

② ラットを用いた2世代繁殖毒性試験（催奇形性試験を含む）

（資料No. 44）

試験機関：

（GLP対応）

報告書作成年：1992年

試験目的：

低用量での影響を確認する為に

再度2世代繁殖試験を実施した。（残留農薬安全性評価委員会からの要求試験）

検体純度：%

供試動物：SD系（Cr1:CD）ラット、開始時6週齢、体重：雄平均値221g、雌平均値195g
1群雌雄各30(P)/25(F₁)匹

投与期間：

P世代；雄 投与開始（6週齢）から交配前9週と5日間及びその後第2回目の交配終了まで

雌 投与開始（6週齢）から交配前9週と5日間及びその後第2回目の妊娠20日まで

F₁A世代；雄 離乳後11週間及び第2回目の交配終了まで

雌 離乳後11週間及び第2回目の妊娠20日まで

（1990年2月8日-12月18日）

投与方法：検体を0、25、100及び400ppmの濃度で飼料に混入し、自由に摂食させた。飼料は毎週調製した。

投与量設定根拠；

観察・検査項目：概要を表1にまとめた。

一般状態及び死亡率；全ての動物について、一般状態及び死亡の有無を毎日観察した。

体重変化；P及びF₁A親世代の雄については週1回測定し、P及びF₁A親世代の雌については、生育及び交配期間には週1回、交尾確認後は妊娠0、7、14及び20日並びに哺育1、7、14及び21日に測定した。

摂餌量；P及びF₁A親世代の雌雄について、交配期間を除き週1回測定した。妊娠、哺育中のP及びF₁A親世代の雌については、体重測定と同様の間隔で測定した。

交配及び交尾・妊娠の確認；雌雄1対1で7日間を期限に同居させ、膣栓或いはスメアー中の精

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

子の存在により交尾を確認した。さらに、交尾徴候がなかった場合交尾が確認された同群の雄動物と7日間を期限に同居させた。交尾確認日を妊娠0日とした。繁殖性に関する指標；各雌動物毎に、交配、交尾、妊娠及び出産の観察に基づき算出した。

$$\text{交尾率} = (\text{交尾動物数} / \text{交配動物数}) \times 100$$

$$\text{繁殖率} = (\text{妊娠動物数} / \text{交配動物数}) \times 100$$

$$\text{受胎率} = (\text{妊娠動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100$$

$$\text{出産率} = (\text{生存児出産動物数} / \text{妊娠動物数}) \times 100$$

児動物の観察；P及びF₁A親世代の妊娠雌を分娩させ、妊娠期間、死亡及び生存児数、性比を記録した。F₁A及びF₂A児世代について症状は毎日観察した。体重測定は哺育1、4、7、14及び21日に実施した。なお哺乳期に死亡の児動物は、外表異常の検査を実施した。以下の指標を算出した。

$$\text{出生率} = (\text{生後0日生存児数} / \text{出産児総数}) \times 100$$

$$\text{生後4、21日生存率} = (\text{生後4、21日生存児数} / \text{生後0、4日生存児数}) \times 100$$

$$\text{離乳率} = (\text{生後21日生存児数} / \text{出産児総数}) \times 100$$

肉眼的病理検査；すべてのと殺及び死亡動物について外表及び内臓異常を検査した。

臓器重量；剖検時に以下の臓器重量を測定した。

雄—精巣、精巣上体、精嚢及び凝固腺、前立腺、副腎　　雌—副腎

病理組織学的検査；P及びF₁A動物について、対照群及び400ppm群の卵巣、子宮、膈、精巣、精巣上体、精嚢、凝固腺、前立腺、下垂体、副腎及び肉眼的病変部について病理標本作製し、鏡検した。

催奇形性検査；P、F₁各世代について、出生児の観察を行った後、それぞれ第2回目の交配を行い、妊娠20日に開腹し、F₁B及びF₂B動物として催奇形性について検査した。

子宮内検査；黄体数、着床数、着床後死亡数（初期及び後期吸収死亡胚に分類）及び生存胎児数を測定した。なお、子宮重量測定は検査後実施した。

胎児；個体別体重及び性別を測定し、外表異常を観察した後、約半数の胎児について内臓異常の有無を検査し、残り半数の胎児について骨格異常の有無を検査した。

結果；結果の概要を表2及び3に示す。

繁殖性試験 親世代；一般状態では、検体投与による影響は認められなかった。

対照群のP及びF₁A世代の雌及び低用量群のP世代の雄の3匹が交配前に死亡した。これらの死亡は偶発的な所見であると考えられた。

体重増加量及び摂餌量において検体投与による影響は認められなかった。

交尾率、授胎率、受胎率、妊娠期間及び出産率において検体投与による影響は認められなかった。肉眼的病理検査、病理組織学的検査及び臓器重量において検体投与による影響は認められなかった。

繁殖性試験 児世代；全投与群のF₁A哺育児の哺育4日の生存率及びこれに引き続く離乳率は、対照群よりもわずかに低かったものの、全投与群のF₂A哺育児の哺育4日の生存率は、対照群とほぼ同じ或いはわずかに高値を示した。両世代とも、一腹当たりの平均哺育児数は全ての群で同程度であった。F₁A、F₂Aともに胎児体重のわずかな変化が認められたが、明らかな検体投与による影響とするには軽微すぎる変化であった。

肉眼的病理検査には、検体投与による影響は認められなかった。また、1世代予備試験（資料No. 補遺2）では、400及び6400ppm群においても哺育児の死亡率の増加はなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

(申請者注：哺育児の死亡率を確認するために実施した 1 世代繁殖毒性試験 (資料 No. 補遺 3) においても死亡率の増加は認められなかった。)

催奇形性試験；外表検査、内臓検査及び骨格検査において、異常、変異及び骨化変異に関して全ての群で有意な差はなく、正常動物における背景データの範囲内にあり、検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、本剤のラットを用いた混餌投与による 2 世代繁殖毒性試験において、いずれの世代においても毒性影響は認められず、受胎率と繁殖成績への影響は認められなかった。

従って、本試験における親及び児動物並びに繁殖能に対する無毒性量は 400ppm (P 雄：28.3、P 雌：35.3、F1 雄：32.9、F1 雌：40.5mg/kg/日) と判断した。

また、外表、内臓及び骨格検査においても異常、変異及び骨化変異に関して有意な差は無く、最高投与量の 400ppm (P 雌：35.3、F1 雌：40.5mg/kg/日) において児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断した。

表1 試験項目概要

世代	期間	作業手順	項目
P	生育(14週)	1群 雄30匹 雌30匹	一般状態、生死を毎日観察。 体重を週1回、摂餌量を週1回測定。
	交配(3週) (1回目)	雌雄1対1で交配。 交尾は膣栓及び膣垢中の精子で確認(妊娠0日)。	交配の観察。
	妊娠(3週) (1回目)		妊娠動物の体重測定。
	F ₁ A 出産		出産状況の観察。 出産児数、生存児数、外表異常及び同腹生存児体重測定。
	哺育(21日)		分娩1、4、7、14及び21日目に体重測定。なお、途中死亡児について異常の検査。
	離乳	継代用の各群雌雄 25匹を出来る限り各腹から1匹ずつ選抜。	親用動物に選抜されなかった児動物の剖検。(生後24日)
	交配(3週) (2回目)	交配は1回目に準ずる。	1回目に準ずる。
	妊娠(3週) (2回目)		1回目に準ずる。
催奇形性検査			
母動物 (P)	妊娠20日に帝王切開		子宮内状況の検査、子宮重量の測定。剖検ならびに病理組織検査
F ₁ B 胎児			催奇形性検査 個別別体重、性別、外表異常の検査、内臓及び骨格検査
F ₁ A	生育(14週)		
	交配(3週) (1回目)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	妊娠(3週) (1回目)		
	F ₂ A 出産		(P世代に準ずる)
	哺育(21日)		(P世代に準ずる)
	離乳		児動物 (F ₂ A) について肉眼的及び組織学的病理検査
	交配(3週) (2回目)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	妊娠(3週) (2回目)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
催奇形性検査			
母動物 (F ₁)	(P世代に準ずる)		(P世代に準ずる)
F ₂ B 胎児			(F ₁ B胎児に準ずる)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

表2 試験結果(繁殖性試験)

世代		親：P 児：F ₁ A、F ₁ B				親：F ₁ A 児：F ₂ A、F ₂ B						
投与量 (ppm)		0	25	100	400	0	25	100	400			
供試動物数		雄	30	30	30	30	25	25	25	25		
		雌	30	30	30	30	25	25	25	25		
検体摂取量 (mg/kg/日)		生育	雄	0	1.8	7.2	28.3	0	2.1	8.4	32.9	
			雌	0	2.2	8.6	35.3	0	2.5	10.3	40.5	
		妊娠	A	雌	0	1.9	7.4	28.3	0	2.0	8.3	32.3
			B	雌	0	1.8	7.1	28.7	0	1.8	7.7	30.0
		哺育	雌	0	3.7	17.0	68.3	0	4.4	18.9	71.7	
一般状態		検体投与に起因する所見なし										
死亡数 (率)		雄	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
		雌	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
体重 増加量 (g)		試験期間	雄	383	369	372	369	524	534	536	505	
		生育期間	雌	111	122	113	119	214	207	217	217	
		妊娠0-20日	雌A	151	151	160	154	152	143	158	146	
			雌B	154	152	158	157	119	121	136	134	
		哺育1-21日	雌	-11	7	0	-4	5	8	-2	16	
親動物 摂餌量 (g/日/rat)		生育 1-9週	雄	30.5	30.5	30.7	30.0	-	-	-	-	
				31.2	30.6	31.6	30.4	-	-	-	-	
				-	-	-	-	27.8	27.3	27.5	27.0	
				-	-	-	-	33.6	33.0	34.4	32.6	
		生育期間	雌	22.6	22.7	22.9	22.9	20.2	19.4	20.2	19.9	
		妊娠 0-20日	雌A	27.3	27.0	27.8	26.2	27.2	26.9	27.9	27.7	
			雌B	28.4	29.0	28.8	28.8	27.3	27.2	28.4	27.9	
哺育 0-21日	雌	59.2	59.1	59.2	59.2	62.6	56.7	62.5	59.4			
交尾率		雄	90	90	93	97	96	88	100	92		
		雌	100	93	100	100	100	100	100	100		
繁殖率		雄	80	77	93	97	92	76	84	92		
		雌	90	77	100	100	96	88	84	100		
受胎率				90	82	100	100	96	88	84	100	
妊娠期間				21.9	22.0	22.0	21.9	21.9	22.1	21.9	21.6	
出産率				100	100	100	100	100	95	100	100	
肉眼的病理検査		雌雄ともに検体投与に起因する所見なし										
臓器重量		雌雄ともに検体投与に起因する所見なし										
病理組織学的検査		雌雄ともに検体投与に起因する所見なし										

有意差検定済 (臓器重量については分散分析、他はLSD法)

-: 実施せず

A: 繁殖試験成績、B: 催奇形性試験成績

表2 試験結果(繁殖性試験) —続き—

世代		親 : P 児 : F ₁ A				親 : F ₁ A 児 : F ₂ A					
投与量 (ppm)		0	25	100	400	0	25	100	400		
児動物	0日生存児数	13.2	14.4	15.1	14.4	14.3	13.0	14.3	14.0		
	1日生存児数	13.0	13.3	14.4	14.0	14.0	12.2	14.0	13.7		
	4日生存児数	12.5	12.0	13.4	13.4	13.5	12.0	13.8	12.4		
	21日生存児数	12.3	11.8	12.5	12.5	13.1	11.7	13.4	11.9		
	出生率(%)	98	98	97	99	99	96	98	99		
	4日生存率(%)	95	80	79	80	88	91	97	89		
	21日生存率(%)	95	94	85	93	93	98	97	97		
	離乳率(%)	89	77	71	75	83	86	92	85		
	体重(g)	雄	1日	6.7	6.2	6.2	6.3	6.8	6.6	6.8	6.2
			4日	9.7	9.0	8.9	8.8	9.9	9.6	9.8	8.8
			21日	46.1	45.0	43.6	44.1	42.5	41.8	41.1	39.5
		雌	1日	6.2	5.8	5.9	6.0	6.3	6.2	6.4	5.8
			4日	9.1	8.4	8.5	8.5	9.2	9.1	9.3	8.2
			21日	43.5	42.6	41.4	42.7	40.4	40.4	39.2	37.3
肉眼的病理検査		雌雄ともに検体投与に起因する所見なし									

有意差検定済 (LSD 法)

A: 繁殖試験成績

表3 試験結果(催奇形性試験) —続き—

世代		親 : P		児 : F ₁ B		親 : F ₁ A		児 : F ₂ B			
投与量 (ppm)		0	25	100	400	0	25	100	400		
親動物	交配成績 B	交尾率(%)	雄	100	87	97	100	100	96	84	96
			雌	100	93	97	100	100	100	100	100
		繁殖(授胎)率	雄	97	87	93	100	96	88	84	92
			雌	97	90	93	100	96	88	84	96
	着床所見	黄体数		17.3	17.2	17.8	17.6	16.9	16.0	17.3	16.6
		着床数		16.8	16.0	17.2	17.3	16.7	15.3	16.9	16.1
		生存着床数		15.4	14.8	16.1	16.0	15.5	14.2	16.0	14.5
		死着床後	初期吸収胚数	1.3	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0	0.8	1.5
			後期吸収胚数	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.05	0.1	0.1
			総吸収胚数	1.4	1.2	1.1	1.3	1.2	1.1	0.9	1.6
	子宮重量		89.9	84.9	92.9	90.8	89.2	81.7	91.3	85.5	
	肉眼的病理検査		検体投与に起因する所見なし								
胎児	胎児体重		3.70	3.66	3.66	3.59	3.64	3.63	3.66	3.61	
	性比(雄/雌)		52.6	51.8	50.9	50.8	53.4	48.2	49.4	52.0	
	外表	検査胎児数		430	386	450	480	346	313	336	336
		検査腹数		28	26	28	30	23	22	21	24
		外表異常 ^{a)}		検体投与に起因する所見なし							
	内臓	検査胎児数		210	187	218	231	168	151	161	161
		検査腹数		28	26	28	30	23	22	21	24
		異常又は変異 ^{a)}		検体投与に起因する所見なし							
	骨格	検査胎児数		220	199	232	249	178	162	175	175
		検査腹数		28	26	28	30	23	22	21	24
異常又は変異 ^{a)}		検体投与に起因する所見なし									

有意差検定済 (LSD 法)

a) 個別症例・発生数は各世代に分け次表以下に記載

B : 催奇形性試験成績

表3 試験結果(催奇形性試験) -続き-

世代		親 : P				児 : F ₁ B				
用量 (ppm)		0	25	100	400	0	25	100	400	
出現数		胎児数				腹数				
胎児	検査胎児数	430	386	450	480	28	26	28	30	
	外表奇形	片側性小眼球	0	0	0	1	0	0	0	1
		横隔膜ヘルニア	0	1	0	0	0	1	0	0
		下大静脈の横隔膜前部での重複	0	1	0	0	0	1	0	0
		左前指(軟組織)の合指 橈骨、尺骨、頸骨、(いずれも両側)の短小及び肥厚、右腸骨の弯曲(軽度)	1	0	0	0	1	0	0	0
	内臓検査胎児数		210	187	218	231	28	26	28	30
	内臓変異	片側または両側性脳室拡張(軽度)	0	1	0	1	0	1	0	1
		心内膜内出血	1	0	0	0	1	0	0	0
		胸腔内出血	1	0	0	1	1	0	0	1
		肝出血	0	3	6	5	0	3	5	5
		腹腔内出血	1	2	1	2	1	1	1	2
		腎盂拡張	3	0	1	2	2	0	1	2
		尿管拡張(中程度)	7	0	2	1	6	0	2	1
		片側または両側性精巣偏位(中程度)	8	10	6	6	6	9	6	6
片側性または両側性精巣骨盤腔内への下降不全		2	0	1	2	2	0	1	2	
頸/胸背部及び背部脂肪出血	5	5	1	6	4	5	1	3		
頭部あるいは後肢出血	3	4	0	0	3	3	0	0		

有意差検定済(LSD法)

表3 試験結果(催奇形性試験) - 続き -

世代		親 : P				児 : F ₁ B			
用量 (ppm)		0	25	100	400	0	25	100	400
出現数		胎児数				腹数			
胎児	骨格検査胎児数	220	199	232	249	28	26	28	30
	縫合骨	1	4	2	1	1	4	2	1
	痕跡的第7頸肋(片側または両側)	3	1	3	1	2	1	1	1
	胸骨節の分離、奇形/扁平	1	0	1	0	1	0	1	0
	胸骨節癒合	0	0	1	1	0	0	1	1
	左第1肋骨欠損、右第1肋骨及び肋軟骨短小、左第2肋骨軽度短小、胸骨節の後方移動	0	0	0	1	0	0	0	1
	痕跡的左第1肋骨、肋軟骨分岐を伴った左第2肋骨の肥厚、左第1肋軟骨欠損及び左第1肋軟骨の短小	0	0	0	1	0	0	0	1
	第1肋骨短小、第1及び第2肋軟骨癒合、左第1肋軟骨欠損、胸骨の後方移動	0	0	0	1	0	0	0	1
	右第1肋骨短小、第1及び第2肋軟骨癒合、胸骨の後方移動	0	0	0	1	0	0	0	1
	胸骨節の非対称	2	5	4	6	2	5	4	6
	肋軟骨の胸骨への非対称結合	0	1	1	2	0	1	1	1
	肋軟骨癒合	0	0	1	0	0	0	1	0
	第1肋軟骨減形成及び胸骨への未結合	0	0	2	0	0	0	1	0
	肩甲骨及び上腕骨の彎曲及び軽度短小	0	0	0	4	0	0	0	1
	胸椎椎体分離	3	3	1	0	3	3	1	0
	第12胸椎椎体の半椎体	1	0	0	0	1	0	0	0
	肋骨起始部減形成	0	1	0	0	0	1	0	0
	複数の波状肋骨	0	5	4	12	0	2	4	4
	骨化不全肋骨	0	1	0	1	0	1	0	1
	骨盤骨非対称	0	0	2	0	0	0	2	0
	骨盤骨非対称(軽度)	2	2	4	1	2	1	4	1
	過剰腰椎(1)を伴った骨盤の後方移動	1	1	1	2	1	1	1	2
	骨盤の尾方移動(軽度)	1	3	0	1	1	3	0	1
	痕跡的第13肋骨(片側または両側)	1	0	1	0	1	0	1	0
	小型第13肋骨(片側または両側)	2	0	1	0	1	0	1	0
	完全第13肋骨(片側または両側)	186	168	201	196	28	25	28	30
痕跡的過剰第14肋骨(片側または両側)	30	29	28	53	13	14	12	19	
小型過剰第14肋骨(片側または両側)	1	2	0	0	1	1	0	0	
完全過剰第14肋骨(片側または両側)	0	0	1	0	0	0	1	0	
その他の過剰第14肋骨(片側または両側)	31	31	29	53	13	14	12	19	

有意差検定済(LSD法)

表3 試験結果(催奇形性試験) -続き-

世代		親 : F ₀				児 : F ₁ B				
用量 (ppm)		0	25	100	400	0	25	100	400	
出現数		胎児数				腹数				
胎児 骨化変異	骨格検査胎児数	220	199	232	249	28	26	28	30	
	4 頭蓋骨以上の骨化不全	4	11	7	15	4	6	5	8	
	3 頭蓋骨以下の骨化不全	42	23	21	31	20	11	11	14	
	胸骨節骨化不全	1	2	0	0	1	2	0	0	
	第2及び第4中手骨骨化不全(片側または両側)	1	2	1	3	1	2	1	3	
	恥骨骨化不全(片側または両側)	7	5	2	4	6	3	2	3	
	坐骨骨化不全(片側または両側)	2	2	0	1	2	2	0	1	
	頸椎及び仙椎椎弓骨化不全(片側または両側)	4	6	4	5	4	3	4	5	
	1 胸椎椎体骨化不全	0	1	0	0	0	1	0	0	
	右上腕骨骨化不全	0	0	1	0	0	0	1	0	
	全身的骨化遅延(指標の2-11の胎児は除く)	3	2	0	0	3	1	0	0	
	後頭骨または骨蓋骨骨化軽度遅延	0	0	1	1	0	0	1	1	
	胸椎椎体の骨化遅延あるいは軽度遅延	6	8	9	9	5	6	6	9	
	恥骨骨化遅延	1	2	8	2	1	2	5	2	
	第5中手骨未骨化	106	100	117	136	23	21	26	26	
	第5中足骨未骨化	0	0	1	0	0	0	1	0	
	尾椎椎体数の腹平均 (骨盤の尾方移動胎児は除く)	3.86	3.96	3.92	3.85	—	—	—	—	
	環椎前方椎弓骨化	76	73	78	66	20	22	24	20	
	歯状突起骨化	1	0	0	0	1	0	0	0	
	その他頸椎椎体骨化	90	82	118	102	22	23	27	28	
	その他指(趾)節骨骨化	24	15	20	15	10	6	11	9	
	胸骨節の骨化遅延	0	110	90	128	112	25	23	28	29
	1	53	63	63	73	23	24	24	28	
	2	46	35	31	50	19	17	15	26	
3	6	8	8	13	4	7	7	8		
>3	5	3	2	1	5	3	1	1		

有意差検定済 (LSD法)

表3 試験結果(催奇形性試験) - 続き -

世代		親 : F ₁ A				児 : F ₂ B				
用量 (ppm)		0	25	100	400	0	25	100	400	
出現数		胎児数				腹数				
胎児	検査胎児数	346	313	336	336	23	22	21	24	
	外表奇形	外脳	0	0	0	4	0	0	0	1
		両側性網膜ひだ形成	0	0	0	1	0	0	0	1
		軽度の鼻吻部短小、胸骨節分離、肋骨及び脊椎異常、軽度の肩甲骨短小及び彎曲、軽度短尾、心室中隔欠損、心房拡張、軽微な皮下浮腫	0	1	0	0	0	1	0	0
		腹腔臓器逆位、大動脈弓中断、大血管系転位、心室中隔欠損、心房拡張、心臓発作起始異常、右主静脈(不對)遺残部に静脈婁を伴った不完全下大動脈、肺分葉異常	0	0	1	0	0	0	1	0
		無尾	0	0	1	0	0	0	1	0
	内臓検査胎児数	168	151	161	161	23	22	21	24	
	内臓変異	軽微な皮下浮腫	0	0	0	1	0	0	0	1
		甲状腺分葉数減少	1	0	1	0	1	0	1	0
		肝出血	2	2	5	2	2	1	5	2
		腎盂拡張	1	0	0	1	1	0	0	1
		尿管拡張(中程度)	8	2	3	3	4	2	3	2
		片側または両側性精巣の偏位(中程度)	6	7	5	6	6	5	5	5
		片側または両側性精巣の骨盤腔内への下降不全	0	2	0	0	0	2	0	0
膀胱拡張		0	0	0	1	0	0	0	1	
頭部出血		4	0	2	0	4	0	2	0	
頸/胸背部中心及び背部脂肪出血		3	2	1	0	3	1	1	0	
尾あるいは前指出血	2	1	0	0	2	1	0	0		

有意差検定済 (LSD 法)

表3 試験結果(催奇形性試験) — 続き —

世代		親 : F ₁ A				児 : F ₂ B			
用量 (ppm)		0	25	100	400	0	25	100	400
出現数		胎児数				腹数			
胎児 骨格 変異	骨格検査胎児数	178	162	175	175	23	22	21	24
	縫合骨あるいは前頭骨との結合	1	5	1	2	1	5	1	2
	痕跡的頸肋 (第7頸椎)	0	0	3	3	0	0	3	3
	胸骨節非対称	2	4	3	1	2	4	3	1
	胸骨節扁平	0	0	1	0	0	0	1	0
	肋軟骨と胸骨との非対称的結合	1	0	3	1	1	0	2	1
	肋軟骨の癒合/部分的癒合	0	0	2	1	0	0	1	1
	複数の波状あるいは軽度波状肋骨	5	3	6	6	4	3	4	5
	胸椎椎体分離	1	1	0	6	1	1	0	4
	胸椎椎体の分離及び減形成、2胸椎の椎体非対称、第13両側肋骨の起始部減形成、腰椎及び仙椎の椎体または椎弓の減形成、あるいは不整列	1	0	0	0	1	0	0	0
	骨盤骨非対称	0	0	0	1	0	0	0	1
	骨盤非対称 (軽度)	0	2	1	0	0	2	1	0
	過剰腰椎 (1) を伴った骨盤の尾方移動	1	1	2	3	1	1	2	2
	骨盤の尾方移動 (軽度)	0	1	0	6	0	1	0	3
	完全13肋骨	154	139	143	133	23	21	21	23
	痕跡的過剰第14肋骨 (片側または両側)	24	21	32	36	13	9	12	15
小型過剰第14肋骨 (片側または両側)	0	2	0	3	0	2	0	2	
完全過剰第14肋骨 (片側または両側)	0	0	0	3	0	0	0	2	
その他の過剰第14肋骨 (片側または両側)	24	23	32	42	13	9	12	16	

有意差検定済 (LSD法)

表3 試験結果(催奇形性試験) —続き—

世代		親 : F ₁ A				児 : F ₂ B				
用量 (ppm)		0	25	100	400	0	25	100	400	
出現数		胎児数				腹数				
胎児	骨化変異	骨格検査胎児数	178	162	175	175	23	22	21	24
		4 頭蓋骨以上の骨化不全	3	3	7	12	3	3	4	6
		3 頭蓋骨以下の骨化不全	24	27	16	28	11	10	11	13
		胸骨核骨化不全	2	2	3	0	1	2	2	0
		第2及び第4中手骨骨化不全(片側または両側)	3	3	0	3	2	3	0	2
		恥骨骨化不全(片側または両側)	2	2	4	3	2	2	4	2
		坐骨骨化不全(片側または両側)	0	0	0	2	0	0	0	2
		頸椎及び仙椎及び腰椎椎弓の骨化不全)	4	8	4	7	3	4	2	3
		骨格検査胎児数*	168	147	167	166	21	20	20	22
		全身的骨化遅延/軽度骨化遅延 (下記の頭頂間骨骨化遅延から指(趾)節骨骨化の 指標を有する胎児は除く)	0	1	0	5	0	1	0	1
		頭頂間骨骨化遅延(軽度)	0	1	0	0	0	1	0	0
		胸椎椎体の骨化遅延あるいは軽度遅延	5	8	4	12	3	6	3	8
		恥骨骨化遅延	2	2	6	1	2	2	5	1
		第5中手骨未骨化	64	60	69	74	17	16	18	20
		第5中足骨未骨化	0	0	1	0	0	0	1	0
		尾椎椎体数の腹平均 (骨盤の尾方移動胎児は除く)	3.85	3.96	3.92	4.10	—	—	—	—
		環椎前方椎弓骨化	62	46	55	52	16	16	15	14
		その他頸椎椎体骨化	69	72	91	86	21	19	19	19
		指(趾)節骨骨化	23	13	10	18	11	7	7	7
		胸骨節の骨化遅延	0	80	58	67	71	18	16	19
	1	41	45	54	57	16	18	18	20	
	2	38	34	30	21	14	13	13	12	
	3	6	9	12	12	4	6	7	7	
	>3	3	1	4	5	3	1	3	1	

有意差検定済 (LSD法)

- : 実施せず

* : 妊娠期間の異なった妊娠動物の胎児は除いた。

③ ラットを用いた催奇形性試験

(資料No. 35)

試験機関：

(GLP 対応)

報告書作成年：1987年

検体純度 : %

供試動物 : SD系 (Cr1:CD) ラット、8-12週齢、体重；180-235g、1群 雌 24-28匹

投与期間 : 妊娠10日間 (1986年9月25日-12月3日)

投与方法 : 検体を1%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、それぞれ毎日の体重を基準に、0、50、200及び800mg/kg/日の投与量で、妊娠6日-15日の10日間、毎日1回強制経口投与した。精子もしくは膣栓を確認した日を妊娠0日とした。

投与量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物 ; 死亡及び症状は1日2回観察した。体重は妊娠0、6-15及び20日に、摂餌量は妊娠0-6、6-10、10-15及び15-20日に測定した。妊娠20日にと殺し、肉眼的観察を行った後、黄体数、着床数、着床位置、吸収胚及び胎児数を測定した。また、以下の指標を求めた。

$$\text{着床前死亡胚率} = \{(\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数}\} \times 100$$

$$\text{着床後死亡胚率} = \{(\text{着床数} - \text{生存胎児数}) / \text{着床数}\} \times 100$$

胎児 ; 生存及び死亡胎児数を確認し、体重、性別及び外表異常を検査した。各腹の約半数の胎児については骨格標本作製し変化の有無を検査し、残りの胎児については内臓変化の有無を検査した。形態変化については、奇形、内臓あるいは骨格異常、骨格変異に分類した[結果の概要には奇形、変異及び骨化変異に再分類して示した]。

結果 : 概要を表1に示す。

母動物 ; いずれの群でも死亡は認められなかった。800mg/kg/日群で投与期間中に体重増加量の低下、投与早期に摂餌量のわずかな低下が認められ、検体影響と考えられた。検体投与に起因する症状は認められなかった。剖検及び子宮内状況検査ではいずれの群においても検体投与に起因する所見は認められなかった。

胎児 ; 胎児体重の著しい低下が800mg/kg/日群で、わずかな低下が200mg/kg/日群で認められた。性比に検体投与の影響は認められなかった。

胎児の奇形・変異については、対照群、50及び200mg/kg/日群で腎盂拡張、無顎症、肺葉の形成不全及び脊椎側弯症等がわずかに認められた。しかし、800mg/kg/日群では認められなかったため、これら変化は投与による影響ではなく、自然発生によるものと考えられた。また対照群と比較して800mg/kg/日群、わずかに200mg/kg/日群で骨化遅延が観察されたが、胎児低体重による二次的な影響と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

以上の結果より、本剤のラットを用いた器官形成期強制経口投与による催奇形性試験において、800mg/kg/日群で母動物に対して体重増加量の低下及び摂餌量のわずかな低下が認められ、胎児に対して体重の低下とそれに伴う二次的な影響として骨化遅延が出現した。200mg/kg/日群で母動物に対する毒性は認められず、胎児に対して体重のわずかな低下とその二次的な影響として頭蓋骨等のわずかな骨化遅延の胎児毒性が出現した。50mg/kg/日群で母動物、胎児ともに毒性は認められなかった。また、いずれの投与量においても催奇形性はなかった。従って、本試験における無毒性量は、母動物は200mg/kg/日、胎児は50mg/kg/日と判断し、最高投与量の800mg/kg/日でも児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断した。

表1 試験結果

投与量 (mg/kg/日)		0	50	200	800
1群当たりの動物数		28	27	28	24
死亡動物数		0	0	0	0
非妊娠動物数		6	7	8	3
妊娠動物数		22	20	20	21
妊娠率 (%)		78.6	74.1	71.4	87.5
100%子宮内死亡数		0	1	0	1
一般状態		特記すべき症状なし			
体重増加量 (g)	(6-10日)	21	22[101]	21[100]	13[58] ↓
	(10-15日)	29	29[101]	25[87]	22[76] ↓
	(6-15日)	50	51[102]	46[92]	34[68] ↓
摂餌量 (g/ラット/日)	(0-6日)	21	22[103]	23[109] ↑	23[111] ↑
	(6-10日)	23	25[106]	24[105]	20[88] ↓
	(10-15日)	27	27[103]	27[102]	26[98]
	(15-20日)	27	29[105]	29[105]	29[107]
剖検所見		検体投与に起因する所見なし			
着床所見	検査母動物数	22	19	20	20
	黄体数	15.9	14.9	15.2	15.2
	着床数	12.3	12.8	11.4	12.9
	早期吸収胚数	0.6	0.6	0.7	0.5
	後期吸収胚数	0.0	0.0	0.0	0.1
	総吸収胚数	0.6	0.6	0.7	0.6
	生存胎児数	11.7	12.2	10.8	12.3
	着床前死亡胚率 (%)	21.4	13.7	24.1	14.8
着床後死亡胚率 (%)	5.2	5.5	6.0	5.2	

Newman-Keuls 検定、Kruskal-Wallis 検定 ↑ ↓ : p < 0.05

[]内の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

表1 試験結果 ー 続き ー

投与量 (mg/kg/日)		0	50	200	800	
検査母動物数		22	19	20	20	
平均生存胎児体重 (g)	雄	3.58	3.60 (101)	3.49 (97)	2.86 (80) ↓	
	雌	3.43	3.46 (101)	3.33 (97)	2.72 (79) ↓	
	雌雄	3.50	3.52 (101)	3.40 (99)	2.79 (80) ↓	
生存胎児の雄性比 (%)		46.7	46.3	49.3	43.7	
検査胎児数 (腹)		257 (22)	231 (19)	215 (20)	245 (20)	
奇形	奇形胎児数 (腹)	3 (3)	3 (3)	1 (1)	0 (0)	
	無顎症及び無口	0	0	1	0	
	出血肝	0	1	0	0	
	大脳半球形成不全	1	0	0	0	
	両側肺葉形成不全	0	1	0	0	
	片側肺葉形成不全	1	0	0	0	
	大脳脳室拡張	0	1	0	0	
	肋骨癒合及び裂溝	1	0	0	0	
	脊椎側弯症	1	0	0	0	
内臓検査胎児数 (腹)		134 (22)	116 (19)	111 (20)	126 (20)	
変内臓	内臓変異胎児数 (腹)	0 (0)	4* (2)	1 (1)	0 (0)	
	腎盂拡張	0	4*	1	0	
骨格検査胎児数 (腹)		123 (22)	115 (19)	104 (20)	119 (20)	
骨格変異	椎体分離	1	1	4	7	
	胸骨癒合	1	0	0	0	
	波状肋骨	3 [2.9]	9 [8.5]	13** [16.7]	15** [15.4]	
	第14肋骨	0	1	3	3	
胎児 骨化変異	遅延	前頭骨骨化遅延	3 [2.5]	5 [4.3]	3 [2.3]	20** [15.7#]
		頭頂骨骨化遅延	14 [13.2]	24 [25.4]	26** [28.0]	87** [75.7#]
		頭頂間骨骨化遅延	33 [30.0]	44 [41.3]	60** [53.4]	114** [96.2##]
		後頭骨骨化遅延	29 [25.5]	51** [47.0]	59** [59.2##]	115** [97.0##]
		側頭骨骨化遅延	4 [4.2]	5 [4.0]	7 [5.8]	36** [34.3##]
		肋骨骨化遅延	9	9	8	16
		脊椎骨化遅延	31 [26.8]	25 [19.2]	20 [22.2]	51** [45.1]
		鼻骨骨化遅延	3 [2.1]	5 [4.1]	4 [3.0]	35** [29.7##]
		胸骨骨化遅延	40	44	34	27
		腰帯骨化遅延	2 [1.4]	9* [7.6]	10* [8.5#]	12** [13.2]
		中手骨(1-5、1-4)骨化遅延	65 [52.6]	73 [60.2]	73** [64.3]	100** [85.5#]
		中手骨(2-5、2-4)骨化遅延	1 [0.6]	0 [0.0]	2 [1.5]	10** [7.8#]
		第13肋骨短縮	0	0	1	0
		肋骨短縮	1	0	1	1
		胸骨骨化不全	60 [48.1]	64 [55.5]	62 [61.9]	118** [99.2##]
		腰部骨化不全	1 [0.8]	3 [2.6]	2 [1.4]	10** [12.0##]

Newman-Keuls 検定、Kruskal-Wallis 検定 ↑ ↓: p<0.05

胎児体重の () 内の数値は対照群に対する変動率 (%) を表す。

胎児の奇形、変異 Fisher test *: p<0.05, **: p<0.01、Dunnnett 検定 † ‡: p<0.01、

Steel 検定 #: p<0.05, ##: p<0.01 (申請者算出)

[] 内は腹当りの数値を示す。(申請者算出)

④ ウサギを用いた催奇形性試験

(資料No. 36)

試験機関：

(GLP対応)

報告書作成年：1987年

検体純度：%

供試動物：ニュージーランド白色ウサギ、入荷時4ヶ月齢、体重：3.20-4.55kg、1群雌16匹

投与期間：妊娠13日間(1986年8月12日-9月12日)

投与方法：検体を1%メチルセルロース水溶液に懸濁し、直近の体重を基準に、0、10、30及び100mg/kg/日の投与量で、妊娠7日-19日の13日間、毎日1回強制経口投与した。交配成立の証拠が得られた日を妊娠0日とした。

投与量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物：症状は毎日観察した。体重は妊娠0、3、7-19、22、25及び28日に、摂餌量は妊娠0-3、3-5、5-7、7-9、9-11、11-13、13-15、15-17、17-19、19-22、22-25及び25-28日に測定した。妊娠28日にと殺し、肉眼的観察を行った後、妊娠状況、黄体数、着床数、着床位置、吸収胚及び胎児数を測定した。また、以下の指標を求めた。

$$\text{着床前死亡胚率} = \{(\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数}\} \times 100$$

$$\text{着床後死亡胚率} = \{(\text{着床数} - \text{生存胎児数}) / \text{着床数}\} \times 100$$

胎児：生存及び死亡胎児数を確認し、体重、性別及び外表異常を検査した。内臓検査は全ての胎児について行った。次いで全ての胎児について骨格標本作製し変化の有無を検査した。形態変化については、奇形、軽度の内臓あるいは骨格異常、骨格変異に分類した結果の概要には奇形、変異及び骨化変異に再分類して示した。

結果：概要を表1に示す。

母動物：検体投与に関連した死亡及び症状は認められなかった。100 mg/kg/日群で投与期間の妊娠11-15日で体重増加量の低下が認められ、摂餌量では有意な低下が認められた。10及び30mg/kg/日群で検体投与の影響は認められなかった。また母動物の肉眼病理的变化についてはいずれの投与群でも検体投与の影響は認められなかった。

胎児：投与群の胎児重量が対照群よりわずかに低かったが、有意差は認められず、またこれ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

は1腹当たりの匹数が多いことに起因していると推察され、検体影響ではないと考えられた。100 mg/kg/日群で雄胎児の比率が高かったが、群間で有意差はなく偶然の所見と考えられた。骨格検査において投与群でわずかな骨化遅延が認められたが、これは胎児体重が軽微な低下に関連するのと考えられた。またいずれの投与量においても催奇形性は認められなかった。

以上の結果より、本剤のウサギを用いた器官形成期強制経口投与による催奇形性試験において、母動物では100mg/kg/日の用量で体重増加抑制が認められた。子宮内生存率、胚・胎児成長及び発達に関して投与による影響は認められなかった。従って、本試験における無毒性量は、母動物は30 mg/kg/日であり、児動物は100 mg/kg/日と判断し、最高投与量の100mg/kg/日でも児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断した。

表1 試験結果

投与量 (mg/kg/日)		0	10	30	100	
1群当たりの動物数		16	16	16	16	
親動物	死亡動物数	0	0	0	0	
	非妊娠動物数	0	1	1	1	
	妊娠動物数	16	15	15	15	
	妊娠率 (%)	100.0	93.7	93.7	93.7	
	流産が疑われた動物数	0	1	1	1	
	早産動物数	0	0	0	0	
	妊娠28日生存胎児腹数	16	14	14	14	
	一般状態	特記すべき症状なし				
	体重増加量 (kg)	(0-7日)	0.15	0.14[93]	0.15[100]	0.14[93]
		(7-11日)	0.05	0.07[140]	0.08[160]	0.07[140]
		(11-15日)	0.10	0.07[70]	0.13[130]	0.00[0]
		(15-19日)	0.04	0.10[250]	0.05[125]	0.11[275]
		(19-22日)	0.03	0.03[100]	0.02[67]	0.06[200]
		(22-28日)	0.13	0.20[154]	0.18[138]	0.16[123]
摂餌量 (g/ウサギ/日)	(0-7日)	161	168[104]	173[107]	167[104]	
	(7-11日)	163	166[102]	176[108]	172[106]	
	(11-15日)	153	157[103]	165[108]	122[80] ↓	
	(15-19日)	162	180[111]	179[110]	142[88]	
	(19-22日)	165	167[101]	170[103]	171[104]	
	(22-28日)	153	160[105]	156[102]	167[109]	
剖検所見		検体投与に起因する所見なし				
親動物 着床所見	検査親動物数	16	14	14	14	
	黄体数	10.8	12.7	11.7	11.6	
	着床数	7.4	9.6 ↑	9.5 ↑	9.1 ↑	
	早期吸収胚数	1.3	0.8	0.6	1.1	
	後期吸収胚数	0.8	0.3	0.9	1.1	
	総吸収胚数	2.1	1.1	1.5	2.2	
	生存胎児数	5.3	8.5 ♂	8.0 ♂	6.9	
	着床前死亡胚率 (%)	34.0	23.5	18.9	21.2	
	着床後死亡胚率 (%)	30.8	11.5	16.4	23.5	

Student t 検定、 χ^2 検定、Kruskal-Wallis 検定 ↑ ↓ : p<0.05、♂ ♀ : p<0.01

[]内の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

表1 試験結果 —続き—

投与量 (mg/kg/日)		0	10	30	100
検査親動物数		16	14	14	14
平均生存胎児体重 (g)	雄	40.7	40.0[98]	38.5[95]	38.9[96]
	雌	40.5	39.6[98]	39.1[97]	37.5[93]
性比(雄:雌)		1.0:1	1.0:1	1.1:1	1.4:1
検査胎児数 (腹)		84 (16)	119(14)	112(14)	96(14)
胎児 奇形	奇形胎児数 (腹)	3 (3)	6 (4)	1 (1)	2 (2)
	肺動脈弁閉鎖	1	1	0	0
	大動脈弓異常	0	0	1	0
	鼻口部及び頭蓋骨異常	1	0	0	0
	重複脾臓	1	0	0	0
	脊柱側弯症	0	3	0	2
	肋骨欠損	0	3	0	0
	肋骨融合	0	1	0	0
	胸骨融合	0	2	0	0
外表及び内臓検査胎児数 (腹)		84 (16)	119(14)	112(14)	96(14)
胎児 外表及び内臓変異	背腰部皮下膿胞	0	1	0	0
	脳室拡張	1	0	0	0
	左総頸動脈異常	4	3	3	1
	無気肺	0	1	0	0
	左肺下葉壊死	0	1	0	0
	肺後背部分葉遺残	0	0	1	0
	脾臓萎縮	0	0	0	1
	胆嚢拡張	3	1	2	2
	胆嚢萎縮	1	0	2	0
	左尿管拡張	0	0	1	0
右卵巢膿胞	0	0	1	0	

Kruskal-Wallis 検定 ↑ ↓ : p < 0.05

表1 試験結果 — 続き —

投与量 (mg/kg/日)		0	10	30	100		
検査親動物数		16	14	14	14		
胎児	骨格検査胎児数 (腹)	84 (16)	119(14)	112(14)	96(14)		
	胸椎数 (14ヶ)	0	1	0	0		
	腰椎数 (8ヶ)	8	7	7	3		
	頸椎/胸椎非対称	1	1	0	1		
	胸椎椎体変形	0	1	0	0		
	肋骨融合	0	0	0	2		
	胸骨融合	1	1	0	2		
	胸骨変形/異常配置	0	4	0	1		
	胸骨歪鈴型/分離	1	10	3	3		
	胸椎数 (13ヶ)	27	43	32	31		
	腰椎数 (6ヶ)	13	19	10	13		
	尾椎椎弓数変異 (6ヶ以下)	25	28	40 ↑	20		
	尾椎椎体数変異 (16ヶ以上)	26	58	37	39		
	片/両側第 13 肋骨痕跡	15	23	15	20		
	第 13 肋骨及び痕跡	13	9	6	5		
	片/両側第 13 肋骨	14	34	25	26		
	骨化変異	遅延	第 2 胸骨化骨遅延	0	1	0	0
			第 4 胸骨化骨遅延	0	1	0	0
			第 5 胸骨化骨不全	11	22	25	18
			第 6 胸骨化骨遅延	1	3	5	6
第 6 胸骨化骨不全			2	5	5	5	
第 5 胸骨化骨遅延			22	20	24	23	
前肢骨化骨不全			13	10	21	19	
前肢上腕骨近位骨化骨不全			20	31	31	30	
前肢上腕骨遠位骨化骨不全			0	2	0	0	
後肢骨化骨不全			38	39	48	48	
後肢上腕骨近位骨化骨不全			31	50	43	31	
後肢上腕骨遠位骨化骨不全			0	4	1	0	

Kruskal-Wallis 検定 ↑ ↓ : p < 0.05

(9) 変異原性

① 細菌を用いた復帰突然変異性試験

(資料No. 37)

試験機関：

(GLP対応)

報告書作成年：1988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 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて復帰変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、TA 100 株のみを用いた用量設定試験及び6菌株を用いた本試験を2回(試験1, 2)さらにTA1537及びTA1538株については試験1において雑菌の混入が認められたため、再試験を実施した。いずれの試験もプレインキュベーション法を用いた。用量設定試験においては33-10000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の6濃度について各濃度毎にプレート1枚を用い、その他の試験においては10-3333 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の6濃度について各濃度につきプレート3枚を用い実施した。結果については、TA 100 株の場合は復帰変異コロニー数が溶媒対照に比べ1.5倍以上、その他の菌株については2倍以上増加し、かつ再現性あるいは用量依存性が認められた場合を陽性と判定した。但し、溶媒対照値が10未満の場合は溶媒対照値を10として評価した。

陽性対照としてメチルメタンサルホネート(MMS)、N-エチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン((ENNG)、2-ニトロフルオレン(2NF)、9-アミノアクリジン(9AA)及び2-アミノアントラセン(2AA)を用いた。

用量設定根拠；用量設定試験では、33-10000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の6濃度を設定した。その結果、高濃度処理群において復帰変異コロニー数の減少が認められたが、微小コロニーのバックグラウンドの薄化は認められなかったため、実験1, 2及び再試験では最高濃度を3333 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、以下、1000、333、100、33及び10 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の計6濃度を設定した。

結果：結果を表1, 2及び3に示す。

すべての試験において、検体ではS-9Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照では全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断した。

表 1 : 試験 1

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 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型	
			TA 100	TA 1535	WP2uvrA	TA 98	
対 照 (DSMO)	100 μl	—	67 \pm 3	8 \pm 1	49 \pm 13	12 \pm 2	
検 体	10	—	71 \pm 12	7 \pm 5	34 \pm 6	12 \pm 5	
	33	—	63 \pm 4	6 \pm 3	32 \pm 5	15 \pm 4	
	100	—	57 \pm 5	5 \pm 2	29 \pm 2	14 \pm 4	
	333	—	40 \pm 6	5 \pm 1	25 \pm 6	8 \pm 2	
	1000	—	14 \pm 3	6 \pm 2	25 \pm 4	4 \pm 1	
	3333	—	3 \pm 1	2 \pm 1	19 \pm 2	1 \pm 1	
対 照 (DSMO)	100 μl	+	144 \pm 11	7 \pm 2	107 \pm 7	22 \pm 8	
検 体	10	+	84 \pm 12	10 \pm 3	115 \pm 3	20 \pm 1	
	33	+	94 \pm 4	6 \pm 2	85 \pm 4	18 \pm 3	
	100	+	88 \pm 4	10 \pm 1	89 \pm 1	14 \pm 1	
	333	+	72 \pm 6	6 \pm 1	86 \pm 11	9 \pm 1	
	1000	+	23 \pm 3	3 \pm 2	78 \pm 13	1 \pm 2	
	3333	+	5 \pm 5	2 \pm 2	76 \pm 6	1 \pm 1	
陽 性 対 照	MMS	100	—	149 \pm 15	757 \pm 91	919 \pm 82	125 \pm 41
	ENNG	10	—				
	ENNG	5	—				
	2-NF	1	—				
	2-AAN	0.5	+	271 \pm 62	77 \pm 5	1012 \pm 8	621 \pm 80
		1	+				
	40	+					

表中の値は 3 枚のプレートの平均値

注) MMS ; メチルメタンサルホネート

ENNG ; N-エチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

2-NF ; 2-ニトロフルオレン

2-AAN ; 2-アミノアントラセン

空 欄 ; 検査せず

表 2 : 試験 2

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 置 換 型			フレームシフト型			
			TA 100	TA 1535	WP2uvrA	TA 98	TA 1537	TA 1538	
対 照 (DSMO)	100 μl	-	87 \pm 3	4 \pm 0	36 \pm 5	14 \pm 3	3 \pm 1	10 \pm 0	
検 体	10	-	72 \pm 2	3 \pm 1	31 \pm 6	14 \pm 3	6 \pm 4	11 \pm 2	
	33	-	71 \pm 4	6 \pm 1	27 \pm 2	10 \pm 2	7 \pm 3	10 \pm 2	
	100	-	76 \pm 11	6 \pm 1	30 \pm 1	8 \pm 3	5 \pm 2	6 \pm 0	
	333	-	46 \pm 8	6 \pm 2	25 \pm 5	7 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 2	
	1000	-	19 \pm 12	3 \pm 1	24 \pm 2	2 \pm 1	0 \pm 1	1 \pm 2	
	3333	-	0 \pm 0	0 \pm 1	25 \pm 4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	
対 照 (DSMO)	100 μl	+	93 \pm 4	5 \pm 1	38 \pm 7	14 \pm 3	7 \pm 4	13 \pm 4	
検 体	10	+	76 \pm 5	9 \pm 2	39 \pm 10	21 \pm 4	7 \pm 3	15 \pm 1	
	33	+	78 \pm 8	5 \pm 2	32 \pm 2	13 \pm 3	4 \pm 2	13 \pm 3	
	100	+	64 \pm 9	7 \pm 2	29 \pm 3	15 \pm 3	3 \pm 1	7 \pm 2	
	333	+	29 \pm 6	7 \pm 2	32 \pm 2	7 \pm 1	1 \pm 0	4 \pm 1	
	1000	+	8 \pm 2	3 \pm 2	28 \pm 3	2 \pm 1	0 \pm 1	1 \pm 1	
	3333	+	0 \pm 1	2 \pm 1	30 \pm 10	0 \pm 0	1 \pm 1	1 \pm 1	
陽 性 対 照	MMS	100	-	315 \pm 13					
	ENNG	10	-		1002 \pm 32				
	ENNG	5	-			1337 \pm 19			
	2-NF	1	-				160 \pm 8		
	9-AA	20	-					156 \pm 9	
	2-NF	1	-						184 \pm 1
		0.5	+	255 \pm 14			235 \pm 6		231 \pm 1
2-AAN	1	+		65 \pm 4			53 \pm 3		
	40	+			1523 \pm 71				

表中の値は3枚のプレートの平均値

注) MMS ; メチルメタンサルホネート

ENNG ; N-エチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9-AA ; 9-アミノアクリジン

2-NF ; 2-ニトロフルオレン

空 欄 ; 検査せず

表 3 : 再試験

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	
			フレームシフト型	
			TA 1537	TA 1538
対 照 (DSMO)	100 μl	-	4 \pm 1	10 \pm 1
検 体	10	-	7 \pm 2	11 \pm 3
	33	-	5 \pm 3	11 \pm 5
	100	-	4 \pm 2	10 \pm 2
	333	-	3 \pm 1	3 \pm 2
	1000	-	1 \pm 1	0 \pm 1
	3333	-	0 \pm 0	0 \pm 0
対 照 (DSMO)	100 μl	+	7 \pm 3	12 \pm 2
検 体	10	+	5 \pm 2	13 \pm 5
	33	+	8 \pm 4	12 \pm 4
	100	+	3 \pm 2	5 \pm 2
	333	+	1 \pm 1	1 \pm 1
	1000	+	0 \pm 1	1 \pm 2
	3333	+	0 \pm 0	0 \pm 0
陽性 対照	9-AA	20	-	122 \pm 3
	2-NF	1	-	181 \pm 10
	2-AAN	1 0.5	+ +	54 \pm 8 225 \pm 3

表中の値は3枚のプレートの平均値

注) 9-AA ; 9-アミノアクリジン
 2-NF ; 2-ニトロフルオレン
 2-AAN ; 2-アミノアントラセン
 空 欄 ; 検査せず

② DNA修復試験 (Rec-Assay)

(資料No. 38)

試験機関 :

(GLP対応)

報告書作成年 : 1988 年

検体純度 : %

試験方法 : 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) H17arg⁻及び M45arg⁻を用いて DNA 修復試験を行った。検体を溶解させるため DMSO を用いた。用量設定試験として 0.5-4938 μ g の処理量で予備ストリーク試験を行った後、本試験として 1786、3571、7143、14286 及び 28571 μ g/ml の処理濃度 (1.25、2.5、5、10、20 mg/プレート) により各濃度 3 枚のプレートを用い、液体懸濁試験を行なった。

生存指数を M45 株の生存菌率(%) / H17 株の生存菌率(%) として算出し、この生存指数が 0.50 よりも小さくなった場合、DNA 組換え欠損株を特異的に抑制したと判定した。

用量設定根拠 ; *Bacillus subtilis* の 2 菌株を用いて 0.5-4938 μ g の処理量 (濾紙への添加量) で予備ストリーク試験を行った結果、いずれの菌株にも毒性は認められなかった。このため、予備試験における最高処理量を本試験における最高処理濃度 (培地での最終処理濃度) とし、以下、公比 2 にて 4 濃度、計 5 濃度を設定した。

結果 : 結果を表 1 に示す。いずれの濃度においても生存指数は 1 以下にはならず、検体が M45 株を特異的に殺してはいないことが示された。一方、陰性対照では 2 菌株にほぼ同程度の殺菌作用が、陽性対照では M45 株に有意な殺菌作用が認められた。

以上の結果から、本剤は外因性の代謝活性化系の非存在下において DNA 損傷性を示さないと判断した。

表 1

薬物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	M45 arg ⁻		H17 arg ⁻		生存指数
		平均数*	生存菌率 **(%)	平均数*	生存菌率 **(%)	
溶媒対照						
水	100 μl 添加	48	100	273	100	1.00
DMSO	100 μl 添加	23	100	144	100	1.00
検体	1786	67	291	180	125	2.33
	3571	59	257	251	174	1.48
	7143	44	191	153	106	1.80
	14286	25	109	141	98	1.11
	28571 ^a	6	26	5	3	8.67
陰性対照						
ゲンタマイシン	0.5	22	46	70	26	1.77
クロラムフェニコール	60.0	1	2	5	2	1.00
陽性対照						
4-ニトロキノリン -N-オキシド	0.5	5	22	184	128	0.17
エチルメタンスル ホネート	6000	0	0	166	115	0

注)
$$\text{生存指数} = \frac{\text{M45 生存菌率}(\%)}{\text{H17 生存菌率}(\%)}$$

a ; 沈殿

* ; 3 枚のプレート の平均値

** ; 検体と陽性対照は DMSO と、陰性対照は水と比較して算出した。

③ チャイニーズハムスターの卵巣細胞における染色体異常試験

(資料No. 41)

試験機関 :

(GLP対応)

報告書作成年 : 1988 年

検体純度 : %

試験方法 : チャイニーズハムスターの卵巣由来細胞を用い、代謝活性化系(S-9Mix)の存在下及び非存在下において、*in vitro*における染色体異常誘発性を調べた。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて溶解した。S-9Mixの存在下では31.3、62.5、125、250及び500 μ g/mlの濃度で検体を6時間処理した後、新鮮な培地に交換してさらに18時間培養を続け、標本作製した。S-9Mixの非存在下では31.3、62.5、125、250及び500 μ g/mlの濃度で22時間、62.5、125、250及び500 μ g/mlの濃度で46時間処理後、標本作製した。各細胞培養あたり100個の細胞を観察し、構造及び数的異常について調べた。すべての分裂像を染色分体及び染色体両方について明確なギャップ、切断、動原体を持たない断片、交換及び異常を調べた。

結果については、下記の表に示すバックグラウンドデータの統計学的評価に基づき、検体処理群の異常頻度がバックグラウンド溶媒対照データの平均値の95%信頼性限界以内の場合は陰性、99%信頼性限界以上でかつ用量相関性及び再現性のある増加が認められた場合は陽性と判定することとした。溶媒対照及び無処理対照の値が信頼性限界95%と99%の間になった場合は検体処理群の異常頻度がその2倍以上であれば陽性と判定することとした。数的異常については10%(異数性、核内倍加、倍数性)を超えない場合、陰性とする事とした。数的異常の増加については、さらに再現性、濃度依存性も考慮した。

異常の項目		p=0.05	p=0.01
異常の頻度	: 細胞当りの損傷	0.00-0.12	0.00-0.14
異常細胞の割合(%)	: ギャップを含む	0-9	0-11
異常細胞の割合(%)	: ギャップを除く	0-4	0-5

陽性対照としてS-9Mix存在下ではシクロフォスファミド及び2-アセチルアミノフルオレンを、非存在下ではメチルメタンサルホネートを用いた。

用量設定根拠 ; 用量設定試験ではS-9Mixの存在下及び非存在下において、DMSOへの溶解限界を考慮し、0.3、0.8、2.5、8.3、25、83、250、833及び2500 μ g/mlの濃度で行った。S-9Mixの存在下では250 μ g/mlで軽度の毒性が観察され、833 μ g/ml以上において明らかな有糸分裂指数の減少が認められたこと、S-9Mixの非存在下、22時間及び46時間処理では各々250及び83 μ g/ml以上において明らかな有糸分裂指数の減少が認められたことから、最高濃度を500 μ g/mlとする本試験濃度を設定した。

結果 : 結果を表1及び2に示す。

投与群において、構造的または数的染色体異常誘発性を示す何らの証拠もなかった。溶媒及び無処理対照群においては陰性反応の範囲内であった。一方、陽性対照群では陽性の染色体構造異常頻度を誘起した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず染色体異常誘発性を有しないものと判断した。

表 1

薬 物	処理 時間	S9Mix の有無	観 察 細胞数	異 常 の 種 類 ^{a)}											細 胞 異常率 (%)	判 定	
				染 色 分 体			染 色 体			複 合			多 数	そ の 他			
				G	B	F	G	B	F	E	D	R					
溶 媒 対 照 1%DMSO	6	+	100	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	—	5	—
	6	+	100	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	5	—
無 処 理 対 照	6	+	100	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	6	—
	6	+	100	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	10	—
陽 性 対 照 シクロホス ファミド 20 μg/ml	6	+	100	14	6	2	3	1	3	0	0	0	0	—	21	+	
	6	+	100	21	3	1	0	2	0	0	0	0	0	—	22	+	
陽 性 対 照 2-アセチル アミノフル オレン 80 μg/ml	6	+	100	19	8	3	1	0	0	2	0	0	0	—	24	+	
	6	+	100	27	12	0	3	1	2	1	0	1	0	—	32	+	
検 体 31.3 μg/ml	6	+	100	4	1	0	2	0	0	0	0	0	0	—	7	—	
	6	+	100	5	2	0	0	0	2	0	0	0	0	—	9	—	
62.5 μg/ml	6	+	100	6	0	2	0	0	0	0	0	0	0	—	7	—	
	6	+	100	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	7	—	
125 μg/ml	6	+	100	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	—	7	—	
	6	+	100	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	8	—	
250 μg/ml	6	+	100	7	2	1	1	0	0	0	0	0	0	—	9	—	
	6	+	100	9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	—	8	—	
500 μg/ml	6	+	100	9	5	1	0	0	0	0	0	0	0	—	13	—	
	6	+	100	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	—	11	—	
溶 媒 対 照 1%DMSO	22	—	100	3	1	0	1	0	1	0	0	0	0	—	6	—	
	22	—	100	7	2	0	1	0	0	0	0	0	0	—	9	—	
無 処 理 対 照	22	—	100	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	—	7	—	
	22	—	100	3	1	1	0	0	1	0	0	0	0	—	6	—	
陽 性 対 照 メチルメタン スルホネート 20 μg/ml	22	—	100	55	15	3	1	0	0	3	0	0	0	—	50	+	
	22	—	75	52	15	8	8	1	5	3	0	0	0	—	57	+	
検 体 31.3 μg/ml	22	—	100	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	—	7	—	
	22	—	100	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	6	—	
62.5 μg/ml	22	—	100	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	7	—	
	22	—	100	5	3	0	1	0	0	0	0	0	0	—	9	—	
125 μg/ml	22	—	100	4	1	0	1	0	1	0	0	0	0	—	7	—	
	22	—	100	6	1	0	0	0	0	0	0	1	0	—	7	—	
250 μg/ml	22	—	100	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	—	8	—	
	22	—	100	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	6	—	
500 μg/ml	22	—	100	8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	—	9	—	
	22	—	100	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	—	6	—	

a) G; ギャップ B; 切 断 F; 断 片 E; 交 換 D; 二動原体 R; 環 状

表 2

薬 物	処理時間	S9Mixの有無	観 察 細胞数	異 常 の 種 類 ^{a)}											細 胞 異常率 (%)	判定
				染 色 分 体			染 色 体			複 合			多数	その他		
				G	B	F	G	B	F	E	D	R				
溶 媒 対 照 1%DMSO	46	—	100	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	—	4	—
	46	—	100	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	4	—
未処理対照	46	—	100	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	8	—
	46	—	100	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	—	7	—
陽 性 対 照 メチルメタン スルホネート 20 μg/ml	46	—	75	21	22	11	3	3	9	0	0	0	0	—	44	+
	46	—	50	12	18	4	2	1	12	2	0	2	0	—	52	+
検 体 62.5 μg/ml	46	—	100	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	—	6	—
	46	—	100	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	—	6	—
125 μg/ml	46	—	100	3	2	0	1	0	0	0	0	0	0	—	6	—
	46	—	100	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	—	5	—
250 μg/ml	46	—	100	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	—	5	—
	46	—	100	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	7	—
500 μg/ml	46	—	100	3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	—	6	—
	46	—	100	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	—	7	—

a) G; ギャップ B; 切 断 F; 断 片 E; 交 換 D; 二動原体 R; 環 状

④ ラット肝細胞における不定期DNA合成試験

(資料No. 39)

試験機関：

(GLP対応)

報告書作成年：1988年

検体純度：%

試験方法：2回の独立した試験を行なった。いずれも検体をDMSOに溶解し9.8、19.5、39、78、156.25、312.5、625及び1250 μ g/mlの濃度でトリチウムチミジン10 μ Ci/mlと共にFischer 344系雄ラット初代培養肝細胞(HPCs)に加え、18-20時間37 $^{\circ}$ Cで培養した。D.P.X.を用いてスライド標本を作製し、顕微鏡により核内粒子数を計数した。

結果：結果を表1及び2に示す。

両試験において1250 μ g/ml群に毒性及び沈殿が認められたが、いずれの投与群でも陽性反応を規定する評価基準を満足しなかった。

溶媒対照群では、いずれの試験でも6個以上の正味粒子数を持つ核は観察されなかった。一方、陽性対照群では、すべての濃度で陽性反応を示した。

以上の結果から、本剤は本試験条件下で、成熟ラット初代培養肝細胞に不定期DNA合成を誘起しないと判断した。

表1

薬物 (μ g/ml)	細胞数	核あたりの平均正味粒子数	6個以上の正味粒子を持つ核%	20個以上の正味粒子を持つ核%
溶媒対照 DMSO 10 μ l				
1	150	-0.51	0	0
2	150	-0.15	0	0
陽性対照 Michler'sケトン				
4	150	15.14	99.33	16.0
8	150	18.95	100	44.67
16	150	19.86	100	54.67
検体				
9.8	150	-0.39	0	0
19.5	150	-0.47	0	0
39	150	-0.47	0	0
78	150	-0.03	0.67	0
156.25	150	-0.12	0.67	0
312.5	150	-0.62	0	0
625	150	0	0	0
1250 ^{a, b}	-	-	-	-

注) a ; 沈殿 b ; 毒性

表 2

薬 物 (μg/ml)	細 胞 数	核あたりの 平均正味粒子数	6 個以上の正味 粒子を持つ核%	20 個以上の正味 粒子を持つ核%
溶 媒 対 照 DMSO 10 μ l				
1	150	-0.69	0	0
2	150	-0.57	0	0
陽 性 対 照 Michler' s ケトン				
4	150	13.94	99.33	7.33
8	100	15.08	100	13
16	150	15.92	100	20
検 体				
9.8	150	-0.77	0	0
19.5	150	-0.35	0	0
39	150	-0.86	0	0
78	150	-0.46	0	0
156.25	150	-0.66	0	0
312.5	100	-0.70	0	0
625 ^b	—	—	—	—
1250 ^{a, b}	—	—	—	—

注) a ; 沈殿 b ; 毒性

⑤ ラット骨髄における姉妹染色分体交換試験

(資料No. 40)

試験機関：

(GLP対応)

報告書作成年：1988年

検体純度：%

供試動物：SD系(CD)雄ラット、9-11週齢、1群5匹

試験方法：各ラットの皮下にBUdRペレットを植え込み、その2時間後、0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)溶液に懸濁した検体を、0.5、1.6及び5.0g/kgの用量で単回強制経口投与した。同様に溶媒対照として0.5% CMC溶液を、陽性対照としてシクロホスファミドの水溶液を単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。さらに22時間後Colchicineを腹腔内に注射し、2時間後に骨髄標本を作製した。骨髄標本はHoechst33258及びギムザ液にて染色し、各ラットについて40本以上の染色体を持つ30個のよく広がった分裂像を観察し、姉妹染色分体交換(SCE)頻度を調べた。

投与量設定根拠；以下の用量設定試験の結果をもとに設定した。

1群2匹の雄ラットに1000、2000、3000、4000及び5000mg/kgを1回経口投与した結果、何ら症状または死亡も認められなかったため、1群5匹の雄ラットを用い、5000mg/kgの用量で本試験(毒性試験)を行なった。その結果、何ら症状または死亡も認められなかったため、最高用量として5.0g/kg、中用量及び低用量として1.6及び0.5g/kgを設定した。

結果：骨髄標本の観察結果を表1に示す。

1.6及び5.0g/kg群において投与日に運動量低下が認められた以外、何らの異常症状は認められなかった。

溶媒対照では概して低く、適正な範囲のSCE頻度が認められた。一方、陽性対照におけるSCE頻度は、溶媒対照の3.80倍でSCE頻度の増加が認められた。

以上の結果から、本剤は本試験条件下でSD系雄ラットの骨髄細胞に姉妹染色分体交換を誘起しなかったと判断した。

表1

薬物	動物数	細胞数	動物あたりの平均SCEs数	細胞あたりの平均SCE数	各範囲のSCEを有する細胞%		
					0-5	6-10	>10
溶媒対照 0.5%CMC 10ml/kg	5	150	76.8	2.56±0.44	91	9	0
陽性対照 シクロホスファミド 5mg/kg	5	150	291.8	9.73±0.94	15	47	38
検体							
0.5g/kg	5	120 ^{a)}	78.8	2.63±0.48	90	9	1
1.6g/kg	5	150	83.8	2.79±0.52	89	11	0
5.0g/kg	5	150	85.6	2.85±0.66	90	10	0

a)：1動物について観察可能な細胞が得られず。

⑥ マウスの骨髄における小核試験

(資料No. 42)

試験機関：

(GLP対応)

報告書作成年：1988年

検体純度：%

供試動物：ICR系(CD-1)マウス、6-8週齢、1群雄15匹、雌15匹、体重17-31g

試験方法：骨髄中の小核を有する多染性赤血球数の出現頻度を指標として小核誘発性を調べた。検体を0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)溶液に懸濁し、2000mg/kgの用量を単回強制経口投与した。同様に溶媒対照として0.5% CMC溶液を、陽性対照としてシクロフォスファミドの水溶液を単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。投与24、48及び72時間目に検体、溶媒対照群及び陽性対照群の雌雄各5匹をと殺し、大腿骨を摘出して牛胎児血清とクエン酸ナトリウム溶液の混合液を用いて骨髄を洗い出し、骨髄標本を作製した。

骨髄標本は、メタノール固定後、メイグルワルド-メタノール溶液にて染色後、ギムザ染色を施し、顕微鏡下で、1動物当たり1000個の多染性赤血球について小核の有無を検査した。また、1動物あたり300個の赤血球を観察し、正染性赤血球数に対する多染性赤血球の割合についても調べた。

結果については、マウスの平均小核出現頻度を0.128%と仮定して計算した最大許容小核頻度0.28%を超えた場合は陽性、0.28%以下の場合は陰性と判定することとした。

投与量設定根拠；以下の毒性試験の結果をもとに設定した。

マウス雌雄各1匹を用い、1000、2000、3000、4000及び5000mg/kgの用量で用量設定試験を実施した結果、3000及び5000mg/kg群で雄各1匹、4000mg/kg群で雌1匹が死亡した。毒性本試験では雌雄各5匹を用い、3000、4000及び5000mg/kgの用量を投与した結果、雌雄共に投与用量順に2/5、2/5及び5/5の死亡が認められた。この結果より、最大耐量を2000mg/kgとし小核試験の用量とした。

結果：骨髄標本の観察結果を表1に示す。

投与群において運動抑制、立毛、うずくまり姿勢、運動失調及び振顫が認められた。投与48及び72時間目と殺の群において1/5の死亡が認められた。いずれの群においても小核出現頻度の増加は認められなかった。

溶媒対照群では本系統のマウスにおける自然発生値内の小核出現頻度の増加が認められた。一方、陽性対照群では、明らかな小核出現頻度の増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性を有しないものと判断した。

表 1

薬 物	骨髓標本 採取時間	供試数	生存 数	正染性赤血球	多染性赤血球			多染性赤血球 /正染性赤血球
				小核数	測定数	小核数	%	
溶媒対照 0.5%CMC (10ml/kg)	24	雄 5	5	0	5000	0	0.00	1.05±0.10
		雌 5	5	1	5000	2	0.04	1.06±0.07
	48	雄 5	5	0	5000	0	0.00	0.97±0.05
		雌 5	5	0	5000	0	0.00	1.02±0.10
	72	雄 5	5	0	5000	0	0.00	1.05±0.07
		雌 5	5	1	5000	0	0.00	1.03±0.10
陽性対照 シクロホス ファミド (80mg/kg)	24	雄 5	5	2	5000	17*	0.34*	0.91±0.03
		雌 5	5	3	5000	20*	0.40*	0.92±0.08
	48	雄 5	5	8	5000	18*	0.36*	0.91±0.04
		雌 5	5	8	5000	14	0.28	0.92±0.07
	72	雄 5	5	3	5000	5	0.10	0.93±0.09
		雌 5	5	2	5000	7	0.14	0.96±0.11
検体 (2000mg/kg)	24	雄 5	5	2	5000	0	0.00	0.99±0.10
		雌 5	5	1	5000	0	0.00	0.96±0.05
	48	雄 5	5	0	5000	0	0.00	0.95±0.04
		雌 5	4	0	4000	0	0.00	0.93±0.02
	72	雄 5	4	0	4000	0	0.00	0.97±0.09
		雌 5	5	0	5000	1	0.02	0.98±0.11

* : 陽性反応

(10) 生体機能への影響

ピラゾスルフロンエチルにおける薬理試験

(資料 No. 43)

試験機関：

(GLP対応)

報告書作成年：1987年

検体純度：%

①中枢神経系に対する作用

i) マウスの一般状態

供試動物：ddY系マウス、1群雄6匹、体重：21-32g

方法：1%カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液を用いて検体を300、1000及び3000mg/kgの濃度に懸濁し、対照群は1%CMC水溶液を経口投与し、投与30分、1、2、4及び6時間に、Irwin法に従い行動観察を行った。必要に応じて投与24時間にも行動を観察した。

結果：300mg/kg群では影響が認められなかった。1000mg/kg群では警戒性、反応性及び自発運動の低下、腹臥、耳介反射の抑制、体温下降及び異常歩行が認められ、さらに3000mg/kgでは立ち直り反射の抑制、呼吸数の減少、握力の低下、驚愕反応、触覚反応亢進及び痙攣が認められた。

ii) マウスの自発運動量に対する作用

供試動物：ddY系マウス、1群雄15匹、体重：21-32g

方法：i)と同様に経口投与し、1匹ずつケージに入れ、自発運動量測定装置にケージを乗せ、投与6時間まで運動量を測定した。

結果：300mg/kg群では明らかな作用は認められなかった。1000mg/kg群では投与30分以降に自発運動量の減少が認められたが、有意な変化ではなかった。3000mg/kg群では各時間帯に自発運動量の減少が認められた。

iii) マウスの筋統御系(回転棒法)に対する作用

供試動物：ddY系マウス、1群雄10匹、体重：21-32g

毎分10回転する棒上に60秒以上乗るマウスを使用した。

方法：i)と同様に経口投与し、投与30分、1、2、4及び6時間に、回転棒上にマウスを乗せ、60秒以内に落下するかどうかを観察した

結果：300mg/kg群では協調運動に影響は認められなかった。1000及び3000mg/kg群では用量に依存して協調運動の抑制が認められた。

iv) マウスの睡眠増強作用

供試動物：ddY系マウス、1群雄10匹、体重：21-32g

方法：i)と同様に経口投与し、投与60分にhexobarbital sodium(90mg/kg)を腹腔内投与した。正向反射が消失してから再度出現するまでの時間を測定した。

結果：結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	0	300	1000	3000
睡眠時間 (分)	43.1	47.6	72.3 \uparrow	73.9 \uparrow

Student 検定 $\downarrow\uparrow:p<0.01$

300mg/kg 群では影響は認められなかった。

1000 及び 3000mg/kg 群では正向反射消失持続時間は著明に延長した。

v) マウスの抗痙攣作用

供試動物 : ddY 系マウス、1 群雄 10 匹または 20 匹、体重 : 21-32g

方法 :

(a) 最大電撃痙攣

1%CMC 水溶液を用いて検体を 30、100、300、1000 及び 3000mg/kg の濃度に懸濁し、対照群は 1%CMC 水溶液を経口投与し、投与 60 分に電撃痙攣刺激装置を用い、耳介電極を介して電撃 (50mA・1msec・100Hz) を 1 秒加えて強直性伸展痙攣発現の有無を観察した。

(b) strychnine 痙攣

i) と同様に経口投与し、投与 60 分に strychnine (1.2mg/kg) を皮下投与し、痙攣により死亡する迄の時間を測定した。

結果 :

(a) 最大電撃痙攣

強直性痙攣の発現に対しては影響が認められなかったが、100mg/kg 群以上で死亡数の増加が認められた。

(b) strychnine 痙攣

結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	0	300	1000	3000
痙攣発現時間 (分)	319.6	384.3	400.3	385.3
死亡時間 (分)	429.4	726.6	1087.9	933.2

Student 検定 $\downarrow\uparrow:p<0.01$

strychnine 痙攣の発現に対しては影響が認められなかったが、1000 及び 3000mg/kg 群で死亡時間の有意な延長が認められた。

vi) マウスの鎮痛作用

供試動物 : ddY 系マウス、1 群雄 10 匹、体重 : 21-32g

方法 : i) と同様に経口投与し、投与 60 分に 0.6% 酢酸-蒸留水 (0.1ml/10g) を腹腔内投与し 10 分間放置した後、10 分後に発現する writhing 回数を計測した。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	0	300	1000	3000
writhing回数	19.5	15.1	1.3↓	0.2↓

Student 検定 ↓↑:p<0.01

300mg/kg 群では影響は認められず、1000 及び 3000mg/kg 群で著明な抑制がみられた。

vii) ラットの体温に対する作用

供試動物 : SD 系ラット、1 群雄 6 匹、体重 : 162-272g

方法 : i) と同様に経口投与し、投与 1、2、4 及び 6 時間に直腸体温を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	投与後時間 (時間)				
	投与前	1	2	4	6
0	37.3	37.3	37.2	37.1	37.0
300	37.3	37.2	37.3	37.3	37.2
1000	37.3	37.2	37.0	36.9	37.1
3000	37.3	37.1	36.3↓	36.2↓	36.6

Student 検定 ↓↑:p<0.01

300 及び 1000mg/kg 群ではほとんど影響が認められず、3000mg/kg 群では投与 2 及び 4 時間で体温が有意に低下した。

viii) ウサギの脳波に対する作用

供試動物 : ニュージーランド白色ウサギ、1 群雄 3 匹、体重 : 2.8-3.4kg

方法 : エーテル麻酔下にてウサギを固定し、脳を手術し電極を埋め込み、麻酔の影響が消失し、脳波が安定した後に 1%CMC 水溶液または検体を 300、1000 及び 3000mg/kg の濃度で経口投与し、60 分間作用を観察した。

結果 : ウサギの自発脳波に対し、明らかな作用は認められなかった。

②呼吸循環系に対する作用

i) ウサギの呼吸、血圧、心拍数及び心電図に対する作用

供試動物 : ニュージーランド白色ウサギ、1 群雄 3-6 匹、体重 : 2.8-3.4kg

方法 : ウサギを α -chloralose (40mg/kg 静脈内投与) 及び urethane (400mg/kg 静脈内投与、200mg/kg 皮下投与) 併用麻酔下で固定し、dimethylsulfoxide を用いて 1、3 及び 10mg/kg の濃度に希釈した検体をウサギの静脈内に投与し、呼吸、血圧、心拍数及び心電図に対する作用を調べた。

結果 : 呼吸数の結果について次表に示す。

投与量 (mg/kg)	投与後時間 (時間)							
	投与前	0	3	5	10	15	30	60
0	35	40	35	34	33	33	34	36
1	39	41	33	38	39	39	40	42
3	33	41	35	35	35	35	37	39
10	32	45↑	39	39	38	39	38	40

Student t-検定 ↑↓: p< 0.05

ウサギの血圧、心拍数及び心電に明らかな影響は認められなかったが、呼吸数は10mg/kg 群で増加がみられた。

③自律神経系に対する作用

i) マウスの瞳孔径に対する作用

供試動物 : ddY 系マウス、1 群雄 10 匹、体重 : 21-32g

方法 : ① i) と同様に経口投与し、投与 30 分、1、2、4 及び 6 時間後に瞳孔径を実体顕微鏡下で測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	投与後時間 (時間)					
	投与前	0.5	1	2	4	6
0	210	220	220	215	200	215
300	210	205	220	220	205	240
1000	205	210	220	240	235	230
3000	210	205	260	270	295↑	250

Student 検定 ↓↑: p< 0.01

3000mg/kg 群で投与 1-6 時間に瞳孔径増大が認められた。

ii) マウスの消化管輸送能に対する作用

供試動物 : ddY 系マウス、1 群雄 10 匹、体重 : 21-32g

方法 : 生理食塩水または検体を 300、1000 及び 3000mg/kg の濃度で経口投与し、投与 60 分に 10%炭末懸濁 0.2ml を経口投与した。30 分後にと殺し、胃腸管を全摘出後、胃幽门部から炭末の先端までの距離及び全小腸の長さを測定して、炭末の輸送能を求めた。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	0	300	1000	3000
輸送能 (%)	47.5	45.1	32.2↓	32.8↓

Student 検定 ↓↑: p< 0.01

1000 及び 3000mg/kg 群で消化管輸送能が有意に抑制された。

④平滑筋に対する作用

i) モルモットの摘出回腸に対する作用

供試動物 : ハートレー白色モルモット、1 群雄 4 匹、体重 : 374-430g

方法 : 放血致死させ回腸を摘出し筒状標本を作製し、acetylcholine (3×10^{-8} g/ml)、histamine (10^{-7} g/ml) 及び KCl (30mM) による収縮に及ぼす検体前処置の影響を検討した。検体は浴槽の用量の 1/1000 を添加し、最終濃度 10^{-4} g/ml を最高濃度に設定した。

結果 : 検体 10^{-5} 及び 10^{-4} g/ml はいずれの収縮に対しても作用を示さなかった。

⑤血液に対する作用

i) ラットの血液凝固に対する作用

供試動物 : SD 系ラット、1 群雄 10 匹、体重 : 162-272g

方法 : ① i) と同様に経口投与し、投与 60 分にエーテル麻酔下で腹大動脈から採血し、3.8% クエン酸ナトリウム液に混和して遠心分離し、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 :

投与量 (mg/kg)	PT(秒)	APTT(秒)
0	12.8	20.3
300	12.4	19.6 ↓
1000	12.7	19.6 ↓
3000	12.6	19.5 ↓

Student t-検定 ↑ ↓ : $p < 0.05$

プロトロンビン時間には影響がみられなかったが、活性化部分トロンボプラスチン時間に対しては 300、1000 及び 3000mg/kg 群で軽度減少した。

ii) ラットの溶血作用

供試動物 : SD 系ラット、雄 5 匹、体重 : 162-272g

方法 : エーテル麻酔下で腹大動脈から採血し、3.8% クエン酸ナトリウム液に混和して遠心分離し、2% 赤血球浮遊液を作製した。

検体を dimethylsulfoxide に溶解し、 10^{-6} 、 10^{-5} 及び 10^{-4} g/ml の濃度で添加し、37°C で 15 分加温後、更に 45 分間室温で放置後、遠心分離した。上清の吸収度を 550nm で測定し、溶血の有無を調べた。

結果 : いずれの濃度においても溶血作用は認められなかった。

iii) ラットの血小板凝集能に対する作用

供試動物 : SD 系ラット、雄 6 匹、体重 : 162-272g

方法 : エーテル麻酔下で腹大動脈から採血し、3.8% クエン酸ナトリウム液に混和して遠心分離後、上清の血小板数を測定した。さらに血小板数を $41-55 \times 10^4 \text{mm}^3$ に調製した。この多血小板血漿に検体を 10^{-6} 、 10^{-5} 及び 10^{-4} g/ml の濃度で添加し、ADP (1×10^{-6} g/ml) による血小板凝集に対する影響を観察した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

結果 : いずれの濃度においても ADP によるラット血小板の凝集に対し影響を与えなかった。

以上の結果から、本剤の 1000mg/kg 以上を投与した際には、中枢神経系及び自律神経系に抑制性の影響を与えるが、平滑筋、循環器系及び血液系に対しては著明な影響を及ぼさないと判断した。

[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		試験動物 (麻醉)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 (匹/群)	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系	一般状態 (Irwin法)	マウス	経口 (1%CMC)	0, 300, 1000, 3000	雄 6	300	1000	抑制 (認知性の低下、運動性の低下、姿勢の異常、運動失調、体温低下)、興奮 (驚愕反応、挙尾反応、痙攣)
	自発運動量				雄 15	300	1000	減少
	筋統御系 (回転棒法)				雄 10	300	1000	協調運動抑制
	睡眠増強作用				雄 10	300	1000	正向反射消失持続時間の延長
	抗痙攣作用	マウス	経口 (1%CMC)	0, 30, 100, 300, 1000, 3000	雄 10 対照群 20	3000	—	影響なし 死亡例 0:1/20, 30:1/10, 100:5/10 300:3/10, 1000:4/10, 3000:6/10
					雄 10	3000	—	影響なし 1000及び3000で死亡時間の延長
	鎮痛作用	マウス	経口 (1%CMC)	0, 300, 1000, 3000	雄 10	300	1000	鎮痛抑制
体温	ラット	経口 (1%CMC)	0, 300, 1000, 3000	雄 6	1000	3000	体温の低下	
脳波	ウサギ	経口 (1%CMC)	0, 300, 1000, 3000	雄 3	3000	—	影響なし	
循環器系	呼吸、 血圧、 心拍数、 心電図	ウサギ (麻醉)	静脈内 (DSMO)	0, 1, 3, 10	雄 3-6	3	10	呼吸数の増加
自律神経系	瞳孔径	マウス	経口 (1%CMC)	0, 300, 1000, 3000	雄 10	1000	3000	瞳孔径の増大
	消化管 輸送能				雄 10	300	1000	消化管輸送能の抑制
平滑筋	摘出回腸	モルモット	in vitro (DSMO)	0.1×10^{-5} , 1×10^{-4} g/ml	雄 4	1×10^{-4} g/ml	—	影響なし
血液	血液凝固	ラット	経口 (1%CMC)	0, 300, 1000, 3000	雄 10	—	300	活性化部分トロンボプラスチン時間の軽度減少
	溶血作用				雄 5	1×10^{-4} g/ml	—	影響なし
	血小板凝集能				雄 6	1×10^{-4} g/ml	—	影響なし

(11) その他

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

①

(資料 No. 補遺 6)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

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日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

③

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

④

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

2. 原体混在物及び代謝物

(1) 代謝物

① 代謝物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 17)

試験機関：

(GLP 対応)

報告書作成年：1988 年

検体純度： %

供試動物：SD 系ラット、1 群雌雄各 10 匹、雄 10 週齢、雌 16-17 週齢、体重：雄 263.4-299.5g
雌 241.9-261.9g

(申請者注：報告書には雄 222.5-260.7g 雌 201.0-261.9g と記載されているが、
個体別表より予備試験の体重であることが明らかとなったので、訂正した)

観察期間：14 日間観察 (投与日を 0 日として起算)

試験方法：LD₅₀ 値算出

投与方法：検体をコーン油に懸濁させ、投与前に一晩絶食後、単回強制経口投与した。限界用量
試験において 5000mg/kg を投与したところ、死亡が認められなかったことから、投与
用量を 5000mg/kg とした。

観察・検査項目：一般状態を、投与 1、2 及び 4 時間、それ以降は 1 日 1 回、14 日間観察した。死亡
数と瀕死期動物数は毎日 2 回観察した。体重は投与直前、投与 7 日及び 14 日に測定
した。観察期間終了時に全動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果：

投与経路	経 口	
	雄	雌
性 別	雄	雌
投与量 (mg/kg)	5000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	> 5000	> 5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡なし	死亡なし
症状発現時間及び消失時間	1 時間/2 日	1 日/2 日
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

死亡；死亡は認められなかった。

症状；尿着色、軟便及び鼻/眼の赤色沈着が散見され、雄 1 匹でわずかな抑うつが認められたが、
それらは遅くとも投与 2 日には回復した。

体重；雌 3 匹に体重減少が認められた。

肉眼的病理検査；雌 1 匹で肝臓の退色化が認められた。

(2) 代謝物

① 代謝物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 18)

試験機関：

(GLP 対応)

報告書作成年：1988 年

検体純度： %

供試動物：SD 系ラット、1 群雌雄各 5 匹、雌雄若齢、体重：雄 213.8—273.6g 雌 206.6—246.4g
(申請者注：報告書には雄 205.6—273.6g と記載されているが、個別別表より記載ミスであることから訂正した)

観察期間：14 日間観察 (投与日を 0 日として起算)

試験方法：LD₅₀ 値算出 (Behrens-Read-Muench 法)

投与方法：検体をコーン油に懸濁させ、投与前に一晩絶食後、単回強制経口投与した。

限界用量及び用量設定試験において 500、1000、2000、3000、4000 及び 5000mg/kg を投与したところ、雄では 5000mg/kg で 5 匹中 5 匹、雌では 2000、3000 及び 4000mg/kg でおのおの 5 匹中 1 匹、5000mg/kg で 5 匹中 5 匹の死亡が認められたことから、下記の投与用量を設定した。

観察・検査項目：一般状態を、投与 1、2 及び 4 時間、それ以降は 1 日 1 回、14 日間観察した。死亡数と瀕死期動物数は毎日 2 回観察した。体重は投与直前、投与 7 日及び 14 日に測定した。観察期間終了時に全生存動物及び瀕死期と殺・死亡動物について肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与経路	経 口	
	雄	雌
性 別	雄	雌
投与量 (mg/kg) *	625, 1250, 2500, 5000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg) * (95%信頼限界)	2806.2 (1653.9—4761.0)	701.5 (428.5—1148.5)
死亡開始時間及び終了時間	1 日/2 日	1 時間/2 日
症状発現時間及び消失時間	1 時間/3 日	1 時間/4 日
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1250	—

*：限界用量及び用量設定試験での 5000mg/kg の結果も LD₅₀ 算出に含めた。

(結果：雌雄共に全動物死亡)

死亡；2500 mg/kg 群雄では 2 匹、雌では全動物が死亡した。1250mg/kg 群雄では死亡は認められなかったものの、雌では全動物が死亡した。625mg/kg 群雄では死亡は認められなかったものの、雌では 2 匹が死亡した。いずれの群も投与 2 日以降死亡は認められなかった。

症状；全群で虚脱、流涙、運動失調、喘鳴及び抑うつなどが散見されたが、遅くとも投与 4 日には回復した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

体重；2500mg/kg 群では雄 2 匹、雌全動物、1250mg/kg 群では雌全動物、625mg/kg 群では死亡した雌 1 匹で体重減少あるいは増加抑制が認められた。

肉眼的病理検査；各群で肺、肝臓、脾臓及び腎臓の退色化がみられ、また胃腸に異常内容物が散見された。

② 代謝物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 47)

試験機関： (GLP 対応)

報告書作成年：1989 年

検体純度 : %
 供試動物 : SD系(Crj:CD)ラット、5週齢、1群雌雄各5匹、体重:雄101.8-116.2g 雌91.9-106.6g
 観察期間 : 14日間観察(投与日を0日として起算)
 試験方法 : LD₅₀値算出
 投与方法 : 検体を1%カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液に懸濁させ、ネラトンカテ-
 テルを用いて単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。動物は投与前に
 18時間絶食した。また投与後4時間絶食した。

観察・検査項目：動物の一般状態及び死亡数について、投与直後、5、10、30、60分後、その後1
 時間ごとに投与6時間まで、それ以降は1日1回、14日間観察した。体重は投与直
 前、投与1、3、7、10及び14日後に測定した。観察期間終了時に全生存動物及び瀕
 死期と殺・死亡動物について肉眼的病理検査を行った。

結果 :

投与経路	経 口	
性 別	雄	雌
投与量 (mg/kg)	500, 700, 1000, 1400, 2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	>2000	1400-2000
死亡開始時間及び終了時間	3時間/5時間	3時間/4時間
症状発現時間及び消失時間	10分/1日	10分/1日
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1000	1000

死亡；2000mg/kg群雄では2匹、雌では4匹、1400mg/kg群雄では2匹、雌では1匹の死亡が認
 められた。

症状；各群に自発運動の低下、呼吸数の減少、閉眼、流涎及びよろめき歩行がみられ、700mg/kg
 群以上では腹臥、流涙、1000mg/kg以上ではさらに横臥、紅涙が認められた。

体重；投与1日後体重増加抑制が認められたが、その後回復した。

肉眼的病理検査；死亡動物では2000mg/kg群において雄1匹に口周囲被毛湿潤、雌1匹に肺のう
 つ血、1400mg/kg群においては雄2匹に気管内白色泡沫物、1匹に肺のうっ血が認め
 られた。他の死亡動物及び生存動物に異常は認められなかった。

③ 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料No. 48)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 TA1535、TA1537、TA98、TA100 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 WP2uvrA 株の 5 菌株を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) 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にて復帰変異原性を調べた。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して、0、313、625、1250、2500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の濃度で処理した。結果の判定は復帰変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍以上で、用量依存性が認められた場合に陽性とした。
陽性対照物質として 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム (NaN_3)、2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン \cdot 2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) を用いた。

用量設定根拠 ; 1、10、100、1000 および 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の濃度において本試験と同様の方法で用量設定試験を実施した。その結果最高用量においても菌に対する生育阻害作用が認められなかったので本試験における最高濃度は 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に設定した。

結果 : 表 1 に本試験結果を、表 2 に用量設定試験結果を示す。

表 1 および 2 に示すように、検体処理プレートにおいてはいずれの菌株でも S-9Mix の存在の有無に関わらず対照プレートと比べ、復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。一方、陽性対照物質を処理したプレートでは著明な復帰変異コロニー数の増加がみられた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断した。

表 1. 本試験結果

薬 物	濃 度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA1535	TA100	WP2 $uvrA$	TA1537	TA98	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	9	99	31	11	28	
検 体	313	—	6	111	29	9	23	
	625	—	8	106	25	14	23	
	1250	—	8	96	32	12	27	
	2500	—	9	109	34	14	22	
	5000	—	7	87	26	12	23	
溶媒対照 (DMSO)	—	+	10	95	41	21	31	
検 体	313	+	10	115	42	21	35	
	625	+	7	106	47	16	27	
	1250	+	7	107	48	17	30	
	2500	+	8	109	37	12	30	
	5000	+	8	115	49	13	32	
陽 性 対 照	NaN ₃	0.5	—	263				
	AF-2	0.01	—		415	187		
		0.1	—				559	
	ICR-191	1	—			1059		
	2AA	0.5	+					386
		1	+			1361		
2		+				232		
20		+	473		934			

表中の値は2枚のプレートの平均値

NaN₃: ナジウム化ナトリウム AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

ICR-191: 2-メチル-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

表 2. 用量設定試験結果

薬 物	濃 度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA1535	TA100	WP2uvrA	TA1537	TA98	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	6	103	26	5	24	
検 体	1	—	9	104	25	7	16	
	10	—	6	133	29	4	23	
	100	—	5	112	29	6	14	
	1000	—	10	102	27	6	18	
	5000	—	8	87	25	6	24	
溶媒対照 (DMSO)	—	+	5	121	41	13	25	
検 体	1	+	7	114	41	15	24	
	10	+	11	114	45	15	26	
	100	+	10	123	47	11	29	
	1000	+	3	121	38	14	22	
	5000	+	7	107	33	13	28	
陽 性 対 照	NaN ₃	0.5	—	233				
	AF-2	0.01	—		481	185		
		0.1	—				565	
	ICR-191	1	—			1116		
	2AA	0.5	+		1172			423
		1	+					
		2	+	439			206	
		20	+			1340		

表中の値は2枚のプレートの平均値

NaN₃: アジ化ナトリウム AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

ICR-191: 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA: 2-アミノアントラセン