

(反復経口毒性/発がん性)

4) ラットを用いた飼料混入投与による2年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験

(資料 No.C-4)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2001 年

検体純度 : %、

供試動物 : Fischer CDF® (F344) CrI/Br ラット、主試験群 : 1 群雌雄各 50 匹、衛星群 (対照群及び最高投与群) : 各 20 匹、開始時約 6 週齢

投与期間 : 主試験群 : 24 か月間 (1997 年 8 月 14 日~1999 年 8 月 26 日)

衛星群 : 12 か月間 (1997 年 8 月 14 日~1998 年 8 月 19 日)

投与方法 : 主試験群の試験 1~24 週には検体を 0、2000、5000 及び 12500ppm の有効成分濃度 (以下同様) で、また試験 25 週以後は 0、160、400 及び 1000mg/kg の有効成分摂取量となるように飼料に混入し、105 から 107 週間にわたって随時摂食させた。衛星群の 1~24 週には検体を 0 及び 15000ppm の有効成分濃度で、また試験 25 週以後は 0 及び 1200mg/kg の有効成分摂取量となるように飼料に混入し、12 か月間にわたって随時摂食させた。動物には剖検前日まで投与した。検体を混入した飼料は週 1 回調製した。飼料中の有効成分濃度は分析して確認した。

用量設定 ;

観察・検査項目及び結果 :

一般状態及び死亡率 ; 一般状態及び生死を毎日 2 回観察した。また、週に 1 回触知可能な腫瘍検査を含む詳細な臨床検査を実施した。

いずれの投与群にも、明らかな毒性の臨床症状は認められなかった。

高用量群における雌雄の尿による被毛の着色、粗毛、円背位、雄の眼周辺の暗色物質、眼分泌物、雌の被毛粗剛、角膜混濁、角膜血管新生、四肢の黄色化、眼の黄色化、呼吸困難、排尿量の減少及び糞の色調異常等臨床兆候の頻度と回

数が対照群、低及び中用量群に比して増加を示した。
 触知可能な腫瘤の発現に意味のある群間差はみられなかった。
 試験終了時の死亡率を下表に示す。

投与量 (ppm)		0	2000	5000	12500
死亡率 (%)	雄	18	17	21	18
	雌	11	8	7	15

体重変化；投与開始後 13 週まで及び 25~31 週は週 1 回、その他は 4 週に 1 回すべての生存動物の体重を測定した。

対照群に比し統計学的に有意差が認められた週ごとの体重変化を下表に示す。

週	雄 (ppm)			雌 (ppm)			週	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
	2000	5000	12500	2000	5000	12500		2000	5000	12500	2000	5000	12500
1							31		↓ 95	↓ 88	↓ 96	↓ 92	↓ 91
2			↓ 94		↓ 97	↓ 94	33		↓ 94	↓ 86	↓ 97	↓ 92	↓ 91
3			↓ 92		↓ 97	↓ 93	37		↓ 94	↓ 85	↓ 96	↓ 92	↓ 91
4			↓ 92		↓ 97	↓ 94	41		↓ 94	↓ 84	↓ 96	↓ 92	↓ 91
5			↓ 93		↓ 97	↓ 94	45		↓ 93	↓ 84	↓ 96	↓ 91	↓ 89
6			↓ 92		↓ 96	↓ 93	49		↓ 96	↓ 86	↓ 96	↓ 92	↓ 89
7		↓ 97	↓ 92		↓ 94	↓ 93	53	↓ 97	↓ 93	↓ 83	↓ 96	↓ 91	↓ 88
8			↓ 92		↓ 96	↓ 94	57		↓ 94	↓ 83	↓ 96	↓ 91	↓ 87
9			↓ 92		↓ 96	↓ 95	61	↓ 96	↓ 93	↓ 82	↓ 95	↓ 89	↓ 86
10			↓ 91	↓ 98	↓ 95	↓ 94	65	↓ 96	↓ 93	↓ 81	↓ 94	↓ 88	↓ 84
11		↓ 97	↓ 91	↓ 97	↓ 94	↓ 94	69	↓ 95	↓ 92	↓ 80	↓ 94	↓ 89	↓ 83
12		↓ 97	↓ 91	↓ 97	↓ 95	↓ 94	73	↓ 95	↓ 92	↓ 80	↓ 94	↓ 88	↓ 80
13		↓ 97	↓ 91	↓ 97	↓ 96	↓ 95	77	↓ 96	↓ 92	↓ 79	↓ 94	↓ 88	↓ 79
17		↓ 97	↓ 91	↓ 98	↓ 95	↓ 95	81	↓ 95	↓ 91	↓ 79	↓ 93	↓ 89	↓ 76
21		↓ 96	↓ 91	↓ 97	↓ 94	↓ 94	85	↓ 93	↓ 90	↓ 78	↓ 94	↓ 90	↓ 77
25		↓ 95	↓ 90	↓ 98	↓ 95	↓ 92	89	↓ 93	↓ 90	↓ 76	↓ 95	↓ 91	↓ 77
26		↓ 94	↓ 88	↓ 97	↓ 93	↓ 92	93	↓ 94	↓ 89	↓ 76	↓ 95	↓ 91	↓ 76
27		↓ 95	↓ 89	↓ 97	↓ 94	↓ 92	97	↓ 93	↓ 90	↓ 75	↓ 94	↓ 90	↓ 76
28		↓ 95	↓ 88	↓ 97	↓ 94	↓ 92	101	↓ 94	↓ 90	↓ 75	↓ 95	↓ 91	↓ 76
29		↓ 94	↓ 88	↓ 97	↓ 94	↓ 92	105	↓ 94	↓ 92	↓ 75	↓ 94	↓ 90	↓ 76
30		↓ 95	↓ 88	↓ 97	↓ 93	↓ 91							

ANOVA : ↓ = P<0.05 ; ↓↓ = P<0.01 ; ↓↓↓ = P<0.001

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す

統計学的に有意な平均体重の低下が、試験期間中低用量、中用量及び高用量群の雌雄に認められ、このうち中用量及び高用量群の平均体重は試験期間中に 10%以上低い値を示し、毒性学的に意味があると考えられた。低用量群の雌雄の平均体重は試験期間を通して対照群の 7%以内であった。

摂餌量；投与開始前の 1 週間、試験直後の 13 週間及び試験 25 週から 31 週までは週 1 回、その他は 4 週間に 1 回個体別摂餌量を測定した。

対照群に比し統計学的に有意差が認められた週ごとの摂餌量を下表に示す。

週	雄 (ppm)			雌 (ppm)			週	雄 (ppm)			雌 (ppm)		
	2000	5000	12500	2000	5000	12500		2000	5000	12500	2000	5000	12500
1-2		↓ 94	↓ 88		↓ 92	↓ 85	30-31		↓ 94	↓ 88			↓ 85
2-3		↓ 94	↓ 88		↓ 92	↓ 92	33-34		↓ 94	↓ 89		↓ 100	↓ 92
3-4		↓ 89	↓ 84		↓ 92	↓ 85	37-38			↓ 94			↓ 92
4-5		↓ 94	↓ 89		↓ 92	↓ 92	41-42		↓ 89	↓ 89		↓ 93	↓ 86
5-6		↓ 94	↓ 89		↓ 100	↓ 92	45-46		↓ 95	↓ 89		↓ 93	↓ 86
6-7			↓ 94			↓ 92	49-50		↓ 95	↓ 95			↓ 86
7-8		↓ 94	↓ 94		↓ 92	↓ 92	53-54		↓ 89	↓ 89		↓ 93	↓ 86
8-9		↓ 94	↓ 94				57-58			↓ 94		↓ 93	↓ 86
9-10		↓ 94	↓ 89			↓ 92	61-62	↓ 95	↓ 90	↓ 85		↓ 93	↓ 87
10-11		↓ 100	↓ 94			↓ 92	65-66		↓ 95	↓ 89		↓ 93	↓ 80
11-12		↓ 94	↓ 89		↓ 92	↓ 92	69-70		↓ 95	↓ 89	↓ 93	↓ 93	↓ 80
12-13		↓ 100	↓ 89		↓ 92	↓ 92	73-74	↓ 95	↓ 89	↓ 89		↓ 100	↓ 86
13-14		↓ 94	↓ 94			↓ 92	77-78		↓ 94	↓ 89	↓ 93	↓ 93	↓ 80
17-18		↓ 94	↓ 94	↓ 108		↓ 100	81-82	↓ 95	↓ 89	↓ 89	↓ 100		↓ 93
21-22		↓ 94	↓ 89			↓ 92	85-86			↓ 89		↓ 93	↓ 87
25-26		↓ 95	↓ 90			↓ 85	89-90		↓ 94	↓ 94			↓ 86
26-27			↓ 94			↓ 85	93-94		↓ 89	↓ 89		↓ 87	↓ 87
27-28	↓ 94	↓ 94	↓ 89			↓ 85	97-98			↓ 89	↓ 93	↓ 93	↓ 87
28-29	↓ 89	↓ 89	↓ 84		↓ 100	↓ 85	101-102						↓ 87
29-30	↓ 94	↓ 94	↓ 83			↓ 85							

ANOVA : † = P<0.05 ; ‡ = P<0.01 ; ↓ = P<0.001

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

平均摂餌量は、試験期間中対照群に比して、低用量、中用量及び高用量群の雌雄で統計学的に有意な減少を示した。しかし、低用量群の差は軽微で、しかも一貫した傾向がみられないか、あるいは平均体重の低下と毒性学的な関連性が認められなかったことから、中用量及び高用量群のみの減少が毒性学的に有意と考えられた。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		2000	5000	12500
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	150	368	989
	雌	155	392	1022

飲水量；6 か月毎に 1 週間をとおし(試験 26~27、53~54、77~78 及び 101~102 週)、各試験群雌雄各 10 匹の個体別飲水量を測定した。

対照群に比し統計学的に有意差が認められた測定週の飲水量を下表に示す。

性別	雄			雌		
	2000	5000	12500	2000	5000	12500
26-27 週			↑ 138			
53-54 週		↑ 119	↑ 169			
77-78 週			↑ 160			

ANOVA : † = P<0.05 ; ‡ = P<0.001

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

対照群に比して統計学的に有意な平均飲水量の増加が、中用量群雄の試験 53~54 週に、高用量群雄の試験 26~27、53~54 及び 77~78 週に認められたが、毒性学的意義は明らかではない。低用量群の雌雄及び中用量及び高用量群の雌に統計学的な有意差は認められなかった。

血液学的検査；試験 27、52、78 及び 104 週に各群雌雄 10 匹ずつの同一動物を対象として、眼窩静脈叢から血液を採取し、以下の項目を測定した。

赤血球数 (RBC)、ヘマトクリット値 (Hct)、ヘモグロビン濃度 (Hgb)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、平均赤血球数容量 (MCV)、血小板数、網状赤血球数、総白血球数及び型別白血球数

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

投与量 (ppm)		2000				5000				12500			
検査時期 (週)		27	52	78	104	27	52	78	104	27	52	78	104
雄	ヘモグロビン							↑110					
	ヘマトクリット							↑108					
	MCH					↑104				↑104			
	MCHC					↑103				↑104	↑102		
	総白血球数										↑134		
	分葉好中球										↑155		
雌	ヘモグロビン											↓96	
	ヘマトクリット											↓95	
	MCV				↓93						↓97	↓97	↓92
	MCH					↑102							
	MCHC							↑102					
	総白血球数										↑159		
	分葉好中球										↑178		
	リンパ球										↑153		

ANOVA: ↑ = P<0.05, ↑↑ = P<0.01, ↑↑↑ = P<0.001

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

試験期間中、対照群に比していくつかの統計学的な有意差が認められたが、これらの差に一貫した傾向または用量反応性が認められなかったことから、毒性的に意味のあるものはないと考えられた。

血液生化学検査；試験 27、52、78 及び 104 週に血液学的検査に用いた以外の各群雌雄 10 匹ずつの同一動物を対象として、眼窩静脈叢から血液を採取し、以下の項目を測定した。

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルブミン、アルブミン/グロブリン (A/G) 比、アルカリフォスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、血中クレアチニン、カルシウム、コレステロール、クレアチンホスホキナーゼ、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT)、グロブリン、グルコース (絶食時)、電解質 (ナトリウム、カリウム、塩素)、リン、総ビリルビン、血清中総タンパク、尿素窒素 (BUN)。

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた項目を下表に示す。

投与量 (ppm)		2000				5000				12500			
検査時期 (週)		27	52	78	104	27	52	78	104	27	52	78	104
雌	AST								↑193	↑73			
	ALT						↑71			↓68	↓68		
	総タンパク		↑103				↑103						
	アルブミン					↑95							
	グロブリン						↑108						
	尿素窒素										↑117		
	クレアチニン												↑75
	カリウム										↑107		
	塩素										↑98		
	カルシウム		↑104				↑103						
	コレステロール									↑124	↓75		↓149
	クレアチンキナーゼ								↑167			↓45	↓130
	GGT								↑149				

検査時期 (週)	2000				5000				12500			
	27	52	78	104	27	52	78	104	27	52	78	104
AST										↑ 72		
ALT										↓ 61		
アルカリフォスファターゼ									↑ 133	↑ 148	↑ 159	
総ビリルビン											↑ 177	
総タンパク									↓ 94			
アルブミン	195	193				193			↓ 86	↓ 87		
グロブリン						1109						
A/G 比	≡ 91					↓ 84	192		↓ 86	↓ 83	↓ 87	≡ 85
尿素窒素										↑ 116	↑ 121	↑ 125
グルコース			↑ 125				↑ 118				↑ 118	
ナトリウム											≡ 99	
カルシウム								↓ 97				
コレステロール					187			185	185			
クレアチニン			168								≡ 61	
GGT								↑ 193		↑ 172		↑ 224
リン					↑ 118	↑ 120			↑ 118	↑ 122		↑ 114

ANOVA : ↑↓ = P<0.05, ↑↑ = P<0.01, ↑↓ = P<0.001
 表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

試験期間中幾つかの項目に統計学的有意差が認められたが、高用量群の雌におけるアルカリフォスファターゼの上昇及びGGTの上昇を除き、毒性学的に重要と考えられる差はなかった。クレアチニンが試験 104 週に高用量群の雄で統計学的に有意な減少を示した。この減少は筋の衰弱の徴候である可能性があり、試験期間中に高用量群の雄に認められた体重及び摂餌量の減少に関連した検体投与の二次的作用であり、直接的な毒性影響ではないと考えられる。

尿検査；血液学的検査と同時期に血液学的検査を実施した動物の尿について以下の項目を検査した。

尿量、色調、外観、pH、比重、尿タンパク、グルコース、ケトン体、ウロビリノーゲン、亜硝酸塩、ビリルビン、潜血、白血球、沈渣の鏡検（白血球、赤血球、円柱細胞、上皮細胞、硝子質、細菌、その他）

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた項目を下表に示す。

検査時期 (週)	2000				5000				12500			
	27	52	78	104	27	52	78	104	27	52	78	104
総尿量	雄									↑ 215	↑ 207	
	雌									↑ 359		↑ 242
比重	雄					198				↓ 96		
	雌									↑ 97		

ANOVA : ↑↓ = P<0.05, ↑↓ = P<0.001
 表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

試験 52 週に、総尿量が高用量群の雌雄で統計学的に有意な増加を示し、比重が中用量及び高用量群の雄及び高用量の雌で有意な低下を示したが、これらの差の毒性学的な意義は明らかではない。その他検体投与に関連する影響は認められなかった。

眼科学的検査；試験前は全動物について、また、投与終了前（試験 101 週）の各群雌雄各 20 匹について検査した。

投与検体に関連ある異常は認められなかった。

臓器重量；投与期間終了時の剖検時に各群雌雄各 20 匹の動物について次の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

肝、肺、腎、副腎、顎下腺、脾、胸腺、下垂体、甲状腺／上皮小体、精巣、

卵巣及び脳

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた項目を下表に示す。

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		2000	5000	12500	2000	5000	12500
最終体重			↓ 92	↓ 74	↓ 93	↓ 88	↓ 75
脳	重量 対体重比			↓ 95 ↑ 127		↑ 112	↑ 130
	重量 対体重比			↑ 80			↑ 175
下垂体	重量 対体重比						↓ 76
	重量 対体重比						↓ 89 ↑ 119
卵巣	重量 対体重比						↓ 50 ↑ 100
	重量 対体重比	↓ 89		↓ 77			↑ 84
顎下腺	重量 対体重比			↑ 60			
	重量 対体重比			↓ 68			
胸腺	重量 対体重比		↑ 87	↓ 90 ↑ 121		↑ 115	↑ 129
	重量 対体重比						
肝	重量 対体重比						
	重量 対体重比						
腎	重量 対体重比						
	重量 対体重比						

ANOVA : †† = P<0.05, ††† = P<0.01, †††† = P<0.001

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

試験終了時に、絶対及び/または相対臓器重量データにいくつかの統計学的な有意差が認められたが、これらの差は一貫した傾向を示さず、或いは何らかの病理組織学的異常との関連性がみられなかったことから、毒性学的な意味はないと考えられた。さらに高用量群の雌雄にみられた絶対又は相対重量における有意差は試験終了時の動物の体重が対照群に比して低下したことに関連した。

肉眼的病理検査；途中死亡、切迫屠殺及び試験終了時の全生存動物について剖検をおこなった。

認められた主要な肉眼的病理所見を下表に示す。

時期	臓器	病理所見	雄 (ppm)				雌 (ppm)			
			0	2000	5000	12500	0	2000	5000	12500
途中死亡動物	検査動物数		9	11	8	13	5	3	3	5
	腹腔	腹水	1/9	3/11	3/8	5/13	0/5	1/3	0/3	0/5
	盲腸	膨満	0/9	3/11	1/8	0/13	0/5	0/3	1/3	0/5
	下垂体	暗赤色領域	4/9	1/11	0/8	2/13	0/5	0/3	1/3	3/5
	精巣	軟化	1/9	1/11	1/8	3/13	—	—	—	—
		小型化	0/9	0/11	2/8	4/13	—	—	—	—
	胸腺	小型化	3/9	2/11	1/8	8/13	0/5	1/3	0/3	0/5
	全身/カーカス	体脂肪枯渇	4/9	3/11	4/8	10/13	0/5	1/3	0/3	1/5
黄疸		4/9	2/11	0/8	1/13	0/5	2/3	2/3	3/5	
計画面前屠殺動物	検査動物数		9	6	13	5	6	5	4	10
	血液	希薄血液	1/9	4/6	6/13	2/5	2/6	1/5	2/4	4/10
	眼	眼球混濁	2/9	1/6	3/13	0/5	1/6	0/5	1/4	4/10
	肝	黄褐色領域	0/9	0/6	3/13	1/5	1/6	0/5	0/4	3/10
	リンパ節 (脾)	暗赤色化	0/9	1/6	3/13	1/5	0/6	0/5	0/4	1/10
	脾	腫大	3/9	5/6	9/13	4/5	1/6	0/5	2/4	9/10
	胸腔	胸水	1/9	1/6	4/13	2/5	0/6	1/5	2/4	1/10
	全身/カーカス	黄疸	0/9	3/6	7/13	3/5	2/6	0/5	2/4	5/10

時期	臓器	病理所見	雄 (ppm)				雌 (ppm)			
			0	2000	5000	12500	0	2000	5000	12500
試験終了時屠殺動物	検査動物数		32	33	29	32	39	42	43	35
	血液	希薄血液	1/32	0/33	0/29	4/32	0/39	0/42	1/43	0/35
		眼	眼球混濁	5/32	4/33	1/29	10/32	7/39	15/42	8/43
	病変		5/32	2/33	5/29	2/32	7/39	4/42	1/43	10/35
	下垂体	暗赤色領域	3/32	7/33	7/29	7/32	7/39	9/42	12/43	6/35
	胃	巣	0/32	0/33	1/29	4/32	0/39	0/42	0/43	0/35
	皮下組織	膿瘍	0/32	0/33	0/29	3/32	0/39	3/42	0/43	0/35
	精巣	小型化	1/32	1/33	0/29	4/32	—	—	—	—
	胸腺	小型化	1/32	7/33	1/29	4/32	0/39	1/42	0/43	2/35
	全身/カーカス	体脂肪枯渇	1/32	2/33	0/29	5/32	0/39	0/42	0/43	1/35

剖検所見の多くは、加齢ラットに広く認められる所見に一致した。試験期間中に死亡した動物の雄では、低用量群における盲腸の膨満、低用量及び中用量群における腹水、ならびに高用量群における脂肪の減少、胸腺の小型化、腹水、精巣の軟化及び精巣の小型化の頻度が対照群に比して増加し、また雌では、高用量群における下垂体の暗赤色領域及び黄疸の頻度が対照群に比して増加した。計画屠殺前に屠殺した動物の雄では、低用量及び中用量群における希薄血液、低用量、中用量及び高用量群における黄疸、中用量群における胸水、脾腫大、肝の黄褐色領域、及び膵リンパ節の暗赤色化の各頻度が対照群に比して増加し、また雌では、対照群に比して高用量群で脾腫大、眼球混濁、黄疸、希薄血液の頻度が増加した。試験終了時に屠殺した動物の雄では、低用量群における胸腺の小型化、低用量、中用量及び高用量群における下垂体の暗赤色領域、ならびに高用量群における脂肪の減少、希薄血液、眼球混濁、胃の病巣、皮下組織の膿瘍、胸腺の小型化及び精巣の小型化の頻度が対照群に比して増加し、また雌では、低用量及び高用量群における眼球混濁ならびに高用量群における眼の病変の頻度が対照群に比して増加した。

病理組織学的検査；途中死亡動物及び試験終了時まで生存した全ての対照群及び高用量群の動物を対象として、以下の組織について病理組織標本を作製し、検鏡した。但し、組織腫瘍、肉眼病変部、標的臓器、肺、肝及び腎については全ての動物を対象として病理標本を作製し、検鏡した。

副生殖器（精巣上体、精囊、前立腺、子宮及び膣）、副腎、大動脈、胆管、脳（延髄/脳橋、小脳皮質及び大脳を含む）、盲腸、結腸、十二指腸、食道、眼窩外涙腺、眼球及び視神経、大腿骨（関節表面を含む）、心、回腸、空腸、腎、喉頭、肝（3組織片）、肺（ホルマリン灌注）及び気管支、乳腺、縦隔リンパ節、腸間膜リンパ節、膵、末梢神経（坐骨神経）、咽頭、下垂体、直腸、唾液腺、顎下腺、骨格筋（大腿筋）、皮膚、脊髄（頸部、胸部中央、腰部）、脾、胸骨及び骨髄、胃（腺胃/非腺胃）、下顎リンパ節、精巣/卵巣、胸腺、甲状腺/上皮小体、舌、気管、膀胱（ホルマリン灌注）。

病理組織検査で非腫瘍性病変及び腫瘍性病変として認められた項目を表1及び表2に示す。

本試験では、脳の脈絡叢を裏打ちする上皮細胞に、投与関連性、用量依存性の細胞質内空胞化が認められた。この病変は、対照群のラットの2%、低用量群の87%、中用量群及び高用量群の100%で認められた。低用量群におけるこの

病変の程度は最小限から軽度まで等しく分布していた。中用量群における程度は主に中等度であり、高用量群における程度は主として重度であった。重度は細胞質内の融合した空胞を特徴とする細胞を示し、細胞の直径は最大で正常値の4倍まで増加した。中等度の病変では、細胞は肥大しない場合が多く、影響は一様ではなかった。最小限または軽度の病変は、細胞質内に大きさの異なる少数の空胞を有した。脳の各脳室の上皮細胞に所見は見られず、試験実施期間中に神経学的な異常は認められなかった。さらに、涙腺における上皮細胞の空胞化が対照群の0%、低用量群の4%、中用量群の32%及び高用量群の100%のラットで認められた。空胞は多巣性に発現する傾向を示し、実質組織及び管の上皮細胞の双方に認められた。空胞化の程度は用量に依存して増大した。その他の所見は、この齢期及び系統のラットに発現する自然発生的な変化と考えられた。ラットは健康状態良好であり、基本的に組織に、試験の有効性に影響を及ぼし得た感染症を示す病変はなかった。本試験において検査したいずれの臓器または組織にも、被験物質に関連する腫瘍は認められなかった。腫瘍はいずれも自然発生性であり、ラットの齢期及び系統に一致すると考えられた。本試験における腫瘍の頻度を統計学的に解析した結果、検体の2年間の投与は良性又は悪性腫瘍のいずれの頻度又は発現にも影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、本剤のラットに対する24ヶ月間飼料混入投与による2年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験における影響として、5000ppm群及び12500ppm群における平均体重及び摂餌量の減少、ならびに全投与群において脳の脈絡叢を裏打ちする上皮細胞の細胞質内空胞化及び涙腺上皮細胞における用量依存性の空胞化が誘発された。しかし、本試験で調べたいずれの用量においても、検体の混餌投与が腫瘍の傾向又は頻度に影響を及ぼすことを示す徴候はなかった。

[申請者註]

表1 [非腫瘍性病変]

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	2000	5000	12500	0	2000	5000	12500
脳	脈絡叢空胞化	0/50	18/20	23/23	50/50	2/50	9/11	10/10	50/50
	(最小限)	(0)	(9)	(0)	(0)	(0)	(3)	(0)	(0)
	(軽微)	(0)	(9)	(3)	(1)	(1)	(6)	(4)	(0)
	(中等度)	(0)	(0)	(16)	(6)	(1)	(0)	(6)	(11)
	(重度)	(0)	(0)	(4)	(43)	(0)	(0)	(0)	(39)
涙腺	空胞変化	0/50	1/17	8/21	49/49	0/50	0/8	1/7	50/50
	(最小限)	(0)	(0)	(6)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)
	(軽微)	(0)	(1)	(1)	(4)	(0)	(0)	(1)	(15)
	(中等度)	(0)	(0)	(1)	(45)	(0)	(0)	(0)	(34)

表2 [腫瘍性病変]

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	2000	5000	12500	0	2000	5000	12500
副腎	褐色細胞腫 (B)	4/50	2/19	2/22	2/50				
	褐色細胞腫、両側 (B)	0/50	1/19	0/22	1/50				
	褐色細胞腫、複合 (B)	0/50	1/19	0/22	0/50	0/50	1/10	0/9	0/50
	褐色細胞腫 (M)					1/50	0/10	1/9	0/50
	褐色細胞腫、複合 (M)					1/50	0/10	1/9	0/50
	褐色細胞腫、両側 (M)	0/50	0/19	0/22	1/50				
骨	骨腫 (B)	0/1	1/1	0/0	0/2				
	骨肉腫 (M)	0/1	0/1	0/0	1/2				
胸骨	骨肉腫 (M)	0/50	0/17	0/20	1/49				
脳	星状細胞腫 (B)	1/50	0/20	0/23	0/50				
	乏突起膠腫 (B)	0/50	1/20	0/23	0/50				
	髄膜肉腫 (M)					1/50	0/11	1/10	0/50
腹腔	平滑筋肉腫 (M)					1/4	0/5	0/3	0/3
	中皮腫 (M)	5/11	2/9	0/2	3/6				
口腔	乳頭腫 (B)	1/1	0/0	0/0	0/0				
頸部	線維腫 (B)					0/0	0/3	1/1	0/0
	間質肉腫 (M)					0/0	2/3	0/1	0/0
陰核腺	腺腫 (B)					0/1	1/5	0/3	0/2
	癌 (M)					0/1	0/5	2/3	0/2
結腸	平滑筋肉腫 (M)					1/49	0/8	0/7	0/50
十二指腸	腺癌 (M)	0/50	1/18	0/21	0/50				
	平滑筋腫 (B)					1/48	0/8	0/7	0/50
心	シュワン細胞腫 (B)	2/50	0/17	0/21	0/50	1/50	0/8	0/7	1/50
腎	腺腫 (B)	0/50	1/50	0/50	2/50				
	癌 (M)	1/50	0/50	0/50	1/50				
肝	肝細胞腺腫 (B)	0/50	2/50	1/50	1/50	0/50	0/50	0/50	2/50
	肝細胞癌 (M)	0/50	0/50	1/50	0/50				
肺 気管支	細気管支・肺胞腺腫 (B)	0/50	0/50	1/50	0/50	1/50	1/49	0/50	1/50
	細気管支・肺胞癌 (M)	1/50	0/50	0/50	1/50				
乳腺	癌 (M)					0/50	0/12	1/11	1/49
	線維腺腫 (B)	2/47	0/18	2/21	0/48	1/50	4/12	3/11	3/49
卵巣	浸襲性腺癌 (M)					0/50	0/12	1/12	0/50
	顆粒膜細胞腫 (M)					1/50	0/12	0/12	0/50
卵管	腺腫 (B)					0/0	0/0	0/0	1/1
膵	島細胞腺腫 (B)	5/50	1/17	3/21	9/50				
	島細胞癌 (M)	2/50	1/17	0/21	1/50				
下垂体	腺腫 (B)	16/50	13/32	9/36	11/50	19/49	21/28	20/30	19/50
包皮腺	腺腫 (B)	2/10	2/13	1/3	1/6				
	癌 (M)	0/10	1/13	0/3	1/6				
皮膚	基底細胞腺腫 (B)	0/50	0/17	0/20	1/50				

注) Pete 解析

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

表2 【腫瘍性病変】 (続き)

性 別		雄				雌			
		0	2000	5000	12500	0	2000	5000	12500
投与量 (ppm)									
病変 皮膚	基底細胞腺腫 (B)	2/11	0/10	1/9	0/8				
	腺維腫 (B)	2/11	3/10	1/9	0/8	0/3	0/4	1/4	0/4
	線維肉腫 (M)	1/11	0/10	1/9	1/8	0/3	1/4	0/4	0/4
	血管肉腫 (M)	0/11	0/10	1/9	0/8				
	角化棘細胞腫 (B)	1/11	1/10	0/9	1/8	0/3	1/4	1/4	0/4
	平滑筋肉腫 (M)	0/11	1/10	0/9	0/8				
	神経冠新生物 (B)	1/11	1/10	1/9	0/8	0/3	0/4	0/4	1/4
	乳頭腫 (B)	1/11	0/10	0/9	0/8	0/3	0/4	1/4	1/4
	扁平上皮乳頭腫 (B)	0/11	0/10	1/9	0/8				
	未分化肉腫 (M)	1/11	1/10	0/9	0/8	1/3	0/4	0/4	0/4
	扁平細胞癌 (M)					0/3	1/4	0/4	0/4
	毛嚢上皮腫 (B)					0/3	1/4	0/4	0/4
脊髄	星状膠細胞腫 (B)	0/50	0/17	1/21	0/50				
脾	未分化肉腫 (M)	0/50	1/23	0/26	0/50				
胃	乳頭腫 (B)	0/50	0/18	0/23	1/50				
精巣	肝細胞腺腫 (B)	50/50	47/50	47/50	41/50				
甲状腺	C細胞腺腫 (B)	6/50	3/22	3/27	3/50	4/50	1/10	2/11	2/50
	濾胞上皮細胞腺腫 (B)					0/50	0/10	1/11	0/50
	C細胞癌 (M)	0/50	1/22	2/27	0/50	2/50	0/10	0/11	0/50
	濾胞上皮細胞癌 (M)	1/50	1/22	3/27	0/50	0/50	1/10	0/11	0/50
子宮	内膜腺癌 (M)					1/50	2/17	3/19	0/50
	内膜腺腫 (B)					1/50	0/17	0/19	1/50
	ポリープ (B)					18/50	8/17	12/19	5/50
	扁平上皮癌 (M)					1/50	1/17	0/19	0/50
膣	浸潤性癌 (M)					0/50	1/8	0/8	0/50
血液リン パ網様系	単核球性白血病 (M)	20/20	17/17	21/21	19/19	11/11	10/10	10/10	19/19

注) Petc 解析

(B) : 良性腫瘍、(M) : 悪性腫瘍

(10) 繁殖毒性及び催奇形性 (繁殖毒性)
1) ラットを用いた繁殖毒性試験 (資料 No.R-1)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検体純度： %

供試動物：Sprague Dawley 系 Crl:CD (SD) IGS BR、1 群雄 28 匹、雌 28 匹、投与開始時雄約 6 週齢、雌約 7 週齢

投与期間：F0 世代；投与開始から F1 児離乳時までの 18 週間、F1 世代；離乳時から F2 児離乳時までの 18 週間（2000 年 5 月 1 日～2000 年 12 月 3 日）。

投与方法：検体に逆浸透脱イオン水を加えて 0、5、20 及び 100mg/mL（有効成分濃度）に調製し、0、50、200 及び 1000 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回強制胃内投与を行った。投与容量は 10mL/kg（体重）とした。検体投与液は毎週 1 回以上調製した。投与液中の有効成分は分析して確認した。

（申請者注）

本試験は、以下の理由から強制胃内投与によって実施された。

- 1) 検体投与の精度および一貫性を高めるため
- 2) 飼料の嗜好性による検体摂取量の制限を避けるため
- 3) 投与混合物の分析を容易にするため

用量設定；

交配・調整・選抜及び観察・検査項目：概要を次頁の表 1 にまとめた。

表 1. 交配・調整・選抜及び観察・検査項目の概要

世代	期間 (週間)	交配・調整・選抜	観察・検査項目
F0	生育 (10 週)		体重、摂餌量を週 1 回測定 交配 3 週間前から交尾が認められるまで、もしくは、交配期間中、膣垢検査により発情周期を確認
	交配 (2 週)	雌雄 1 対 1 で交配。交配は膣栓又は膣垢中精子の検出により交尾を確認した (妊娠 0 日)。	交配状況の観察 交配確認後に雌雄を分離 (交配の証拠がない場合は 14 日後に雌雄を分離)。交配終了後の計画殺動物 (全児死亡、無分娩の雌親) について病理学的検査、計画殺時に全群の雄動物について精子検査
	妊娠 (3 週)		体重測定: 妊娠 0、7、14 及び 20 日 摂餌量: 測定せず
	出産		出産状況の観察 妊娠期間、新生児数、死産児数、外表異常、性別
	哺育 (3 週)	哺育 4 日に各同腹児を雌雄各 4 匹に調整 (同腹児数が 8 匹以下の場合は調整せず)	母動物は哺育 1、4、7、14、21 日に体重測定。摂餌量週 1 回測定。児動物の生死観察は毎日、外表異常、性別検査及び体重測定は哺育 0 (1)、4、7、14 及び 21 日に実施、死亡児の剖検。
	離乳	継代用に一腹当たり無作為に雌雄各 1 匹、一群当たり合計雌雄各 28 匹を選抜	親動物の対照群と最高投与群 (一部組織は全投与群) について病理組織学的検査。継代用以外の全児動物は屠殺して肉眼病理検査。
F1	生育 (11 週)		性成熟 (雄の包皮分離、雌の膣開口) 観察
	交配 (2 週)	(F0 世代に準ずる)	(F0 世代に準ずる)
	妊娠 (3 週)		(F0 世代に準ずる)
	出産		(F0 世代に準ずる)
	哺育 (3 週)		(F0 世代に準ずる)
F2	離乳		哺育 21 日に全 F2 児動物を剖検・肉眼病理検査に供した。親動物の対照群と最高投与群 (一部組織は全投与群) について病理組織学的検査。

結果：概要を表 2-1 及び 2-2 に示した。
(申請者注)

表 2-1. 結果の概要 (F0/F1)

世代		親：F0		児：F1		
投与量 (mg/kg/日)		0	50	200	1000	
動物数	雄	28	28	28	28	
	雌	28	28	28	28	
一般状態		流涎、口周辺赤色物質				
死亡数	雄	0/28	0/28	0/28	1/28	
	雌	0/28	1/28	0/28	6/28	
体重及び 体重増加	雄	(表 3-1 参照)				
	雌					
摂餌量	雄	(表 4-1 参照)				
	雌					
交尾率 (%)		96.4	100.0	96.4	96.0	
受胎率 (%)		96.3	100.0	100.0	87.5	
発情周期 (日)		3.9	3.9	4.0	4.0	
交尾前期間 (日)		3.0	2.5	2.9	3.5	
妊娠期間 (日)		22.0	22.1	22.0	22.1	
肉眼的病理検査		検体投与に関連した所見は認められず。				
平均着床痕数		15.3	14.9	14.6	13.8	
臓器重量		(表 5-1 参照)				
精子検査	運動性 (%)	80	84	80	19 [#]	
	前進運動率 (%)	73	77	73	16 [#]	
	正常形態 (%)	85.5	88.4	86.9	18.2 [#]	
	精子濃度 (M/mL) ¹⁾	3.8	3.4	3.8	2.6 [#]	
	精子数 (M/g) ²⁾	873.5	801.3	875.7	725.2 ^{**}	
	精子濃度 (M/mL) ³⁾	1.9	2.0	1.7	1.3 [#]	
精子数 (M/g) ⁴⁾		84.1	95.3	78.5	59.6 ^{**}	
病理組織学的検査		脳脈絡叢上皮細胞空胞変化 精巣上体上皮細胞空胞変化				
生産児同腹数		26	28	27	20	
産児数 (一腹当たり)		14.5	14.0	14.0	12.5	
生存児数 (出産 0 日)		14.0	13.4	13.7	12.3	
出生率 (%)		96.8	95.7	97.4	93.5	
性比 (雄/雌)		54.4/45.6	54.8/45.2	54.5/45.5	51.6/48.4	
生後 4 日目生存率 (%)		98.4	98.1	97.3	86.6 ^{**}	
離乳時生存率 (%)		99.0	95.8	99.5	93.3 [*]	
離乳時体重 (g)	雄	54.0	53.4	53.0	49.1 ^{**}	
	雌	51.9	50.4	51.5	46.1 ^{**}	
臍開口 (日)		34.3	34.5	34.0	34.3	
包皮分離 (日)		42.7	43.0	43.5	44.0	
肉眼的病理検査		顕著な剖検所見なし (全群に無気肺、胃内乳汁不在あり)				
臓器重量 (g) (対体重比)	脳	雄	1.56 (2.90)	1.54 (2.90)	1.57 (2.99)	1.55 (3.19 ^{**})
		雌	1.50 (2.89)	1.52 (3.01)	1.52 (2.99)	1.49 (3.36 ^{**})
		計	1.53 (2.90)	1.53 (2.96)	1.55 (2.99)	1.52 (3.25 ^{**})
	脾	雄	0.24 (0.45)	0.24 (0.45)	0.24 (0.44)	0.21 (0.42)
		雌	0.26 (0.48)	0.23 (0.46)	0.23 (0.45)	0.20 ^{**} (0.44)
		計	0.25 (0.47)	0.24 (0.45)	0.23 (0.45)	0.20 ^{**} (0.43)

Dunnnett 検定：* F0<0.05、** F0<0.01、[#] F0<0.001、交尾前期間：同居から交配まで

注：1) 精巣尾部精子濃度：Millions/mL、2) 精巣尾部精子数：Millions/g (左尾部重量)

3) 精巣精子濃度：Millions/mL、4) 精巣精子数：Millions/g (精巣重量)

表 2-2. 結果の概要 (F1/F2)

世代		親 : F1 児 : F2				
投与量 (mg/kg/日)		0	50	200	1000	
動物数	雄	28	28	28	28	
	雌	28	28	28	28	
一般状態				流涎、口周辺赤色物質	流涎、口周辺赤色物質、不安定歩行、活動性低下	
死亡数	雄	0/28	0/28	5/28	5/28	
	雌	1/28	0/28	0/28	2/28	
体重及び体重増加	雄	(表 3-2 参照)				
	雌					
摂餌量	雄	(表 4-2 参照)				
	雌					
交尾率 (%)		96.3	96.4	82.1	88.9	
受胎率 (%)		81.5	92.6	82.6	87.5	
発情周期 (日)		4.2	3.9	3.9	4.0	
交尾前期間 (日)		3.1	3.4	3.1	3.4	
妊娠期間 (日)		22.0	22.0	22.1	22.3**	
肉眼的病理検査		検体投与に関連した所見は認められず。				
平均着床痕数		13.8	14.1	14.3	12.7	
臓器重量		(表 5-2 参照)				
精子検査	運動性 (%)	73	80	76	19 [#]	
	前進運動率 (%)	68	74	70	16 [#]	
	正常形態 (%)	86.0	88.7	88.3	14.4 [#]	
	精子濃度 (M/mL) ¹⁾	4.0	3.9	3.3 [*]	2.3 [#]	
	精子数 (M/g) ²⁾	926.4	870.1	764.6 [*]	633.6 [#]	
	精子濃度 (M/mL) ³⁾	2.2	2.0	2.1	1.9	
	精子数 (M/g) ⁴⁾	101.1	89.4	99.5	88.4	
病理組織学的検査					精巣上体上皮細胞空胞変化	
生産児同腹数		22	25	19	20	
産児数 (一腹当たり)		13.5	13.4	13.6	11.9	
生存児数 (出産 0 日)		13.2	13.1	13.3	11.6	
出生率 (%)		97.6	97.3	97.3	97.5	
性比 (雄/雌)		54.1/45.9	49.5/50.5	47.2/52.8	49.4/50.6	
4 日目生存率 (%)		99.0	99.1	98.8	93.6 ^{**}	
離乳時生存率 (%)		97.7	100.0	100.0	99.3	
離乳時体重 (g)	雄	55.4	56.3	56.0	52.2	
	雌	53.2	53.4	53.2	49.8	
肉眼的病理検査		顕著な剖検所見なし (死亡動物に無気肺、乳汁不在あり)、 一般所見：尾端欠損、耳介欠損、腎盂拡張等				
臓器重量 (g) (対体重比)	脳	雄	1.56 (2.90)	1.60 (2.82)	1.59 (2.85)	1.57 (3.09)
		雌	1.55 (2.95)	1.54 (2.88)	1.54 (2.93)	1.49 (3.12)
		計	1.55 (2.92)	1.57 (2.85)	1.57 (2.89)	1.53 (3.10 [*])
	胸腺	雄	0.25 (0.45)	0.26 (0.46)	0.24 (0.43)	0.22 [*] (0.42)
		雌	0.25 (0.47)	0.25 (0.47)	0.25 (0.47)	0.22 [*] (0.45)
		計	0.25 (0.46)	0.25 (0.46)	0.24 (0.45)	0.22 [*] (0.44)

Dunnett 検定 : * F0<0.05, ** F0<0.01, # F0<0.001、交尾前期間：同居から交配まで

注：1) 精巣尾部精子濃度：Millions/mL、2) 精巣尾部精子数：Millions/g (左尾部重量)

3) 精巣精子濃度：Millions/mL、4) 精巣精子数：Millions/g (精巣重量)

一般状態及び死亡率；F0 及び F1 親動物の生死及び一般症状を毎日観察した。

F0 雄動物では 1000mg/kg/日投与群の 1 例死亡を除き、全動物が計画剖検時まで生存した。試験期間中における検体投与に関連した一般症状は 200mg/kg/日投与群及び 1000mg/kg/日投与群における流涎、1000mg/kg/日投与群における口周辺部の赤色物質付着であった。

F0 雌動物では 0、50、200 及び 1000mg/kg/日における死亡及び切迫殺動物数は各々 0/28、1/28、0/28 及び 6/28 例であった。不妊動物、総同腹児の死亡等の理由により屠殺剖検した動物を除き、哺育 21 日の計画屠殺時まで生存した雌親動物数は各々 26/28、27/28、27/28 及び 17/28 例であった。検体投与に関連した一般症状は雄と同様に 200mg/kg/日投与群及び 1000mg/kg/日投与群における流涎、1000mg/kg/日投与群における口周辺部の赤色物質付着であった。

F1 雄動物では 200 及び 1000mg/kg/日における死亡及び切迫殺動物数は各々 5/28 及び 5/28 であり、検体投与に関連した一般症状は F0 雄と同様であった。

F1 雌動物では死亡及び切迫殺動物数は 0、50、200 及び 1000mg/kg/日の投与群で各々 1/28、0/28、0/28 及び 2/28 例であった。不妊動物、総同腹児の死亡等の理由により屠殺剖検した動物を除き、哺育 21 日の計画殺時まで生存した雌親動物数は各々 22/28、25/28、19/28 及び 19/28 例であった。検体投与による一般症状は F0 動物と同様であり、高用量群における流涎は高頻度にみられ、さらに不安定歩行及び活動性の低下が観察された。

体重及び体重増加量；F0 及び F1 親動物の体重を週 1 回測定した。F1 動物は離乳後の選抜時から測定を開始した。妊娠動物は妊娠 0、7、14 及び 20 日に、哺育期間の母動物は哺育 1、4、7、14 及び 21 日に測定した。対照群と比べて統計学的有意差の認められた平均体重及び平均体重増加量を表 3-1 及び 3-2 に示す。

(申請者注)

表 3-1. F0 世代（親動物）の平均体重及び平均体重増加量

性 別		雄						雌					
投与量 (mg/kg/日)		50		200		1000		50		200		1000	
期 間	項 目	体 重	増 加 量	体 重	増 加 量	体 重	増 加 量	体 重	増 加 量	体 重	増 加 量	体 重	増 加 量
		生育 8 日 (1~8 日)											
生育 15 日 (8~15 日)													
生育 22 日 (15~22 日)													
生育 29 日 (22~29 日)													
生育 36 日 (29~36 日)			↑132		↑132		↑142				↑267		↑367
生育 43 日 (36~43 日)			↑130		↑130		↑130						
生育 50 日 (43~50 日)													
生育 57 日 (50~57 日)													
生育 64 日 (57~64 日)					↓↓68		↓52						
生育 71 日 (64~71 日)							↓78						↑300
生育 78 日 (71~78 日)													
生育 85 日 (78~85 日)													
生育 92 日 (85~92 日)													
生育 99 日 (92~99 日)													
生育 106 日 (99~106 日)													
妊娠 20 日 (14~20 日)													↓79
哺育 1 日												↑106	
哺育 4 日 (1~4 日)								↓65		↓↓47			↓↓18
哺育 21 日 (14~21 日)										↑(-7)*			↑(-4)*

分散分析及び Dunnett 検定：↑↓ = p < 0.05、↑↑ = p < 0.01、↑↓ = p < 0.001

空欄は対照群に比し統計学的に有意差なし

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

*全群とも体重減少を示したため、体重減少値 g を () 内に示した (対照群：-19g)。

表 3-2. F1 世代（親動物）の平均体重及び平均体重増加量

性別		雄						雌					
投与量 (mg/kg/日)		50		200		1000		50		200		1000	
期間	項目	体重	増加量	体重	増加量	体重	増加量	体重	増加量	体重	増加量	体重	増加量
		生育 8 日 (1~8 日)											
生育 15 日 (8~15 日)													
生育 22 日						195						1191	
生育 29 日						189						1184	
生育 36 日												1189	
生育 43 日													
生育 50 日 (43~50 日)							192		185				1119
生育 57 日 (50~57 日)													11122
生育 64 日 (57~64 日)													11122
生育 71 日													
生育 78 日 (71~78 日)													11127
生育 85 日													
生育 92 日 (85~92 日)			11121										
生育 99 日													
生育 106 日 (99~106 日)													11107
生育 113 日 (113~120)							160						
生育 120 日													
生育 127 日													
生育 134 日 (127~134 日)			11150		11140		11150						
妊娠 7 日 (0~7 日)												181	1174
妊娠 7 日 (7~14 日)													
妊娠 7 日 (14~21 日)													
哺育 4 日 (1~4 日)												1123	11(-3)*
哺育 4 日 (4~7 日)													
哺育 4 日 (7~14 日)													
哺育 4 日 (14~21 日)													

分散分析及び Dunnett 検定：11 = p < 0.05、111 = p < 0.01、↑↓ = p < 0.001

空欄は対照群に比し統計学的に有意差なし

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

*全群とも体重減少を示したため、体重減少値 g を () 内に示した (対照群：+13g)。

F0 動物では生育期間における検体投与 10 週間後から交配前までの期間中に、雌雄いずれの平均体重にも統計学的な有意差は認められなかった。生育 29~43 日には全ての検体投与群雄において体重増加量の有意な増加が認められ、生育 57~71 日には 200 及び 1000mg/kg/日投与群雄で有意な体重増加抑制が認められた。生育 29~36 日に 200 及び 1000mg/kg/日投与群雌に体重増加量の有意な増加が認められた。1000mg/kg/日投与群では生育 64~71 日にも体重増加量に有意な増加が認められ、妊娠 14~20 日には、有意な体重増加抑制が認められた。哺育期間中では全ての投与群で哺育 1~4 日に有意な体重増加抑制が認められた。哺育 21 日時には、対照群を含む全試験群に体重増加抑制傾向が認められた。

F1 親動物雌雄に体重及び体重増加量の増減がみられたが、検体投与による影響はみられなかった。200 及び 1000mg/kg/日投与群雌では妊娠 0～7 日の体重増加抑制がみられた。哺育 4 日時には全ての投与群において平均体重は統計学的に有意な低下が認められた。F1 雌の体重増加量は、哺育 1～4 日の期間中 200 及び 1000mg/kg/日投与群に有意な抑制がみられた。

摂餌量；F0 及び F1 親動物について体重測定と同一日に個体別摂餌量を記録した。但し、交配中及び哺育期間中には測定しなかった。対照群と比べて統計学的有意差の認められた摂餌量を表 4-1 及び 4-2 に示す。

(申請者注)

表 4-1. F0 親動物の体重増加量および摂餌量

性別	雄						雌					
	50		200		1000		50		200		1000	
投与量 (mg/kg/日)	増加量	摂餌量	増加量	摂餌量	増加量	摂餌量	増加量	摂餌量	増加量	摂餌量	増加量	摂餌量
生育期間												
1～8												
8～15						1193						
15～22						193						
22～29												
29～36	1132		1132		↑142				11267		↑367	
36～43	1130		1130		1130							
43～50												
50～57												
57～64			1168		↓52	193						
64～71					178	193				189	1300	1111
71～78												
78～85												
85～92					↓90	↓86						
92～99					↓93	↓90						
99～106						↓90						

分散分析及び Dunnett 検定：11 = p<0.05、111 = p<0.01、↑↓ = p<0.001

空欄は対照群に比し統計学的に有意差なし

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

表 4-2. F1 親動物の体重増加量および摂餌量

性別	雄						雌					
	50		200		1000		50		200		1000	
投与量 (mg/kg/日)	増加量	摂餌量	増加量	摂餌量	増加量	摂餌量	増加量	摂餌量	増加量	摂餌量	増加量	摂餌量
生育期間												
1~8												
8~15												
15~22												
22~29												
29~36								194				
36~43												
43~50												††111
50~57				190	192	193	185				††119	††105
57~64											††122	
64~71											††122	††105
71~78				191		194						††105
78~85				194							††127	
85~92				194				195				
92~99	††121											
99~106								186				
106~113												
113~120					160	190						
120~127				190		190						
127~134	††150		††140	187	††150	187						

分散分析及び Dunnett 検定 : ††1 = p < 0.05, ††11 = p < 0.01

空欄は対照群に比し統計学的に有意差なし

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

F0 雄の摂餌量は、1000mg/kg/日投与群で生育期間中、対照群に比較して有意な減少を示した。F0 雌の摂餌量は、1000mg/kg/日投与群で交配前に有意な増加を示し、200mg/kg/日投与群では有意な減少を示した。

F1 雄の摂餌量は、200 及び 1000mg/kg/日投与群で有意な減少を示した。また、F1 雌の摂餌量は、1000mg/kg/日投与群で有意な増加がみられ、50mg/kg/日投与群で有意な減少が散見された。

繁殖指数；発情周期は交配前の少なくとも3週間（21日間）及び交尾が認められるまで、もしくは交配期間が終了するまでの同居期間中、F0 および F1 のすべての雌から毎日膣垢塗抹標本を作成して、発情周期及びその正常性を調べた。交配は検体を70日以上投与した後、雌を同一投与群から無作為に選抜した雄と同居させた（1対1交配）。F1世代の繁殖時は兄妹交配を避けて同居させた。各交配ペアについて1日1回、交尾の確認に膣栓または膣垢塗抹標本における精子の検査を行った。交尾が確認された日を妊娠0日として、雌雄を別居、分離して、雌は個別別ケージに戻した。交配14日後までに交尾の確認が得られない場合は雌雄を別居させて、交配を終了した。また、F1雌との1対1交配に十分な匹数の雄が得られない場合は、F1雄を同群の雌2匹以上と交尾させた。

交配、妊娠及び授乳期の観察に基づき、次の指標を算出した。

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{交尾が確認された動物数}}{\text{交配に用いた動物数}} \times 100$$

$$\text{受胎率 (\%)} = \frac{\text{妊娠した動物数 (雌)}}{\text{交尾が確認された動物数 (雌)}} \times 100$$

$$\text{出生率 (\%)} = \frac{\text{出産時生存児数}}{\text{新生児数}} \times 100$$

$$\text{4日齢生存率 (\%)} = \frac{\text{4日齢生存児数}}{\text{出産時生存児数}} \times 100$$

$$\text{離乳時生存率 (\%)} = \frac{\text{離乳時生存児数}}{\text{4日齢調整後生存児数}} \times 100$$

F0の交尾率及び受胎率、発情周期、交尾前期間（同居から交配確認まで）または妊娠期間に統計学的な有意差は認められなかった。F0の受胎率は高用量群で低下傾向（87.5%）を示したものの、本試験実施機関における蓄積対照の範囲内（77.8～100.0%）であった。F0の平均交尾前期間は2.5～3.5日、平均妊娠期間は22.0～22.1日、また、平均発情周期は3.9～4.0日であった。F1の交尾率及び受胎率、発情周期および交尾前期間に、統計学的な有意差はなかった。F1の平均交尾前期間は3.1～3.4日であった。F1の平均妊娠期間は、対照群の22.0日に対して、1000mg/kg/日投与群では22.3日を示し統計学的に有意であった。平均発情周期は試験群間で同等であった。

肉眼的剖検；試験期間中に死亡または計画屠殺を含むすべてのF0及びF1親動物について剖検し肉眼的観察を行った。体の外表、すべての開口部ならびに頭蓋腔、胸腔、腹腔および骨盤腔とそれぞれの内部臓器を検査し、すべての肉眼的異常を記録した。また、子宮内容を検査して着床数を記録した。

F0動物の死亡動物のうち50mg/kg/日投与群及び1000mg/kg/日投与群の雌各1例ならびに切迫屠殺した1000mg/kg/日投与群雌1例に食道の穿孔が認められた。計画屠殺の期間中にF0の雄に多くの臨床観察所見が認められたが、これらの所見に投与との関連性を示す一貫した傾向は認められなかった。哺育21日の計画殺時における雌親の剖検所見には検体投与の影響は認められなかった。F0動物に他の顕著な剖検所見は認められなかった。F1親動物には顕著な剖検所見はみられなかった。F1雄親動物の食道に穿孔が200および1000mg/kg/日投与群の各5例に認められたが、これらは検体投与時における挿管の機械的創傷に起因すると考えられた。

（申請者注）

着床痕数；F0雌の平均着床痕数、哺育0日の生存児数は対照群及び検体投与群の間に統計学的な有意差は認められなかった。F1雌の着床痕数、哺育0日における生存児数にも統計学的有意差はみられなかった。また、F0及びF1における着床後胚生存率には検体投与による影響は認められなかった。

臓器重量；計画剖検時に、すべてのF0及びF1生存親動物から採取した次の臓器重量を測定した：副腎、脳、精巣上体、腎、左精巣上体尾部、精巣、肝、卵巣、下垂体、前立腺、精囊、脾、甲状腺、子宮。

F1 淘汰児動物及び F2 児動物については、計画剖検時に任意に選択した一腹当たり雌雄各 1 匹の F1 及び F2 児動物から採取した脳、脾及び胸腺の重量を測定した。臓器重量の対体重比を算出し、記録した。対照群に比較し統計学的有意差の認められた臓器重量及びその対体重比を表 5-1 及び 5-2 に示す。

(申請者注)

表 5-1. F0 世代（親動物）の臓器重量及び対体重比

性別		雄						雌					
投与量 (mg/kg/日)		50		200		1000		50		200		1000	
臓器	測定項目	重量	体重比	重量	体重比	重量	体重比	重量	体重比	重量	体重比	重量	体重比
		脳			198		197						
下垂体													
甲状腺/上皮小体													
副腎												↑115	↑112
肝												↑117	↑113
腎							↑106					↑106	
脾						188							189
前立腺						↓82	↓83	-	-	-	-	-	-
精囊								-	-	-	-	-	-
精巣 (左側)								-	-	-	-	-	-
精巣 (右側)								-	-	-	-	-	-
精巣								-	-	-	-	-	-
精巣上体						↓92		-	-	-	-	-	-
卵巣		-	-	-	-	-	-						
子宮		-	-	-	-	-	-						

分散分析及び Dunnett 検定 : †† = F0 < 0.05, ††† = F0 < 0.01, †††† = F0 < 0.001

- : 該当せず、空欄は対照群に比し統計学的に有意差なし

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

表 5-2. F1 世代（親動物）の臓器重量及び対体重比

性別	雄						雌					
	50		200		1000		50		200		1000	
投与量 (mg/kg/日)	重量	体重比	重量	体重比	重量	体重比	重量	体重比	重量	体重比	重量	体重比
臓器												
脳												
下垂体												
甲状腺/上皮小体												
副腎												
肝											↑↑116	↑↑116
腎											↑106	↑107
脾					↓↓88	↓↓88						
前立腺												
精囊					↓↓83	↓↓83	-	-	-	-	-	-
精巣（左側）												
精巣（右側）												
精巣												
精巣上体					↓↓90	↓↓90	-	-	-	-	-	-

分散分析及び Dunnett 検定：↑↑ = F0 < 0.05、↑↑↑ = F0 < 0.01
 - : 該当せず、空欄は対照群に比し統計学的に有意差なし
 表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

F0 雄における 200 および 1000mg/kg/日投与群の平均脳重量は対照群に比較して統計学的に有意な低値を示したが、この所見は体重に対する相対脳重量が対照群と同等であったこと、ならびに対照群に対する平均脳重量の差が 5%未満であったことから、毒性学的な意味はないと考えられた。また、1000mg/kg/日投与群雄の脾、前立腺および精巣上体の平均臓器重量は対照群に比較し統計学的に有意な低値を示した。1000mg/kg/日投与群雄で腎重量対体重比が有意な増加を示し、前立腺の対体重比は有意に低下した。F0 雌については哺育 21 日の剖検時において 1000mg/kg/日投与群の副腎、肝及び腎の平均臓器重量が対照群に比較して統計学的に有意な増加を示し、副腎及び肝の対体重比が有意な高値を示した。これに対して、1000mg/kg/日投与群雌における脾の対体重比は有意に低い値を示した。計画屠殺時における F1 雄の脾、精囊及び精巣上体の絶対重量及びそれらの対体重比は対照群に比して統計学的に有意な減少を示した。また、F1 雌では肝及び腎の絶対重量及び対体重比は有意な増加を示した。

精子検査；計画屠殺時に安楽死させたすべての F0 および F1 雄親動物から精液を採取し、全群の精子数、精子濃度、精子の運動性を調べ、また、形態学的評価を行った。

F0 雄の 1000mg/kg/日投与群における精子検査項目は全て対照群に比較し統計学的に有意な低値を示した。その他の投与群における精子検査項目は対照群と同等であった。F1 雄の 1000mg/kg/日投与群における精子の運動性、形態、精子濃度及び精子数に統計学的に有意な低下が認められた。さらに、200mg/kg/日投与群雄においても精子濃度及び精子数に統計学的に有意な低下が認められた。精子数及び精子濃度には用量反応性がみられた。

病理組織学的検査；試験期間中に死亡または屠殺した F0 及び F1 親動物から採取し

たすべての組織を検査した。無作為に選択した対照群及び 1000mg/kg/日投与群の F0 雌雄親動物各 10 例から採取した次の組織を組織学的に検査した：副腎、脳（脈絡叢）、肉眼病変部、涙腺、卵巣、下垂体、前立腺、右精巣上体（ならびに左精巣上体の体部及び頭部）、右精巣、精囊（凝固腺及び精液）、子宮（卵管及び頸部を含む）、膈。上記以外に対照群を含む全ての検体投与群における F0 雌雄親動物から採取した脳及び涙腺を組織学的に検査した。さらに、任意に選抜した 50 および 200mg/kg/日投与群の F0 雄親動物各 10 例から採取した精巣上体について空胞性変化を調べた。また、任意に選抜した対照群及び 1000mg/kg/日投与群の F1 雌雄親動物から採取した次の組織について組織学的に検査した：副腎、肉眼病変部、卵巣、下垂体、前立腺、右精巣上体（ならびに左精巣上体の体部及び頭部）、右精巣、精囊（凝固腺及び精液を含む）、子宮（卵管及び頸部を含む）、膈。対照群及び 1000mg/kg/日投与群 F1 母動物の各群 10 例の左右卵巣について原始卵胞及び発育卵胞を定量的に解析した。1 卵巣当たり 5 切片を作成、観察した。また、対照群及び 1000mg/kg/日投与群の発育卵胞及び原始卵胞を計数した。さらに、任意に選抜した 50 及び 200mg/kg/日投与群の F1 雄親動物各 10 例から採取した精巣上体の空胞性変化を調べた。

F0 雌雄の 200 および 1000mg/kg/日投与群で脈絡叢上皮細胞に空胞性変化が認められ、1000mg/kg/日投与群の F0 及び F1 雄動物で精巣上体上皮細胞に空胞性変化が認められた。しかし対照群にこれらの変化が認められなかったことから、これらは検体投与に関連する影響と考えられた。対照群及び 1000mg/kg/日投与群の選抜雌動物から採取した卵巣の原始卵胞及び発育卵胞に有意な変化は認められなかった。

散見されたその他の病変は、この系統及び年齢の雌雄ラットに通常みられるバックグラウンド以内の変化であった。

児動物の生存率；分娩した F0 雌親動物数及び分娩直後の同腹児数は 1000mg/kg/日投与群で減少した。出生率は対照群 96.8%に比較して 1000mg/kg/日投与群は 93.5%と低く、平均同腹児数は対照群及び 1000mg/kg/日投与群で各々 14.5 及び 12.5 匹と差が認められた。哺育 0 日における一腹当たりの平均生存児数は対照群に比して 1000mg/kg/日投与群で低い値を示し、生後 0~21 日の間に死亡、損失あるいは食殺（カニバリズム）による F1 児動物数は対照群、50、200 及び 1000mg/kg/日投与群で各々 8、8、11 及び 23 例を示し、1000mg/kg/日投与群で統計学的に有意差が認められた。また、哺育 0 日における一腹当たりの平均生存児数も 12.3 匹で、これは試験実施機関の蓄積対照範囲（13.0~15.5 匹）を逸脱する値であった。高用量群の死亡は主に哺育 1~4 日の間に発現した。投与群の F1 児動物の性比は対照群と同等であった。

F1 分娩雌親動物数は 200 および 1000mg/kg/日投与群でやや少ない値を示した。一腹当たりの平均分娩児数は、対照群の 13.5 匹に比して 1000mg/kg/日投与群で 11.9 匹と低値を示した。平均出生率は群間に差はみられなかった。哺育 4 日における 1000mg/kg/日投与群の死亡、消失あるいはカニバリズムによる F2 児動物数は統計学的に有意な増加が認められた。哺育 0 日における一腹当たりの平均生存児動物数（同腹児数）は対照群に比して 1000mg/kg/日投与群で低い値を示した。F1 児動物と同様に、高用量群における死亡は主に哺育 1~4 日の間に発現した。児動物の生存率は 1000mg/kg/日投与群で低い傾向を示した

が、対照群に対して統計学的有意差はみられなかった。検体投与群の F2 児動物における性比は対照群と同等であった。

児動物の哺育期間中における臨床観察所見；哺育期間中における F1 及び F2 児動物に検体投与による影響は認められなかった。

児動物の哺育期間中における体重；F1 児動物では、哺育期間中における 1000mg/kg/日投与群の平均児動物体重は低値を示し、哺育 14 および 21 日では対照群に比較して統計学的に有意な低下を示した。その他の投与群における平均児動物体重は対照群と同等であった。F2 児動物の体重は哺育 21 日の離乳まで統計学的に有意な変化はみられなかった。

児動物の発育状況；F1 児の 1000mg/kg/日投与群雌における膈開口完了時平均体重は統計学的に有意な低下を示したが、雌の膈開口あるいは雄の包皮分離の平均日齢には各群間に統計学的有意差は認められなかった。

児動物の肉眼的剖検所見；計画屠殺前に死亡または屠殺した F1 児動物に検体投与に関連する顕著な肉眼的剖検所見は認められなかった。剖検所見として、無気肺及び胃内乳汁の不在が散見された。計画剖検時においても、他の顕著な剖検所見はみられなかった。F2 児動物では 200 および 1000mg/kg/日投与群で各々 1 例及び 8 例の児動物が死亡し、胃内に乳汁は認められなかった。しかし計画屠殺前に死亡または計画殺動物には顕著な異常所見は認められなかった。計画屠殺時の F2 児動物に尾端欠損、耳介の欠損および腎盂拡張が散見されたが、群間に差異はみられなかった。

児動物の臓器重量；計画殺時に、F1 児動物の脳、脾及び胸腺の平均重量を記録した。1000mg/kg/日投与群の児動物雌及び雌雄合計の平均脾重量は対照群に対して統計学的に有意な低下を示した。しかし、F1 児動物の脾重量対体重比が対照群と同等であったこと、ならびに脾重量の減少は対照群の 5%未満であったことから、この所見に毒性学的な意味はないと考えられた。F1 の 1000mg/kg/日投与群児動物の脳重量対体重比は統計学的に有意な増加を示した。これは、高用量群の動物の平均体重の低下に起因すると思われた。F2 児動物では 1000mg/kg/日投与群に胸腺重量の有意な低下が認められた。しかし、その対体重比は対照群と同等であったことから、この所見には毒性学的に重要な意義はないと考えられた。また、脳重量対体重比が有意に増加したが、これは高用量群の平均体重が低かったことに起因するものと考えられた。

以上の通り、本剤を 0、50、200 及び 1000mg/kg/日の用量で二世代にわたって連続経口投与したところ、高用量の 1000 mg/kg/日（限界用量）で、検体投与による顕著な影響が観察された。高用量投与群の F0 世代では、流涎、平均体重の変動、摂餌量の低下等の所見ならびに雄動物における精子検査結果に変動がみられた。高用量群の F1 世代では生存率の有意な低下が認められ、この所見は主として哺育 1 日から哺育 4 日の淘汰時までの期間に発現した。高用量群 F1 動物の体重は有意な増加抑制を示し、F2 児の哺育期間（14 及び 21 日）には統計学的に有意な低下を示した。F1 世代の高用量群雌雄では、投与期間中に親動物（F0）と同等の所見である流涎が認められた。F1 高用量群雄の精子検査では、対照群に比して、精子数、精子濃度、精子運動性および形態に有意な低下が認められた。高用量群の F2 児動物の平均体重は、哺育期間中に対照群に比較してやや低値を示した。中用量（200mg/kg/日）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

群で体重および摂餌量に検体投与による影響が認められたが、試験期間中における繁殖項目に対する影響は認められず、また低用量（50mg/kg/日）群では対照群に比較して毒性学的影響は認められなかった。

以上の結果より、検体のプロパモカルブ塩酸塩をラット二世代にわたって投与した場合、200 mg/kg/日及びそれ以下の投与群で繁殖に対する影響は認められなかったことから、本試験における無毒性量（NOAEL）は200mg/kg/日と考えられる。

（申請者注）

2) ラットにおける催奇形性試験

(催奇形性)
(資料 No.R-2)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2001 年

検体純度： %

供試動物：ウィスター (Cri:[WI] BR) 系妊娠ラット (10 週齢)、1 群 24 匹、
体重 200~300g

投与期間：妊娠期間 15 日間 (2000 年 11 月 19 日~2000 年 12 月 4 日)

投与方法：検体を 0、375、1500 及び 6000ppm の有効成分濃度で飼料に混入し、妊娠 6 日
目から 21 日目までの 15 日間にわたって自由摂取させた。検体を混入した飼料
は 2 週間に 1 回以上調製した。飼料中の有効成分濃度は分析して確認した。
(申請者注)

用量設定根拠；

観察・検査項目：

親動物；一般状態、妊娠状態及び生死を毎日観察し、妊娠 0、3、6、9、12、15、18 及び
21 日目に体重を測定した。妊娠 21 日目に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及
び死亡・吸収胎児数を検査した。なお、膣栓及び膣垢中の精子を確認した日を妊
娠 0 日とした。

生存胎児；性別及び外表異常を観察し、体重を測定した。

各腹の 1/2 の生存胎児について 96%エタノールで固定し、アリザリンレッド S で
染色して骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。残りの生存胎児につい
て Bouin 液で固定し、Wilson 変法によるフリーハンド切片により内臓異常の有無
を検査した。

結 果：概要を表 [結果の概要] に示した。

親動物：

一般状態及び生死；試験期間中、親動物に死亡はみられなかった。脱毛、痂皮、腹部
退色及び立毛が観察されたが、本系統のラットに散見される偶発所見であり毒性
学的な意義はないと考えられた。

体重；対照群に比し統計学的有意差の認められた体重及び体重増加量 (表 1-1)、並
びに試験期間中における子宮重量補正体重増加量を (表 1-2) を示す。

表 1-1

妊娠 (日)	375ppm		1500ppm		6000ppm	
	体重	増加量	体重	増加量	体重	増加量
12						μ 58
15					↓ 95	μ 74
18					↓ 96	μ 82
21					μ 93	μ 80

Dunnett 検定: ††=p<0.05, †††=p<0.01

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

表 1-2

	0	375ppm	1500ppm	6000ppm
子宮重量補正体重増加量* (g)	26.4	28.3	27.4	μ 7.8
子宮重量補正体重増加率** (%)	10.3	10.9	10.8	μ 3.1

Dunnett 検定: ††=p<0.05, †††=p<0.01

* 子宮重量補正体重増加量 = (剖検時体重) - (交尾後 6 日体重) - (子宮重量)

** 子宮重量補正体重増加率 = (子宮重量補正体重増加量) / (交尾後 6 日体重) × 100

6000ppm 投与群に統計学的に有意な体重低下、体重増加抑制及び子宮重量による補正体重増加抑制が認められた。これらの所見は検体投与に起因すると考えられた。

摂餌量；対照群に比し統計学的有意差の認められた摂餌量及び相対摂餌量を下表に示す。

妊娠 (日)	375ppm		1500ppm		6000ppm	
	摂餌量	相対摂餌量	摂餌量	相対摂餌量	摂餌量	相対摂餌量
6-9				↑ 107	μ 87	μ 89
9-12					↓ 92	
12-15					↓ 92	
15-18						
18-21					μ 88	

Dunnett 検定: ††=p<0.05, †††=p<0.01

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

6000ppm 投与群に統計学的に有意な摂餌量及び相対摂餌量の減少が認められ、検体の投与に起因すると考えられた。1500ppm 群における妊娠 6~9 日の統計学的に有意な相対摂餌量の増加には毒性的な意義はなく、検体投与に起因しないと考えられた。

検体摂取量；妊娠期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		375	1500	6000
雌	検体摂取量 (mg/kg/日)	31	123	456

肉眼的剖検所見；6000ppm 投与群の 1 例に腎盂拡張がみられたが、本系統のラットに通常散見される所見であり、毒性学的に意義のない変化と考えられた。着床所見はいずれの投与群間に有意差はみられなかった。生存胎児数には投与群及び対照群とも正常範囲内であり、投与に関連する差はみられなかった。

胎児：

性比、体重等；6000ppm 投与群の胎児の性比（雄／雌）は統計学的に有意な減少を示したが、蓄積対照値の範囲内であり、投与との関連性はないと考えられた。対照群に比し統計学的有意差の認められた胎児体重を下表に示す。

群		375ppm	1500ppm	6000ppm
各腹別	雄+雌			∥ 92
	雄			∥ 93
	雌			∥ 94
個別別	雄+雌		∥ 98	∥ 92
	雄		↓ 98	∥ 91
	雌			∥ 94

Dunnett 検定 : †† = p < 0.05, ††† = p < 0.01

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

6000ppm 投与群の胎児体重は、各腹別及び個別別重量とも対照群に比し統計学的に有意な低下を示し、検体投与に起因するものと考えられた。1500ppm の個別別胎児体重に統計学的に有意な低下が見られたが、腹別では影響がみられず、また母体重には差はなく、これらの胎児体重は蓄積対照データの範囲内であったことから、偶発的な差と考えられた。胎盤重量に対する検体の影響はみられなかった。

外表検査；6000ppm 投与群には対照群に比して小型胎児数の増加が認められ、この所見は胎児体重の低下と一致し、投与に関連すると考えられた。また、対照群及び投与群に四肢異常回転が認められたが、用量依存性や骨格検査での裏付け所見が認められなかったことから、本所見は偶発的に生じたもので、検体投与に関連した所見ではないと考えられた。また、1500ppm の 1 例に臍ヘルニアがみられたが、この所見は偶発的なものと考えられた。

内臓検査；対照群を含むすべての群で各種の異常が認められ、各検査所見の胎児及び同腹児の頻度に群間差が記録されたが、検体投与及び投与量に関連すると考えら傾向は認められなかった。なお、対照群を含む全群において膀胱拡張がみられ、対照群に比較し投与群の発生頻度が高い傾向を示したが、各腹当たりの発生率は対照群と投与群間に差はみられなかった。腎所見（腎盂空洞化、腎乳頭欠損、水尿管）あるいは膀胱拡張等の発生には用量相関性はみられず、毒性学的な意義はないと考えられた。

骨格検査；6000ppm 投与群に頭蓋骨、頸椎及び尾椎の椎骨中心、上腕骨、前肢及び後肢の指節骨及び中足骨の骨化遅延がみられた。

以上の結果から、母動物及び胎児における無毒性量は 1500ppm（被験物質 123mg/kg/日）であり、最高用量の 6000ppm（456mg/kg/日）投与群においても胎児に対して催奇形性を示さないと判断される。

結果の概要

投与群 (ppm)		0	375	1500	6000	
1 群当たり動物数		24	24	24	24	
親動物	一般状態	脱毛、痂皮、退色 (腹部)	立毛、脱毛	脱毛	立毛、脱毛	
	死亡数	0	0	0	0	
	体重変化				体重減少**、 体重増加抑制** 子宮重量補正体重増加抑制**	
	摂餌量				摂餌量減少**、 相対摂餌量減少**	
	妊娠動物数 (率)	23 (95.8)	21 (87.5)	22 (91.7)	22 (91.7)	
	非妊娠動物数 (率)	1 (4.2)	3 (12.5)	2 (8.3)	2 (8.3)	
	子宮重量 (g)	103.1	101.3	101.4	96.3	
	肉眼的病理				腎盂拡張 (1)	
	着床所見	検査親動物数	23	21	22	22
		黄体数 (率)	17.4 (75.7)	18.6 (88.6)	18.1 (82.3)	17.9 (81.4)
		着床数 (率)	15.3 (87.9)	15.6 (83.9)	15.3 (84.5)	15.0 (83.8)
		生存胎児数 (率)	14.6 (95.4)	14.4 (92.3)	14.8 (96.7)	14.6 (97.3)
		死亡胎児数 (率)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		吸収胚数 (率)	0.7 (4.6)	1.2 (7.7)	0.5 (3.3)	0.4 (2.7)
吸収胎児数 (率)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
胎動物	体重 (g) < 同腹児 >	雄	5.4	5.3	5.3	5.0**
		雌	5.1	5.1	5.0	4.8**
	体重 (g) < 個別別 >	雄	5.4	5.3	5.3*	4.9**
		雌	5.1	5.1	5.0	4.8**
	性比 (雄/雌、%)	54.6/45.4	48.3/51.7	48.0/52.0	45.3/54.7#	
	外表変異	検査数	335	302	325	322
		小型胎児	12	13	25	80
		四肢異常回転	13	18	27	22
		臍ヘルニア			1	
	内臓変異	検査数 (同腹数)	162 (23)	145 (21)	157 (22)	160 (22)
膀胱拡張数 (同腹数)		16 (11)	23 (10)	35 (13)	34 (11)	
同発生率% (同腹数%)		9.9 (47.8)	15.9 (47.6)	22.3 (59.1)	21.3 (50.0)	
骨格変異	化骨遅延	表 2 参照				

Dunnett 検定 : * = p<0.05、** = p<0.01、Fisher の直接検定 : # = p<0.05

表 2. 骨格変異の概要

投与群 (ppm)		0	375	1500	6000
検査動物数		173	157	168	162
頭部					
骨化遅延	上後頭骨	5 (2.9)	2 (1.3)	8 (4.8)	27 (16.7)
	頭頂間骨	33 (19.1)	42 (27.1)	28 (16.9)	56 (34.6)
	頭頂骨	11 (6.4)	7 (4.5)	10 (6.0)	22 (13.6)
	前頭骨	3 (1.7)	—	5 (3.0)	11 (6.8)
	鼻骨	4 (2.3)	—	3 (1.8)	11 (6.8)
	側頭鱗	1 (0.6)	5 (3.2)	7 (4.2)	14 (8.6)
	頬骨	2 (1.2)	4 (2.6)	4 (2.4)	10 (6.2)
	上顎骨	3 (1.7)	3 (1.9)	8 (4.8)	13 (8.0)
	下顎骨	—	—	1 (0.6)	4 (2.5)
	舌骨	8 (4.7)	9 (5.8)	13 (7.8)	29 (17.9)
	舌骨 (評価不能)	3 (1.7)	—	—	—
頭蓋 (評価不能)	—	2 (1.3)	1 (0.6)	—	
脊椎及び胸郭					
骨化遅延が認められた頸椎の椎骨中心数	0	76 (43.9)	58 (36.9)	39 (23.4)	34 (21.0)
	1	31 (17.9)	29 (18.5)	47 (28.1)	27 (16.7)
	2	31 (17.9)	32 (20.4)	23 (13.8)	18 (11.1)
	3	15 (8.7)	10 (6.4)	16 (9.6)	27 (16.7)
	4	6 (3.5)	5 (3.2)	18 (10.8)	11 (6.8)
	5	11 (6.4)	12 (7.6)	14 (8.4)	34 (21.0)
	6	3 (1.7)	10 (6.4)	8 (4.8)	8 (4.9)
	7	—	1 (0.6)	2 (1.2)	3 (1.9)
	評価不能	—	—	1 (0.6)	—
骨化した尾椎の椎骨中心数	4	1 (0.6)	2 (1.3)	1 (0.7)	2 (1.3)
	5	19 (11.4)	17 (11.0)	30 (20.3)	46 (30.1)
	6	53 (31.7)	56 (36.4)	59 (39.9)	56 (36.6)
	7	65 (38.9)	45 (29.2)	31 (20.9)	34 (22.2)
	8	23 (13.8)	18 (11.7)	23 (15.5)	12 (7.8)
	9	6 (3.6)	15 (9.7)	4 (2.7)	2 (1.3)
	10	—	—	—	1 (0.7)
	11	—	1 (0.6)	—	—
	評価不能	6 (3.5)	3 (1.9)	20 (11.9)	9 (5.6)
四肢					
前肢指節骨の骨化遅延	遠位	9 (5.5)	13 (8.4)	12 (8.1)	30 (19.4)
	近位	4 (2.4)	8 (5.2)	8 (5.4)	14 (9.0)
後肢指節骨の骨化遅延	遠位	4 (2.4)	8 (5.2)	3 (2.1)	12 (7.8)
	近位	94 (56.6)	91 (58.7)	70 (49.0)	109 (71.2)
骨化が認められた中足骨数	4	33 (19.9)	44 (28.4)	32 (21.5)	75 (48.1)
	5	133 (80.1)	111 (71.6)	117 (78.5)	81 (51.9)
	評価不能	7 (4.0)	2 (1.3)	19 (11.3)	6 (3.7)

括弧内の数値は発症率 (%) を示す

3) ウサギにおける催奇形性試験

(催奇形性)
(資料 No.R-3)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2002 年

検体純度 : %

供試動物 : ニュージーランドホワイト種妊娠ウサギ (19~20 週齢) 、1 群 29~32 羽、
体重 3343~3435g

投与期間 : 妊娠期間 22 日間 (2001 年 9 月 2-24 日~2001 年 11 月 8-30 日)

投与方法 : 検体を 0、500、2000 及び 8000ppm の有効成分濃度で飼料に混入、ペレットと
し、妊娠後 6 日目から 28 日目までの 22 日間にわたって自由摂取させた。検体
を混入した飼料は週に 1 回調製した。飼料中の有効成分濃度は分析して確認し
た。なお、人工授精を行った日を妊娠 0 日とした。

用量設定根拠 :

観察・検査項目 :

親動物 ; 一般状態、妊娠状態及び生死を毎日観察し、妊娠 0、3、6、9、12、15、19、24
及び 28 日目に体重を測定した。妊娠 28 日後に帝王切開し、肉眼的病理検査を実
施した。各動物の卵巣及び子宮角を摘出し、黄体数、妊娠子宮重量、生存及び死
亡胎児数と分布、胚・胎児死亡数と分布、着床数を検査した。

生存胎児 ; 性別及び外表異常を観察し、体重を測定した。

各腹の 1/2 の胎児について 96%エタノールで固定しアザリンレッド S で染色し骨
格標本を作製して、骨格異常の有無を検査した。残りの胎児について Bouin 固定
し、Wilson 法によるフリーハンド切片内を作成して内臓異常の有無を検査した。

結 果 : 概要を表 [結果の概要] に示した。

親動物 :

一般状態及び生死 ; 対照群及び 500ppm 投与群でそれぞれ 1 羽及び 2 羽が死亡した。
2000ppm 投与群の 1 羽を切迫屠殺し、また、早産した対照群の 1 羽及び 8000ppm
投与群の 2 羽を屠殺した。立毛、脱毛、痂皮、粘液を含む糞、排糞量の減少及び
削瘦等の臨床徴候がみられたが、発生頻度から検体投与に関連する臨床症状では
なく本系統のウサギに通常散見される偶発所見であると考えられた。これらの所
見には毒性学的な意義はないと考えられた。

体重及び摂餌量 ; 対照群に比し統計学的有意差の認められた体重及び体重増加量 (表
1-1) 、並びに試験期間中における子宮重量補正体重増加量 (表 1-2) を示す。

表 1-1

妊娠 (日)	500ppm		2000ppm		8000ppm	
	体重	増加量	体重	増加量	体重	増加量
9						∥ -33
12						∥ 25
15						∥ 43
19						∥ 57
24						∥ 50
28						∥ 44

Dunnett 検定 : ∥ = p < 0.05, ∥∥ = p < 0.01

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

表 1-2

	0	500ppm	2000ppm	8000ppm
子宮重量補正体重増加量* (g)	-48.5	-20.8	-95.7	↓ -233.8
子宮重量補正体重増加率** (%)	-1.3	-0.7	-2.5	↓ -6.5

Dunnett 検定 : ∥ = p < 0.05, ∥∥ = p < 0.01

* 子宮重量補正体重増加量 = (剖検時体重) - (交尾後 6 日体重) - (子宮重量)

** 子宮重量補正体重増加率 = (子宮重量補正体重増加量) / (交尾後 6 日体重) × 100

また、対照群に比し統計学的有意差の認められた摂餌量及び相対摂餌量を下表に示す。

妊娠 (日)	500ppm		2000ppm		8000ppm	
	摂餌量	相対摂餌量	摂餌量	相対摂餌量	摂餌量	相対摂餌量
6-9					∥ 78	∥ 80
9-12					∥ 80	∥ 83

Dunnett 検定 : ∥ = p < 0.05, ∥∥ = p < 0.01

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値を表す。

8000ppm 投与群の母体重が低下し、統計学的に有意な体重増加抑制及び子宮重量による補正体重増加抑制がみられ、また有意な摂餌量の減少及び相対摂餌量の減少が認められた。これらの所見は検体の投与に起因すると考えられた。

検体摂取量；妊娠期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		500	2000	8000
雌	検体摂取量 (mg/kg/日)	20	76	269

肉眼的剖検所見；対照群の雌 1 例に脾の小形化、500ppm 投与群の 1 例に左側子宮角粘膜の単発性嚢胞及び左側子宮角に發育不全がみられ、また、1 例に右側卵巣の漿液性透明嚢胞が認められた。8000ppm 投与群の 1 例には右側卵巣の単発性漿液性透明嚢胞がみられた。対照群の早産した 1 例の心に退色、肺に不規則性表面と退色、黒褐色液体の貯留した盲腸、肝の小葉像明瞭化及び退色、胸腔の漿液性透明液体貯留が認められた。これらの所見は発生頻度が少ないことから毒性学的に意義のない変化と考えられた。親動物の繁殖性に、検体投与に関連する影響は認められなかった。2000ppm 投与群の着床前胚損失率及び着床率に認められた統計学的に有意な低下は、投与が受精後 6 日に開始されたことから、投与に関連しないと考えられた。

胎児：

性比、体重等；一腹当たりの生存胎児数や胎児体重は対照群と投与群の間に差はみられず、性比（雄／雌）及び胎盤重量に対しても検体投与の影響は認められなかった。

外表検査；いずれの投与用量群にも検体投与に関連すると考えられる所見はみられなかった。対照群、500ppm 投与群及び 8000ppm 投与群に散見された小型胎児、対照群にみられた胎児の左前肢の外転は、通常本系統のウサギにみられる生物学的変動の範囲内と考えられた。

内臓検査；いずれの投与用量群においても母体に対する検体投与に関連すると考えられる所見は認められなかった。対照群を含むすべての投与群において余剰血管、血管の変位及び胃のガス膨満等が認められた。眼強膜の混濁、左側気管支の嚢胞、腎盂拡張、両眼レンズ中央部の赤色斑及び肝に余剰小葉がみられた。また、対照群では 1 例に下行大動脈の狭窄と右心室の肥大及び肺動脈幹の狭窄、大動脈弓の拡張と右心室の肥大がみられ、500ppm 投与群の 1 例に右心室壁の肥厚と大動脈弓の狭窄がみられた。2000ppm 投与群の 1 例には大動脈弓の変位（気管及び食道の下方）、腹側からの肺動脈幹の下行大動脈への合流と動脈の欠失、また、1 例に右側腎乳頭欠失、重度の腎盂拡張と右側腎の肥大が認められた。しかし、いずれの所見とも用量反応性はみられず、また、本系統の無処置動物にみられる通常のバックグラウンド変動の範囲内と考えられた。

骨格検査；胎児頭部の軟組織検査では検体投与に関連する差はなく、骨格検査では、検査項目に軽微な群間差が認められたが、検体の用量及び投与に関連した骨化の遅延又は促進の徴候等は認められなかった。また、試験群の多くの胎児が軽微な形態学変化を示したが、検体投与に関連した所見は認められなかった。

以上の結果から、母動物における無毒性量は 2000ppm（被験物質 76mg/kg/日）、胎児及び繁殖性に対する無毒性量は 8000ppm（被験物質 269mg/kg/日）であると判断された。

結果の概要

投与群 (ppm)		0	500	2000	8000	
1 群当たり動物数		32	29	30	30	
親動物	一般状態	脱毛、痂皮、糞量減少	糞量減少	立毛、脱毛、糞量減少、粘液便、削瘦	糞量減少	
	死亡数	1 ^a	2 ^b	1 ^c	0	
	体重変化				体重増加抑制** 子宮重量補正体重増加抑制*	
	摂餌量				摂餌量減少**、相対摂餌量減少**	
	妊娠動物数 (率)	27 (84.4)	16 (55.2)	20 (66.7)	20 (66.7)	
	着床のみみられた動物数	1	0	1	1	
	早産	1	0	0	2	
	非妊娠数 (率)	5 ^a (15.6)	13 ^b (44.8)	10 ^c (33.3)	10 (33.3)	
	子宮重量 (g)	388.0	375.0	433.3	380.4	
	肉眼的病理検査	心 (退色)、肺 (不規則表面、退色)、脾 (小型化)、肝 (小葉像明瞭、退色)、盲腸 (黒色液体貯留)、胸腔 (液体貯留)	卵巣 (嚢胞)、子宮 (嚢胞、発育不良)		卵巣 (嚢胞)	
	着床所見	検査親動物数	25	16	19	17
		黄体数	9.4	9.4	9.4	9.7
		着床前胚損失数 (率)	2.2 (23.5)	2.4 (25.3)	1.1 (11.2 ^{##})	2.3 (23.6)
		着床数 (率)	7.2 (76.5)	7.0 (74.7)	8.3 (88.8 ^{##})	7.4 (76.4)
		生存胎児数 (率)	6.9 (96.1)	6.6 (93.8)	7.7 (92.4)	7.1 (95.2)
		死亡胎児数 (率)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		吸収胎児数 (率)	0.1 (1.7)	0.1 (0.9)	0.2 (2.5)	0.2 (3.2)
吸収胎児数 (率)	0.2 (2.2)	0.4 (5.4)	0.4 (5.1)	0.1 (1.6)		
胎児動物	体重 (g) <同腹児> 雄	36.8	36.7	36.5	35.6	
	雌	36.6	36.5	34.9	35.2	
	体重 (g) <個体別> 雄	35.3	35.5	35.7	34.3	
	雌	34.6	35.3	34.6	34.3	
	性比 (雄/雌、%)	48.3/51.7	41.9/58.1	56.8/43.2	49.2/50.8	
	外表変異	検査数	172	105	146	120
		小型胎児	6	3		4
		前肢異常回転	1			
	内臓変異	検査数	172	105	146	120
		余剰血管	11	2	2	5
血管変異		0	0	1	0	
胃のガス膨満	12	4	15	6		
1 (下行大動脈狭窄/右側心室肥大)、1 (肺動脈幹狭窄/大動脈弓拡張/右側心室肥大)	1 (右側心室壁肥厚/大動脈弓狭窄)	1 (大動脈弓変位/肺動脈幹の下行大動脈合流/動脈管欠失)	1 (右側腎乳頭欠失/腎盂拡張/右腎肥大)			
骨格変異	検査数	172	105	146	120	
	13 対肋骨を有する胎児数 (%)	72 (41.9%)	56 (53.3%)	101 (69.2%)	74 (61.7%)	
	8 腰椎骨を有する胎児数 (%)	15 (8.7%)	6 (5.7%)	27 (18.5%)	24 (20.0%)	

Dunnett 検定 : * = p < 0.05, ** = p < 0.01, Fisher's exact test : ## = p < 0.01

^a 1羽が受精後 6 日に偶発死亡、妊娠状況不明

^b 受精後 3 及び 7 日に各 1羽偶発死亡、妊娠状況不明

^c 1羽を受精後 7 日に切迫屠殺、妊娠状況不明

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(参考)

(11) 変異原性 (変異原性)

1) 遺伝子突然変異原性

細菌を用いた復帰変異原性試験 (1) (資料 No.MU-1)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1997 年

検体純度 : %、

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は滅菌蒸留水で希釈し、50~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の 5 用量とした。試験は 3 連制とし、2 回実施した。

用量設定根拠 :

試験結果 : 結果を次表に示した。

2 回の試験において検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、最高濃度 (5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) においても、いずれの菌株の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 ENNG、4NOPD、4NQO、9AA 及び 2AA ではすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニーの増加を示した。

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

1 回目試験

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix の有無	復帰変位コロニー数/プレート				
			塩基置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA1538	TA98	TA1537
対照 (蒸留水)		—	103	17	22	20	8
検体	50	—	101	19	20	18	7
	150	—	112	18	14	18	6
	500	—	108	20	16	17	8
	1500	—	105	18	20	23	7
	5000	—	111	17	18	16	10
対照 (蒸留水)		+	112	16	20	26	6
検体	50	+	108	14	22	24	6
	150	+	118	13	19	25	8
	500	+	117	16	20	28	10
	1500	+	118	15	23	23	7
	5000	+	114	16	18	19	6
陽性 対照	ENNG	3	—	522			
		5	—		304		
	4NOPD	5	—			458	
	4NQO	0.2	—				167
	9AA	80	—				943
	2AA	0.5	+			592	579
1 2		+	1006				
		+		292			318

注) ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine、4NOPD : 4-nitro-o-phenylenediamine、
4NQO : 4-nitroquinoline-1-oxide、9AA : 9-aminoacridine、2AA : 2-aminoanthracene

2 回目試験

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix の有無	復帰変位コロニー数/プレート				
			塩基置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA1538	TA98	TA1537
対照(蒸留水)		—	104	19	22	18	9
検体	50	—	102	19	20	17	7
	150	—	96	15	18	20	8
	500	—	97	17	20	17	10
	1500	—	102	16	15	21	8
	5000	—	99	14	22	16	7
対照(蒸留水)		+	117	16	21	25	6
検体	50	+	112	13	21	26	8
	150	+	111	15	23	19	9
	500	+	122	15	20	25	6
	1500	+	118	14	20	25	9
	5000	+	125	18	21	25	7
陽性 対照	ENNG	3	—	433			
		5	—		329		
	4NOPD	5	—			759	
	4NQO	0.2	—				253
	9AA	80	—				706
2AA	0.5	+			625	414	
	1	+	1053				
	2	+		261			223

注) ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine、4NOPD : 4-nitro-o-phenylenediamine、
4NQO : 4-nitroquinoline-1-oxide、9AA : 9-aminoacridine、2AA : 2-aminoanthracene

細菌を用いた復帰変異原性試験 (2) (変異原性)
(資料 No.MU-2)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2001 年

検体純度 : %、

試験方法 : トリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は精製水に溶解後にろ過滅菌した原液を精製水で希釈し、予備試験/1 回目及び 2 回目試験では有効成分換算 (以下同様) で 3455 μ g/プレート を最高用量とする 7 用量 (7~3455 μ g/プレート) 及び 5 用量 (69~3455 μ g/プレート) を用いた。また、3 回目及び 4 回目の試験ではさらに 5000 μ g/プレート を最高用量とする 3 用量 (1000~5000 μ g/プレート) で実施した。各試験は 3 連制とした。なお、S-9 Mix 中の S-9 画分添加量を予備試験/1 回目試験及び 3 回目試験では 5% (v/v)、2 回目及び 4 回目試験では 10% (v/v) とした。

用量設定根拠 :

試験結果 : 結果を次表に示した。

4 回の試験において検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、最高濃度 (5000 μ g/プレート) においても、*Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株の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 4NQO 及び 2AA では本検定菌株で明らかな復帰変異コロニーの増加を示した。

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

予備試験/1回目試験

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$) [*]	S-9 Mix の 有無	復帰変位コロニー数/プレート	
			塩基置換型	
			WP2 <i>uvrA</i>	
対照 (蒸留水)		—	13	
検体	7	—	16	
	23	—	15	
	69	—	15	
	230	—	17	
	619	—	14	
	2300	—	16	
3455	—	11		
対照 (蒸留水)		+	17	
検体	7	+	16	
	23	+	18	
	69	+	17	
	230	+	14	
	619	+	19	
	2300	+	15	
3455	+	21		
陽性 対照	4NQO	10	—	861
	2AA	5	+	259

* 有効成分換算値 (検体)

注) 4NQO : 4-nitroquinoline-1-oxide, 2AA : 2-aminoanthracene

2回目試験

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$) [*]	S-9 Mix の 有無	復帰変位コロニー数/プレート	
			塩基置換型	
			WP2 <i>uvrA</i>	
対照 (蒸留水)		—	13	
検体	69	—	11	
	230	—	13	
	619	—	13	
	2300	—	6	
	3455	—	12	
対照 (蒸留水)		+	9	
検体	69	+	15	
	230	+	10	
	619	+	12	
	2300	+	16	
	3455	+	16	
陽性 対照	4NQO	10	—	947
	2AA	10	+	252

* 有効成分換算値 (検体)

注) 4NQO : 4-nitroquinoline-1-oxide, 2AA : 2-aminoanthracene

3 回目試験

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$) [*]	S-9 Mix の 有無	復帰変位コロニー数/プレート
			塩基置換型
			WP2 <i>uvrA</i>
対照 (蒸留水)		—	11
検体	1000	—	10
	3330	—	11
	5000	—	10
対照 (蒸留水)		+	12
検体	1000	+	9
	3330	+	11
	5000	+	11
陽性 対照	4NQO	—	535
	2AA	+	247

* 有効成分換算値 (検体)

注) 4NQO : 4-nitroquinoline-1-oxide、2AA : 2-aminoanthracene

4 回目試験

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$) [*]	S-9 Mix の 有無	復帰変位コロニー数/プレート
			塩基置換型
			WP2 <i>uvrA</i>
対照 (蒸留水)		—	14
検体	1000	—	15
	3330	—	12
	5000	—	15
対照 (蒸留水)		+	15
検体	1000	+	15
	3330	+	9
	5000	+	10
陽性 対照	4NQO	—	968
	2AA	+	294

* 有効成分換算値 (検体)

注) 4NQO : 4-nitroquinoline-1-oxide、2AA : 2-aminoanthracene

2) ヒトの抹消血リンパ球細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (変異原性)
(資料 No.MU-3)
試験機関：
[GLP 対応]
報告書作成年：2001 年

検体純度： %、

試験方法：ヒトの継代培養した抹消血リンパ球細胞を用い、代謝活性化及び非活性化によって染色体異常誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解して用いた。

各培養液の有糸分裂指数は細胞 1000 個あたりの分裂中期細胞数を計数して測定した。試験は 2 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：一回目、二回目及び追加試験の結果を表 1~3 に示す。

一回目試験では、S9-Mix 存在の有無にかかわらず検体は染色体異常を有する細胞数に統計学的に有意又は生物学的に意味のある増加を誘導しなかった。

二回目試験では、S9-Mix 非存在下で 24 時間連続暴露により検体は染色体異常を有する細胞数に統計学的に有意又は生物学的に意味のある増加を誘導しなかった。48 時間連続暴露では、2073 µg/mL の濃度でギャップを含めた場合に検体は染色体異常を有する細胞数に統計学的に有意な増加を誘導したが、この増加はヒストリカルコントロールデータの範囲内であり、また、この増加は用量関連性がなくギャップを含めた場合にのみ有意であること、また最高の試験濃度及び細胞毒性濃度（有糸分裂指数 38%）でのみ認められたこと、さらに、観察された異常の種類は主に染色体の切断で、これは試験化合物を細胞毒性のある濃度で処理した培地に屢々みられる例であること等から、この増加は生物学的に有意とは考えられなかった。S9-Mix の存在では、検体は最高試験濃度の 3455 µg/mL まで染色体異常を有する細胞数に統計学的に有意又は生物学的に有意な増加を誘導しなかった。

追加試験では、S9-Mix の非存在下、24 時間連続暴露及び所定の有糸分裂指数の抑制を誘発する濃度で、検体は染色体異常を有する細胞数に統計学的又は生

物学的に有意な増加を誘導しなかった。S9-Mix の存在下では、5000 μ g/mL の濃度まで染色体異常を有する細胞数に統計学的又は生物学的に有意な増加を誘導しなかった。

なお、陽性対照化学物質、Mitomycin C 及び Cyclophosphamide はいずれも染色体異常を有する細胞の出現頻度を統計学的に有意に増加させたことから、本試験条件が適切であり、また代謝活性系 (S9-Mix) が適切に機能していたことを示唆した。

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染色体異常誘発性は有しないものと判断される。

表 1. 1回目試験 (n=2 の合計)

薬物	濃度 [#] (μ g/mL)	処理時間 ・ hr	標本作製時間 ・ hr	有糸分裂指数 ・ %	観察細胞数	S-9 Mix の有無	染色体異常数							異常細胞数		判定		
							染色分体			染色体				ギャンプ含む	ギャンプ含まず			
							ギャンプ	切断	無動原体断片	ギャンプ	切断	無動原体断片	交換				二動原体	その他
溶媒対照 (DMSO)	1.0% (v/v)	3	24	100	200	-					4			1		5	5	
検体	1000	3	24	95	200	-	1	1			1		1		2	2	-	
	3300			101	200										1	0		
	5000			102	200										2	1		
陽性対照 MMC-C	0.5	3	24	90	200	-	6	18			14	29		3	*** 56	*** 52	+	
溶媒対照 (DMSO)	1.0% (v/v)	3	24	100	200	+	1				1		1		3	2		
検体	1000	3	24	89	200	+	1	2			1		2	1	3	2	-	
	3300			90	200										1	5		
	5000			87	200										1	4		1
陽性対照 CP	15	3	24	33	200	+	8	38	1	2	24	3	18	1	2	*** 69	*** 65	+

[#] 有効成分換算値 (検体)

その他: 上記のいずれにも属さないその他の異常

カイ二乗検定: 対照に比して有意差あり; *P<0.05, **P<0.01 又は***P<0.001

MMC-C: Mitomycin C, CP: Cyclophosphamide

表 2. 2 回目試験 (n=2 の合計)

薬 物	濃度 [#] (µg/mL)	処理時間 ・ hr	標本作製時間 ・ hr	有糸分裂指数 ・ %	観察細胞数	S-9 Mix の有無	染色体異常数							異常細胞数		判定		
							染色分体			染色体				ギャンプ含む	ギャンプ含まず			
							ギャンプ	切断	無動原体断片	ギャンプ	切断	無動原体断片	交換				二動原体	その他
溶媒対照 (DMSO)	1.0% (v/v)	24	24	100	200	-	2				3		1		6	4		
検 体	518	24	24	106	200	-	3	1			1		1		5	3	-	
	1382			84	200		1	2		2	1	2	8	5				
	2764			55	200		3	1			2		6	3				
陽性対照 MMC-C	0.2	24	24	100	200	-	4	8		2	9	1	11		2	*** 33	*** 28	+
溶媒対照 (DMSO)	1.0% (v/v)	48	48	100	200	-		1							1	1		
検 体	518	48	48	86	200	-		1		1			1		3	2	-	
	691			71	200		1	1		1	1	3	2					
	2073			38	200		4	4		1	1	11**	6					
陽性対照 MMC-C	0.1	48	48	80	200	-	1	8		1	15		12	2	5	*** 37	*** 36	+
溶媒対照 (DMSO)	1.0% (v/v)	3	48	100	200	+		3		1					3	3		
検 体	691	3	48	108	200	+	1			1					2	1	-	
	2301			119	200		1			1	1	3	1					
	3455			113	200							0	0					
陽性対照 CP	15	3	48	- ^{b)}	200	+	7	33		1	16		13	1	1	*** 60	*** 54	+

[#] 有効成分換算値 (検体)

その他: 上記のいずれにも属さないその他の異常

カイ二乗検定: 対照に比して有意差あり; *P<0.05, **P<0.01 又は***P<0.001

MMC-C: Mitomycin C, CP: Cyclophosphamide

^{b)} CP は 24 時間後に作製、従って有糸分裂指数は対照のパーセントとして算出できず。

表 3. 追加試験 (n=2 の合計)

薬 物	濃度# (µg/mL)	処理時間 ・ hr	標本作製時間 ・ hr	有糸分裂指数 ・ %	観察細胞数	S-9 Mnの有無	染色体異常数							異常細胞数		判定		
							染色分体			染色体				ギャンプ含む	ギャンプ含まず			
							ギャンプ	切断	無動原体断片	ギャンプ	切断	無動原体断片	交換				二動原体	その他
溶媒対照 (DMSO)	1.0% (v/v)	24	24	100	200	-		2		1			3		6	5		
検 体	2500	24	24	47	200	-	3	3		5					10	8	-	
陽性対照 MMC-C	0.2	24	24	112	200	-	6	14		2	9		14	2	4	*** 43	*** 38	+
溶媒対照 (DMSO)	1.0% (v/v)	3	48	100	200	+	1			1					2	1		
検 体	1000 3330 5000	3	48	117 138 144	200 200 200	+	1 1 2	1 1		1 4					2 6 3	2 4 1	-	
陽性対照 CP	15	3	48	- ^{b)}	200	+	10	41		3	13		13	5	*** 68	*** 59	+	

有効成分換算値 (検体)

その他：上記のいずれにも属さないその他の異常

カイ二乗検定：対照に比して有意差あり；*P<0.05、**P<0.01 又は***P<0.001

MMC-C：Mitomycin C、CP：Cyclophosphamide

^{b)} CPは24時間後に作製、従って有糸分裂指数は対照のパーセントとして算出できず。

3) マウスを用いた小核試験

(変異原性)
(資料 No.MU-4)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2001 年

検体純度 : %、

供試動物 : NMRI BR 系マウス (6~8 週齢、体重 雄 $28.2 \pm 2.3 \sim 32.0 \pm 1.6$ g、
雌 $23.2 \pm 2.3 \sim 24.8 \pm 1.8$ g)、一群雌雄各 5 匹

試験方法 : 検体を生理食塩水に溶解し、有効成分換算 (以下同様) で 69、138 及び 276mg/kg の投与レベルで、1 回腹腔内投与した。陰性対照群には生理食塩水を、また、陽性対照群にはシクロフォスファミドの生理食塩溶液を 50mg/kg の投与レベルで同様に投与した。

投与 24 及び又は 48 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てスライドグラス上にメタノール中で固定後、Wright の染色法により染色し骨髓標本を作製した。陽性対照動物は、48 時間後に動物を屠殺した。

各標本について、2000 個の多染性赤血球を観察して小核を有する多染性赤血球を計数した。同時に、細胞毒性を調べるために最初の 1000 個の赤血球を観察して正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した。

用量設定根拠 :

結 果 : 骨髓標本の観察結果を表 (次頁) に示した。

観察結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg) *	性	観察動物数	MNPCE (平均値±SD)	PCE/NCE (平均値±SD)
24	陰性対照 (生理食塩水)	—	雄	5	0.2±0.4	1.10±0.08
			雌	5	0.4±0.8	1.16±0.22
	検 体	276	雄	5	0.8±0.8	1.21±0.12
			雌	5	0.4±0.9	1.15±0.18
		138	雄	5	0.4±0.5	1.03±0.21
			雌	5	0.6±0.9	1.13±0.21
69	雄	5	0.6±1.3	1.12±0.19		
	雌	5	0.4±0.9	1.12±0.11		
48	検 体	276	雄	5	1.4±2.2	1.28±0.20
			雌	5	1.4±2.1	1.07±0.11
	陽性対照 (シクロfosファミド*)	50	雄	5	23.0±11.7 ⁽¹⁾	0.41±0.15
			雌	5	21.4±10.4 ⁽¹⁾	0.44±0.09

* 有効性換算値 (検体)

⁽¹⁾ 対応する対照群と有意に差がある (Wilcoxon Rank Sum 検定、 $p \leq 0.01$)

PCE : 多染性赤血球数、NCE : 正染性赤血球数

MNPCE : 多染性赤血球 2000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

投与後 1 時間以内に 276mg/kg 投与群の全例に嗜眠及び運動失調が、また雄 1 例及び雌 3 例に被毛状態の異常が認められた。投与後 20 時間以内に全動物が回復した。その他の投与群の動物の一般状態には異常は認められなかった。雌雄いずれの標本採取時間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。陽性対照であるシクロfosファミドでは、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。

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、変異原性は陰性と判断される。

(変異原性)

4) L5178Y マウスリンパ腫細胞を用いた *in vitro* 哺乳動物細胞遺伝子突然変異試験
(資料 No.MU-5)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2001 年

検体純度： %、

試験方法：L5178Y マウスリンパ腫細胞を用い、代謝活性系の存在の有無によるチミジンキナーゼ座 (TK-座位) における前進変異の誘導に対する影響を検定した。

検体処理：検体は DMSO に溶解し、2 つの独立した試験で S9-Mix 存在の有無の両方で試験した。培養当たり細胞を 10^6 /mL で用いた。細胞培養液は遠心管中、 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 及び 145rpm で 3 又は 24 時間振とう培養機で処理した。溶媒及び陽性対照も含めた。溶媒対照は 2 反復で試験した。暴露後の細胞は遠心分離し、上清を除去後、細胞をハンクスバランスド塩類溶液に懸濁し、再度遠心分離した。得られた細胞を F10 完全培地に再懸濁し、最終懸濁液中の細胞を改良 Neubauer 血球計算盤で顕微鏡下に計数した。

直接クローニング効率：検体への暴露直後に、各用量 1 cell/well を有する 2×96-well プレートを用意し、0 日の生存性を測定した。プレートは 9 及び 10 日間培養後に採点してクローニング効率を判定した。

表現期：変異体表現型の表示について、各用量の検体で 24 時間処理した培養液中の残存細胞を 2 日間培養した。検体で 3 時間処理した場合は 3 日間培養した。この培養期間中に、対数増殖期を維持するために最低一日おきに継代培養した。検体処理開始 3 日後に細胞をプレートに移し、クローニング効率 (CE) 及び変異体頻度 (MF) を測定した。

変異体頻度の測定：CE の測定には細胞懸濁液を希釈して、96-well プレートに接種した。非選択培地に well 当たり 1 細胞 (2×96-well プレート/濃度) 添加した。MF の測定には、合計数 9.6×10^5 cell/濃度を、各 well が選択培地 (TFT-選択) 中で 2500cell を含む、4 個の 96-well プレートに入れた。CE 及び MF のプレートは 5%CO₂ を含む加湿空气中、 37°C で 10 及び 11 日間培養した。培養期間後に TFT-選択のプレートは、各 well に 0.5 mg/mL の MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を添加して 2 時間染色した。CE 及び MF のプレートは肉眼又は顕微鏡で採点した。

用量設定根拠：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

一回目試験：

S9-Mix 非存在下；3、10、33、100、333、1000、3330 及び 5000 µg/mL

8% (v/v) S9-Mix 存在下；3、10、33、100、333、1000、3330 及び 5000 µg/mL

二回目試験：

S9-Mix 非存在下；33、100、333、560、1000、1250、1600 及び 2000 µg/mL

12% (v/v) S9-Mix 存在下；3、10、33、100、333、1000、3330 及び 5000 µg/mL

試験結果：一回目及び二回目試験の結果を表 3 及び 4 に示す。

毒性：一回目試験の S9-Mix 非存在下、及び存在下で、処理 3 時間後では、非検体の最高濃度の実生存細胞が溶媒対照に比し、それぞれ 52 及び 83%減少した。二回目試験の S9-Mix 非存在下の処理 24 時間後及び S9-Mix 存在下の処理 3 時間後では、非検体の最高濃度の実生存細胞が溶媒対照に比し、それぞれ 96 及び 68%減少した。

変異原性：一回目及び二回目試験とも、検体は S9-Mix 存在の有無にかかわらず TK 座位における変異体頻度の増加を誘導しなかった。小及び大コロニー数とも溶媒対照の小及び大コロニー数と同等であった。溶媒対照培養液における自然発生頻度は背景データの範囲内であった。また陽性対照化合物で処理した培養液中の変異体頻度は各試験とも明らかな増加が認められ（EMS：7.7 及び 23 倍；DMN：13 及び 9.2 倍）、S9-Mix 存在の有無が突然変異原性の検出に適切であり、代謝活性系も適切に機能したと結論された。

以上の結果から本試験条件下において、検体は L5178Y マウスリンパ腫細胞試験系における突然変異原性は陰性と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

表 1. L5178Y マウスリンパ腫細胞を用いる用量設定試験

表 2. L5178Y マウスリンパ腫細胞を用いる用量設定試験

表 3. マウスリンパ腫 L5175Y 試験系におけるプロプラントの細胞毒性および突然変異反応

用量* ($\mu\text{g/mL}$)	処理後の 細胞数 対照に対する%	処理後の CE 対照に対する%	実生存細胞 対照に対する% ⁽¹⁾	試験 3 日 の CE 絶対%	変異体 well 総数		突然変異頻度 $\times 10^5$	
					合計 (小 大)	合計 (小 大)		
[一回目試験]								
代謝活性化なし 3 時間処理								
SC1	100	100	100	143	63 (17 46)	5.0 (1.3 3.7)		
SC2	-	-	-	143	67 (22 45)	5.4 (1.8 3.6)		
3	92	90	83	145	50 (15 35)	3.8 (1.1 2.7)		
10	115	73	84	135	51 (19 32)	4.2 (1.6 2.6)		
33	86	85	73	93	32 (10 22)	3.7 (1.2 2.5)		
100	103	85	88	154	71 (24 47)	5.3 (1.8 3.5)		
333	108	92	99	150	61 (28 38)	4.6 (1.7 2.9)		
1000	105	103	108	167	103 (14 89)	7.5 (1.0 6.5)		
3330	83	60	50	143	28 (11 17)	2.1 (0.8 1.3)		
5000	83	58	48	173	56 (14 42)	3.6 (0.9 2.7)		
EMS	103	88	91	133	282 (33 249)	39.9 (4.7 35.2)		
8% (v/v) 代謝活性化あり 3 時間処理								
SC1	100	100	100	162	62 (21 41)	4.3 (1.5 2.8)		
SC2	-	-	-	145	42 (16 26)	3.2 (1.2 2.0)		
3	97	98	95	143	49 (17 32)	3.8 (1.3 2.5)		
10	102	87	89	170	47 (6 41)	3.1 (0.4 2.7)		
33	93	94	87	157	45 (10 35)	3.2 (0.7 2.5)		
100	100	98	98	179	42 (11 31)	2.6 (0.7 1.9)		
333	88	102	90	176	55 (13 42)	3.5 (0.8 2.7)		
1000	93	83	77	173	37 (10 27)	2.3 (0.6 1.7)		
3330	55	71	39	179	49 (15 34)	3.1 (0.9 2.2)		
5000	37	46	17	137	59 (17 42)	4.9 (1.4 3.5)		
DMN	97	83	81	72	225 (75 150)	49.0 (16.3 32.7)		

*有効成分換算値 (検体)

SC=溶媒対照=DMSO

(1) 実生存細胞 (対照に対する%) = 処理後の細胞数 (対照に対する%) \times 処理後の CE (対照に対する%)

表 4. マウスリンパ腫 L5175Y 試験系におけるプロプラントの細胞毒性および突然変異反応

用量* ($\mu\text{g/mL}$)	処理後の 細胞数 対照に対する%	処理後の CE 対照に対する%	実生存細胞 対照に対する% ⁽¹⁾	試験 3 日 の CE 絶対%	変異体 well 総数 合計 (小 大)	突然変異頻度 $\times 10^5$	
						合計 (小 大)	
[二回目試験]							
代謝活性化なし 24 時間処理							
SC1	100	100	100	131	20 (6 14)	1.6 (0.5 1.1)	
SC2	-	-	-	133	34 (4 30)	2.8 (0.3 2.5)	
33	91	97	88	116	38 (7 31)	3.6 (0.7 2.9)	
100	85	93	79	125	43 (4 39)	3.8 (0.4 3.4)	
333	57	80	46	107	21 (0 21)	2.1 (0.0 2.1)	
560	48	69	33	102	15 (4 11)	1.6 (0.4 1.2)	
1000	73	55	40	81	18 (3 15)	2.4 (0.4 2.0)	
1250	75	39	29	72	21 (1 20)	3.1 (0.1 3.0)	
1600	48	26	12	68	28 (6 22)	4.5 (1.0 3.5)	
2000	22	19	4	90	42 (8 34)	5.1 (1.0 4.1)	
EMS	85	54	46	88	255 (9 246)	49.6 (1.8 47.8)	
12% (v/v) 代謝活性化あり 3 時間処理							
SC1	100	100	100	154	50 (1 49)	3.6 (0.1 3.5)	
SC2	-	-	-	170	53 (8 45)	3.5 (0.5 3.0)	
3	101	89	90	150	52 (3 49)	3.9 (0.2 3.7)	
10	91	122	111	162	35 (3 32)	2.4 (0.2 2.2)	
33	89	102	91	147	54 (2 52)	4.1 (0.2 3.9)	
100	92	77	71	179	60 (3 57)	3.8 (0.2 3.6)	
333	97	90	87	154	46 (1 45)	3.3 (0.1 3.2)	
1000	87	98	85	170	84 (6 78)	5.8 (0.4 5.4)	
3330	68	70	48	154	53 (6 47)	3.9 (0.4 3.5)	
5000	55	58	32	143	28 (4 24)	2.1 (0.3 1.8)	
DMN	103	63	65	58	145 (24 121)	32.7 (5.4 27.3)	

*有効成分換算値 (検体)

SC = 溶媒対照 = DMSO

(1) 実生存細胞 (対照に対する%) = 処理後の細胞数 (対照に対する%) \times 処理後の CE (対照に対する%)

(12) 生体機能影響

プロパモカルブ塩酸塩の生体機能への影響試験

(資料 No. P)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

検体純度：

① マウスの中樞神経系に対する作用

マウスにおける一般状態

供試動物： Crj:CD-1 (ICR) 系マウス、5 週齢、体重 雌 19.1~21.9g 1 群雌 6 匹

投与方法： 検体を注射用水に希釈し、0、500、1000 及び 2000mg/kg の有効成分用量（以下同様）で強制経口投与し、一般症状及び行動を観察した。なお、動物は検体投与前 19~20 時間絶食させた。対照群には注射用水のみを同様に投与した。投与液中の有効成分は分析して確認した。

結果： 本剤の 500mg/kg 投与群では自発運動の亢進または抑制、探索行動及び触反応の亢進がみられ、1000mg/kg 投与群では自発運動の抑制が認められた。2000mg/kg 投与群では投与後 0.5 時間以内に 1 匹が死亡し、また、警戒性、探索行動及び触反応の亢進または抑制ならびに自発運動の抑制等がみられた。これらの症状は投与後 4 時間で回復した。

② ラットの腎機能に対する作用

供試動物： Crj:CD (SD) IGS 系ラット、5 週齢、体重 雌 112.2~128.8g 1 群雌 6 匹

投与方法： 検体を注射用水に希釈し、0、500、1000 及び 2000mg/kg の有効成分用量で強制経口投与した。検体投与直後に生理食塩水 20mL/kg を経口投与し、その後 6 時間までの尿を採取した。尿量、尿比重、尿中電解質、体重当りの 6 時間排泄量及び尿浸透圧を測定した。なお、動物は検体投与前 18~19 時間絶食させた。対照群には注射用水のみを同様に投与した。投与液中の有効成分は分析して確認した。

結果： 結果を下表に示す。

	投与量* (mg/kg)	尿量 (mL/100g/ 6 時間)	尿比重	電解質排泄量 ($\mu\text{mol}/100\text{g}/5$ 時間)			尿浸透圧 (mOsm/kg)
				Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	
溶媒 対照	0	2.0	1.020	270	95	272	748
検 体	500	↑2.9	1.021	↑397	↑155	↑518	727
	1000	↑3.3	1.023	↑505	↑186	↑774	833
	2000	1.8	↑1046	↑365	↑155	↑705	↑1430

* 有効成分換算値

Dunnett 検定；↑；<0.05

尿量は 500 及び 1000mg/kg 投与で、尿中電解質排泄は Na⁺、K⁺、Cl⁻いずれにおいても全投与群で溶媒対照群と比較し有意な高値を示した。また尿比重及び尿浸透圧は 2000mg/kg 投与群で有意な高値を示した。なお、2000mg/kg 投与群では投与 40 分後に 1 匹が死亡した。

③ ウサギの呼吸、循環器系に対する作用

供試動物： Kbl : JW 系ウサギ、10～11 週齢、体重 1.9～2.3kg 雌 4 匹

投与方法： 動物をウレタンの腹腔内投与で麻酔後背位に固定し、検体を同一動物に対して、0（注射用水のみ）、1.26、30.3 及び 728mg/kg の有効成分用量で大腿静脈に挿入したカニューレから投与した。投与は 40 分以上の間隔をあけた。呼吸系パラメータとして呼吸数及び呼吸換気量を測定し、循環器系パラメータとして血圧、心拍数、心電図を測定した。投与液中の有効成分は分析して確認した。

結 果： 本剤の 1.26mg/kg 投与は、呼吸、循環器系に何ら影響を及ぼさなかった。
30.3mg/kg 投与後では血圧及び心拍数が投与後 1 分で有意に低下した。
728mg/kg 投与後直後には 4 例全てが死亡した。

以上の試験結果より、本剤は無麻酔動物の生体機能に対して、マウスでは 500mg/kg 以上の投与量で一般症状への影響がみられ、ラットでは 500mg/kg の投与量で尿量及び尿中電解質の変動が認められた。麻酔下のウサギでは 30.3mg/kg の投与で血圧及び心拍数を低下させ、728mg/kg 投与では死亡をひき起こした。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (供試動物)		投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢 神経系	一般症状 [Irwin 法] (マウス)	経口 (注射用水)	0	♀6	≥ 500	-	500mg/kg以上の投与群で自発運動の抑制、探索行動及び触反応の亢進がみられた。2000mg/kg 群ではさらに警戒性の亢進または抑制、発声等が認められ、1匹が死亡した。
			500				
			1000				
			2000				
腎機能	尿量 尿中電解質 尿比重 尿浸透圧 (ラット)	経口 (注射用水)	0	♀6	≥ 500	-	500及び1000mg/kg 群で尿量が増加した。2000mg/kg 群で尿比重及び浸透圧が増加し、1匹が死亡した。全群で Na ⁺ 、K ⁺ 、Cl ⁻ の増加がみられた。
			500				
			1000				
			2000				
呼吸器系	呼吸数呼吸換気量 (ウサギ、 麻酔)	静脈内 (注射用水)	0	♀4 (同一動物 に段階的 投与)	728	30.3	728mg/kg 投与後直後には4例全てが死亡した。
循環器系	血圧 心拍数 心電図 (ウサギ、 麻酔)		1.26		30.3	1.26	30.3mg/kgの投与後1分で血圧及び心拍数の有意な低下がみられた。
			30.3				
			728				

投与量、作用量及び無作用量はいずれも有効成分換算値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2. 原体中混在物及び代謝物を用いた試験

(資料 No. TIA-1)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.TIA-2)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.TIMU-1)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No. TIMU-2)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3. 製剤を用いた試験

(製剤急性経口)

液剤のラットにおける急性経口毒性試験 (限界試験)

(代替資料 No. A-1)

試験成績代替

代替理由

農薬の登録申請に係る試験成績について(平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)の記5の規定に基づき、原体の毒性試験成績で製剤の毒性試験成績を代替する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

液剤のラットにおける急性経皮毒性試験（限界試験）
試験成績代替

（製剤急性経皮）
（代替資料 No. A-2）

代替理由

農薬の登録申請に係る試験成績について（平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産
第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知）の記 5 の規定に基づき、原体の毒性
試験成績で製剤の毒性試験成績を代替する。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

液剤のラットにおける急性吸入毒性試験（限界試験）
試験成績代替

（製剤急性吸入）
（代替資料 No. A-3）

代替理由

農薬の登録申請に係る試験成績について（平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産
第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知）の記 5 の規定に基づき、原体の毒性
試験成績で製剤の毒性試験成績を代替する。

(製剤皮膚刺激性)

液剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 No. I-1)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1995 年

検体の純度： %液剤、

供試動物：ニュージーランド白色ウサギ、12～20 週齢、体重：2.46～2.69kg、一群雌 6 匹

観察期間：3 日間

投与方法：検体の 0.5mL を処理したガーゼパッチ (2.5cm 四方) を剪毛した背部皮膚に適用し、半閉塞貼付した。暴露時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は蒸留水を含ませた脱脂綿を用いて拭き取った。

観察項目：暴露終了後 1、24 時間、2 及び 3 日後に塗布部分の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無等を観察し、Draize 法に従って採点した。

皮膚反応の判定基準は以下のとおりである。

紅斑及び痂皮の形成

紅斑なし	0
非常に軽度の紅斑 (かろうじて識別できる。)	1
はっきりした紅斑	2
中等度から重度の紅斑	3
重度の紅斑 (深紅色) から軽度の痂皮形成 (深部損傷)	4

浮腫の形成

浮腫なし	0
非常に軽度の浮腫 (かろうじて識別できる。)	1
軽度の浮腫 (はっきりした膨隆による明確な縁が識別できる。)	2
中等度の浮腫 (約 1mm の膨隆)	3
重度の浮腫 (1mm 以上の膨隆と暴露範囲を越えた広がり)	4

結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

項目	最高評点*	暴露後時間			
		1 時間	24 時間	2 日	3 日
紅斑・痂皮	4	0.5	0.0	0.0	0.0
浮腫	4	0.0	0.0	0.0	0.0
合計	8	0.5	0.0	0.0	0.0

注) 表の点数は 6 匹の平均値である。 *判定基準の最高評点

暴露終了後 1 時間では 3 匹の動物に非常に軽度の紅斑が認められたが、24 時間後では全動物の処理皮膚部位は正常であった。また、試験期間中に皮膚腐食性の症状は認められなかった。

以上の結果から、検体はウサギの皮膚に対して、刺激性がないものと思われる。

(製剤眼刺激性)

液剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 No. I-2)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1995 年

検体の純度： %液剤

供試動物：ニュージーランド白色ウサギ、12~20 週齢、体重：2.52~3.45kg、一群雌 6 匹

観察期間：3 日間

投与方法：検体の 0.1mL を動物の右眼の結膜嚢内に適用し、1 秒間閉眼保持した。左眼は処置せずに対照とした。なお、検体適用時の疼痛を抑える目的で処理 1~2 分前に動物の両眼に 0.5% proxymetacaine 塩酸塩 1 滴を点眼して麻酔した。

観察項目：適用後約 1、24 時間、2 及び 3 日後に、角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Draize の方法に従って採点した。

眼の刺激性判定基準は以下のとおりである。

角 膜

(A) 混濁の程度 (最も濃い部分で判定)

混濁なし	0
散在性又はびまん性の混濁、虹彩の細部は明瞭に見える	1
容易に識別できる半透明部位、虹彩の細部は僅かに不明瞭	2
真珠様光沢部位、虹彩の細部は不明で、瞳孔の大きさが かろうじて見分けられる	3
不透明、虹彩が見分けられない	4

(B) 角膜混濁の範囲

0 以上で 1/4 未満	1
1/4 以上で 1/2 未満	2
1/2 以上で 3/4 未満	3
3/4 以上で全面積まで	4

合計点数 = (A×B) × 5 最大合計点 = 80

虹 彩

(C) 数 値

正常	0
正常より深いひだ、充血、腫脹、角膜周囲の充血 (これらの いずれか又は組み合わせ)、虹彩はまだ光に反応する (反応は 遅く、鈍い)	1
対光反応消失、出血、著しい組織崩壊 (これらのいずれか又は すべて)	2

合計点数 = C×5 最大合計点 = 10

結 膜

(D) 発 赤 (眼瞼及び眼球結膜、角膜及び虹彩を除く)

血管正常	0
血管が明らかに充血	1

	びまん性の深紅色、個々の血管は容易に見分けられない	2
	びまん性の牛肉様赤色	3
(E)	浮腫	
	腫脹なし	0
	正常を超える腫脹（瞬膜を含む）	1
	一部の眼瞼の外反を伴う明らかな腫脹	2
	眼瞼の 1/2 未満の閉鎖を伴う腫脹	3
	眼瞼の 1/2 以上で完全な閉鎖を伴う腫脹	4
(F)	分泌物	
	分泌物なし	0
	正常を超える分泌量（正常動物の内眼角に認められる少量を含まない）	1
	眼瞼及び眼瞼に隣接する被毛の湿潤を伴う分泌物	2
	眼瞼及び眼周囲の大部分の被毛の湿潤を伴う分泌物	3
	合計点数 = (D+E+F) × 2 最大合計点 = 20	
	最大合計点 = 110	

結果：観察した眼刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

項 目		最高 評点**	適用後時間			
			1時間	24時間	2日	3日
角 膜	混濁程度 (A)	4	0.0	0.0	0.0	0.0
	面積 (B)	4	0.0	0.0	0.0	0.0
虹 彩	程 度 (C)	2	0.5	0.0	0.0	0.0
結 膜	発 赤 (D)	3	1.0	0.2	0.0	0.0
	浮 腫 (E)	4	0.3	0.0	0.0	0.0
	分 泌 物 (F)	3	0.7	0.0	0.0	0.0
合 計*		110	6.5	0.3	0.0	0.0
陽性反応を示した動物数			6/6	1/6	0/6	0/6

注) 表の点数は 6 匹の平均値である

*Draize 法による評価点 = (A×B×5) + (C×5) + [(D+E+F) × 2] (最高 110 点)

**判定基準の最高評点

検体適用後 1 時間では全動物の結膜に軽度～中等度の刺激性が認められ、24 時間では 1 例に軽度の結膜発赤が持続した。適用後 1 時間の 3 例に虹彩の炎症が認められたが、角膜への作用は試験期間中に認められなかった。すべての動物は適用 24～48 時間までに正常に回復した。

以上の結果から、検体はウサギの眼粘膜に対して、僅かな刺激性があるものと思われる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

液剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験
試験成績代替

(製剤皮膚感作性)
(代替資料 No. S)

代替理由

農薬の登録申請に係る試験成績について(平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)の記5の規定に基づき、原体の毒性試験成績で製剤の毒性試験成績を代替する。