]	4 (4) [4.1]	2 (2) [1.7]	2 (2) [1.6]
心膜内出血	-	2 (2) [2.1]	2 (2) [1.7]	3 (3) [2.5]
胸腔内出血	1 (1) [1.0]	-	2 (2) [1.7]	1 (1) [0.8]
異所性腎 (両側)	1 (1) [1.0]	-	-	-
異所性腎 (片側)	-	-	1 (1) [0.8]	2 (2) [1.6]
腹腔内出血	9 (7) [8.7]	5 (4) [5.2]	5 (5) [4.3]	4 (4) [3.3]

↓ ↑ : p<0.05 (計量値: 順位和検定)
(計数値: Fisher 直接確率計算法、申請者実施)
{ } 検査動物の内 Wilson 法で検査した胎児数
- : 所見なし

- 1) 肺動脈弁閉鎖、心室中隔欠損
- 2) 短尾、腹部膨満、腎臓萎縮、肝臓肥大、右心房肥大
- 3) 心室中隔欠損、動脈管遺残
- 4) 単眼、長鼻、水頭症

表 2. 胎児への影響 (続き)

投与群 (mg/kg/日)	0	50	225	1000
対象となる母動物数	13	13	15	15
合計生存胎児数	103	97	121	122
骨格検査：() は腹数, [%]				
検査動物数	68	65	82	81
異常	3(3) [4.1]	6(6) [8.5]	8(6) [9.8]	7(3) [8.6]
骨盤帯不整合 (腰仙椎部側弯伴う)	1(1) [1.5]	5(5) [7.7]	6(6) [7.3]	5(4) [6.2]
骨盤帯不整合 (側弯伴わない)	-	1(1) [1.5]	1(1) [1.2]	1(1) [1.2]
半円型椎骨(8-10尾 椎) 及び10-11尾椎骨癒着	1(1) [1.5]	-	-	-
手根骨屈曲	1(1) [1.5]	-	1(1) [1.2]	1(1) [1.2]
変異				
冠状あるいは矢状 縫合の不整	6(4) [8.8]	↓ 0	↓ 0	↓ 1(1) [1.2]
12肋骨のみ(両側)	27(9) [39.7]	23(8) [35.4]	32(13) [39.0]	↑ 47(14) [58.0]
13肋骨/痕跡	20(10) [29.4]	16(9) [24.6]	22(13) [26.8]	15(10) [18.5]
13肋骨/痕跡及び完全	7(7) [10.3]	6(4) [9.2]	11(8) [13.4]	4(4) [4.9]
13肋骨/完全(両側)	14(8) [20.6]	20(10) [30.8]	17(9) [20.7]	15(4) [18.5]
骨化遅延				
頭蓋骨/骨化遅延	8(8) [11.8]	9(6) [13.8]	9(5) [11.7]	↑ 22(9) [27.2]
脛骨・大腿骨骨端部 /未骨化	9(7) [13.2]	13(7) [20.0]	11(5) [14.3]	19(10) [23.5]
四肢全骨端部/未骨化	-	↑ 5(4) [7.7]	-	↑ 6(4) [7.4]
腰椎骨側突起/骨化遅延	3(2) [4.4]	8(5) [12.3]	-	10(8) [12.5]

↓ ↑ : p<0.05 (計数値 : Fisher 直接確率計算法、申請者実施)

- : 所見なし

ウサギに対する催奇形性試験 (3)

毒性資料 No. 原体-40

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1992 年

検体の純度 :

供試動物 : New Zealand White 系妊娠ウサギ (NZW: Interfauna, UK)、15~24 週齢、
1 群 : 5 及び 71mg/kg 群は雌 16 匹、対照群と 1000mg/kg 群は雌 21 匹)

投与期間 : 妊娠 6~18 日の 13 日間 [1991 年 8~10 月]

投与方法 : 検体を 1%CMC 水溶液に懸濁させ、0、5、71 及び 1000mg/kg の投与量で妊娠
6 日から 18 日まで毎日 1 回、強制経口投与した (投与容量 : 10mL/kg)。対照
群には 1%CMC 水溶液を同量投与した。

用量設定の根拠 ;

交配方法 : 交配には同系統の雄を用い、少なくとも 1 時間は 1 : 1 で同居させ、交配
確認後に排卵促進剤を投与した。交配日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目 :

母動物 : 一般状態及び生死を毎日観察した。体重は妊娠 0、2、6、8、10、14、19、
23 及び 29 日に測定した。また体重測定日間の摂餌量を測定した。

妊娠 29 日に全ての母動物を屠殺し、子宮を摘出、重量を測定した。そして黄
体数、着床数、生存及び死亡胎児数、初期・後期死胚数を検査した。併せて
母動物の剖検を行った。また、以下の指標を算出した。

受胎率 (%) = (着床確認雌数 / 交尾雌数) × 100

妊娠率 (%) = (担生存胎児雌数 / 着床確認雌数) × 100

着床前死胚率 (%) = ((黄体数 - 着床数) / 黄体数) × 100

着床後死胚率 (%) = ((着床数 - 生存胎児数) / 着床数) × 100

生存胎児 : 性別及び体重を記録し、すべての胎児について外表及び内臓検査を行っ
た。この時点で異常所見がみられたものについてはさらに詳細検査が行われ
た。その後メチルアルコールで固定してアリザリンレッド S 骨格標本を作製
し、骨格検査を実施した。

所見の定義：胎児の各検査所見は以下の定義に従い分類した。

奇形；まれな所見であり、時として致命的な所見（例 無肢、外脳症）

異形；しばしばみられる所見であるが明らかに正常とは異なる所見（例 二葉胆のう、半球椎骨体）

変異；自然発生的によくみられる所見、一過性（骨化遅延等）の場合、恒久的（腰肋等）の場合がある。

結果：表1に母動物、表2に胎児に対する検査の概要を示した。

1. 母動物への影響

1000mg/kg 群の2匹がそれぞれ妊娠15及び20日で死亡した。うち1例は流産を伴った。またいずれも摂餌量の減少と体重低下がみられたが、他に所見がみられず、また予備試験では2000mg/kgの投与でも死亡がみられなかったことから、この2例の死亡については検体投与に起因したものではないと考えられた。

試験期間を通じて検体投与に関連したと思われる症状は観察されなかった。1000mg/kg 群で体重増加量の減少傾向がみられ、とくに妊娠6～14日では統計学的有意に減少した。また摂餌量についても1000mg/kg 群で減少（有意差なし）がみられた。

7及び51mg/kg 群では体重や摂餌量への影響は認められなかった。

剖検ではいずれも特筆すべき肉眼的異常所見は観察されなかった。

繁殖成績において受胎率、妊娠率に検体投与の明らかな影響はみられなかった。また着床所見でも、黄体数、着床数、着床前及び着床後死胚数、さらに生存胎児数には統計学的有意な変動はみられなかった。

2. 胎児への影響

胎児の性比及び重量については各投与群で統計学的有意な変動を認めなかった。

胎児の形態学的検査において種々の奇形所見が散見された。しかしいずれの所見についても頻度は低くまた用量に依存した頻度の増加は観察されなかった。また奇形を有する胎児数についても統計学的有意な変動は観察されなかった。

上記の奇形を有する胎児を除く胎児に対して行われた内臓及び骨格検査において、種々の内臓異形や骨格異形が観察された。内臓異形のうち頸部・胸部動脈異形の頻度が5及び71mg/kg 群で統計学的有意に増加した。しかし用量に依存した増加ではないことから投与には関連しない所見と判断した。また

表 1. 母動物への影響

投与群 (mg/kg/日)		0	5	71	1000
母動物	1群あたりの動物数	21	16	16	21
	一般症状	-	-	-	-
	死亡動物数	0	0	0	2 ^{#1}
	対象動物数 (担生存胎児雌数)	15	13	15	16
	体重増加量 ^{a)} 妊娠 6-14 日	-	-	-	↓78
	妊娠 6-19 日	-	-	-	(80)
	妊娠 6-29 日	-	-	-	(81)
	摂餌量 ^{a)} 妊娠 10-13 日	-	-	-	(88)
	妊娠 14-18 日	-	-	-	(89)
	妊娠 19-22 日	-	-	-	(89)
	肉眼的病理検査	-	-	-	-
	交尾雌数	21	16	16	21
	着床確認雌数	18	14	15	18
	担生存胎児雌数	15	13	15	16
	流産動物数	1 ^{#2}	1 ^{#3}	0	0
	死亡動物数	0	0	0	2
	全吸収胚動物数	1	0	0	0
	帝王切開前出産数	1 ^{#4}	0	0	0
	受胎率 (%)	86	88	94	86
	妊娠率 (%)	83	93	100	89
着床所見 (腹あたり)	#5 黄体数	10.5	11.5	11.3	11.1
	着床数	8.3	9.4	9.7	8.6
	着床前死胚数	2.2	2.1	1.6	2.5
	着床前死胚率 (%)	21.0	16.6	14.8	24.7
	生存胎児数	7.4	8.4	8.7	7.3
	初期死胚数	0.7	0.5	0.4	0.6
	後期死胚数	0.2	0.5	0.7	0.7
	死亡胎児数	0.0	0.0	0.0	0.0
着床後死胚数	0.9	1.0	1.0	1.3	
着床後死胚率 (%)	12.2	9.9	11.5	13.6	

↓↑ : p<0.05 (計量値 : Williams 検定) (計数値 : Fisher 直接確率計算法 (申請者実施))

() は参考値 (有意差なし)

- : 検体投与に関連した所見なし/有意差なし

a) 対照を 100 とした場合の値

#1 : 妊娠 15 及び 22 日, #2 : 妊娠 24 日, #3 : 妊娠 19 日, #4 : 妊娠 29 日

#5 : 流産、死亡、帝王切開前出産及び全吸収胚動物は含めず

表 2. 胎児への影響

投与群 (mg/kg/日)	0	5	71	1000
対象となる母動物数	15	13	15	16
合計生存胎児数	111	109	130	117
性比 (雄の割合、%)	58	57	53	50
平均体重 (両性)	-	-	-	-
外表/内臓/骨格検査: () は腹数, [腹あたりの平均%]				
検査胎児数	111	109	130	117
奇形				
担奇形胎児数	2 (2[2.4])	5 (4[5.2])	4 (3[4.1])	2 (2[1.5])
小眼症	-	-	1(1)	-
小眼球	-	-	1(1)	-
網膜不整	-	-	2(1)	-
扁平頭蓋(後頭突起)	-	-	1(1)	-
頸部・胸部動脈異常	-	1(1)	-	1(1)
肺動脈異常	1(1)	2(2)	-	1(1)
心室中隔欠損	-	1(1)	-	1(1)
心室拡張または萎縮	1(1)	-	-	-
胸部側弯	-	1(1)	-	-
脊髄裂	-	-	1(1)	-
腰部側弯	-	1(1)	-	-
臍帯ヘルニア	1(1)	-	-	-
無尾	-	-	1(1)	-
後肢回転異常	-	-	1(1)	-
内臓異形 (担奇形動物を除く) () は腹数, [腹あたりの平均%]				
検査胎児数	109	104	126	115
担内臓異形胎児数	4 (4[4.1])	9 (7[10.0])	11 (7[7.5])	4 (3[4.0])
角膜:混濁	-	-	1(1)	1(1)
虹彩出血	-	1(1)	2(2)	-
頸部・胸部動脈異形	-	↑6(5)	↑8(5)	2(2)
無気肺	1(1)	-	-	-
肝臓:小葉異常	1(1)	2(2)	-	-
肝臓:被膜下嚢胞	1(1)	-	-	-
二葉胆嚢	1(1)	-	-	-
卵巣:嚢胞	-	-	-	1(1)

↓ ↑ : p<0.05 (計量値:順位和検定)
(計数値: Mantel 検定、一部申請者による Fisher 検定)

- : 所見なし/有意差なし

表 2. 胎児への影響 (続き)

投与群 (mg/kg/日)	0	5	71	1000
対象となる母動物数	15	13	15	16
合計生存胎児数	111	109	130	117
骨格異形 (担奇形動物を除く) () は腹数, [腹あたりの平均%]				
検査胎児数	109	104	126	115
担骨格異形胎児数	20 (12[17.8])	8 (5[8.3])	14 (9[11.7])	12 (8[15.5])
縫合骨	2(2)	1(1)	5(4)	3(3)
頬骨・上顎骨：結合	7(4)	↓1(1)	2(1)	↓0(0)
頭骨：骨化不整	3(2)	1(1)	1(1)	-
頸椎骨：骨化不整	9(7)	↓1(1)	↓3(3)	6(3)
頸椎骨：部分癒合	1(1)	-	-	-
頸肋	1(1)	2(2)	-	-
頸部：側弯(軽微)	1(1)	-	-	-
胸部：肋軟骨不整	-	-	-	1(1)
胸骨：過剰核中心	-	2(1)	-	-
胸骨：核癒合	-	3(2)	3(2)	3(2)
胸骨：核異形	-	-	-	1(1)
胸骨：背・腹歪曲	-	-	-	1(1)
骨格変異 (担奇形動物を除く) () は腹数, [腹あたりの平均%]				
検査胎児数	109	104	126	115
12 肋骨	55(14)	55(12)	66(13)	57(13)
13 肋骨	54(15)	49(13)	60(15)	58(14)
胸骨核変異：合計	14[15.5]	11[11.4]	31[29.1]	35[31.0]
未骨化	9(5)	5(4)	23(9)	22(9)
萎縮	3(3)	4(3)	9(5)	12(6)
非対称/二分	3(2)	4(4)	4(3)	8(5)

↓↑ : p<0.05 (計数値 : Mantel 検定、一部申請者による Fisher 検定)

(13) 変異原性

細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験)

毒性資料 No. 原体-41

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1986 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* 5 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) を用い、Aroclor 1254 で誘導した Sprague-Dawley ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9-mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いてプレート法で変異原性を検索した。検体は溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて調製し、処理容量は 0.1 mL/プレートとした。濃度は 15, 50, 150, 500 及び 1500 μ g/プレートの 5 濃度とした。各濃度 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験及び溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 72 時間培養後、復帰変異コロニーを計数した。また、再現性をみるために日を改めて 2 回試験を実施した。溶媒対照に比し 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、統計学的有意な増加が濃度に依存してみられた場合、加えて再現性が見られた場合に変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠 :

結 果 : 結果を次表に示した。

表 1 に示したように、1 回目の試験において S9-mix の有無にかかわらず TA100 で復帰変異コロニー数の軽度の増加が認められた。また、1500 μ g/プレートでは各菌株で 抗菌作用が観察された。そこで 2 回目の試験においては最高濃度を 500 μ g/プレートで実施した。その結果、表 2 に示したごとく S9-mix の有無にかかわらず、いずれの菌株共、明らかな復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

TA100 については異なる結果が得られたため、3 回目の試験を行った。その結果、表 3 に示したように S9-mix の有無にかかわらず、明らかな復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。従って、1 回目で見られた TA100 における増加については検体によるものではないと判断した。

各試験における陽性対照群では、明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は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、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において復帰突然変異誘発性を有しないと考えられた。

表 1 復帰突然変異試験成績 (1回目)

(表中の値は3反復の平均値)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9-mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA1538	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	-	100	10	8	32	14
検 体	0		101	9	9	31	10
	15		145	10	11	35	14
	50		144	9	8	24	13
	150		203	11	9	17	12
	500		264	5	1	3	11
	1500		b	b	b	b	2
陽性対照							
NF	1		-	-	-	84	-
	2		-	-	42	-	-
ENNG	3	219	-	-	-	-	
	5	-	88	-	-	-	
9-AA	80	-	-	-	-	994	
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	+	128	13	12	35	13
検 体	0		128	10	12	29	11
	15		210	11	11	33	11
	50		200	11	9	27	13
	150		189	9	12	37	14
	500		140	8	9	28	8
	1500		46	b	3	13	3
陽性対照							
2-AA	0.5		-	71	99	-	72
	2		259	-	-	140	-

NF : 2-nitrofluorene

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

9-AA : 9-aminoacridine

2-AA : 2-amino-a-hracene

b : 抗菌作用あり、- : 未実施

表 2 復帰突然変異試験成績 (2回目)

(表中の値は3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9-mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA1538	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	-	107	11	11	37	12
検 体	0		125	9	11	41	8
	5		92	10	7	35	9
	15		102	7	9	37	8
	50		95	12	7	35	10
	150		100	7	7	33	7
	500		91	2	4	32	5
陽性対照							
NF	1		-	-	-	95	-
	2		-	-	38	-	-
ENNG	3	277	-	-	-	-	
	5	-	207	-	-	-	
9-AA	80	-	-	-	-	991	
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	+	124	11	10	41	10
検 体	0		135	12	10	43	10
	5		122	9	8	31	10
	15		123	11	10	44	10
	50		124	8	8	36	12
	150		116	6	7	41	12
	500		93	3	8	34	4
陽性対照							
2-AA	0.5		-	63	91	-	53
	2		258	-	-	138	-

NF : 2-nitrofluorene

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

9-AA : 9-aminoacridine

2-AA : 2-amino-a-hracene

b : 抗菌作用あり、- : 未実施

表 3 復帰突然変異試験成績 (3回目)

(表中の値は3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9-mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA1538	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	-	74	-	-	-	-
検 体	0		78	-	-	-	-
	5		86				
	15		83				
	50		74				
	150		81				
	500		81				
1500	47						
陽性対照 ENNG	3						
			214	-	-	-	-
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	+	76	-	-	-	-
検 体	0		92	-	-	-	-
	5		102				
	15		113				
	50		97				
	150		101				
	500		97				
1500	60						
陽性対照 2-AA	0.5						
			217	-	-	-	-

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

2-AA : 2-amino-a-hracene

- : 未実施

細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験)

毒性資料 No. 原体-42

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1987 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* 5 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) を用い、Aroclor 1254 で誘導した Sprague-Dawley 雄ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9-mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いてプレート法で変異原性を検索した。

検体は溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて調製し、処理容量は 0.05~0.1 mL/プレートとした。濃度は 1, 10, 100, 500, 1000, 2500, 5000 及び 10000µg/プレートの 8 濃度とした。各濃度 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験及び溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数した。また、再現性をみるために日を改めて 2 回試験を実施した。

3 濃度以上で用量相関ある増加がみられ、かつ溶媒対照に比し 最大で 3 倍以上 (TA98, TA100 では 2 倍以上) の復帰変異コロニー数の増加がみられた場合、加えて再現性がみられた場合に変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠 :

結 果 : 結果を表 1 及び 2 に示した。

2 回の試験共に S9-mix の有無にかかわらず、いずれの菌株でも明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められなかった。

各試験における陽性対照群では、明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において復帰突然変異誘発性を有しないと考えられた。

表 1 復帰突然変異試験成績 (1回目)

(表中の値は3反復の平均値)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9-mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA1538	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	-	118.7	14.5	17.7	26.3	13.0
検 体	1		116.0	13.7	18.3	21.7	9.3
	10		108.3	19.0	11.0	19.3	9.3
	100		110.3	14.0	13.3	25.3	8.3
	500		104.3	13.7	13.3	17.7	7.7
	1000		107.0	15.3	9.0	13.7	7.0
	2500		58.0	4.3	6.0	10.3	4.7
	5000		5.3	0	0	2.7	0
10000	0		0	0	0	0	
陽性対照							
NF	10	-	-	1146.3	1052.3	-	
NaN ₃	10	862.3	837.3	-	-	-	
QM	5	-	-	-	-	777.0	
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	+	114.3	12.3	26.0	34.0	14.3
検 体	1		116.0	8.3	26.7	35.7	12.7
	10		110.0	10.3	27.7	31.3	10.3
	100		129.7	11.0	32.3	32.0	10.0
	500		109.0	7.3	28.7	30.0	13.0
	1000		112.3	6.7	21.3	25.7	7.7
	2500		64.0	5.3	17.0	12.7	6.3
	5000		10.7	0	5.3	3.3	0
10000	0		0	0	0	0	
陽性対照							
2-AA	2.5	1655.7	349.3	1809.3	1597.3	297.0	

NF : 2-nitrofluorene

NaN₃ : Sodium Azide

QM : Quinacrine Mustard

2-AA : 2-amino-a-hracene

- : 未実施

表 2 復帰突然変異試験成績 (2回目)

(表中の値は3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9-mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA1538	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	-	88.7	11.0	11.7	30.0	7.3
検 体	1		106.3	10.0	9.7	29.0	8.7
	10		109.0	12.7	9.7	36.3	8.0
	100		113.3	10.0	10.3	31.7	11.7
	500		102.0	7.3	10.7	28.0	8.0
	1000		114.0	8.0	11.0	26.7	9.7
	2500		44.3	5.3	10.3	21.0	6.3
	5000		0	0	0	0	0
10000	0		0	0	0	0	
陽性対照							
NF	10	-		-	956.0	795.0	-
NaN ₃	10	764.3		839.3	-	-	-
QM	5	-	-	-	-	234.3	
溶媒対照 (DMSO)	0.1 mL	+	95.3	9.0	27.7	31.0	15.7
検 体	1		112.0	7.3	25.3	33.7	10.3
	10		106.0	7.7	25.0	32.0	11.0
	100		116.0	8.3	28.0	36.3	9.0
	500		97.3	7.3	21.0	29.3	11.3
	1000		116.0	9.0	19.0	18.7	10.3
	2500		55.3	6.0	15.0	18.7	8.3
	5000		0	0	2.0	0	0.7
10000	0	0	0	0	0		
陽性対照							
2-AA	2.5	1157.0	431.3	1088.0	1422.3	351.0	

NF : 2-nitrofluorene

NaN₃: Sodium Azide

QM : Quinacrine Mustard

2-AA : 2-amino-a-hracene

- : 未実施

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

細菌を用いた復帰変異試験

毒性資料 No. 原体-43

試験機関：

報告書作成年：1976年

検 体：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の5株 (TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100) を用い、Aroclor 1254 で酵素誘導したマウス肝から調製した薬物代謝酵素系 (S9-mix) の非存在下及び存在下でプレート法による復帰変異試験を行った。検体は Dimethylsulfoxide (DMSO) を用いて調製し、処理容量は 0.2mL/プレートとした。試験は 5~2500 μ g/プレートの5濃度で実施した。変異コロニーを計数し、溶媒対照に比し2倍以上の用量と関連性のある復帰変異コロニー数の増加が認められた場合に変異原性を有すると判定した。なお、陽性対照として 2-aminoanthracene を用いた。

結 果：結果を表に示した。

各菌株において代謝活性化の有無にかかわらず用量との関連を伴った復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-aminoanthracene は、S9-Mix を加えることにより活性化され、TA1537 を除くすべての菌株に明らかな復帰変異を誘起した。

以上、検体の復帰突然変異性は代謝活性化の有無にかかわらず陰性と考えられた。

試験結果

(1 濃度 1 プレート)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix の 有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
溶媒対照 (DMSO)		-	63	29	25	29	28
検体	5		65	30	29	37	32
	25		59	26	20	31	21
	125		40	23	21	34	20
	500		48	17	9	29	20
	2500 [#]		*	*	*	*	*
陽性対照 (2-AA)	0.5	51	33	15	40	19	
溶媒対照 (DMSO)		+	29	19	25	40	32
検体	5		23	15	25	56	36
	25		42	11	16	50	31
	125		40	20	22	41	31
	500		24	13	16	36	14
	2500 [#]		*	*	*	*	*
陽性対照 (2-AA)	0.5	119	143	26	84	74	

* : 菌株の生育阻止を認める

: 結晶析出

2-AA: 2-aminoanthracene

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

細菌を用いた変異原性試験 (Rec Assay 及び Ames 試験)

毒性資料 No. 原体-44

試験機関 :

報告書作成年 : 1980 年

検体の純度 :

(1) Rec Assay (DNA 修復試験)

試験方法: 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、この両株の -80°C 保存株を融解後、小型ピペットを用いて B-II 寒天培地上に出発点が接触しないようにストリークした。検体は Dimethylsulfoxide (DMSO) で希釈した (最高濃度: 500mg/mL、10mg/ディスク相当)。直径 10mm の濾紙 (ディスク) に 0.02mL を添加し、ストリークの開始点を覆うように置き、 37°C で一夜培養後、阻止帯の長さを測定した。そして両株での阻止長の差が 2mm 以上の場合を陽性と判定した。なお陰性対照として Kanamycin、陽性対照として Mitomycin C を用いた。

結果 :

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	0
検体	20	0	0	0
	100	0	0	0
	500	0	0	0
	1000	0	0	0
	2000	0	0	0
陰性対照 (Kanamycin)	10 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$	4	4	0
陽性対照 (Mitomycin C)	0.1 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$	7	1	6

検体処理で両株に全く生育阻止を認めなかった。

一方、陽性対照として用いた Mitomycin C では組換修復機構保持株に比し修復機構欠損株に著明な生育阻止帯を生じ、陰性対照として用いた Kanamycin では両株に同程度の生育阻止帯を認めた。

以上、Rec assay において、検体の DNA 損傷性は陰性と考えられた。

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

(2) Ames 試験 (復帰突然変異試験)

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 5 株 (TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100) 及びトリプトファン要求性大腸菌 (*Escherichia coli*) の 1 株 (WP2 *hcr*(*uvrA*)) を用い、Aroclor 1254 で酵素誘導したラット肝から調製した薬物代謝酵素系 (S9-mix) の非存在下及び存在下でプレート法による復帰変異試験を行った。検体は溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて調製し、処理容量は 0.1 mL/プレートとした。最高濃度は 5000 µg/プレートとし、1~5000 µg/プレートの 8 用量で実施した。各用量 2 枚のプレートを用いた。陽性対照及び溶媒対照も同時に設けた。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、溶媒対照に比し 2 倍以上の用量と関連性のある復帰変異コロニー数の増加が認められた場合に変異原性を有すると判定した。

結 果 :

次表に示したように、各菌株において S9-mix の有無にかかわらず用量との関連性を伴った復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

陽性対照として用いた AF-2、 β -propiolactone、9-aminoacridine、2-nitrofluorene では溶媒対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加を認めた。また、2-amino-anthracene は S9-Mix を加えることにより活性化され、試験に用いたすべての株に著明な復帰変異を誘起した。

以上の結果より、検体の復帰突然変異性は代謝活性化の有無にかかわらず陰性と考えられた。

(表中の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9- mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			WP2hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	8	12	107	4	11	22	
検体	1		15	6	124	6	12	25	
	5		11	7	113	5	10	30	
	10		12	8	121	10	16	20	
	50		13	5	117	6	9	19	
	100		9	10	123	9	10	29	
	500		14	7	140	5	3	25	
	1000		8	4	*106	*	*	15	
5000	3	*	*	*	*	*			
溶媒対照 (DMSO)	0	+	13	8	86	5	13	24	
検体	1		8	13	83	3	12	18	
	5		13	8	116	6	10	23	
	10		10	9	93	9	16	27	
	50		18	7	88	5	17	19	
	100		11	11	61	4	15	15	
	500		17	7	71	6	16	19	
	1000		10	*	58	3	11	11	
5000	5	*	*	*	*	*			
陽性 対照	AF-2	0.05			1073				
		0.1						357	
		0.25	>2000						
	β -p	50		1205					
	2-ni	50					>3000		
	9-ami	200				>10000			
	2-AA	10		17	14	162	16	20	40
	2-AA	10	+	183	344	>3000	195	>3000	>3000

* : 菌株の生育阻止を認める。

β -p : β -propiolactone
 2-ni : 2-nitrofluorene
 9-ami : 9-aminoacridine
 2-AA : 2-amino-Anthracene

哺乳動物細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (HPRT 前進突然変異試験)

毒性資料 No. 原体-45

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1987 年

検体の純度 :

試験方法 : チャイニーズハムスター肺由来 V79 細胞を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化系 (S9-mix) の存在下及び非存在下で、HPRT 遺伝子座の前進性遺伝子突然変異試験を行った。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し S9-mix 非存在下では 75, 100, 125, 150 及び 200 μ g/mL、S9-mix 存在下では 50, 75, 100, 125 及び 150 μ g/mL の濃度で試験を実施した。検体処理時間は 4 時間とし、検体処理後、変異原性の評価のため細胞を播種して 7~8 日間培養し、その後 6-チオグアニン (TG) を含む選択培地に再播種し、さらに 10 日間培養後に突然変異コロニーを計数した。培養は各濃度 12 枚のプレートを用い、2 反復で実施した。

細胞毒性の評価は検体処理後、細胞を播種して 7~8 日間培養後に溶媒対照に対するコロニー形成率を求めこれを指標とした。また、変異原性評価時におけるコロニー形成能をみるために再播種後のコロニー形成率を求めた。

結果の評価は用量相関性のある突然変異誘発頻度の増加がみられた場合を陽性とした。また、何れの場合も無処理、溶媒対照ならびに陽性対照 (5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (-S9) 及び 3-Methylcholanthrene (3-MCA) (+S9)) を同時に試験した。

濃度設定の根拠 :

結 果 : 本試験の結果を表 1 に示した。

S9-mix の非存在下条件では 150 μ g/mL の 2 反復のうちの 1 反復で統計学的有意な突然変異誘発頻度の増加がみられた。しかし濃度に依存した増加はみられず、その他の濃度でも頻度の増加はみられなかった。S9-mix の存在下条件ではいくつかの濃度区で統計学的有意な頻度の増加が観察された。しかし同様に濃度に依存した増加は認められなかった。さらにいずれも背景対照である $1 \sim 15 \times 10^{-6}$ の範囲にあり、突然変異誘発頻度の明らかな増加は観察されなかった。

陽性対照では突然変異誘発頻度の明らかな増加が認められ試験系の感受性が

確認された。

以上の結果より、チャイニーズハムスター肺由来 V79 細胞を用いての代謝活性化を含む HPRT 前進突然変異試験で、本検体は遺伝子突然変異誘発性を有さないと考えられた。

表 1. 前進突然変異試験成績

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9-Mix の有無	TG 処理前 コロニー 形成率 [#] (%)	TG 処理後 コロニー 形成率(%)	平均突然変 異誘発頻度 ($\times 10^{-6}$)
溶媒対照 (DMSO)	-	-	100	91	5.5
				100	2.1
検 体	75		104	107	1.6
			95	84	1.5
	100		79	110	3.0
			77	100	1.7
	125		41	105	2.8
			43	104	2.4
	150		40	73	↑8.0
			54	111	1.9
200	1		102	6.5	
	1		84	0.0	
陽性対照 (BrdU)	50		50	97	↑33.3
			57	100	↑25.9
溶媒対照 (DMSO)	-	+	100	109	1.1
				105	4.4
検 体	50		89	100	5.0
			88	104	↑8.4
	75		84	95	↑14.6
			88	99	↑6.7
	100		76	108	5.0
			72	104	↑5.6
	125		23	120	3.8
			32	95	↑5.7
150	1		75	0.0	
	1		75	4.5	
陽性対照 (3-MCA)	5		70	90	↑467.8
			73	109	↑459.1

↑ : $P < 0.05$ 、↑ : $P < 0.01$ (Kastenbaum & Bowman 検定)

: TG 処理前コロニー形成率 : 細胞毒性の指標、溶媒対照に対する割合

BrdU: 5-Bromo-2'-deoxyuridine

3-MCA: 3-Methylcholanthrene

培養細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

毒性資料 No. 原体-46

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1988 年

検体の純度：

試験方法：無処理の F344 系雄ラットを麻酔下にてコラゲナーゼ液等で生体位灌流し、肝を摘出してから Williams E (WME) 培地を用いて単離した。さらに WME 培地で 37°C、90～120 分培養し単層細胞を得た。その後リン酸緩衝液で未接着の細胞を除去してから、所定の検体液 (溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を使用) とともに 5 μ Ci/ml の ³H-チミジンを含む培養液で 18～19 時間培養した。その後、1%クエン酸ナトリウムでの核の膨化処理に続いて、酢酸と純エタノール混液 (1:3) で細胞の固定を行い、水洗後に風乾。Kodak -B2 で現像後、ヘマトキシリンエオジン染色し標本作製した。各濃度あたり 3 枚のスライド標本作製し、各スライド標本につき 50 細胞を観察 (各濃度あたり計 150 細胞) した。³H-チンジンの取り込みを反映する細胞中の粒子を自動計測し、正味核粒子数 (核粒子数 - 細胞質内粒子数)、修復期細胞 (正味核粒子数を 6 及び 20 以上もつ細胞) の割合を求めた。そして、正味核粒子数が対照より 6 以上の場合、6 以上の正味核粒子数を有する細胞が 10%以上、あるいは 20 以上の正味核粒子数を有する細胞が 2%以上の場合、陽性と判定した。細胞毒性の確認は、³H-チミジンを含まない培養液で 20～24 時間培養後トリパンプルーを用い生存細胞数を計測し、溶媒対照群の生存細胞数に対する検体処理群の生存細胞数から、相対的生存率を求めた。また陽性対照物質としては 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) を使用した。

用量設定根拠；

結 果：試験の結果を次表に示した。

表にみられるように正味核内粒子数において検体処理による有意な増加は認められなかった。また、核内粒子を 6 以上あるいは 20 以上有する細胞 (修復期細胞) の割合にも増加も認められなかった。

一方、陽性対照区では明らかな正味核粒子数と修復期細胞の明らかな増加がみられた。

以上の結果より、本検体は、ラット肝臓の初代培養細胞における不定期 DNA 合成を指標とした DNA 損傷を示さないと考えられた。

表 1 *in vitro* 不定期 DNA 合成試験成績

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	正味核内 粒子数	核内に 6 粒 子以上有す る細胞 (%)	核内に 20 粒 子以上有す る細胞 (%)	相对 生存率 (%)
溶媒対照 (DMSO)	—	-4.14	0.7	0.0	100
検 体	2.5	-3.31	3.3	0.0	ND
	5.0	-3.07	0.0	0.0	ND
	10	-2.01	0.0	0.0	102
	25	-3.41	0.7	0.0	102
	37.5	-2.61	0.0	0.0	99
	50	-2.17	1.3	0.0	63
陽性対照 (2-AAF)	0.1	27.61	95.3	68.7	97

各濃度 3 視野の平均

2-AAF: 2-Acetyl aminofluorene

ND: 計測されず

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

毒性資料 No. 原体-47

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1986年

検体の純度：

試験方法：チャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞を用い、染色体異常誘発性を薬物代謝酵素系 (S9-mix; ラット肝由来) の非存在下及び存在下で検索した。検体に最も適した溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を選択した。試験濃度は S9-mix の非存在下では 18.75~150 μ g/mL、存在下では 37.5~300 μ g/mL の範囲で各々4濃度とした。培養は24時間とし、終了2時間前にコルヒチン処理し、染色体標本を作製した。なお標本観察は S9-mix 存在の 300 μ g/mL で結晶析出が強かったため、S9-mix の非存在下及び存在下共に 37.5、75 及び 150 μ g/mL の3濃度について実施した。また、何れの場合も溶媒対照ならびに陽性対照 (メチルメタンサルホネート (MMS) (-S9) 及びシクロホスファミド (CPA) (+S9)) を同時に試験した。すべて各濃度あたり2反復で培養した。1濃度あたり200個の分裂中期像を観察した (但し陽性対照は50個)。そして濃度に依存した染色体異常率の増加 (ギャップを除く) が認められた場合を陽性と判定した。

用量設定根拠；

結果：表1に示したように、S9-mix の非存在下では 150 μ g/mL で染色体構造異常を有する細胞の頻度の増加がギャップの有無に係わらず認められた。また S9-mix の存在下でも 150 μ g/mL で頻度の増加がみられた。しかし、S9-mix の非存在下及び存在下共に 37.5 及び 75 μ g/mL では統計学的有意な頻度の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたメチルメタンサルホネート (-S9) 及びシクロホスファミド (+S9) では染色体構造異常を有する細胞の頻度の増加がみられた。

このように、S9-mix の非存在下及び存在下の 150 μ g/mL で染色体構造異常を有する細胞の頻度の増加がギャップの有無に係わらず認められた。しかし、S9-mix の非存在下 150 μ g/mL における分裂指数は溶媒対照と変わりなかったものの、細胞毒性をみるための増殖抑制試験では 200 μ g/mL で 0%を示していた。また S9-mix の存在下 150 μ g/mL における分裂指数は溶媒対照に比して 65%減と明らかな細胞毒性がみられた。以上より、S9-mix の非存在下及び存在下

条件とも、染色体構造異常を有する細胞の頻度の増加がみられた 150 μ g/mL では細胞毒性があらわれる濃度と示唆された。

また本検体の変異原性を示唆する結果は他の変異原性試験でみられていないことから、本試験でみられた所見は細胞毒性に伴った非特異的な染色体構造異常率の増加と考えられた。

以上、本検体はチャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞における染色体異常誘発性は細胞毒性がみられない濃度で陰性と考えられた。

表 1. 染色体異常試験結果

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	処理 時間	標 本 作 製 時 間	S9- mix の 有 無	分 裂 指 数 (%)	観 察 細 胞 数	染色体構造異常					構造異 常合計		構造異常細胞 頻度(%)			
							ギ ャ ッ プ	染色体		染色分体		そ の 他	ギャップ		ギャップ		判 定
								欠 失	交 換	欠 失	交 換		含 む	除 外	含 む	除 外	
溶媒対照 (DMSO)	—	24	24	—	4.0	200	6	0	0	0	2	8	2	4.0	1.0	—	
検体	37.5				8.3	200	3	0	0	0	1	4	1	2.0	0.5	—	
	75				4.3	200	3	2	0	0	2	7	4	3.0	2.0	—	
	150				5.4	200	27	15	0	4	5	1	52	25	↑18.0	↑9.0	+
陽性対照 (MMS)	50	—	75	5	4	0	3	1	0	13	8	↑16.0	↑11.0	+			
溶媒対照 (DMSO)	—	24	24	+	7.9	200	4	2	0	0	0	6	2	3.0	1.0	—	
検体	37.5				7.5	200	6	4	2	0	0	2	14	8	7.0	4.0	—
	75				5.5	200	4	3	0	1	0	3	11	7	5.0	3.5	—
	150				2.8	200	41	18	0	4	15	8	86	45	↑22.0	↑14.0	+
陽性対照 (CPA)	50	—	50	14	28	0	52	17	21	132	118	↑90.0	↑86.0	+			

MMS: Methyl methanesulfonate

CPA: Cyclophosphamide

↑: $P < 0.01$ (カイ二乗検定)

ヒトのリンパ球細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (1)

毒性資料 No. 原体-48

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1994 年

検体の純度：

試験方法：ヒトのリンパ球の培養細胞を用い、染色体異常誘発性を薬物代謝酵素系 (S9-mix ラット肝由来) の非存在下及び存在下で検索した。検体に最も適した溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を選択した。リンパ球はあらかじめ Phytohemagglutinin で刺激を加えたものを用いた。試験濃度は S9-mix の非存在下では 1.0~500 μ g/mL の範囲で 10 濃度、存在下では 25~250 μ g/mL の範囲で 9 濃度とした。培養は 18 時間とし、終了 2 時間前にコルヒチン処理して染色体標本作製した。なお S9-mix の存在下では培養開始 3 時間後に洗浄し、その後 15 時間培養した。

標本観察の対象は結晶析出や細胞毒性の結果から、S9-mix 非存在下については 31.3、125 及び 250 μ g/mL、存在下は 25、100 及び 160 μ g/mL の各々 3 濃度について実施した。2 回目の試験における試験濃度は 1 回目の試験結果を参考に S9-mix の非存在下では 15.6~500 μ g/mL の範囲で 10 濃度、存在下では 25~250 μ g/mL の範囲で 9 濃度とした。

また、何れの場合も溶媒対照 (DMSO) ならびに陽性対照 (エチルメタンサルホネート (EMS) (-S9) 及びシクロホスファミド (CPA) (+S9)) を同時に試験した。すべて各濃度あたり 2 反復 (DMSO のみ 4 反復) で培養した。1 濃度あたり 200 個の分裂中期像を観察した。本試験は再現性をみるために日をあらためて 2 回試験実施した。

濃度設定の根拠：

結 果：1 回目、2 回目の試験結果を表 1 及び 2 に示した。

表 1 に示したように、1 回目の試験では 125 μ g/mL 以上で結晶析出がみられた。標本観察の結果、S9-mix の非存在下の 250 μ g/mL、存在下の 160 μ g/mL で、染色体構造異常を有する細胞の頻度の増加を統計学的有意に認めた。しかし、いずれも分裂指数が溶媒対照に比べて明らかに低下した濃度であった。

2 回目の試験は 1 回目の試験を参考に濃度設定して実施した。その結果、分裂指数が明らかに低下する濃度 (S9-mix 非存在下: 150 μ g/mL、S9-mix 存在下: 140 μ g/mL) では、染色体構造異常を有する細胞の頻度の増加が観察された。しかし、1 回目、2 回目試験共に、分裂指数が溶媒対照と変わらない濃度では染色体構造異常率の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたエチルメタンスルホネート (-S9) 及びシクロホスファミド (+S9) では染色体構造異常を有する細胞の頻度の増加がみられた。

このように、本試験では染色体構造異常率の増加が S9-mix 存在の有無に係わらず観察されたが、いずれも分裂指数の低下した濃度でみられていること、本検体の変異原性を示唆する結果は他の変異原性試験でみられていないことから、本試験でみられた所見は細胞毒性に伴った非特異的な染色体構造異常率の増加と考えられた。

以上、本検体はヒトのリンパ球培養細胞における染色体異常誘発性は細胞毒性がみられない濃度で陰性と考えられた。

表 1. 染色体異常試験結果 (1回目)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理 時間	標本 作製時間	S9- mix の有 無	分裂 指数 (%)	観 察 細 胞 数	染色体構造異常						構造異常細胞 頻度(%)			
							染色体			染色分体			そ の 他	ギャップ		
							ギャ ップ	切 断	交 換	ギャ ップ	切 断	交 換		含 む	除 外	
溶媒対照 (DMSO)	—				9.9	400	0	1	0	1	4	0	0	1.5	1.3	
検体	1.0	18	18	—	7.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	2.0				8.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	3.9				7.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	7.8				7.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	15.6				7.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	31.3				6.3	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
	62.5				6.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	125 [§]				7.2	200	0	2	0	1	2	0	0	0	2.0	1.5
	250 [§]				2.3	200	0	5	0	1	14	0	0	0	↑8.0	↑7.5
500 [§]	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
陽性対照 (EMS)	500					200	0	22	0	9	26	1	0	↑20.5	↑17.0	
溶媒対照 (DMSO)	—				9.0	400	0	2	0	0	0	0	0	0.5	0.5	
検体	25	3	18	+	6.5	200	0	3	0	0	2	0	0	2.5	2.5	
	50				8.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	100				8.9	200	0	0	0	1	0	0	0	0.5	0.0	
	120				8.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	140 [§]				7.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	160 [§]				6.1	200	0	1	0	3	11	0	0	↑7.0	↑5.5	
	180 [§]				1.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	200 [§]				0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	250 [§]				0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
陽性対照 (CPA)	10					200	0	8	0	4	19	0	0	↑12.0	↑11.0	

↑ : P<0.01 (Fisher 検定)

- : 観察未実施

§析出 (S9mix(+)) の 200 及び 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以外は処理終了時に消失)

EMS : Ethylmethanesulfonate

CPA : Cyclophosphamide

表 2. 染色体異常試験結果 (2 回目)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理 時間	標 本作 製時間	S9- mix の 有無	分 裂 指 数 (%)	観 察 細 胞 数	染色体構造異常						構造異常細胞 頻度(%)				
							染色体			染色分体			# そ の 他	ギャップ			
							ギャ ップ	切 断	交 換	ギャ ップ	切 断	交 換		含 む	除 外		
溶媒対照 (DMSO)	—				6.1	400	0	1	0	0	6	0	0	1.8	1.8		
検体	15.6	18	18	—	7.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
	31.3				6.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	62.5 [§]				6.3	200	0	0	0	1	0	0	0	0	0.5	0.0	
	125 [§]				6.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	150 [§]				4.9	200	0	14	0	1	30	1	0	0	▲14.5	▲14.0	
	200 [§]				2.9	200	0	7	0	4	20	0	0	0	▲10.0	▲9.0	
	250 [§]				0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	300 [§]				0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	400 [§]				0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	500 [§]				0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
陽性対照 (EMS)	500					200	0	5	0	3	24	0	0	▲13.0	▲11.5		
溶媒対照 (DMSO)	—				7.9	400	0	1	0	2	5	0	0	2.0	1.5		
検体	25	3	18	+	7.6	200	0	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5		
	50				8.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	100 [§]				6.4	200	0	1	0	2	0	0	0	0	1.5	0.5	
	120 [§]				7.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	140 [§]				5.7	200	0	3	0	4	25	1	0	0	▲9.5	▲9.5	
	160 [§]				2.6	200	0	2	0	4	13	0	1	1	▲8.5	▲6.5	
	180 [§]				0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	200 [§]				0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	250 [§]				0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
陽性対照 (CPA)	10								200	0	7	0	6	58	3	0	▲24.5

▲ : P<0.01 (Fisher 検定)

— : 観察未実施

§ 析出 (処理終了時には消失)

10 以上の異常を有する細胞、細胞あるいは染色体の粉砕化

EMS : Ethylmethanesulfonate

CPA : Cyclophosphamide

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

ヒトのリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (2)

毒性資料 No. 原体-49

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検体の純度：

試験方法：ヒトの静脈血から採取したリンパ球を用いた。

本試験の濃度は非代謝活性化法で 2.5、5.0、10 及び 25 μ g/mL、活性化法で 50、100、200 及び 400 μ g/mL とした。溶媒には Dimethylsulfoxide (DMSO) を用いた。検体は 1 濃度あたり 2 反復、対照及び陽性対照は 1 反復とし、1 反復あたり 100 個 (陽性対照は 50 個) の分裂中期像を観察した。染色体の異常をギャップ、切断、交換等に分類し計測した。異常を有する細胞の出現頻度に有意 ($P < 0.05$) な上昇が認められる場合を陽性とした。なお、陽性対照としては Mitomycin C (非代謝活性化) 及び Cyclophosphamide (代謝活性化) を用いた。

結 果：結果を表に示した。

検体のすべての濃度区で染色体異常の発現頻度において、対照と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 Mitomycin C (非代謝活性化) 及び Cyclophosphamide (代謝活性化) では有意な染色体異常の増加が認められた。

以上の結果から、ヒトのリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験で、検体の変異原性は陰性と考えられた。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間	標本作製時間	S9 mix	分裂 指数 (%)	観察 細胞 数	異常を有する細胞数					異常 細胞 発生率 (%)			
							染色分体型			染色 体型	HR		RF	T	
							TB	TR	QR						AF
対照 ¹⁾	—	48.5 (hr)	50.75 (hr)	—	0.8	200	2			2			1.5		
検体	2.5				—	200									0.0
	5.0				—	200	2				1				1.0
	10.0				0.6	200	1			1					1.0
	25.0				0.4	200									0.0
陽性対照 ²⁾	0.05							—	50	2	2	2	2		
対照 ¹⁾	—	1 (hr)	50 (hr)	+	3.0	200	3		1				2.0		
検体	50.0				—	200	4			1					2.5
	100.0				—	200	1			2		1			2.0
	200.0				1.0	200	1						1		1.0
	400.0				0.8	156	2								1.3
陽性対照 ³⁾	50.0							—	50	13	2		2		

↓ ↑ : $p < 0.05$ (カイ 2 乗検定)

1) : 無処理及び溶媒 (DMSO) 対照の合計

2) : Mitomycin C

3) : Cyclophosphamide

TB: 染色分体切断 (Chromatid break)、

TR: 三放射状交換 (Triradial)、

QR: 四放射状交換 (Quadriradial)

AF: 無動原体断片 (Acentric fragment)

HR: 高二倍性 (Hyperdiploid/合計に含めない)

RF: 無動原体断片をもつ環 (Ring with associated acentric fragment)

T: 転座 (Translocation)

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

マウスの精原細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験

毒性資料 No. 原体-50

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検体の純度：

供試動物：NMRI マウス (NMRI/Bom)、10～12 週齢 (投与時体重 30～40 g)、
1 群雄各 5 匹 (3 検体投与群、溶媒および陽性対照群)

試験方法：検体をピーナツ油に溶解し、15000mg/kg の用量で単回経口投与した (投与容量：40mL/kg)。溶媒対照群は媒体であるピーナツ油を同様に投与した。陽性対照群は脱イオン水で調製したシクロホスファミド(CPA)を 50mg/kg の用量で経口投与した (投与容量：40mL/kg)。投与 12、24 及び 48 時間後に動物を屠殺し、各動物から両側の精巢を摘出、精原細胞標本を作製した。なお、屠殺 4 時間前にコルヒチン 4mg/kg を腹腔内投与した。各標本について 50 個の分裂中期像 (1 匹につき 100 個) 鏡検し、染色体異常の種類を観察、記録した。

用量設定の根拠：

結 果：表 1 に観察された構造異常のタイプ別の頻度を示した。

検体投与 12、24 及び 48 時間後に得られた精巢において、染色体構造異常の頻度の増加は認められなかった。

一方、陽性対照のシクロホスファミド投与では統計学的有意に構造異常の頻度の増加が認められた。

以上、本検体はマウスの精巢を用いた *in vivo* 染色体異常試験において、染色体構造異常の頻度の増加は認められず、陰性と考えられた。

表 1. 染色体異常試験結果

薬 剤	投与量 mg/kg	標本作製時間	動物番号	染色体構造異常											# ギャップ除く異常数	群平均 異常頻度 (%)		
				ギャップ		切断		断片		二重微小染色体	染色体内交換	非対称染色体交換	対称染色体交換	二動原体		その他	ギャップ	
				染色体	染色体	染色体	染色体	染色体	染色体								含む	除外
溶媒 対照 (DMSO)	—	24	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.6	0.8
			2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2		
			3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			4	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			5	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0		
検体	15000	12	6	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.4	1.0	
			7	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0			2
			8	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0			1
			9	6	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0			2
			10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0
		24	11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.2	0.4
			12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			13	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
			14	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1		
			15	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	48	16	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3.0	0.8	
		17	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
		18	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2			
		19	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1			
		20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
陽性 対照 (CPA)	50	24	21	11	4	2	0	3	0	0	1	2	2	0	0	10	26.4	10.0
			22	19	12	3	0	5	1	1	0	2	1	0	0	13		
			23	9	11	0	0	1	1	0	0	3	1	0	0	4		
			24	23	8	6	1	1	3	4	2	0	3	0	0	20		
			25	8	7	5	0	3	1	0	0	1	0	0	0	10		

▲ : P<0.01 (カイ二乗検定または Fisher 検定)

1 匹あたり分裂中期像 100 個観察

ギャップ除く構造異常を有する分裂中期像の数 (最大 100)

CPA : Cyclophosphamide

マウスを用いた小核試験 (1)

毒性資料 No. 原体-51

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1985 年

検体の純度 :

供試動物 : NMRI マウス (NMRI/Bom)、6~7 週齢、1 群雌雄各 5 匹 (3 検体投与群 (24、48 及び 72 時間後屠殺)、溶媒及び陽性対照群)

試験方法 : 検体をピーナツ油に溶解し、15000mg/kg の用量で単回経口投与した (投与容量 : 40mL/kg)。溶媒対照群は媒体であるピーナツ油を同様に投与した。陽性対照群は脱イオン水で調製したシクロホスファミド (CPA) を 50mg/kg の用量で経口投与した (投与容量 : 40mL/kg)。

検体投与群については投与 24、48 及び 72 時間後に経時的に雄 5 匹、雌 5 匹ずつ屠殺し、各動物から骨髓を摘出し、骨髓塗抹標本を作製した。溶媒対照群は投与 24、48 及び 72 時間後に経時的に 1~2 匹を屠殺 (計雄 5 匹、雌 5 匹)、陽性対照群は投与 24 時間後に雄 5 匹、雌 5 匹を屠殺し、同様に処理して骨髓塗抹標本を作製した。そして各標本について 1000 個の多染性赤血球 (PCE) 及び正染性赤血球 (NCE) 中の小核を有する多染性赤血球 (MNPCE) 及び正染性赤血球 (MNNCE) を計数した。そして小核を有する多染性赤血球 (MNPCE) の明らかな増加がみられた場合、染色体異常誘発性が陽性と判定した。また、造血機能への影響をみるために全赤血球に対する多染性赤血球 (PCE) の割合を求めた。

結 果 : 表 1 に雌雄マウスの骨髓塗抹標本から得られた結果を示した。

検体投与群では経時的観察でいずれにおいても MNPCE の増加は認められなかった。一方、陽性対照の CPA 投与では統計学的有意な MNPCE の明らかな増加がみられた。

全赤血球に対する PCE の割合においては、統計学的有意ではなかったものの、検体投与群でやや減少傾向がみられ、15000mg/kg が毒性影響量に近いことが示唆された。

以上の結果から、本検体のマウス小核試験で突然変異誘発性は陰性と考えられた。

表 1. 小核試験の標本観察結果

薬剤	投与量 (mg/kg)	動物数	標本作 製時間 (h)	PCE 観察数 (合計)	全赤血球に 対する PCE の割合 (%)	1000 PCE に対 する MNPCE	1000 NCE に 対する MNNCE
溶媒対照	0	雌雄 各 5	24~72	10000	47.9	0.5	0.4
検体	15000	雌雄 各 5	24	10000	46.1	0.8	0.6
		雌雄 各 5	48	10000	45.5	0.3	0.5
		雌雄 各 5	72	10000	46.7	0.7	0.4
陽性対照 (CPA)	50	雌雄 各 5	24	10000	43.7	↑40.5	1.3

↑ : P<0.01 (Blom 検定)

PCE : 多染性赤血球,

NCE : 正染性赤血球

MNPCE : 小核を有する多染性赤血球

MNNCE : 小核を有する正染性赤血球

マウスを用いた小核試験 (2)

毒性資料 No. 原体-52

試験機関：

報告書作成年：1978年

検体：

供試動物：NMRI マウス (NMRI/ORIG Kisslegg)、11～13 週齢 (投与時体重：雄 35～38g、雌 29～32g)、1 群雌雄各 5 匹 (3 検体投与群、溶媒及び陽性対照群)

試験方法：微粉碎した検体を溶媒 (0.9%NaCl, 0.085%Myrj*水溶液) に懸濁し、100、300 及び 1000mg/kgの用量で 2 回経口投与した (投与容量：10mL/kg)。投与間隔は 24 時間とした。溶媒対照群は媒体のみを同様に投与した。陽性対照群は同じ溶媒で調製したTriaziquone (トレニモン®) を 0.3mg/kgの用量で 24 時間間隔の 2 回経口投与した (投与容量：10mL/kg)。

最終投与 6 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髄を採取して骨髄塗抹標本を作製した。各標本について 2000 個の多染性赤血球 (PCE) 及び正染性赤血球 (NCE) 中の、小核を有する多染性赤血球 (MNPCE) 及び正染性赤血球 (MNNCE) を計数した。そして小核を有する多染性赤血球 (MNPCE) の明らかな増加がみられた場合、染色体異常誘発性が陽性と判定した。また、造血機能への影響をみるために多染性赤血球 (PCE) と正染性赤血球 (NCE) との比を求めた。

* ステアリン酸ポリオキシエチレン

結 果：表 1 に雌雄マウスの骨髄塗抹標本から得られた結果を示した。

雌雄共 MNPCE の増加は認められなかった。

一方、陽性対照の Triaziquone 投与では統計学的有意な MNPCE の明らかな増加がみられた。また参考として計数した MNNCE も陽性対照で統計学的有意な増加をみた。

PCE:NCE は各投与群共、ほぼ 1:1 であった。

以上の結果から、本検体のマウス小核試験で突然変異誘発性は陰性と考えられた。

表1 マウスの小核試験における標本観察結果（最終投与 6 時間後）

性別	雄					
群	投与量 (mg/kg)	動物数	PCE 観察 細胞数	1000 PCE に 対する MNPCE	NCE 観察 細胞数	1000 NCE に 対する MNNCE
溶媒対照	0×2	5	10000	1.9	10000	1.5
検体	100×2	5	10000	1.8	10000	1.8
	300×2	5	10000	1.8	10000	1.2
	1000×2	5	10000	2.2	10000	1.8
陽性対照 (Triaziquone)	0.3×2	5	10000	▲20.3	10000	▲2.3

性別	雌					
群	投与量 (mg/kg)	動物数	PCE 観察 細胞数	1000 PCE に 対する MNPCE	NCE 観察 細胞数	1000 NCE に 対する MNNCE
溶媒対照	0	5	10000	2.3	10000	1.7
検体	100×2	5	10000	2.3	10000	1.5
	300×2	5	10000	1.3	10000	1.8
	1000×2	5	10000	3.0	10000	2.1
陽性対照 (Triaziquone)	0.3×2	5	10000	▲12.1	10000	▲3.2

▲ : P<0.01 (Turkey 検定)

PCE : 多染性赤血球

NCE : 正染性赤血球

MNPCE : 小核を有する多染性赤血球

MNNCE : 小核を有する正染性赤血球

(14) 生体機能に及ぼす影響

一般薬理試験

毒性資料 No. 原体-53

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1990年

検体の純度：

1) マウスの一般行動

供試動物：CD-1系マウス (Cr1-UK)、体重：20～24g、1群雄5匹

投与方法：検体を0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液に懸濁し、用量50、150及び500mg/kgで単回経口投与した(投与容量：10mL/kg)。対照群(0mg/kg)には0.5%CMC水溶液のみを同量投与した。そして投与30、90、150及び300分後、Irwin法に従って一般症状を観察した。

結果：500mg/kg群では投与30分後、2例に軽度の活動性低下と1例に呼吸促迫を観察した。50～500mg/kg投与群では爪先立ち歩行を観察したがこれらは非特異的なもので毒性影響とは捉えられなかった。

2) 麻酔ネコの呼吸・循環器系に対する作用(漸増投与)

供試動物：ネコ、約8ヶ月齢、体重4.1～4.35kg、3匹供試

投与方法：まずエーテル麻酔導入を行い、抱水クロラル(60～80mg/kg開始時)で静脈麻維持を行った。そして大腿部動脈にカテーテルを挿入し、血圧を高圧用トランスジューサーで、血圧の記録から心拍数を記録した。さらに大腿部の血流量を測定した。また気管にもカニューレを装着し呼吸を記録、併せて第2誘導による心電図を記録した。検体は溶媒(0.5%CMC水溶液)に懸濁させ胃及び幽門括約筋を経由して十二指腸投与(投与容量：1mL/kg)とし、上記の処置後およそ30分経過後に溶媒のみを与えた。その後同じ動物に50、150及び500mg/kgを60分間隔で漸増投与した。

結果：3匹いずれのネコについても500mg/kgで血圧、心拍数、心電図、血流量及び呼吸に対して検体投与による変化は何ら認められなかった。

3) マウスの腸管にける炭末輸送能に対する作用

供試動物：CD-1系マウス (Cr1-UK)、体重：20～24g、1群雄10匹

投与方法：検体を0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液で懸濁し用量50、

150 及び 500mg/kg で単回経口投与した (投与容量: 10mL/kg)。対照群 (0 mg/kg) には 0.5%CMC 水溶液のみを同量投与した。検体投与 30 分後に水に懸濁させた 5%炭末を 0.25mL 経口投与した。さらに 30 分後に屠殺して腸管を摘出し、小腸の長さに対する炭末の到達距離を求めた。

結 果: 次表に結果を示した。

500mg/kg 群で炭末輸送率の統計学的有意な減少がみられた。

表. 炭末輸送能

群	投与量 (mg/kg)	平均炭末輸送率 (%)	阻害率 (%)
対照	0	56.1	—
検体	50	52.3	5.3
	150	49.4	10.5
	500	↓47.2	14.5

炭末輸送率 (%) = (炭末の幽門からの到達距離/小腸の全長) × 100
↓ : p<0.05 (一元配置分散分析+Student t 検定)

4) 摘出臓器に対する作用

4)-1 モルモットの摘出回腸—各種薬物による収縮に対する作用

供試動物: Dunkin-Hartley 系モルモット、体重 250~350g、3 匹供試

試験方法: モルモット 3 匹から摘出した回腸を各々タイロード液中に懸

吊し、その収縮を等張性収縮用トランスジューサーでピックアップし記録した。用いた収縮薬の濃度はアセチルコリン (Ach) 10-40ng/mL、ヒスタミン (His) 300-400ng/mL、5-ヒドロキシトリプタミン (5-HT) 400ng/mL、及び塩化バリウム (BaCl₂) 100-200 μg/mL とした。また検体はメタノールで調製し、最終濃度 1、10 及び 100 μg/mL で適用した。検体適用 2 分後に収縮薬を添加した。

結 果: 4 種の収縮薬による収縮に対する検体の抑制率を次表に示した。

Ach、His 及び BaCl₂ による収縮に対して 10 μg/mL 以上で統計学的有意な抑制を示し、5-HT の収縮に対しては 1 μg/mL 以上で抑制が観察された。

表. モルモット摘出回腸の各種薬物収縮に対する作用

群	投与量 (μ g/mL)	無処理時の収縮に対する抑制率 (%)			
		Ach	His	5-HT	BaCl ₂
対照	-	1.4	-7.5	-13.3	-8.6
検体	1	4.6	2.9	↑41.4	18.6
	10	↑28.8	↑12.8	↑84.3	↑91.7
	100	↑100	↑99.1	↑100	↑100

数値はいずれも3連の平均値

↑ : $p < 0.05$ (一元配置分散分析+Student t検定)

4)-2 ウサギの摘出空腸—薬物及び神経刺激反応に対する作用

供試動物 : New Zealand White 系ウサギ、体重 2~3kg、3 匹供試

試験方法 : 3 匹のウサギから空腸を摘出し、クレス液中に浸漬。懸吊して等張性収縮用トランスジューサでピックアップし自動運動を記録した。そして神経刺激とノルアドレナリン (NA) による抑制作用に対する検体の影響を調べた。神経刺激 (60-100v、1msec、10Hz) は血管周囲神経に対して、また NA は 0.1-10 μ g/mL を適用した。検体の適用は神経刺激及び NA 刺激の 1 分前とし、濃度は 1、10 及び 100 μ g/mL とした。ただし、100 μ g/mL 適用については神経刺激及び NA 刺激を行わず、自動運動に対する直接の影響を調べた。

結果 : ウサギの空腸への神経刺激及び NA 適用による抑制反応に対して、検体 1、及び 10 μ g/mL の前処理は何らの影響も与えなかった。

検体 100 μ g/mL の単独の適用では空腸の自動運動に対して明らかな抑制 (78~100%阻害) を示した。しかし適用後に洗浄し、神経刺激及び NA 刺激を加えたところ、無処理と同程度の抑制反応を示した。

4)-3 ラットの摘出横隔膜—横隔膜神経刺激反応に対する作用

供試動物 : Wistar 系ラット、体重 177~300g、3 匹供試

試験方法 : ラットから横隔膜神経を付けた状態で横隔膜を摘出し、タイロード液中に浸漬・懸吊して等張性収縮用トランスジューサでピックアップし神経刺激 (12 回/分電撃、矩形波 0.5ms 間隔) による収縮を記録した。検体の適用は 3 分間、濃度は 1、10 及び 100 μ g/mL とした。

結果 : 次表に示したように横隔膜神経刺激による横隔膜の収縮反応に対して、検体の 1 及び 10 μ g/mL では何らの影響もみられなかった。しかし、検体 100 μ g/mL の適用では統計学的有意な収縮反応の抑制が観察され、検体の

神経筋接合部に対する影響が示唆された。

表. 横隔膜神経刺激による横隔膜の収縮反応

群	投与量 (μ g/mL)	無処理時の収縮に 対する抑制率 (%)
対照	-	-4.5
検体	1	2.6
	10	3.5
	100	↑36.1

↑ : $p < 0.05$ (一元配置分散分析+Student t検定)
数値はいずれも3連の平均値

5) 血液に対する作用

5)-1 ヒトの血液を用いた溶血作用

方 法 : 3名から各々採血した血液 5mL を用い、3%の赤血球浮遊液を生理食塩水で調製した。そして検体を溶解した生理食塩水 3mL に 3%赤血球浮遊液 1mL を加え 37°C恒温槽中に 2 時間維持した。検体の最終濃度は 0.0005、0.001、0.002 及び 0.006mg/mL (生理食塩水における最大溶解濃度) とした。その後遠沈して上清の吸光度を比色計 (540nm) で計測し溶血率を求めた。

結 果 : 検体の最大溶解濃度 0.006mg/mL でも溶血はみられなかった。

5)-2 ラットの血液凝固に対する作用

供試動物 : Wistar 系ラット、体重 : 177~300g、1 群雄 10 匹

投与方法 : 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液で懸濁させ、用量 50、150 及び 500mg/kg で単回経口投与した (投与容量 : 10mL/kg)。対照群 (0 mg/kg) には 0.5%CMC 水溶液のみを同量投与した。この検体投与 60 分後に尾から採血した血液で凝固時間を測定した。また、直ちにエーテル軽麻酔下で眼窩静脈叢からクエン酸処理下で採血し、これを用いてプロトロンビン時間 (PT) 及び活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。

結 果 : 各検査項目に統計学的有意な延長は観察されなかった。

表. 凝固への影響

群	投与量 (mg/kg)	全血凝固時間 (秒)	PT (秒)	APTT (秒)
対照	0	87.7	10.5	14.1
検体	50	87.1	10.8	16.0
	150	84.4	10.7	16.1
	500	83.1	10.9	17.2

(一元配置分散分析)

以上の試験結果より、本検体は中枢神経系や呼吸循環系、血液凝固系に対して明らかな作用はみられず、急性中毒による生体機能への影響は低いと考えられた。消化管に対してはマウスの炭末輸送能の低下や摘出臓器の試験で薬物による収縮反応に対して抑制作用が観察された。また摘出横隔膜の試験では神経筋接合部に対する抑制影響が示唆された。

フェンメディファムの「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	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 一般行動 [Irwin 法]	マウス	経口	0, 50, 150, 500	♂5	50 (LOAEL= 500)	<50 (NOAEL =150)	50-500mg/kg で爪先 立ち歩行。500mg/kg で活動性低下、呼吸 速拍
呼吸・循環器 系に及ぼす 影響 呼吸, 血圧 心拍, 心電図, 血流量	ネコ (麻酔下)	十二指腸	0, 50, 150, 500 で漸増投与	3	>500	500	影響なし。
消化管に対 する影響 炭末輸送能	マウス	経口	0, 50, 150, 500	♂10	500	150	500mg/kg で輸送率 低下
摘出回腸 薬物収縮に 対する作用	モルモット	<i>in vitro</i> (タイロド液)	1, 10, 100 (μ g/mL)	3	1 (μ g/mL)	<1 (μ g/mL)	アセチルコリン、ヒスタミン、塩化 バリウム収縮に対し 10 μ g/mL 以上で抑制。 5-HT 収縮に対して は 1 μ g/mL 以上で抑 制。
摘出空腸 薬物・神経刺 激に対する 作用	ウサギ	<i>in vitro</i> (クラブ液)	1, 10, 100 (μ g/mL)	3	100 (μ g/mL)	10 (μ g/mL)	神経刺激, ノルアドレナリン 刺激反応に対し 10 μ g/mL まで影響な し。100 μ g/mL で自 動運動を抑制
摘出横隔膜 横隔膜神経刺 激に対する作 用	ラット	<i>in vitro</i> (タイロド液)	1, 10, 100 (μ g/mL)	3	100 (μ g/mL)	10 (μ g/mL)	神経刺激による横隔 膜収縮に対し 100 μ g/mL で抑制
溶血への 影響	ヒト 血液	<i>in vitro</i> (生理食塩 水)	0.0005, 0.001, 0.002, 0.006 (mg/mL)	3	>0.006 (mg/mL)	0.006 (mg/mL)	影響なし。
血液凝固に 対する作用	ラット	経口	0, 50, 150, 500	♂10	>500	500	影響なし。

2. 代謝物を用いた試験成績

(1) 急性毒性

ラットにおける急性経口毒性試験 (限度投与試験)

毒性資料 No. 代謝物-1

試験機関 :

報告書作成年 : 1984 年

検 体 :

供試動物 : Sprague-Dawley 系ラット、体重 : 120~140g、1 群 10 匹 (雌雄各 5 匹)

観察期間 : 14 日間

投与方法 : 検体をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して、これを単回経口投与した。投与前夜は絶食し、投与 3 時間後に再給餌した (投与容量 : 10mL/kg)。予備試験の結果から投与量は 800、1270、2000 及び 3160mg/kg とした。また対照群を設けて DMSO のみを同様に投与した。

観察・検査項目 : 中毒症状及び生死を投与後 14 日間にわたり 1 日 1 回観察した。体重を投与前並びに投与後 7 及び 14 日に測定した。すべての動物を対象に肉眼的病理検査を行った。得られた結果から LD₅₀ を推定した。

結 果 :

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄 : 0、800、1270、2000、3160
LD ₅₀ (mg/kg) 95%信頼限界	雄 : 1460 [§] (1210~1760) 雌 : 1600 [§] (1160~2200)
死亡開始時間及び終了時間	投与後 15 分開始 投与後 1 日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与直後に発現、 投与後 2 日消失
死亡例を認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄 : 800

[§]: 報告書では雌雄合計で算出されていたため、申請者が雌雄別に算出 (移動平均法)。

報告書での雌雄合計の結果から算出されている LD₅₀ 値は以下の通り。

LD₅₀ : 1518mg/kg (95%信頼限界 1261~1828 mg/kg)

1) 中毒症状

投与直後から各投与群動物に嗜眠、活動性低下がみられ、投与 1 日後にも 1270mg/kg 以上の投与群では活動の緩慢を観察した。しかし投与 2 日後にはこれらの症状は消失した。死亡は 3160mg/kg 群では 10 例全例が投与 15 分後に、2000mg/kg 群では 8 例が 3 時間までに観察された。

死亡及び症状発現において明らかな性差は認められなかった。

生存動物の投与 7 及び 14 日後の体重においては、明らかな体重増加抑制は認められなかった。

2) 肉眼的病理検査

死亡動物の全例に肺の軽度の炎症が観察された。投与後 14 日における生存動物に対する剖検では、肺に軽度の炎症をもつ個体が散見された。その他には特記すべき肉眼的異常所見は観察されなかった。

(2) 変異原性

細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験)

毒性資料 No. 代謝物-2

試験機関 :

報告書作成年 : 1984 年

検 体 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 5 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) を用い、 β -naphthoflavone と phenobarbital Na で誘導したラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9-mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いてプレート法で変異原性を検索した。検体は溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて調製し、処理容量は 0.1 mL/プレートとした。濃度は予備試験の結果から 100, 500, 1000 及び 2500 μ g/プレートの 4 濃度で実施した。各濃度 3 枚のプレートを用いた。2-アミノアントラセン(2-AA)を用いた陽性対照 (S9-mix 存在下、TA100 のみ) 及び溶媒対照も同時に実施した。37°C で 72 時間培養後、復帰変異コロニーを計数した。また、再現性をみるために日を改めて 2 回試験を実施した。溶媒対照に比し 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、濃度に依存してみられた場合、加えて再現性がみられた場合に変異原性を有すると判定した。

結 果 : 2 回の試験結果を表 1 及び 2 に示した。

表に示したように両試験共、S9-mix の有無に係らずいずれの菌株共、明らかな復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、S9-mix 存在の TA100 において陽性対照(2-AA)では、明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、代謝物 は代謝活性化を含む本試験条件下において復帰突然変異誘発性を有しないと考えられた。

表 1 復帰突然変異試験成績 (1 回目)

(表中の値は 3 反復の平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9-mix の 有 無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA1538	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	—	—	60.7	20.0	14.3	6.7	10.0
検 体	100		82.3	20.0	11.3	7.7	3.3
	500		59.3	19.7	15.0	10.0	2.7
	1000		56.7	27.0	11.0	16.3	3.7
	2500		42.0	22.7	9.3	8.3	2.0
溶媒対照 (DMSO)	—	+	74.3	28.0	32.0	16.7	11.0
検 体	100		76.0	29.0	30.3	18.3	2.7
	500		56.3	29.0	34.7	21.0	9.3
	1000		67.7	30.3	31.7	21.0	5.0
	2500		70.7	18.7	32.7	10.3	5.7
陽性対照 2-AA	5		3150	NT	NT	NT	NT

2-AA : 2-amino-anthracene

NT : 未実施

表 2 復帰突然変異試験成績 (2回目)

(表中の値は3反復の平均値)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9-mix の 有 無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA1538	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	—	—	73.0	15.0	5.0	12.0	4.7
検 体	100		91.0	17.3	12.7	9.0	2.7
	500		68.3	14.3	6.0	6.3	3.0
	1000		45.0	20.0	8.0	5.3	3.0
	2500		40.7	14.0	6.7	3.3	5.0
溶媒対照 (DMSO)	—	+	76.7	15.0	16.0	18.3	4.3
検 体	100		106.0	14.0	28.0	27.7	2.0
	500		66.3	10.7	22.3	13.5	4.0
	1000		93.7	11.0	10.7	13.7	5.7
	2500		51.7	11.3	18.3	6.7	4.0
陽性対照 2-AA	5		2350	NT	NT	NT	NT

2-AA : 2-amino-anthracene

NT : 未実施

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

3. 製剤を用いた試験成績

(1) 急性毒性

ラットにおける急性経口毒性試験（限度投与試験）

毒性資料 No. 製剤-1

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検体の純度：14.5%水和剤（フロアブル）

・組成 フェンメディファム原体 ; 14.5%
界面活性剤、水等 ; 85.5

供試動物：Sprague-Dawley 系ラット（Charles River UK）、5～8 週齢

体重：雄 134～155g、雌 138～150g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

投与方法：投与前夜絶食したラットに投与用量 2000mg/kg とし検体をそのまま単回経口投与した。投与容量は比重と投与時の体重から求めた。限度投与試験のための投与量 2000mg/kg は、あらかじめ雌雄各 1 匹に対して 2000mg/kg を投与した用量設定試験の結果から決定した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を投与日は 30 分、1、2 および 4 時間後に、その後 14 日まで 1 日 1 回観察した。体重を投与前、投与後 7 および 14 日に測定した。すべての動物を対象に肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄：2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄：>2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び終了時間	発症例なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄：2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄：2000

観察期間を通じて外徴や行動の変化、死亡は観察されなかった。また体重は順調に増加を示し、投与に関連したと思われる変動は認められなかった。剖検において、特記すべき肉眼的異常所見は認められなかった。

ラットにおける急性経皮毒性試験（限度投与試験）

毒性資料 No. 製剤-2

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検体の純度：14.5%水和剤（フロアブル）

・組成 フェンメディファム原体 ; 14.5%
界面活性剤、水等 ; 85.5

供試動物：Sprague-Dawley ラット（Charles River UK）、10～14 週齢

体重：雄 212～224g、雌 205～214g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

投与方法：投与前日に剪毛した背部および腹側部皮膚（体表面の約 10%）に所定量の検体をそのまま単回経皮投与した。投与容量は比重と投与時の体重から求めた。限度投与試験のため投与量は 2000mg/kg とした。塗布部位は包帯にて半閉塞し、塗布時間は 24 時間とした。塗布時間経過後は蒸留水で清拭した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を投与日は 30 分、1、2 および 4 時間後に、その後 14 日まで 1 日 1 回観察した。併せて皮膚の状態を観察した。体重を投与前、投与後 7 および 14 日に測定した。すべての動物を対象に肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 皮
投与量 (mg/kg)	雌雄：2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄：>2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び終了時間	発症例なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄：2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄：2000

観察期間を通じて外徴や行動の変化、死亡は観察されなかった。また体重は順調に増加を示し、投与に関連したと思われる変動は認められなかった。

雄の全例では塗布部位に検体による黄色着色が 7 日後まで認められた。また雌の 2 例に塗布部位に落屑が 4 日から 7 日まで観察された。

剖検において、特記すべき肉眼的異常所見は認められなかった。

マウスにおける急性経口毒性試験（限度投与試験）

毒性資料 No. 製剤-3

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2000 年

検体の純度：14.5%水和剤（フロアブル）

・組成 フェンメディファム原体 ; 14.5%
界面活性剤、水等 ; 85.5

供試動物：ICR 系マウス（Crj:CD-1(ICR)）、7 週齢、

体重：雄 30.9~33.6g、雌 22.1~24.0g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体に蒸留水を加えてよく混和し、用量 5000mg/kg で単回経口投与した。投与容量は 10mL/kg とした。また対照群を設けて蒸留水のみを同量投与した。投与前 3~4 時間は絶食させ、再給餌は投与 6 時間後とした。限度投与試験のための投与量 5000mg/kg は、あらかじめ雌雄各 3 匹に 5000mg/kg を投与した用量設定試験の結果から決定した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を投与日は 30 分、1、2 および 4 時間後に、その後 14 日まで 1 日 1 回観察した。体重を投与前、投与後 7 および 14 日に測定した。すべての動物を対象に肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄：0, 5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄：>5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び終了時間	発症例なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄：5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄：5000

観察期間を通じて外徴や行動の変化、死亡は観察されなかった。また体重は順調に増加を示し、投与に関連したと思われる変動は認められなかった。剖検において、特記すべき肉眼的異常所見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バイエルクロップサイエンス株式会社にある

(2)皮膚及び眼に対する刺激性

ウサギを用いた皮膚刺激性試験

毒性資料 No. 製剤-4

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検体の純度：14.5%水和剤（フロアブル）

・組成 フェンメディファム原体 ; 14.5%
界面活性剤、水等 ; 85.5

供試動物：New Zealand White 系ウサギ (Moston, UK)、約 12~16 週齢

体重：2.53~2.81kg、雄 1 匹、雌 2 匹

観察期間：塗布後 7 日

投与方法：前日に剪毛した動物の背部皮膚（2.5 cm×2.5 cm）に検体 0.5mL を塗布したガーゼパッチを貼付し、外科用粘着テープで固定して伸縮性包帯で被った。塗布時間は 4 時間とし、塗布時間経過後、皮膚に残った検体は湿らせた綿でふき取った。

観察項目：塗布終了後 1、24、48 及び 72 時間に塗布部分の刺激性変化（紅斑及び痂皮の形成、浮腫の形成）の有無等を Draize 法に従って観察した。なお 72 時間でも変化がみられたことから 7 日後にも観察した。そして 3 匹の 24 及び 72 時間の紅斑及び浮腫のスコアを合計し 6（3 匹、2 項目）で除し、一次刺激指数（P. I. I）を求めて刺激程度を以下の基準で評価した。

(EEC Commission Directive of 91/325/EEC, Council Directive 67/548/EEC)

P. I. I.	刺激の分類
0	刺激性なし
>0 ~ 2	軽度刺激性
>2 ~ 5	中等度刺激性
>5 ~ 8	重度刺激性

結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりであった。

動物番号	項目	最高 評点	暴露後時間 (hrs)				
			1	24	48	72	7日
1	紅斑・痂皮	4	1	1	1	1D	0D
	浮腫	4	1	1	1	0	0
2	紅斑・痂皮	4	1	1	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	1	2	2	2	0D
	浮腫	4	1	2	2	2	0
合計	紅斑・痂皮	12	3	4 [#]	3	3 [#]	0
	浮腫	12	3	3 [#]	3	2 [#]	0
平均	紅斑・痂皮	4	1	1.3	1	1	0
	浮腫	4	1	1	1	0.7	0
P. I. I	2.0 (= 12/6 ^{##})						

[#] P. I. I算出に用いたスコア

^{##} P. I. I算出に用いた累積匹数 (24 及び 72hrの各 3 匹×2)

D: 落屑

塗布除去後、3 匹共に皮膚の刺激性変化が観察され、ごく軽度から明らかに識別できる紅斑、ごく軽度から軽度の浮腫が認められた。変化は塗布除去後 1 時間から全例にみられ、72 時間においても 2 例に紅斑、1 例に浮腫が観察された。P. I. I は 2.0 であり、この値は分類基準から軽度刺激性に相当した。

以上の結果から、フェンメディファム 14.5%水和剤 (フロアブル) はウサギの皮膚に対して軽度刺激性を有すると判定された。

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

表. 観察した刺激性変化の採点

動物 番号	項目		最高 評点	投与後時間 (時間)			
				1	24	48	72
1	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	1	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
2	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	1	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
3	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
合計*			330	15.0	2.0	0	0
平均			110	5.0	0.7	0.0	0.0

* Draize法による評価点 (最高110)

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

結果：各観察時間における皮膚観察結果を表に示した。

	群		供 試 動 物 数	感 作 反 応 動 物 数										陽 性 率	
	適用濃度			24 時間					48 時間						
	感 作	惹 起		皮膚反応評点					皮膚反応評点						
				0	1	2	≥3	計	0	1	2	≥3	計	24 時間	48 時間
検 体	原液	原液	19	19	0	0	0	0/19	19	0	0	0	0/19	0	0
		75%		19	0	0	0	0/19	19	0	0	0	0/19	0	0
	-	原液	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0
		75%		10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0

検体感作群に惹起後の皮膚反応は全く認められなかった。

陽性対照試験は、2-Mercaptobenzothiazole を用いて同試験条件で定期的に実施されており、直近の試験（1994年10～11月実施）で15%の陽性率がみられ感受性が確認されている。

なお、感作群及び無感作群との間に体重及び体重増加量に差はみられなかった。試験7日に感作群の1匹に死亡がみられ、死因は特定できなかったが、試験の目的及び信頼性に影響を及ぼすものではないと判断した。

以上、フェンメディファム 14.5%水和剤（フロアブル）のモルモットに対する皮膚感作性は陰性と考えられた。

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

4. 参考試験¹

ラットにおける4週間反復経口投与毒性試験

毒性資料 No. 参考-1

試験機関：

報告書作成年：1967年

試験目的：

検体純度：

供試動物：Wistar系ラット、投与时体重：160～190g、1群雌雄各5匹

投与期間：4週間

投与方法：検体は0.5%Carboxymethylcelluloseで懸濁し調製した。1日の投与量は2500及び5000mg/kgとした。そして各々1日の投与量を5分割(5×500mg/kgあるいは5×1000mg/kg)、2時間間隔で経口投与した(1回投与容量：10または20mL/kg)。投与は4週間にわたり毎日実施した。併せて担体投与(1回投与容量：20mL/kg)の対照群を設けた。

観察・検査項目：

死亡率：投与期間中、生死を観察した。

その結果、雌雄各群で死亡動物は認められなかった。

(一般状態については報告書に記載なし。)

体重：投与期間中、毎週測定した。

次表にみられるように、雌雄共2500及び5000mg/kg群では投与4週で明らかな低体重がみられた。また、雄の5000mg/kg群、雌の両群では投与開始時の体重よりも低下していた。

表. 体重

性別	雄		雌	
投与量(mg/kg/日)	2500	5000	2500	5000
4週	86	71	83	76

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの、統計処理は実施されていない。

¹ 毒性資料 No. 参考 1～3 は試験実施が古く、現在のガイドラインに準拠した試験報告に比べて内容が限定的で詳細の確認が難しいため、本抄録の整備にあたり参考試験に留め記載した。

摂餌量：投与期間中、3～4日毎に測定した。

雌雄共2500及び5000mg/kg群では投与期間における摂餌量は対照群に比較し明らかに低かった。

表. 摂餌量

性別	雄		雌	
	2500	5000	2500	5000
投与量(mg/kg/日)				
1～4週	87	74	77	71

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの、統計処理は実施されていない。

血液学的検査：投与2及び4週に、全動物を対象として以下の項目を測定した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン(Hb)、網状赤血球数(Retic)、白血球数、白血球分画

統計学的に有意な変動を示した項目について次表に示した。

表. 血液学的検査結果

性別	投与量(mg/kg/日)	雄		雌	
		2500	5000	2500	5000
RBC	2週	↓85	↓81	↓78	↓70
	4週	↓66	↓61	↓68	↓65
Hb	2週		↓77		↓81
	4週	↓92	↓81		↓80
Retic	2週		↑627	↑644	↑1660
	4週	↑311	↑>529	↑312	↑>562

↓↑：p<0.05、↓↑：p<0.01 (Student t検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したものの。

いずれの検査時期においても、雌雄共に両投与群でヘモグロビン、赤血球数の減少が認められ、用量及び投与期間に応じて網赤血球数の増加、赤芽球の出現、赤血球不同症が認められた。

以上の結果から、本剤の4週間にわたる反復経口投与により、5000mg/kg/日(1000mg/kg×5)でも死亡例は認められなかった。しかし、2500mg/kg/日(500mg/kg×5)で明らかな体重減少、摂餌減少がみられ、加えて赤血球数やヘモグロビン濃度の減少、これに関連して網状赤血球数の明らかな増加が認められた。

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

ラットにおける反復経口投与（混餌）毒性試験（120日間）

毒性資料 No. 参考-2

試験機関：

報告書作成年：1967年

検体純度：

供試動物：Wistar系ラット、体重：60～80g、1群雌雄各20匹

投与期間：120日間

投与方法：検体を0（対照）、125、250及び500mg/kg/日の投与量となるように飼料に混入し、120日間にわたって随時摂食させた。

観察・検査項目：

死亡率：投与期間中、生死を観察した。（報告書に一般状態の記載なし。）

その結果、雌雄各群で死亡動物は認められなかった。

体重：投与期間中、毎週測定した。

雌雄各投与群では投与16週で明らかな低体重がみられた。

表. 投与16週の体重

性別	雄			雌		
	125	250	500	125	250	500
投与量(mg/kg/日)						
16週	↓88	↓84	↓73	↓89	↓85	↓80

↓↑：p<0.05、↓↑：p<0.01（Student t検定）

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

摂餌量：投与期間中、3～4日毎に測定した。

雄では250mg/kg以上の投与群で投与期間における摂餌量の低下がみられた。また、雌では500mg/kg群で明らかに低かった。雌の125mg/kg群でも摂餌量の減少が統計学的有意にみられたが用量に依存していなかったことから検体投与の影響とは考えられなかった。

表. 摂餌量

性別	雄			雌		
	125	250	500	125	250	500
投与量(mg/kg/日)						
1～16週		↓94	↓84	↓94		↓88

↓↑：p<0.05、↓↑：p<0.01（Student t検定）

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

血液学的検査：投与前、投与後 2、4、8 及び 16 週時に各群雌雄 5 匹ずつを対象として、以下の項目について測定した。

赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、網状赤血球数 (Retic)、白血球数 (WBC)、白血球百分率
統計学的に有意な変動を示した項目について次表に示した。

表. 血液学的検査結果

性別		雄			雌		
投与量 (mg/kg/日)		125	250	500	125	250	500
RBC	4 週		↓84	↓84		↓88	↓85
	8 週			(84)	↓88	(90)	↓85
	16 週	↓86	↓84	↓78	↓86	↓89	↓84
Hb	4 週			↓94			↓89
	8 週		(92)	↓89			↓87
	16 週	↓89	↓89	↓81		↓91	↓90
Ht	16 週		↓89	↓77			
Retic	8 週			↑247		↑176	↑206
WBC	2 週		↑126				
	4 週			↑176			
	8 週		↑175	↑212		(154)	↑180
	16 週			↑182		↑144	

↓↑ : p<0.05、↓↑ : p<0.01 (Student t 検定)

() は参考値 (有意差なし)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの。

250mg/kg 以上では投与 4 週以降雌雄で RBC 及び Hb が統計学的有意な減少が認められ、16 週では雌雄共に 125mg/kg 群でも RBC、雄で Hb の有意な減少が認められた。Ht は 16 週時に雄の 250 及び 500mg/kg 群で統計学的有意な減少をみた。さらに Retic の増加が 8 週時に雄の 500mg/kg 群、雌の 250mg/kg 以上の投与群で統計学的有意に認められた。

WBC の増加が、500mg/kg の雄で 4 週以降、雌で 8 週に認められ、投与後 8 週時の検査では 250 mg/kg でも雌雄 (雌は有意差なし) で増加した。

尿検査：投与前、投与後 2、4、8 及び 16 週時に各群雌雄 5 匹ずつを対象として、以下の項目について測定した。

糖、タンパク、ウロビリノーゲン、沈渣 [定性分析]

pH、比重 [定量分析]

検体の投与による影響と考えられる異常は認められなかった。

臓器重量：試験終了時の全生存動物を対象として、剖検後に以下の臓器について重量を測定した。また、対体重比を算出した。

肝、腎、心臓、精巣、副腎、甲状腺、胸腺、眼、脾臓、下垂体及び卵巣統計学的有意な変動を示した項目について次表に示した。

表. 臓器重量

性別		雄			雌		
投与量 (mg/kg/日)		125	250	500	125	250	500
最終体重		↓88	↓85	↓73	↓88	↓85	↓80
肝臓	対体重比	↑113	↑124	↑130	↑111	↑122	↑130
	実重量			↓85			
腎臓	対体重比	↑112	↑113	↑116			
	実重量			↓84	↓86	↓84	↓84
心臓	対体重比	↑107	↑119	↑115			
	実重量						
精巣	対体重比	↑110	↑120	↑130			
副腎	実重量					↓91	↓79
	対体重比		↑120	↑140			
甲状腺	実重量		↓85	↓69		114	
	対体重比				↑125	↑125	↑125
胸腺	実重量			↓72		↓76	↓82
眼	実重量			↓92			
	対体重比		↑115	↑127	↑110	↑113	↑123
脾臓	実重量		↑130	↑143			↑123
	対体重比	↑121	↑157	↑199		↑128	↑152
下垂体	実重量		↓91	↓73		↓86	↓64
	対体重比						↓88
卵巣	対体重比						↑136

↓↑ : p<0.05、↓↑ : p<0.01 (Student t 検定)

() は参考値 (有意差なし)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの。

雄 250mg/kg 以上、雌 500mg/kg 群において脾臓の実重量及び対体重比の増加が認められた。また、雌 250mg/kg の対体重比も増加が認められた。

その他の臓器重量の統計学的有意な変動については、いずれも対照群に比し低体重に起因したものと考えられた。

肉眼的病理検査：試験終了時の全生存動物を対象として剖検を行った。

各投与群とも検体投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

病理組織学的検査：各群雌雄 5 匹ずつについて、以下の臓器について病理組織標本を作製し、検鏡した。

肝、腎、心臓、精巣、副腎、甲状腺、胸腺、脾臓、下垂体、卵巣、胃、十二指腸、結腸、膵臓、子宮、膣、肺、骨髄、リンパ節、大脳、小脳、延髄、脊髄及び皮膚

表. 脾臓での病理組織学的検査所見数

性別	雄				雌			
	0	125	250	500	0	125	250	500
投与量 (mg/kg/日)								
検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5
脾臓： 赤脾髄充血	0	5	5	4	0	5	5	5
ヘモジデリン沈着	0	3	5	5	0	5	5	5
髄外造血	0	5	5	5	0	5	4	5
リンパ球減少	0	0	3	4	0	0	0	5
胚中心	0	0	1	3	0	0	0	5

すべての投与群で脾の赤脾髄充血、ヘモジデリン沈着、髄外造血所見が認められた。250 及び 500ppm 投与群では、脾のマルピギー小体のリンパ球の軽度減少及び胚中心の増加を認めた。

以上の結果から、検体のラットに対する 120 日間にわたる混餌投与により、雄 250mg/kg/日以上、雌 500mg/kg/日で摂餌量低下、脾臓の実重量、及び脾臓対体重比（雌 250mg/kg を含む）が増加した。250 mg/kg 以上の雌雄で RBC 及び Hb 減少、WBC 増加、雄で Ht 減少、雌で Retic が増加し、雄 500mg/kg でも Retic が増加した。125mg/kg 群でも雌雄で RBC、雄で Hb の減少が認められた。雌雄共に 125mg/kg/日で低体重がみられ、病理組織学的検査では脾臓で赤脾髄充血、ヘモジデリン沈着、髄外造血所見が認められた。よって本試験において無毒性量は得られなかった。