

(13) 変異原性

1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 毒性-21)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

被験物質: ピリベンカルブ原体

試験方法: ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvzA 株を用い、フェノバルビタール/ β -ナフトフラボンで薬物代謝酵素系を誘導した雄ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下で Ames らのプレート法を用いて復帰突然変異誘発性を検索した。

溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて被験物質溶液を調製した。処理容量は 0.1 ml /プレートとし、50, 150, 500, 1500, 5000 μ g/プレートの 5 用量で試験を実施した。1 用量につき 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で培養を行い、実験 1 では 48 時間後、実験 2 では 96 時間後に復帰変異コロニー数を計数した。1 菌株以上において用量に相関した復帰変異頻度の増加が認められた場合および 1 用量以上において再現性のある増加が認められた場合に復帰突然変異誘発性を有すると判定した。

用量設定根拠:

められた。以上の結果より、S9 mix 非存在下および存在下共に 5000 μ g/プレートを最高用量として 50, 150, 500, 1500, 5000 μ g/プレートの 5 用量を設定した。

結果: 結果を次表に示した。

2 回の独立した復帰突然変異試験の結果、被験物質処理群では、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの処理濃度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、陽性対照群では明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、被験物質は、代謝活性化系を含む本試験条件下において復帰突然変異誘発性を有しないと判断される。

表-1 復帰突然変異試験成績 (実験 1)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

試験物質	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数 / プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2 <i>uvrA</i>	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	23	98	20	18	12	
ピリベンカルブ	50	—	19	105	17	15	9	
	150	—	22	109	22	19	8	
	500	—	20	103	21	16	11	
	1500 #	—	21	98	21	17	13	
	5000 #	—	16	66	12	15	6	
陽性 対照	ENNG	2	—	669				
		3	—		407			
		5	—			253		
	4NQO	0.2	—				182	
	9AA	80	—					705
溶媒対照 (DMSO)	—	+	28	95	16	14	10	
ピリベンカルブ	50	+	25	89	11	18	8	
	150	+	26	79	11	19	11	
	500	+	22	80	11	16	8	
	1500 #	+	29	90	14	19	10	
	5000 #	+	17	65	9	13	4	
陽性 対照	2AA	1	+		2023			
		2	+			124		464
		10	+	384				
	BP	5	+				155	

: 被験物質の沈殿物を認めた。

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド

9AA : 9-アミノアクリジン

2AA : 2-アミノアントラセン

BP : ベンズ (a) ピレン

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

表-2 復帰突然変異試験成績 (実験 2)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数 / プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2 <i>uvrA</i>	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	—	—	22	97	25	28	20	
ピリベン カルブ	50	—	21	103	34	35	16	
	150	—	28	110	30	32	15	
	500	—	23	118	26	34	14	
	1500 #	—	22	94	18	24	13	
	5000 #	—	18	87	23	28	13	
陽性 対照	ENNG	2	—	1297				
		3	—		823			
		5	—			539		
	4-NQO	0.2	—			252		
	9-AA	80	—					1008
対照 (DMSO)	—	+	38	84	16	33	23	
ピリベン カルブ	50	+	38	84	14	37	21	
	150	+	37	81	19	41	21	
	500	+	26	92	14	34	22	
	1500 #	+	30	96	13	28	22	
	5000 #	+	28	76	13	26	18	
陽性 対照	2-AA	1	+		1634			
		2	+			394		733
		10	+	459				
	BP	5	+				152	

: 被験物質の沈殿物を認めた。

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド

9AA : 9-アミノアクリジン

2AA : 2-アミノアントラセン

BP : ベンズ (a) ピレン

P : 析出あり

2) CHL細胞を用いた*in vitro*染色体異常試験

(資料 毒性-22)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年:

被験物質: ピリベンカルブ原体

試験方法: チャイニーズハムスター肺 (CHL) 細胞を用いて、フェノバルビタール/ β -ナフトフラボンで薬物代謝酵素系を誘導した雄ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下で被験物質の染色体異常誘発性を検索した。

溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用い、実験1では、短時間処理法としてS9 mixの存在下では被験物質を3.13~50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、S9 mixの非存在下では3.13~25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で6時間処理した。被験物質処理後、新しい培地に交換し、18時間培養後に染色体標本作製した。

実験2では、連続処理法としてS9 mixの非存在下で被験物質を0.20~3.13 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で24時間連続処理した。また、S9 mixの存在下で被験物質を3.13~37.50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で6時間処理し、被験物質処理後、新しい培地に交換し、18時間培養後に染色体標本作製した。

何れの場合も溶媒対照ならびに陽性対照 (マイトマイシンCまたはシクロホスファミド) を同時に試験し、すべて各濃度あたり2連制で培養した。

染色体異常を解析する用量は、実験1においては、S9 mix非存在下では3.13, 6.25, 9.38, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 、S9 mix存在下では6.25, 12.5, 25, 37.5 $\mu\text{g/ml}$ を選択し、実験2においてはS9 mix非存在下の24時間処理では0.39, 0.78, 1.57 $\mu\text{g/ml}$ 、S9 mix存在下の6時間処理では6.25, 12.5, 18.75, 25 $\mu\text{g/ml}$ を選択した。すべてのスライド標本にコード番号を付し、盲検法で、1濃度あたり200個の中期分裂細胞を観察した。データはSavageらの分類に従って記録し、各処理群における染色体異常を持つ細胞の出現頻度 (ギャップを除く) を溶媒対照群と比較した。統計学的有意差の検定にはフィッシャーの直接確率検定法を用いた。

用量設定根拠:

したがって、実験1においては、S9 mix非存在下では25 $\mu\text{g/ml}$ 、S9 mix存在下では50 $\mu\text{g/ml}$ を最高用量とし、実験2の24時間処理では3.13 $\mu\text{g/ml}$ を最高用量として試験を実施した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

結 果： 結果を次頁の表に示した。

被験物質は代謝活性化系の存在下および非存在下とも、6時間処理において染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加を示した。24時間処理では異常細胞の出現頻度に有意な増加は見られなかったが、これは被験物質の毒性により連続処理では設定濃度が低くなったためと考えられた。また、陽性対照として用いたマイトマイシンCおよびシクロホスファミドは染色体の構造異常の明らかな増加を誘発した。

以上の結果より、被験物質は代謝活性化を含む本試験条件下においてチャイニーズハムスター肺（CHL）細胞に対し染色体異常誘発性を有すると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

表-1 染色体異常試験結果 (実験1: 短時間処理)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処 理 時 間 h	標 本 作 成 時 間 h	S9 mix の 有 無	分 裂 指 数 %	倍 数 性 細 胞 %	観 察 細 胞 数	各染色体異常を有する細胞数 (%)						異常細胞の 出現頻度 (ギャップ を除く) (%)	判 定
								染色分体型		染色体型		そ の 他	ギ ャ ッ プ		
								切 断	交 換	断 片	交 換				
溶媒対照 (DMSO)	—	6	18	—	100	0	200	0	0.5	0.5	0	0	0	1.0	/
ピリベン カルブ	3.13	6	18	—	87	0	200	0	0	0	0	0	1.5	0	—
	6.25				89	0	200	0	0	0	0	0	0.5	0	—
	9.38				66	0	200	0.5	2.0	0	1.5	0	0.5	3.0	—
	12.5				46	0	200	1.0	10.0	0	0.5	0	2.0	11.0***	+
陽性対照 (MMC)	0.1	6	18	—	54	0	150	8.7	15.3	2.7	2.0	0	12.7	27.3***	+
溶媒対照 (DMSO)	—	6	18	+	100	0.5	200	0	0	0	0	0	0	0	/
ピリベン カルブ	6.25	6	18	+	83	0	200	0	0	0.5	0	0	0	0.5	—
	12.5				80	0	200	0	0	0	0	0	0	0	—
	25				99	0	200	0	0	0	0	0	0	0	—
	37.5				36	0	200	1.0	2.0	0.5	1.0	0	0	3.5**	+
陽性対照 (CP)	5	6	18	+	23	0	200	5.0	10.0	1.5	1.0	0	1.5	16.0***	+

MMC: マイトマイシンC, CP: シクロホスファミド

フィッシャーの直接確率検定法 ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$

表-2 染色体異常試験結果 (実験2: 連続処理及び短時間処理)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処 理 時 間 h	標 本 作 成 時 間 h	S9 mix の 有 無	分 裂 指 数 %	倍 数 性 細 胞 %	観 察 細 胞 数	各染色体異常を有する細胞数 (%)						異常細胞の 出現頻度 (ギャップ を除く) (%)	判 定	
								染色分体型		染色体型		そ の 他	ギ ャ ッ プ			
								切 断	交 換	断 片	交 換					
溶媒対照 (DMSO)	—	24	0	—	100	0	200	0	0	0	0	0	0	0		
ピリベン カルブ	0.39	24	0	—	98	0	200	0.5	0	0	0.5	0	1.0	1.0	—	
	0.78				84	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	1.57				81	0	200	0	0	1.0	0	0	0	0	1.0	—
	2.35				0	Tox										
陽性対照 (MMC)	0.05	24	0	—	75	0	200	5.5	8.0	2.5	0.5	0	4.0	14.0***	+	
溶媒対照 (DMSO)	—	6	18	+	100	0	200	0	0.5	0	0	0	0	0.5		
ピリベン カルブ	6.25	6	18	+	127	0	200	0	0.5	0	0.5	0	1.0	1.0	—	
	12.5				155	0	200	0	2.0	0.5	1.5	0	1.0	3.5	—	
	18.75				100	0	200	0.5	0.5	0	0	0	0.5	1.0	—	
	25				63	0.5	200	2.0	5.5	0.5	1.5	0	3.5	9.5***	+	
陽性対照 (CP)	5	6	18	+	52	0	100	18.0	32.0	4.0	4.0	0	7.0	49.0***	+	

MMC: マイトマイシンC, CP: シクロホスファミド

Tox: 毒性のため観察せず

フィッシャーの直接確率検定法 ***: $p < 0.001$

3) マウスを用いた小核試験

(資料 毒性-23)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：：

被験物質：ピリベンカルブ原体

供試動物：CD-1™ (ICR) BR雄マウス (小核試験投与時 5~8週齢、体重：22~30 g)

1群雄7匹 (陽性対照群のみ雄5匹)

試験方法：被験物質をラッカセイ油に懸濁し、140, 280および560 mg/kgの用量で胃ゾンデを用いて単回経口投与した。陰性対照群は媒体であるラッカセイ油を同様に単回経口投与した。被験物質投与群および溶媒対照群ともに投与容量は10 ml/kgとした。陽性対照群はシクロホスファミドを50 mg/kgの用量で単回経口投与した。

投与24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骨髓塗抹標本を作製した。スライド標本はメタノールで固定後、メイグリュンワルド/ギムザ液で染色した。最高用量群および陰性対照群については投与48時間後にも同様に骨髓塗抹標本を作製した。

すべてのスライドにコード番号を付し、盲検法により鏡検した。1動物あたり2000個の多染性赤血球 (幼若赤血球) を観察し、小核を有する多染性赤血球の数を計数した。さらに1000個の赤血球を観察し、正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した。

被験物質投与群における小核を有する多染性赤血球の数をStudentのt検定を用いて溶媒対照群と比較した。

用量設定根拠：

これらの結果から、小核試験では雄のみを用いることとし、最大耐用量である560 mg/kgを最高用量とし、以下280, 140 mg/kgを設定した。

結果：骨髓塗抹標本の観察結果を表に示した。

被験物質280 mg/kg以上の投与群では、円背位、下痢、運動失調の症状が観察されたが、いずれの用量、標本作製時間においても小核を有する多染性赤血球の頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。また、いずれの用量、標本作製時間においても正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合に有意な減少は認められなかった。

一方、陽性対照物質であるシクロホスファミドを投与した陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球の頻度が明らかに増加した。よって、本小核試験は有効であると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

観察結果

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	MNPCE % (平均±標準偏差)	PCE/ (NCE+PCE) # (平均値±標準偏差)
24時間	陰性対照 (ラッカセイ油)	—	雄	7	0.07±0.06	54.8±6.0
	被験物質	140		7	0.04±0.03	54.8±9.0
		280	雄	7	0.05±0.05	54.7±7.2
		560		7	0.06±0.05	59.9±5.4
	陽性対照 (シクロホス ファミド)	50	雄	5	1.81±0.45	65.3±7.1
48時間	陰性対照	—	雄	7	0.10±0.08	59.0±8.4
	被験物質	560	雄	7	0.05±0.05	56.5±7.7

PCE : 多染性赤血球、NCE : 正染性赤血球

MNPCE : 多染性赤血球2000個のうち小核を有する多染性赤血球の割合 (%)

申請者註 : 申請者がPCE/NCEの値から計算した。

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

(14) 生体機能への影響

1) 生体機能への影響に関する試験

(資料 毒性-24)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

被験物質: ピリベンカルブ原体

1) マウスの一般症状及び行動に及ぼす影響

供試動物: Crlj: CD1 (ICR) 系 SPF マウス、1 群雌雄各 5 匹、4~5 週齢 [体重範囲: 雄 22.3~24.2 g 及び 23.7~27.6 g (追加試験)、雌 18.3~20.9 g 及び 18.0~21.0 g (追加試験)]

投与方法: 被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 (0.5%CMC-Na) に懸濁して 225, 450, 900, 及び 1800 mg/kg の投与量で経口投与した。対照群には 0.5%CMC-Na を同様に投与した。投与前並びに投与後 30, 60, 120, 240, 360 分、及び 24 時間に Irwin の多次元観察法に従い、一般症状及び行動について以下の項目を観察した。

行動的プロフィール (警戒性、常同性、受動性、身づくろい、発声、いらだち、自発運動、触反応、疼痛反応)、神経学的プロフィール (驚愕反応、挙尾、振戦、痙攣、体姿勢、異常歩行、正向反射、握力、耳介反射、角膜反射、同側屈筋反射)、自律神経学的プロフィール (苦悶、眼瞼開裂、眼球突出、散瞳、流涎、排尿、立毛、皮膚の色、下痢)

なお、当初試験で雌雄ともに最低用量 (225 mg/kg) まで被験物質の影響が認められたことから、無影響量を確認するため、56.3, 113, 225, 及び 450 mg/kg の投与量で追加試験を行った。

結果: 当初試験において 1800 mg/kg 群の雄全例及び雌 3 例、900 mg/kg 群の雌雄各 3 例、並びに 450 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 3 例が死亡し、追加試験において 450 mg/kg 群の雌 2 例が死亡した。113~1800 mg/kg 群で神経学的プロフィールに、225~1800 mg/kg 群で行動的プロフィール及び自律神経学的プロフィールに、主として抑制的影響が認められた。特に、神経学的プロフィールでは、異常歩行、運動協調性障害である正向反射の低下、筋緊張度の低下である握力低下、並びに耳介反射及び角膜反射の消失が認められ、これらは中枢抑制である可能性が推察された。これらの作用には、種類、出現頻度、強度、及び発現期間の点で雌雄間に明確な差異は認められなかった。

56.3 mg/kg 群では雌雄ともに被験物質投与による影響は認められなかった。

2) 中枢神経系に及ぼす影響

① マウスの自発運動量に及ぼす影響

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

供試動物：Crlj: CD1 (ICR) 系 SPF マウス、1 群雄 6 匹、5 週齢 (体重範囲 ; 22.6~26.8 g)

投与方法：被験物質を 0.5%CMC-Na に懸濁して 50, 150, 及び 450 mg/kg の投与量で経口投与した。対照群には 0.5%CMC-Na を同様に投与した。投与後 240 分まで 15 分毎に運動量を測定し、各測定値及び累積値を比較した。

結果：対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	投与後時間 (分)	投与量 (mg/kg)		
		50	150	450
自発運動量	180~195		△232	

統計学的有意差：△▽： $p \leq 0.05$ 、▲▼： $p \leq 0.01$ (Dunnett 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示した。

150 mg/kg 群で投与後 180~195 分の測定値が対照群と比較して有意に高値であったが、その前後の値に統計学的な有意差はなく、累積値でも有意差は認められなかったこと、また、発現時間が投与後約 3 時間と遅いこと、行動的プロフィールで自発運動の減少が被験物質投与の影響として認められていることから、偶発的なものと判断した。

従って、いずれの投与群でも被験物質投与による影響はなかった。

[申請者註]

自発運動量試験において、450 mg/kg 投与群では 15 分間隔の自発運動量およびその累積値ともに溶媒対照群と比べいずれも統計学的有意差は認められず、対照群においても同様の反応が見受けられたことから、薬剤影響はないと結論された。

しかし、ケージ交換より 15 分以上を経た後の 15~60 分の 15 分間隔の自発運動量は、450 mg/kg 投与群では統計学的な有意差はみられないものの溶媒対照群の値に比べ低値の傾向が認められ、環境変化のない条件では自発運動量の減少が生じていた可能性が推察された。この運動抑制を示唆する事例としては、Irwin 法試験において、大きな運動負荷を加える測定項目である正向反射 (Righting reflex) において雌雄ともに 450 mg/kg 投与群に抑制が認められている。

自発運動量試験成績では、統計学的な有意差をベースとした評価法では影響の判定ができなかったものの、時間毎の反応を精査すると、抑制系の影響があったものと考えられ、本試験における NOAEL は 150 mg/kg と判断した。

②マウスを用いた抗痙攣作用

供試動物：Crlj: CD1 (ICR) 系 SPF マウス、1 群雄 6 匹、4~5 週齢 (体重範囲 ; 22.2~26.2 g)

投与方法：被験物質を 0.5%CMC-Na に懸濁して 50, 150, 及び 450 mg/kg の投与量で経口投与した。対照群には 0.5%CMC-Na を同様に投与した。投与後 30 分に電撃痙攣装置を用いてマウスの両角膜に電極を接触させ、100 V、50 mA の電流を 0.2 秒間通電し、誘発される強直性屈曲痙攣、強

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

直性伸展痙攣、間代性痙攣、及び死亡発現の有無を観察した。

結果：450 mg/kg 群で統計学的有意差はないものの、死亡の発現例数に増加傾向が認められた（対照群：2例、450 mg/kg 群：5例）。

150 及び 50 mg/kg 群では明確な影響は認められなかった。

③ラットの体温に及ぼす影響

供試動物：Cri: CD (SD) 系 SPF ラット、1 群雄 6 匹、6~7 週齢（体重範囲；198~224 g）

投与方法：被験物質を 0.5%CMC-Na に懸濁して 50, 150, 及び 450 mg/kg の投与量で経口投与した。対照群には 0.5%CMC-Na を同様に投与した。投与前並びに投与後 10, 30, 60, 120, 及び 180 分に直腸温度を測定し、直腸温度の経時的変化及び投与前値からの温度差について比較した。

結果：対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	投与後時間 (分)	投与量 (mg/kg)		
		50	150	450
直腸温度	60			▽98
	120			▼96
	180			▼94
投与前値からの温度差	60			▼-600 (注)
	120			▼1500
	180		▽350	▼1250

統計学的有意差：△▽： $p \leq 0.05$ 、▲▼： $p \leq 0.01$ (Dunnett 検定または Mann-Whitney の U 検定)
表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示した。

(注) 対照群の値 0.1、450 mg/kg 群の値 -0.6 を反映した。

450 mg/kg 群で投与後 60, 120, 及び 180 分に各測定値並びに投与前値からの温度差が対照群と比較して有意な低値を示し、150 mg/kg 群で投与後 180 分に投与前値からの温度差が有意な低値を示した。

50 mg/kg 群では明確な影響は認められなかった。

3) 麻酔ウサギの呼吸・循環器系に及ぼす影響

供試動物：New Zealand White 系ウサギ、雄 4 匹、16~17 週齢（体重範囲；3.36~3.61 kg）

投与方法：被験物質を 8%N,N-dimethylformamide 含有 polyethylene glycol に溶解し、ペントバルビタールナトリウム麻酔下のウサギに 0 (溶媒)、1、及び 10 mg/kg の投与量の順に 60 分以上の投与間隔で静脈内投与した。投与前並びに投与後 0, 1, 3, 5, 10, 30, 及び 60 分の呼吸数、呼吸深

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

度、血圧、及び心拍数を集計し、投与前並びに投与後 1, 3, 5, 10, 30, 及び 60 分の心電図を集計した。

結果：対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	投与後時間 (分)	投与量 (mg/kg)	
		1	10
収縮期血圧	0		▽79
	1		▼82
	3		▼90
平均血圧	0		▼69
	1		▼70
	3		▼83
	5		▽89
拡張期血圧	0		▼54
	1		▼60
	3		▼76
	5		▽84
呼吸数	0		▲195
	1		△170

統計学的有意差：△▽： $p \leq 0.05$ 、▲▼： $p \leq 0.01$ (Dunnett 検定または Mann-Whitney の U 検定)
表中の数値は変動の目安として対照値を 100 とした場合の値を示した。

10 mg/kg の投与量で投与直後から投与後 3 分まで収縮期血圧が低下し、投与直後から投与後 5 分まで平均血圧及び拡張期血圧が低下した。また、当該投与量で投与直後から投与後 1 分まで呼吸数が増加し、呼吸深度が低下した。

1 mg/kg の投与量では明確な影響は認められなかった。

4) マウスの消化管系に及ぼす影響

供試動物：Crlj: CD1 (ICR) 系 SPF マウス、1 群雄 6 匹、5 週齢 [体重範囲；22.9~27.1 g 及び 22.6~26.4 g (追加試験)]

投与方法：被験物質を 0.5%CMC-Na に懸濁して 50, 150, 及び 450 mg/kg の投与量で経口投与した。対照群には 0.5%CMC-Na を同様に投与した。投与後 10 分に 5%炭末懸濁液を 0.1 mL/10 g で経口投与し、その 30 分後に動物を屠殺して小腸を摘出し、炭末の移動距離及び小腸の長さを測定して炭末の移動率を求めた。なお、当初試験で最低用量 (50 mg/kg) まで被験物質の影響が認められたことから、無影響量を確認するため、5, 15, 及び 45 mg/kg の投与量で追加試験を行った。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

結果：対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	投与量 (mg/kg)					
	5	15	45	50	150	450
炭末の移動率				▲181	▲191	▲208

統計学的有意差：△▽： $p \leq 0.05$ 、▲▼： $p \leq 0.01$ (Dunnett 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示した。

450, 150, 及び 50 mg/kg 群で炭末の移動率が有意な高値を示し、小腸輸送能の亢進が認められた。
45, 15, 及び 5 mg/kg 群では明確な影響は認められなかった。

5) ラットの水及び電解質代謝に及ぼす影響

供試動物：Cri: CD (SD) 系 SPF ラット、1 群雄 6 匹、7 週齢 (体重範囲 ; 208~238 g)

投与方法：被験物質を 0.5%CMC-Na に懸濁して 50, 150, 及び 450 mg/kg の投与量で経口投与した。対照群には 0.5%CMC-Na を同様に投与した。その直後に 37°C に加温した生理食塩液を 25 mL/kg で経口的に負荷し、投与後 6 時間までの尿を採取して尿量、pH、比重、並びに尿中のナトリウム、カリウム、及びクロールを測定した。

結果：対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

検査項目	投与量 (mg/kg)		
	50	150	450
尿量		▽55	▽48
比重			▲102
クロール		▽58	

統計学的有意差：△▽： $p \leq 0.05$ 、▲▼： $p \leq 0.01$ (Dunnett 検定または Mann-Whitney の U 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示した。

450 mg/kg 群で尿量の減少及び尿比重の増加が認められ、150 mg/kg 群で尿量の減少及びクロール排出量の減少が認められた。

50 mg/kg 群では被験物質投与による影響は認められなかった。

以上の試験結果から、本剤はマウスの一般症状及び行動並びに消化管系、ラットの中枢神経系及び腎機能、並びにウサギの呼吸及び循環器系に明確な毒性的影響を示した。無影響量はマウスへの経口投与で 45 mg/kg、ラットへの経口投与で 50 mg/kg、麻酔ウサギへの静脈内投与で 1 mg/kg と考えられた。

「生体機能への影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	影響量 (mg/kg)	無影響量 (mg/kg)	結果の概要	
一般状態及び行動に及ぼす影響	マウス	経口 (0.5%CMC-Na)	0, 56.3, 113, 225, 450, 900, 1800	雄 5 匹 雌 5 匹	113	56.3	113 mg/kg 以上の群から異常歩行、正向反射低下、握力低下、耳介反射消失、角膜反射消失が見られ、450 mg/kg 以上の群で死亡が見られた。	
中枢神経系に及ぼす影響	自発運動量に及ぼす影響	マウス	経口 (0.5%CMC-Na)	0, 50, 150, 450	雄 6 匹	450	150	統計学的な有意差をベースとした評価法では影響の判定ができなかったものの、時間毎の反応で、抑制系の影響があったものと考えられた。
	抗痙攣作用	マウス	経口 (0.5%CMC-Na)	0, 50, 150, 450	雄 6 匹	450	150	450 mg/kg 群で死亡の発現例数(5/6 例)が増加傾向を示した(対照群は 2/6 例)。
	体温に及ぼす影響	ラット	経口 (0.5%CMC-Na)	0, 50, 150, 450	雄 6 匹	150	50	投与直前に比較して 150 mg/kg で投与後 180 分に、450 mg/kg で投与後 60、120、180 分に体温の低下が認められた。
呼吸・循環器系に及ぼす影響	ウサギ (麻酔下)	静脈内 (8%N,N-dimethyl formamide 含有 polyethylene glycol)	0, 1, 10	雄 4 匹	10	1	10 mg/kg 群で投与直後から、投与 1 分後まで呼吸数の増加、及び呼吸深度低下が認められ、投与 3 分後まで収縮血圧低下が、投与 5 分後まで平均及び拡張期血圧低下が見られた。	
消化管系に及ぼす影響	マウス	経口 (0.5%CMC-Na)	0, 5, 15, 45, 50, 150, 450	雄 6 匹	50	45	50 mg/kg 以上の群で小腸輸送能の亢進が認められた。	
水及び電解質代謝に及ぼす影響	ラット	経口 (0.5%CMC-Na)	0, 50, 150, 450	雄 6 匹	150	50	150 mg/kg で尿量とクロールの減少が、45 mg/kg で尿量の減少と尿比重の増加が認められた。	

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(15) 毒性機序解明試験

1)

(資料 毒性-25)

試験機関：

報告書作成年：

被験物質：ピリベンカルブ原体

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクミアイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

2)

(資料 毒性-26)

試験機関：

報告書作成年：

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクミアイ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および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

3)

(資料 毒性-27)

試験機関：

報告書作成年：

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクミアイ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および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

4)

(資料 毒性-28)

試験機関：

報告書作成年：

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

5)

(資料 毒性-29)

試験機関：

報告書作成年：：

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

6)

(資料 毒性-30)

試験機関 :

報告書作成年 :

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(資料 毒性-31)

7)

試験機関：

報告書作成年：

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

2. 代謝分解物

(1) KIE-9749 のラットにおける急性経口毒性試験 (毒性等級法)

(資料 代謝毒-1)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

被験物質: KIE-9749

供試動物: Sprague-Dawley CD (CrI:CD (SD) IGS BR) 系雌ラット、8~12 週齢、体重: 211~228 g、
1 群 3 匹

観察期間: 14 日間

投与方法: 被験物質を落花生油 BP に懸濁し、2000 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与前に動物を絶食させた。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を投与後 30 分、1、2、4 時間、その後は 1 日 1 回、14 日間観察した。被験物質投与直前、試験 7 日および 14 日に体重測定を行った。観察期間終了時に全生存動物を屠殺して肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000 (注)
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現時間および消失時間	毒性徴候なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000

(注) 原文報告書の記載は >2500 mg/kg。

全身毒性症状は認められなかった。全動物とも体重増加は正常であった。

試験終了時に屠殺した動物の剖検で、異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(2-1) KIE-9749 のラットを用いた 21 日間反復経口投与毒性試験

(資料 代謝毒-2-1)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

被験物質：KIE-9749

供試動物：Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crj:CD (SD)]、1 群雌雄各 6 匹、開始時 5 週齢 (体重範囲；雄 142~154 g、雌 119~131 g)

投与期間：21 日間 (2005 年 9 月 8 日~2005 年 9 月 29 日)

投与方法：検体を 0、500、2000、及び 5000 ppm の濃度で飼料に混入し、21 日間にわたって随時摂食させた。

観察・検査項目及び結果：

死亡率；生死を毎日観察した。

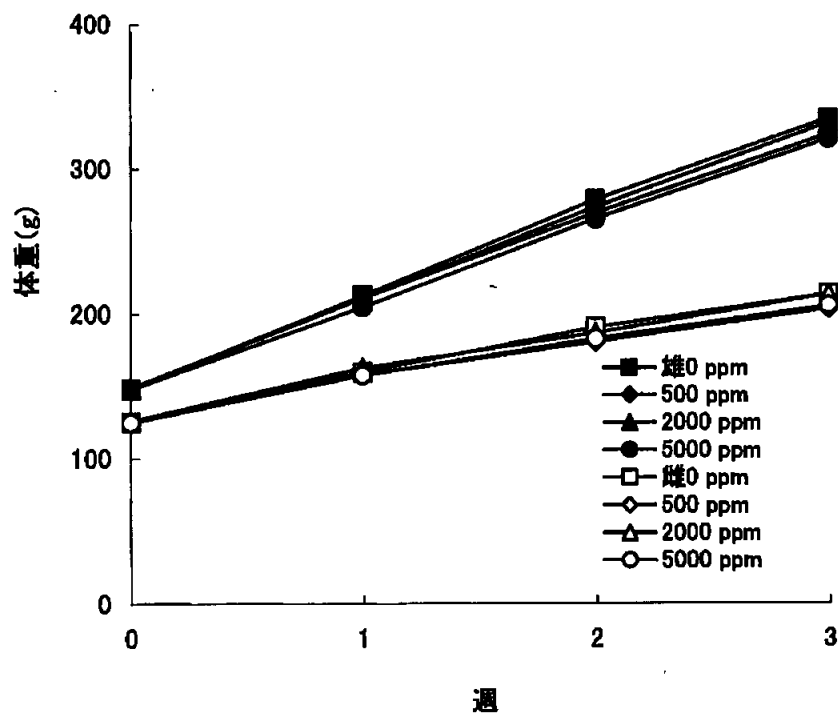
死亡例はなかった。

一般状態；一般状態を毎日観察した。さらに、触診を含む詳細な観察を週 1 回行った。

投与に関連した異常は認められなかった。

体重変化；投与開始前及び投与期間中に週 1 回、全動物の体重を測定した。有意差検定は Dunnett または Steel の多重比較法を用いた。体重変化を次図に示す。

体重変化



被験物質投与群の雌雄動物の体重は、全期間を通じて対照群の値とほぼ同等であった。

摂餌量；投与期間中に週1回、全動物の摂餌量を測定し、食餌効率も算出した。

摂餌量の変化を次表に示す。

摂餌量

検査時期 (週)	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	500	2000	5000	500	2000	5000
1			92			94
2			99			96
3			99			90
平均			97			93

統計学的有意差：△▽：p<0.05、▲▼：p<0.01 (Dunnett/Steelの多重比較法)

表中の数値は、変化の目安として対照群を100とした場合の値を示した。

試験期間中の摂餌量において、雌雄ともに統計学的に有意な変化は認められなかった。

5000 ppm 群の雌雄の投与1週時の摂餌量が低い傾向にあり、雄では投与2週以降回復した。

一方、雌では投与2および3週時の摂餌量も軽微ながら低い傾向にあった。その結果、同群の雌では総平均摂餌量が軽度に低値を示した。しかし、体重および食餌効率に明らかな影響がみ

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

られなかったことから、これらの摂取量の減少は摂取忌避が原因である可能性が考えられた。

食餌効率はすべての投与群の雌雄で対照群と同程度であった。

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。

平均検体摂取量

投与量 (ppm)		500	2000	5000
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	42.0	165	418
	雌	45.7	181	429

血液学的検査；投与終了後に全動物を対象として、エーテル麻酔下で後大静脈から採血し、以下の項目を検査した。

ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、網赤血球数、白血球数、白血球のディファレンシャルカウント [リンパ球、好中球、単球、好酸球、好塩基球、大型非染色球]

対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

血液学的検査

検査項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	500	2000	5000	500	2000	5000
平均赤血球血色素濃度	99	100	99	99	97▼	98▼

統計学的有意差：△▽：p<0.05、▲▼：p<0.01 (Dunnett/Steelの多重比較法)

表中の数値は、変化の目安として対照群を100とした場合の値を表した。

5000および2000 ppm群の雌に、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) の有意な減少が認められた。しかし、これらの変化はいずれも3%以下と軽微であるうえ、その他の血液学的検査項目に変化は認められなかったため、この減少は生物学のおよび毒性学的意義はないと考えられた。一方、同用量群の雄および500 ppm群の雌雄において統計学的に有意な変化は認められなかった。

血液生化学的検査；血液学的検査と同時期に採血し、得られた血漿を用いて以下の項目を検査した。

アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGTP)、クレアチニン、尿素窒素、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アルブミン/グロブリン比、血糖、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、総ビリルビン、カルシウム、無機リン、ナトリウム、カリウム、塩素

対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

血液生化学的検査

検査項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	500	2000	5000	500	2000	5000
総ビリルビン	83	▼83	▼67	100	83	▼83
クレアチニン	111△	100	96	97	94	▽91
アルブミン	96	98	▽96	99	100	103

統計学的有意差：△▽：p<0.05、▲▼：p<0.01 (Dunnettの多重比較法)

表中の数値は、変化の目安として対照群を100とした場合の値を表した。

2000 ppm 群以上の雌雄および500 ppm 群の雄で総ビリルビンの有意な減少ないし減少傾向が認められた。これらの変化は親化合物 KIF-7767 原体の21日間および90日間反復経口投与毒性試験でも観察されており、投与に関連した変化であると考えられた。しかし、高度の貧血など総ビリルビン減少に深く関連するその他の検査項目の変化は認められなかった。

また、5000 ppm 群では雄にアルブミンの有意な減少、雌にクレアチニンの有意な減少が認められた。しかし、アルブミンの減少は軽微であり、クレアチニンの減少についてもこれと関連づけられるその他の所見は認められなかったことから、これらの減少に大きな毒性学的意義があるとは考えられなかった。

500 ppm 群の雄ではクレアチニンの有意な増加が観察されたが、この2000および5000 ppm 群での変化が認められないことから、被験物質投与と関連するものではないと考えられた。

臓器重量：投与終了後に全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、体重比も算出した。

脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓（両側）、脾臓、副腎（両側）、精巣（両側）、卵巣（両側）

対照群と比較して統計学的有意差の認められた臓器、組織を次表に示す。

臓器重量

検査項目		投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		500	2000	5000	500	2000	5000
脳	絶対重量	97	▽95	▽96			
	体重比	102	97	101			
心臓	絶対重量				96	△111	100
	体重比				102	△113	105
胸腺	絶対重量				85	83	▼76
	体重比				90	84	▽81
肝臓	絶対重量	96	109	▲121	98	108	112
	体重比	99	▲111	▲128	103	109	▲118

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

統計学的有意差：△▽：p<0.05、▲▼：p<0.01 (Dunnett/Steel の多重比較法)

表中の数値は、変化の目安として対照群を 100 とした場合の値を表した。

5000 ppm 群の雌雄および 2000 ppm 群の雄では肝臓の体重比の有意な増加が認められ、5000 ppm 群の雄では絶対重量にも有意な増加が観察された。これらの変化は親化合物 KIF-7767 原体の 21 日間および 90 日間反復経口投与毒性試験でも観察されており、光異性体である本被験物質の主な標的臓器も肝臓であると考えられた。また、5000 ppm 群の雌では胸腺の絶対重量および体重比に有意な減少が認められた。

5000 および 2000 ppm 群の雄では脳の絶対重量に有意な減少が観察されたが、この変化は投与用量と明瞭に関連するものではなく、また体重比には変化がなかった。

2000 ppm 群の雌では心臓の絶対重量および体重比に有意な増加が観察されたが、これらの変化に投与用量との関連性はなかった。

500 ppm 群では、雌雄において統計学的に有意な臓器重量の変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；投与終了後に全動物を対象として検査した。

雌雄のいずれの投与群においても、観察された剖検所見の発生頻度に統計学的に有意な増減は認められなかった。

以上の結果から、雄では 500 ppm 以上の投与群、雌では 2000 ppm 以上の投与群で被験物質投与に関連づけられる変化が観察された。主な標的臓器は肝臓であると考えられた。従って、親化合物との毒性学的比較を目的として実施する本被験物質の 90 日間反復経口投与毒性試験では、その最高用量を「KIF-7767 原体の 90 日間反復経口投与毒性試験」で用いた用量 (3200 ppm) と同等とすることが適切と考えられた。また最低用量は 500 ppm より低い用量を選択するのが適切であると考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

(2-2) KIE-9749 のラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験

(資料 代謝毒-2-2)

試験機関：

【GLP 対応】

報告書作成年：

被験物質：KIE-9749

供試動物：Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crj:CD (SD)]、1 群雌雄各 10 匹、開始時 5 週齢（体重範囲：
雄 148～175 g、雌 118～135 g）

投与期間：13 週間（雄：2006 年 7 月 13 日～2006 年 10 月 12 日、雌：2006 年 7 月 20 日～2006 年 10 月
19 日）

投与方法：検体を 0、200、800、及び 3200 ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたって随時投食させた。

用量設定根拠：Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crj:CD (SD)] を用い、0、500、2000、及び 5000 ppm
の投与量で実施した 21 日間反復経口投与毒性試験の結果、5000 ppm 群の雌雄で摂餌量が減少し、
5000 ppm 群の雌雄と 2000 ppm 群の雄で肝臓重量の増加が認められ、5000 及び 2000 ppm 群の
雌雄と 500 ppm 群の雄で血液生化学的変化が認められた。KIE-9749 はピリベンカルブの変化生
成物であり、本試験の目的は親化合物との毒性学的比較であるため、その 90 日間反復経口投与毒
性試験（資料 毒性-7）における最高用量を本試験の最高用量とした。最低用量は何の毒性徴候も
生じないと予測される 500 ppm より低い用量を選択するのが適切と考え、公比を 4 として中間用
量を 800 ppm とし、最低用量に 200 ppm を設定した。

観察・検査項目及び結果：

死亡率；生死を毎日観察した。

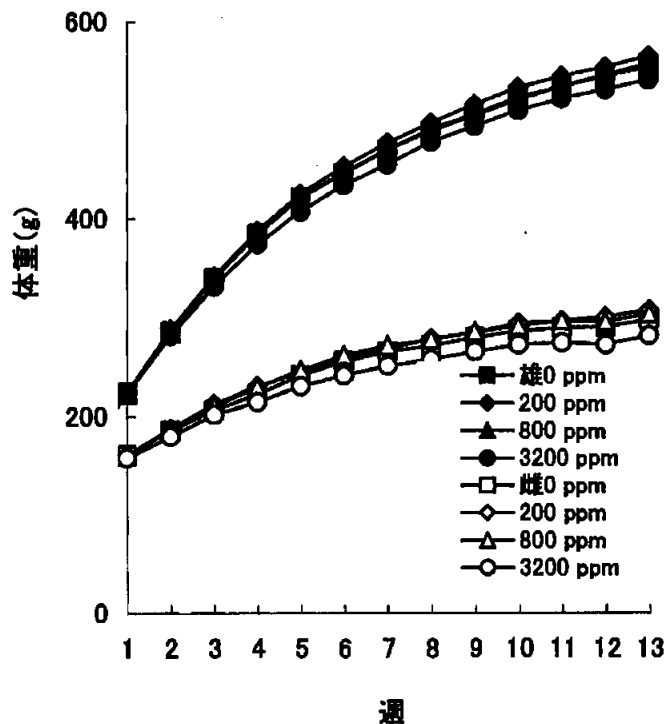
死亡例はなかった。

一般状態；一般状態を毎日観察した。さらに、触診を含む詳細な観察を週 1 回行った。

投与に関連した異常は認められなかった。

体重変化；投与開始前及び投与期間中に週 1 回、全動物の体重を測定した。有意差検定は Dunnett または
Steel の多重比較法を用いた。体重変化を次図に示す。

体重変化



3200 ppm 群の雌雄で体重は対照群と比較して低値傾向で推移したが、統計学的有意差はなく、検体投与による明らかな影響とは判断できなかった。
800 及び 200 ppm 群の雌雄では体重の推移は対照群と同様であった。

摂餌量；投与期間中に週 1 回、全動物の摂餌量を測定し、食餌効率も算出した。

摂餌量について、対照群と比較して統計学的有意差の認められた週を次表に示す。

摂餌量

検査時期 (週)	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	200	800	3200	200	800	3200
3			▽93			
4			▽92			
9				△112		

統計学的有意差：△▽：p<0.05、▲▼：p<0.01 (Dunnett/Steel の多重比較法)

表中の数値は、変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示した。

3200 ppm 群の雄で投与 3 及び 4 週目に摂餌量が有意な低値を示したが、一時的かつ軽度な変動であることから、検体投与との関連はないと判断した。

200 ppm 群の雌で 9 週目に摂餌量が有意な高値を示したが、用量依存性はなく、偶発的変化で

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

あると判断した。

従って、いずれの投与群の雌雄でも投与による変化はなかった。

食餌効率はすべての投与群の雌雄で対照群と同程度であった。

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。

平均検体摂取量

投与量 (ppm)		200	800	3200
検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	11.9	48.2	190
	雌	14.3	54.0	219

血液学的検査；投与終了後に全動物を対象として、エーテル麻酔下で後大静脈から採血し、以下の項目を検査した。

ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、網赤血球数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、白血球数、白血球のディファレンシャルカウント [リンパ球、好中球、単球、好酸球、好塩基球、大型非染色球]

対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

血液学的検査

検査項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	200	800	3200	200	800	3200
ヘマトクリット値			▽97			
血色素量			▽97			▼97

統計学的有意差：△▽：p<0.05、▲▼：p<0.01 (Dunnett/Steel の多重比較法)

表中の数値は、変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表した。

3200 ppm 群の雌雄で血色素量及び/またはヘマトクリット値の減少が認められ、軽度の貧血傾向が観察され、被験物質投与の影響と判断された。

800 及び 200 ppm 群の雌雄では投与による変化はなかった。

血液生化学的検査；血液学的検査と同時期に採血し、得られた血漿を用いて以下の項目を検査した。

アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGTP)、クレアチニン、尿素窒素、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アルブミン/グロブリン比、血糖、総コレステロール、トリグリセライド、総ビリルビン、カルシウム、無機リン、ナトリウム、カリウム、塩素

対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

血液生化学的検査

検査項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	200	800	3200	200	800	3200
GGTP			△1			
総コレステロール			▲134			△126
トリグリセライド			▽56			
総ビリルビン			▼71			

統計学的有意差：△▽：p<0.05、▲▼：p<0.01 (Dunnett/Steelの多重比較法)

表中の数値は、変動の目安として対照群を100とした場合の値を表した(ただし、GGTPは対照群の雌雄の値が0 U/Lのため実数値を記載した)。

3200 ppm 群の雌雄で総コレステロールが増加し、さらに、3200 ppm 群の雄でGGTPが増加し、トリグリセライド及び総ビリルビンが減少した。総コレステロール及びトリグリセライドの変化は、対応する変化として肝臓重量の増加及び肝臓の病理組織学的変化(肝細胞肥大)が認められたことから、検体投与による影響であると推察された。総ビリルビンの減少は21日間反復経口投与毒性試験でも観察されていることから、投与に関連した変化と判断した。GGTPの増加に関しては、雄の個別数値を検討したところ、1 U/L以上の値を示した動物数は対照群で10例中4例、3200 ppm 群で10例中9例であり、明らかに3200 ppm 群において高値を示す動物が増加していることから、検体投与に関連した変化と判断した。

800及び200 ppm 群の雌雄では投与による変化はなかった。

尿検査：投与13週目に全動物を対象として以下の項目を検査した。

尿比重、ブドウ糖、ビリルビン、ケトン体、潜血、pH、蛋白質、ウロビリノーゲン、尿色、尿量、尿沈渣

対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

尿検査

性別	雄				雌			
	0	200	800	3200	0	200	800	3200
投与量 (ppm)								
検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
ケトン体 -					5	10	5	4
±					3	0	5	3
+					2	0	0	3
++					0	0	0	0
+++					0	0	0	0
++++					0	0	0	0
						*		

統計学的有意差：*：p<0.05 (Steelの多重比較法)

-：陰性、±：微量、+：軽度、++：中等度、+++：重度、++++：極度

200 ppm 群の雌でケトン体が有意に減少したが、用量依存性はなく、偶発的変化であると判断した。

従って、いずれの投与群の雌雄でも投与による変化はなかった。

眼科学的検査；投与開始前に全動物を対象として、投与 13 週目に対照群及び 3200 ppm 群の全動物を対象として検査した。

投与 13 週目の検査において異常は認められなかった。

臓器重量；投与終了後に全動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、下垂体、甲状腺（両側）、心臓、胸腺、肝臓、腎臓（両側）、脾臓、副腎（両側）、精巣（両側）、精巣上体（両側）、卵巣（両側）、子宮

対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

臓器重量

検査項目		投与量 (ppm)					
		雄			雌		
		200	800	3200	200	800	3200
甲状腺	絶対重量			△119			
	体重比			△122			▲115
心臓	体重比						△106
肝臓	体重比			▲115			▲116
副腎	体重比						△116

統計学的有意差：△▽：p<0.05、▲▼：p<0.01 (Dunnett/Steelの多重比較法)

表中の数値は、変動の目安として対照群を100とした場合の値を表した。

3200 ppm 群の雌雄で肝臓及び甲状腺の体重比重量が増加し、3200 ppm 群の雄では甲状腺の絶対重量も増加した。肝臓重量の増加は、対応する肝臓の病理組織学的変化(肝細胞肥大)が雌雄ともに観察されていることから、投与に起因する変化であると考えられた。また、甲状腺重量の増加は、対応する甲状腺の病理組織学的変化(濾胞上皮細胞肥大)が雄のみであるもの認められていることから、雌雄ともに投与に関連する変化であると判断した。

さらに、3200 ppm 群の雌で心臓及び副腎の体重比重量が有意に増加したが、その他の検査において対応する変化がないことから、偶発的变化であると判断した。

800 及び 200 ppm 群の雌雄では投与による変化はなかった。

肉眼的病理検査；投与終了後に全動物を対象として検査した。

いずれの投与群の雌雄でも検体投与に関連する異常は認められなかった。

病理組織学的検査；対照群及び3200 ppm 群の全動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、鏡検した。

脳(大腦、小脳、橋、及び延髄)、脊髄(頸部、胸部、及び腰部)、坐骨神経(片側)、下垂体、胸腺、甲状腺(両側)、上皮小体(両側)、副腎(両側)、脾臓、骨及び骨髓(胸骨及び片側大腿骨)、リンパ節(頸部及び腸間膜)、心臓、大動脈、唾液腺(顎下腺及び舌下腺)、食道、胃(前胃及び腺胃)、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、鼻腔、咽頭、喉頭、気管、肺(気管支を含む)、腎臓(両側)、膀胱、精巢(両側)、精巢上体(両側)、前立腺、精囊(両側)、凝固腺(両側)、卵巣(両側)、子宮(角部及び頸部)、臍、眼球(網膜及び視神経を含む、両側)、ハーダー腺(両側)、下腿三頭筋(片側)、膝関節(片側)、皮膚(腰背部)、乳腺(腹部)、肉眼的異常部位

200 及び 800 ppm 群の全動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、鏡検した。
肝臓、脾臓、甲状腺、及び肉眼的異常部位

対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

病理組織学的検査

性別	雄				雌			
	0	200	800	3200	0	200	800	3200
投与量 (ppm)	0	200	800	3200	0	200	800	3200
所見/検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
脾臓：褐色色素沈着減少	0	0	0	4	0	0	0	0
肝臓：びまん性肝細胞肥大	0	0	0	▲10	0	0	0	0
肝臓：小葉中心性肝細胞肥大	0	0	0	0	0	0	0	2
甲状腺：濾胞上皮細胞肥大	0	0	0	△5	0	0	0	0

統計学的有意差：△▽：p<0.05、▲▼：p<0.01 (Fisherの正確確率検定)

3200 ppm 群の雄全例で肝臓にびまん性肝細胞肥大が、3200 ppm 群の雌 2 例で肝臓に小葉中心性肝細胞肥大が認められた。さらに、3200 ppm 群の雄で甲状腺の濾胞上皮細胞肥大の発生頻度が増加し、統計学的に有意ではないものの、脾臓の褐色色素沈着減少が 4 例に認められた。これらの所見は投与に関連した変化と考えられた。

800 及び 200 ppm 群の雌雄では投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果から、本検体のラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験における影響として、3200 ppm 群の雌雄で軽度の貧血、血液生化学的変化、肝臓及び甲状腺重量の増加、並びに肝臓、甲状腺、及び/または脾臓に病理組織学的変化が認められたことから、無毒性量は雌雄ともに 800 ppm (雄：48.2 mg/kg/day、雌：54.0 mg/kg/day) であると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

(3) のラットにおける急性経口毒性試験 (毒性等級法) (資料 代謝毒-3)

試験機関：
[GLP 対応]
報告書作成年：

被験物質：

供試動物：Sprague-Dawley (CrI:CD (SD)) 系雄ラット、8~9 週齢
体重：178.16~195.58 g、1 群 3 匹

観察期間：14 日間

投与方法：被験物質を 0.5%CMC-Na 水溶液に懸濁し、300 mg/kg または 2000 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与前に動物を約 16 時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を投与後 30 分まで連続して、その後は 1, 2, 4, 6 時間に、さらにその後は 1 日 1 回、14 日間観察した。被験物質投与直前、投与後 3 日、7 日および 14 日に体重測定を行った。観察期間終了時に全生存動物を屠殺して肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	300、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	300~2000
死亡開始時間および終了時間	1 日
症状発現時間および消失時間	30 分~1 日
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	< 300
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	300

一般状態では、自発運動の低下、自発運動の消失、鼻汁、流涙、流涎、不規則呼吸、呼吸数減少、腹臥位、横臥位が見られた。2000 mg/kg 群では投与後 1 日で全例が死亡した。

体重では 300 mg/kg 群で順調な増加が認められた。

剖検では、2000 mg/kg 群の死亡例を含めて、全例で肉眼的異常所見は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

(5) のラットにおける急性経口毒性試験 (毒性等級法) (資料 代謝毒-5)

試験機関：
[GLP 対応]
報告書作成年：

被験物質：

供試動物：Sprague-Dawley (CrI:CD (SD)) 系雌ラット、8~9 週齢
体重：179.50~207.21 g、1 群 3 匹

観察期間：14 日間

投与方法：被験物質を 0.5%CMC-Na 水溶液に懸濁し、300 mg/kg または 2000 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与前に約 16 時間、動物を絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を投与後 30 分まで連続して、その後は 1, 2, 4, 6 時間に、さらにその後は 1 日 1 回、14 日間観察した。被験物質投与直前、3 日、7 日および 14 日に体重測定を行った。観察期間終了時に全生存動物を屠殺して肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	300、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	300~2000
死亡開始時間および終了時間	投与後 1 日
症状発現時間および消失時間	投与後 30 分~1 日
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	< 300
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	300

一般状態では、自発運動の低下、流涙、流涎、下痢、粘液便、軟便、立毛、鼻端の汚れが見られた。

2000 mg/kg 群では全例が死亡した。

体重では 300 mg/kg 群で順調な増加が認められた。

剖検では、2000 mg/kg 群の死亡例を含めて、全例で肉眼的異常所見は認められなかった。

(6) KIE-9749 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代謝毒-6)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

被験物質：KIE-9749

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用い、フェノルピタール/ β -ナフトフラボンで薬物代謝酵素系を誘導した雄ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下で Ames らのプレート法を用いて変異原性を検索した。溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて被験物質溶液を調製した。処理容量は 0.1 ml /プレートとし、50, 150, 500, 1500, 5000 μ g/プレートの 5 用量で試験を実施した。1 用量につき 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニー数を計数した。1 菌株以上において用量に相関した復帰変異頻度の増加が認められた場合および 1 用量以上において再現性のある増加が認められた場合に変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠：

結 果：結果を次表に示した。

2 回の独立した復帰突然変異試験の結果、被験物質処理群では、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの処理濃度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、陽性対照群では、明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、被験物質は、代謝活性化系を含む本試験条件下において復帰突然変異誘発性を有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

表-1 復帰突然変異試験成績 (実験 1 注)

(表中の値は 3 枚のプレートの平均値)

薬 剤	濃度 (μg / プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 <i>uvrA</i>	TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	—	—	19	77	19	12	13
KIE-9749	50	—	16	101	14	12	11
	150	—	12	79	22	9	10
	500	—	17	81	20	14	15
	1500	—	13	81	27	16	10
	5000	—	13	67	21	16	7
陽性 対 照	ENNG	2	639	435	298	99	1041
	ENNG	3					
	ENNG	5					
	4NQO	0.2					
	9AA	80					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	17	104	14	24	14
KIE-9749	50	+	13	111	11	26	20
	150	+	20	104	10	26	21
	500	+	16	106	11	27	16
	1500	+	19	111	12	26	18
	5000	+	19	107	15	21	17
陽性 対 照	2AA	1	574	964	343	180	442
	2AA	2					
	2AA	10					
	BP	5					

注：原文報告書では用量設定試験と称している。

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド

9AA : 9-アミノアクリジン

2AA : 2-アミノアントラセン

BP : ベンゾ (a) ピレン

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

表-2 復帰突然変異試験成績 (実験 2 注)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2 <i>uvrA</i>	TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	—	—	20	91	19	22	13
KIE-9749	50	—	16	90	24	23	15
	150	—	19	87	16	21	13
	500	—	21	91	18	23	16
	1500	—	12	97	22	27	22
	5000	—	18	109	15	21	21
陽性 対 照	ENNG	2	1280	672	826	161	546
	ENNG	3					
	ENNG	5					
	4NQO	0.2					
	9AA	80					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	30	79	17	25	17
KIE-9749	50	+	27	75	12	30	15
	150	+	26	86	21	24	14
	500	+	24	81	12	24	16
	1500	+	17	87	16	27	18
	5000	+	25	90	25	25	20
陽性 対 照	2AA	1	792	470	386	218	266
	2AA	2					
	2AA	10					
	BP	5					

注：原文報告書では本試験と称している。

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド

9AA : 9-アミノアクリジン

2AA : 2-アミノアントラセン

BP : ベンゾ (a) ピレン

(7) KIE-9749のCHL細胞を用いた*in vitro*染色体異常試験

(資料 代謝毒-7)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：

被験物質：KIE-9749

試験方法：チャイニーズハムスター肺（CHL）細胞を用いて、フェノバルビタール/β-ナフトフラボンで薬物代謝酵素系を誘導した雄ラットの肝臓から調製した代謝活性化系（S9 mix）の存在下および非存在下で被験物質の染色体異常誘発性を検索した。

溶媒としてジメチルスルホキシド（DMSO）を用い、実験1では、短時間処理法としてS9 mixの存在下および非存在下で被験物質を7.07～169.6 μg/mlの濃度で6時間処理した。被験物質処理後新しい培地に交換し、18時間培養後に染色体標本を作製した。

実験2では、連続処理法としてS9 mixの非存在下で被験物質を7.07～113.06 μg/mlの濃度で24時間連続処理した。また、S9 mixの存在下で被験物質を14.13～226.13 μg/mlの濃度で6時間処理し、被験物質処理後新しい培地に交換し、18時間培養後に染色体標本を作製した。

何れの場合も溶媒対照ならびに陽性対照（マイトマイシンCまたはシクロホスファミド）を同時に試験し、すべて各濃度あたり2連制で培養した。

染色体異常を解析する用量は、実験1においては、S9 mix非存在下では14.13, 28.27, 56.53 μg/mlを、S9 mix存在下では56.53, 113.06, 169.6 μg/mlを選択し、実験2においてはS9 mix非存在下の24時間処理では14.13, 28.27, 56.53 μg/mlを、S9 mix存在下の6時間処理では28.27, 56.53, 113.06, 169.6 μg/mlを選択した。

すべてのスライド標本にコード番号を付し、盲検法で、1濃度あたり200個の分裂中期細胞を観察した。データはSavageらの分類に従って記録し、各処理群における染色体異常を持つ細胞の出現頻度（ギャップを除く）をフィッシャーの直接確率検定法を用いて溶媒対照群を比較した。

用量設定根拠：

在下の6時間処理群では113.06 μg/mlで約50%の抑制が認められた。S9存在下の6時間処理群では急

以上の結果から、実験1においては、S9 mix非存在下、存在下とも169.6 μg/mlを、実験2の24時間処理（S9 mix非存在下）では113.06 μg/ml、6時間処理（S9 mix存在下）では226.13 μg/mlを最高用量として試験を実施した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

結 果：結果を表に示した。

被験物質は代謝活性化系 (S9 mix) の存在下において最高用量である169.6 µg/mlで構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加を示した。代謝活性化系の非存在下では6時間処理、24時間処理とも異常細胞の出現頻度に有意な増加は見られなかった。また、陽性対照として用いたマイトマイシンCおよびシクロホスファミドは構造的染色体異常の明らかな増加を誘発した。

以上の結果より、被験物質は代謝活性化を含む本試験条件下においてチャイニーズハムスター肺 (CHL) 細胞に対し染色体異常誘発性を有すると判断される。

表-1 染色体異常試験結果 (実験1: 短時間処理)

薬 剤	濃 度 ($\mu\text{g/mL}$)	処 理 時 間 h	標 本 作 成 時 間 h	S9 mix の 有 無	分 裂 指 数 (%)	倍 数 性 細 胞 (%)	観 察 細 胞 数	各染色体異常を有する細胞数(%)						異常細胞の 出現頻度 (ギャップ を除く) (%)	判 定
								染色分体型		染色体型		そ の 他	ギ ャ ッ プ		
								切 断	交 換	断 片	交 換				
溶媒対照 (DMSO)	—	6	18	—	100	0	200	0	0	0.5	0	0	0	0.5	
KIE-9749	14.13	6	18	—	139	0	200	0	0	0	0	0	0.5	0	—
	28.27				158	0	200	0	0.5	0	0.5	0	0	1.0	—
	56.53				159	0	200	0	0.5	0.5	0	0	1.5	1.0	—
	113.06				0	Tbx									
陽性対照 (MMC)	0.1	6	18	—	129	0	100	35.0	62.0	13.0	6.0	7.0	18.0	78.0***	+
溶媒対照 (DMSO)	—	6	18	+	100	0	200	0	0	0	0	0	0.5	0	
KIE-9749	56.53	6	18	+	71	0	200	0	0	0	0	0	1.0	0	—
	113.06				110	0	200	0.5	0	0	0	0	0	0.5	—
	169.6				112	0	200	2.0	3.5	0.5	2.0	0.5	1.5	7.0***	+
陽性対照 (CP)	5	6	18	+	139	0	150	11.3	9.3	8.0	1.3	0	10.7	25.3***	+

MMC: マイトマイシンC、 CP: シクロホスファミド

Tbx: 毒性のため観察せず

フィッシャーの直接確率検定法 ***: $p < 0.001$

表-2 染色体異常試験結果 (実験2: 連続処理及び短時間処理)

薬 剂	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処 理 時 間 h	標 本 作 成 時 間 h	S9 mix の 有 無	分 裂 指 数 (%)	倍 数 性 細 胞 (%)	観 察 細 胞 数	各染色体異常を有する細胞数(%)						異常細胞の 出現頻度 (ギャップ を除く) (%)	判 定	
								染色分体型		染色体型		そ の 他	ギ ャ ッ プ			
								切 断	交 換	断 片	交 換					
溶媒対照 (DMSO)	—	24	0	—	100	0	200	0	0	0	0	0	0	0	/	
KIE-9749	14.13	24	0	—	89	0	200	0	0	0.5	0	0	0	0.5	—	
	28.27				51	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	56.53				65	0	200	0.5	0	0	0	0	0	1.0	0.5	—
陽性対照 (MMC)	0.05	24	0	—	68	0	100	16.0	33.0	0	4.0	0	12.0	45.0***	+	
溶媒対照 (DMSO)	—	6	18	+	100	0	200	0.5	0	0	0	0	0.5	0.5	/	
KIE-9749	28.27	6	18	+	132	0	200	0	0	0	1.0	0	0	1.0	—	
	56.53				116	0	200	0	0.5	0	0	0	1.5	0.5	—	
	113.06				128	1.0	200	0.5	0	0.5	1.0	0	0	2.0	—	
	169.6				85	0.5	200	6.5	8.5	0	0.5	0	3.5	13.0***	+	
陽性対照 (CP)	5	6	18	+	79	0.5	200	7.0	18.0	0	0	0	5.0	23.0***	+	

MMC: マイトマイシンC、 CP: シクロホスファミド

フィッシャーの直接確率検定法 ***: $p < 0.001$

(8) KIE-9749のマウスを用いた小核試験

(資料 代謝毒-8)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：

被験物質：KIE-9749

供試動物：CD-1™ (ICR) BR雄マウス (小核試験投与時 5~8週齢、体重：22~30 g)

1群雄7匹 (陽性対照群のみ雄5匹)

試験方法：被験物質をラッカセイ油に懸濁し、250, 500および1000 mg/kgの用量で胃ゾンデを用いて単回経口投与した。陰性対照群は媒体であるラッカセイ油を同様に単回経口投与した。被験物質投与群および溶媒対照群ともに投与容量は10 ml/kgとした。陽性対照群はシクロホスファミドを50 mg/kgの用量で単回経口投与した。

投与24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骨髓塗抹標本を作製した。スライド標本はメタノールで固定後、メイグリュンワルド/ギムザ液で染色した。最高用量群および陰性対照群については投与48時間後にも同様に骨髓塗抹標本を作製した。

すべてのスライドにコード番号を付し、盲検法により鏡検した。1動物あたり2000個の多染性赤血球 (幼若赤血球) を観察し、小核を有する多染性赤血球の数を計数した。さらに1000個の赤血球を観察し、正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した。

被験物質投与群における小核を有する多染性赤血球の数をStudentのt検定を用いて溶媒対照群と比較した。

用量設定根拠：

結 果：骨髓標本の観察結果を表に示した。

被験物質投与群では、円背位、眼瞼下垂、昏睡、運動失調、開脚歩行の症状が観察され、1000 mg/kg投与群の1例が死亡したが、いずれの用量、標本作製時間においても小核を有する多染性赤血球の頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。また、いずれの用量、標本作製時間においても正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合に有意な減少は認められなかった。

一方、陽性対照物質であるシクロホスファミドを投与した陽性対照群では小核を有する多染性赤血球の頻度に明らかな増加が認められた。よって、本小核試験は有効であると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

観察結果

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	MNPCE % (平均±標準偏差)	PCE/(NCE+PCE)# (平均値±標準偏差)
24時間	陰性対照 (ラッカセイ油)	—	雄	7	0.09±0.09	58.3±6.2
	KIE-9749	250	雄	7	0.06±0.07	54.4±5.8
		500		7	0.07±0.06	56.5±6.8
		1000		7	0.08±0.06	54.9±4.8
陽性対照 (シロホスファミド)	50	雄	5	2.02±1.01	66.1±5.9	
48時間	陰性対照	—	雄	7	0.13±0.08	57.8±8.0
	KIE-9749	1000	雄	7	0.08±0.05	51.8±5.4

PCE：多染性赤血球、 NCE：正染性赤血球

MNPCE：多染性赤血球2000個のうち小核を有する多染性赤血球の割合 (%)

申請者註：申請者がPCE/NCEの値から計算した。

以上の結果より、本試験条件下において、被験物質は骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

(9) の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代謝毒-9)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

被験物質：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA98、TA100、TA1535、TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA (pkM101) 株を用い、フェノバルビタール/5,6-ベンゾフラボンで薬物代謝酵素系を誘導した雄ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下で Ames らのプレインキュベーション法を用いて変異原性を検索した。

溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて被験物質溶液を調製した。312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/プレート の 5 用量で試験を実施した。1 用量につき 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニー数を計数した。同一条件で 2 回試験を行い、試験結果の信頼性および再現性を確認した。

復帰変異コロニー数が陰性対照群の 2 倍以上に増加し、その結果に再現性および用量依存性が認められた場合を陽性と判定した。

用量設定根拠：

この結果から、S9 mix 非存在下および存在下ともに 5000 µg/プレートを最高用量として 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/プレート の 5 用量を設定した。

結果：結果を次表に示した。

2 回の独立した復帰突然変異試験の結果、被験物質処理群では、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの処理濃度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、陽性対照群では、明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、本被験物質は代謝活性化系を含む本試験条件下において復帰突然変異誘発性を有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

1. 用量設定試験の結果

(表中の値は2枚のプレートの平均値)

試験物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2uvz4 (pKM101)	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	110	94	15	22	12	
	312.5	—	121	84	14	14	12	
	625	—	133	100	12	15	14	
	1250	—	120	82	17	17	12	
	2500	—	132	92	18	20	11	
	5000	—	131	86	18	20	11	
陽性 対 照	SA	1.5	—	548	465	373	548	601
	ENNG	1.0	—					
	2-NF	5.0	—					
	9-AA	80.0	—					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	129	91	18	17	13	
	312.5	+	131	99	24	17	12	
	625	+	147	83	19	25	14	
	1250	+	134	98	21	18	13	
	2500	+	144	86	16	21	14	
	5000	+	135	92	21	20	13	
陽性 対 照	2-AA	1.0	+	425	431	153	397	128
		2.0	+					

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

SA : アジ化ナトリウム

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

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

2. 本試験の結果 (1回目)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

試験物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2uvrA (pKM101)	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	115	95	12	15	7	
	312.5	—	110	94	16	14	11	
	625	—	122	94	13	16	11	
	1250	—	119	83	11	14	13	
	2500	—	133	97	10	12	11	
	5000	—	117	76	15	13	12	
陽性 対 照	SA	1.5	—	564	428	309	438	531
	ENNG	1.0	—					
	2-NF	5.0	—					
	9-AA	80.0	—					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	114	89	15	18	14	
	312.5	+	113	85	10	25	13	
	625	+	116	86	11	17	11	
	1250	+	127	87	15	18	11	
	2500	+	130	90	14	22	14	
	5000	+	118	94	12	23	13	
陽性 対 照	2-AA	1.0	+	362	381	128	500	143
		2.0	+					

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

SA : アジ化ナトリウム

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

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

3. 本試験の結果 (2回目)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

試験物質	濃度 (μg / プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2uvzA (pKM101)	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	126	97	14	20	9	
	312.5	—	118	93	13	26	9	
	625	—	120	85	12	19	7	
	1250	—	134	83	11	18	6	
	2500	—	124	82	10	16	7	
	5000	—	125	72	14	19	8	
陽性 対照	SA	1.5	—	—	421	367	—	—
	ENNG	1.0	—	582	—	—	449	—
	2-NF	5.0	—	—	—	—	—	—
	9-AA	80.0	—	—	—	—	—	431
溶媒対照 (DMSO)	—	+	123	81	15	21	14	
	312.5	+	122	96	15	23	11	
	625	+	132	99	16	18	11	
	1250	+	128	102	14	21	10	
	2500	+	136	91	13	19	10	
	5000	+	118	94	11	19	14	
陽性 対照	2-AA	1.0	+	—	366	—	420	—
		2.0	+	367	—	139	—	186

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

SA : アジ化ナトリウム

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

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

(10)

の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代謝毒-10)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

被験物質：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA98、TA100、TA1535、TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA (pkM101) 株を用い、フェノバルビタール/5,6-ベンゾフラボンで薬物代謝酵素系を誘導した雄ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下で Ames らのプレインキュベーション法を用いて変異原性を検索した。

溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて被験物質溶液を調製した。312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/プレート の 5 用量で試験を実施した。1 用量につき 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニー数を計数した。同一条件で 2 回試験を行い、試験結果の信頼性および再現性を確認した。

復帰変異コロニー数が陰性対照群の 2 倍以上に増加し、その結果に再現性および用量依存性が認められた場合を陽性と判定した。

用量設定根拠：

この結果から、S9 mix 非存在下および存在下ともに 5000 µg/プレートを最高用量として 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/プレート の 5 用量を設定した。

結果：結果を次表に示した。

2 回の独立した復帰突然変異試験の結果、被験物質処理群では、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの処理濃度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、陽性対照群では、明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、本被験物質は代謝活性化系を含む本試験条件下において復帰突然変異誘発性を有しないと判断される。

1. 用量設定試験の結果

(表中の値は2枚のプレートの平均値)

試験物質	濃度 (μg / プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2uvrA (pKM101)	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	128	85	12	14	10	
	312.5	—	123	87	12	10	8	
	625	—	114	80	17	15	10	
	1250	—	108	95	18	19	9	
	2500	—	140	100	12	15	7	
	5000	—	30*	0*	3*	0*	0*	
陽性 対照	SA	1.5	—	—	556	380	—	—
	ENNG	1.0	—	671	—	—	—	—
	2-NF	5.0	—	—	—	—	470	—
	9-AA	80.0	—	—	—	—	—	537
溶媒対照 (DMSO)	—	+	122	118	14	19	19	
	312.5	+	119	115	13	18	25	
	625	+	124	123	16	11	21	
	1250	+	120	107	9	15	15	
	2500	+	114	90	13	13	11	
	5000	+	47*	52*	8*	0*	5*	
陽性 対照	2-AA	1.0	+	—	435	—	532	—
		2.0	+	431	—	117	—	98

* : 生育阻害を認めた。

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

SA : アジ化ナトリウム

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

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

2. 本試験の結果 (1回目)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

試験物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			WP2uvzA (pKM101)	TA100	TA1535	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	—	—	123	110	12	14	10
	312.5	—	119	81	17	11	8
	625	—	98	105	21	11	8
	1250	—	95	92	16	14	9
	2500	—	121	95	15	13	6
	5000	—	20*	2*	2*	0*	2*
陽性 対 照	SA	1.5	—	450	288		
	ENNG	1.0	—	660			
	2-NF	5.0	—			457	
	9-AA	80.0	—				447
溶媒対照 (DMSO)	0	+	119	101	14	16	10
	312.5	+	124	103	14	14	12
	625	+	117	98	16	11	12
	1250	+	111	108	18	12	13
	2500	+	105	83	16	10	13
	5000	+	41*	42*	6*	1*	2*
陽性 対 照	2-AA	1.0	+	418		452	
		2.0	+	466	115		135

*: 生育阻害を認めた。

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

SA: アジ化ナトリウム

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

9-AA: 9-アミノアクリジン

2-AA: 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

3. 本試験の結果 (2回目)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

試験物質	濃度 (μg / プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2uvz4 (pKM101)	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	116	105	15	14	11	
	312.5	—	117	97	16	12	10	
	625	—	119	98	13	17	9	
	1250	—	115	94	14	11	11	
	2500	—	123	86	11	11	10	
	5000	—	39*	2*	1*	0*	1*	
陽性 対 照	SA	1.5	—	—	418	338	—	—
	ENNG	1.0	—	619	—	—	475	—
	2-NF	5.0	—	—	—	—	—	—
	9-AA	80.0	—	—	—	—	—	423
溶媒対照 (DMSO)	—	+	128	101	12	19	10	
	312.5	+	116	111	13	14	9	
	625	+	113	118	18	21	10	
	1250	+	105	96	14	16	12	
	2500	+	97	67	18	9	11	
	5000	+	28*	30*	8*	3*	3*	
陽性 対 照	2-AA	1.0	+	—	399	—	416	—
		2.0	+	446	—	158	—	188

*: 生育阻害を認めた。

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

SA: アジ化ナトリウム

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

9-AA: 9-アミノアクリジン

2-AA: 2-アミノアントラセン

(11) の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代謝毒-11)

試験機関：
[GLP 対応]
報告書作成年：

被験物質

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA (pkM101) 株を用い、フェノバルビタール/5,6-ベンゾフラボンで薬物代謝酵素系を誘導した雄ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下で Ames らのプレインキュベーション法を用いて変異原性を検索した。

溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて被験物質溶液を調製した。312.5, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の 5 用量で試験を実施した。1 用量につき 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニー数を計数した。同一条件で 2 回試験を行い、試験結果の信頼性および再現性を確認した。

復帰変異コロニー数が陰性対照群の 2 倍以上に増加し、その結果に再現性および用量依存性が認められた場合を陽性と判定した。

用量設定根拠：

この結果から、S9 mix 非存在下および存在下ともに 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量として 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の 5 用量を設定した。

結 果：結果を次表に示した。

2 回の独立した復帰突然変異試験の結果、被験物質処理群では、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの処理濃度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、陽性対照群では、明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、本被験物質は代謝活性化系を含む本試験条件下において復帰突然変異誘発性を有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

1. 用量設定試験の結果

(表中の値は2枚のプレートの平均値)

試験物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2urza (pKM101)	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	132	112	13	22	12	
	312.5	—	112	106	12	26	15	
	625	—	109	129	15	31	13	
	1250	—	104	120	14	21	11	
	2500	—	105	134	14	25	15	
	5000	—	97	135	14	21	12	
陽性 対照	SA	1.5	—		389	304		
	ENNG	1.0	—	674				
	2-NF	5.0	—				620	
	9-AA	80.0	—					603
溶媒対照 (DMSO)	—	+	101	121	18	32	14	
	312.5	+	98	107	16	24	13	
	625	+	105	118	19	27	10	
	1250	+	92	119	17	29	14	
	2500	+	113	119	15	23	15	
	5000	+	135	114	15	34	14	
陽性 対照	2-AA	1.0	+		420		412	
		2.0	+	504		202		152

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

SA : アジ化ナトリウム

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

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

2. 本試験の結果 (1回目)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

試験物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2uvrA (pKM101)	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	125	98	11	15	9	
	312.5	—	117	120	14	16	9	
	625	—	113	103	11	13	8	
	1250	—	90	117	11	12	8	
	2500	—	94	108	16	17	12	
	5000	—	100	109	9	16	8	
陽性 対照	SA	1.5	—	744	345	309	518	595
	ENNG	1.0	—					
	2-NF	5.0	—					
	9-AA	80.0	—					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	113	91	9	16	15	
	312.5	+	115	89	10	21	15	
	625	+	97	91	12	19	14	
	1250	+	99	94	13	18	13	
	2500	+	96	91	12	18	11	
	5000	+	101	84	13	13	10	
陽性 対照	2-AA	1.0	+	486	330	184	350	193
		2.0	+					

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

SA : アジ化ナトリウム

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

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

3. 本試験の結果 (2回目)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

試験物質	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2uvrA (pKM101)	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	—	—	108	106	11	24	9	
	312.5	—	124	106	11	24	10	
	625	—	120	112	17	21	8	
	1250	—	149	107	12	20	10	
	2500	—	115	119	16	20	7	
	5000	—	112	113	15	18	8	
陽性 対照	SA	1.5	—	545	447	357	450	431
	ENNG	1.0	—					
	2-NF	5.0	—					
	9-AA	80.0	—					
溶媒対照 (DMSO)	—	+	132	89	16	25	13	
	312.5	+	153	104	11	23	12	
	625	+	128	98	12	23	10	
	1250	+	104	90	12	21	10	
	2500	+	116	87	12	28	8	
	5000	+	131	104	15	24	7	
陽性 対照	2-AA	1.0	+	482	416	173	338	109
		2.0	+					

(陽性対照群の空欄は試験の該当がない。)

SA: アジ化ナトリウム

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

9-AA: 9-アミノアクリジン

2-AA: 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

3. 原体混在物

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクミアイ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および内容の責任はクミアイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクミアイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクミアイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクミアイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクミアイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ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および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。