

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

細菌を用いる復帰突然変異試験②

(毒性資料 No. 原体-27)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2006年5月24日

検体の純度:

試験系: 細菌 (サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102))

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の5株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下、非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体はDMSOに溶解し、16~5000 μ g/プレートの範囲の6濃度で実施した。試験は各菌株あたり3プレートとし、2回行った(初回; プレートインコーポレーション法、2回目; プレインキュベーション法)。陽性対照としてアジ化ナトリウム(NaN_3)、ニトロフラントイン(NF)、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン(4-NPDA)、マイトマイシンC(MMC)、クメンヒドロペルオキシド(Cumene)、2-アミノアントラセン(2-AA)を用いた。

なお、用量設定試験は行わなかった。

結果及び考察

表1、2に示したように、2回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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に溶媒対照の2倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。すべての菌株で158 μ g/プレートまでの濃度では、生育阻害は認められなかった。なお、生育阻害の程度から、500 μ g/プレートまでを、場合によっては1581 μ g/プレートまでを評価の対象とした。

一方、陽性対照として用いた非代謝活性化条件下での NaN_3 、NF、4-NPDA、MMCおよびCumeneでは、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化条件下での2-AAは、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断された。

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

表 1. 1 回目試験(プレート インコーポレーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照(DMSO)		-	105	14	171	14	7
検体	16	-	122	19	162	13	6
	50	-	96	16	171	15	6
	158	-	111	21	168	14	8
	500	-	93	15	183	12	6
	1581	-	77	15	128B	9B	3B
	5000	-	54B	7B	-B	6B	-B
対照(DMSO)		+	126	10	183	34	7
検体	16	+	103	6	177	24	8
	50	+	92	7	175	25	5
	158	+	121	6	169	23	6
	500	+	104	6	166	20	7
	1581	+	90	6B	145B	11B	5B
	5000	+	59B	4B	88B	8B	-B
陽 性 対 照	NaN ₃	10	-		592		
	NF	0.2	-	242			
	4-NPDA*	10/0.5	-			147	78
	MMC	0.2	-		268		
	2-AA	3	+	1500	59	633	1040

B : 背景細菌叢の減少

* : TA1537; 10µg/プレート, TA98; 0.5µg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1, 2-フェニレンジアミン

MMC : マイトマイシンC

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及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 2. 2 回目試験(プレインキュベーション法)

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	130	17	136	20	7
検体	16	—	117	18	123	23	7
	50	—	119	17	121	23	9
	158	—	124	11	152	18	6
	500	—	108	9B	114	17	2B
	1581	—	85B	4B	65B	8B	-B
	5000	—	73B	-B	-B	5B	-B
対照 (DMSO)		+	129	8	136	25	9
検体	16	+	132	10	146	27	7
	50	+	116	8	141	35	8
	158	+	141	8	126	34	7
	500	+	124	7	136	28	5
	1581	+	93	4B	101B	17B	3B
	5000	+	100B	-B	100B	9B	-B
陽 性 対 照	NaN ₃	10	—		790		
	NF	0.2	—	368			
	4-NPDA*	10/0.5	—			131	144
	Cumene	50	—		362		
	2-AA	3	+	1367	67	420	1024

B : 背景細菌叢の減少

* : TA1537;10µg/プレート, TA98;0.5µg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

Cumene : クメンヒドロペルオキシド

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及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

2) チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験①

(毒性資料 No. 原体-28)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2002 年 10 月 24 日

検体の純度 :

試験系 : チャイニーズハムスター由来 V79 細胞

試験方法 : チャイニーズハムスターの継代培養した V79 細胞を用い、代謝活性化および非活性化によって染色体異常誘発性を検定した。検体は DMSO に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 100 個の分裂中期像について 2 反復で行った。

用量設定の根拠:

表 1 設定濃度

試験群	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix	処理時間 (時間)	回収時期 (時間)
溶媒対照	0	-/+	4	18*
検体	10	-	4	18*
	20	-	4	18
	30	-	4	18*、30
	50	-	4	18*、30*
	70	-	4	18、30
	20	+	4	18*
	40	+	4	18*
	60	+	4	18、30
	80	+	4	18*、30*
	100	+	4	18、30
陽性対照 マイトマイシン C	0.1	-	4	18*
陽性対照 シクロホスファミド	2.0	+	4	18*

*: 染色体異常を評価した。

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

(続き)

試験群	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix	処理時間 (時間)	回収時期 (時間)
溶媒対照	0	-	18	18
検体	6	-	18	18
	12	-	18	18*
	24	-	18	18*
	36	-	18	18
	48	-	18	18*
陽性対照マイトマイシンC	0.03	-	18	18*

*: 染色体異常を評価した。

試験結果:

以上の濃度について、細胞生存率、有糸分裂指数および染色体異常を調べたところ、以下のとおりであった。

1) 細胞生存率

S9-Mix 非存在下

4時間処理では50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、18時間処理では48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で溶媒対照と比較して統計学的に有意な減少がみられた。マイトマイシンCで処理した培養では4時間処理のみで減少が認められた。

S9-Mix 存在下

40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で有意な減少を示した。シクロホスファミドで処理した培養でも有意な減少が認められた。

2) 有糸分裂指数

S9-Mix 非存在下

溶媒対照に比較して、4時間処理では50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、18時間処理では24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で有意に減少した。マイトマイシンCで処理した培養では、溶媒対照に比較して、4時間処理のみ減少が認められた。

S9-Mix 存在下

溶媒対照に比較して、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のみの濃度で有意に減少した。シクロホスファミドで処理した培養では有意な減少が認められた。

3) 染色体異常

細胞生存率および有糸分裂指数の結果をもとに、検体については次の濃度について、染色体異常を評価した。

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

- S9 mix- 処理 4 + 回収 18 時間 : 10、30、50 µg/mL
- S9 mix- 処理 4 + 回収 30 時間 : 50 µg/mL
- S9 mix+ 処理 4 + 回収 18 時間 : 20、40、80 µg/mL
- S9 mix+ 処理 4 + 回収 30 時間 : 80 µg/mL
- S9 mix- 処理 18 + 回収 18 時間 : 12、24、48 µg/mL

染色体異常の結果を表 2 および表 3 に示した。

S9-Mix 非存在下

4 時間処理し総培養時間が 18 時間 (50 µg/mL) と処理および総培養時間が 18 時間の最高濃度区 (48 µg/mL) において、異常がみられる分裂中期像に、統計学的に有意なわずかな増加が認められた。なお、陽性対照であるマイトマイシン C による処理では、異常がみられる分裂中期像の数に関して明瞭かつ統計学的に有意な増加が認められ、本試験系の感度が十分であることが証明された。

S9-Mix 存在下

4 時間処理し総培養時間が 18 時間および 30 時間の最高濃度区 (80 µg/mL) において、異常がみられる分裂中期像に統計学的に有意なわずかな増加が認められた。なお、陽性対照であるシクロホスファミドは、統計学的に有意、かつ生物学的に意味のある異常を有する分裂中期像の増加を誘発し、本試験系の感度が十分であること、ならびに使用した S9mix の活性が証明された。

以上の結果より、代謝活性化を含む本試験条件下でのチャイニーズハムスター由来 V79 細胞に対して、本検体による染色体異常誘発性は弱陽性と判断された。

[申請者追記]

表2 4時間処理

実験群 濃度 μg/mL	S9- Mix	回収 時間	観察 細胞 数	ギャップ		構造異常の分類									構造異常細胞 ^c				
				染色分体型			染色体型			その他			ギャップ		交換				
				g	ig	b	f	d	ib	if	id	ex	maE	ma		cd	含む	除外	
DMSO	-	18	200	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1.5	1.5	0.0	
検			200	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	0.0	
体			30	200	0	0	0	1	0	0	0	8	0	0	0	0	4.0	4.0	0.0
			50	200	0	0	3	0	1	1	0	15	0	0	0	0	8.0**	8.0**	0.0
MMC ^A			200	2	1	16	0	1	26	6	6	33	0	0	0	36.0**	34.5**	14.5**	
DMSO	+	18	200	0	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	2.5	2.5	0.0	
検			200	1	0	0	0	0	0	1	4	1	0	0	0	3.0	2.5	0.5	
体			40	200	1	0	1	1	0	3	0	4	2	0	0	0	5.0	5.0	1.0
			80	200	0	0	0	1	0	2	1	11	2	0	0	0	7.5**	7.5**	1.0
CP ^B			200	1	3	8	2	0	43	5	6	32	0	0	0	37.0**	36.0**	14.0**	
DMSO	-	30	200	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	0.0		
検			200	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1.5	1.5	0.0	
体			50	200	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1.5	1.5	0.0	
DMSO			200	0	0	0	0	0	0	1	1	10	0	0	0	5.5*	5.5*	0.0	
検	+	30	200	0	0	0	0	0	1	1	10	0	0	0	5.5*	5.5*	0.0		
体			80	200	0	0	0	0	0	1	1	10	0	0	0	5.5*	5.5*	0.0	

* : p ≤ 0.05, ** : p ≤ 0.01 (Fisher の正確確率検定)

A : MMC マイトマイシン C (0.1 μg/mL), B : CP/シクロホスファミド (2.0 μg/mL) C : 百分率

g ; 染色分体型ギャップ ig ; 染色体型ギャップ

b ; 染色分体型切断 ib ; 染色体型切断

f ; 染色分体型断片 if ; 染色体型断片

d ; 染色分体型欠失 id ; 染色体型欠失

ex ; 交換, maE ; 交換を含む重複異常

ma ; 重複異常, cd ; 染色体破損

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

表3 18時間処理

実験群 濃度 µg/mL	S9- Mix	回収 時間	観察 細胞数	ギャップ		構造異常の分類										構造異常細胞 ^c			
				染色体型			染色体型			その他				ギャップ		交換			
				g	ig	b	f	d	ib	if	id	ex	maE	ma	cd		含む	除外	
DMSO			200	0	0	0	1	0	0	0	3	1	0	0	0	2.0	2.0	0.5	
検 体	12	-	18	200	1	0	3	0	0	1	1	5	4	0	0	5.5	5.0	2.0	
	24			200	0	0	0	2	0	3	2	5	3	0	0	0	5.5	5.5	1.5
	48			200	0	0	0	0	0	6	0	7	2	0	0	0	7.0*	7.0*	1.0
MMC ^A	200			2	1	13	0	0	19	4	5	23	2	0	0	27.0*	26.0*	11.0**	

* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$ (Fisher の正確確率検定)

A : MMC マイトマイシン C (0.1 µg/mL), B : CP/シクロホスファミド (2.0 µg/mL) C : 百分率

g ; 染色体型ギャップ ig ; 染色体型ギャップ

b ; 染色体型切断 ib ; 染色体型切断

f ; 染色体型断片 if ; 染色体型断片

d ; 染色体型欠失 id ; 染色体型欠失

ex ; 交換, maE : 交換を含む重複異常

ma ; 重複異常, cd ; 染色体破損

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

チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験②

(毒性資料 No. 原体-29)

試験機関:

報告書作成年月日: 2003 年 1 月 13 日

検体の純度 :

試験系 : チャイニーズハムスター由来 V79 細胞

試験方法 : チャイニーズハムスターの継代培養した V79 細胞を用い、代謝活性化および非活性化によって染色体異常誘発性を検定した。検体は DMSO に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 100 個の分裂中期像について行った。

用量設定の根拠: 毒性資料 No. 原体-28 の試験に基づいて、設定濃度は以下のとおりとした。

表 1

試験群	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix	処理時間 (時間)	回収時期 (時間)
溶媒対照	0	-/+	4	18
検 体	30	-	4	18
	50	-	4	18
	70	-	4	18*
	90	-	4	18
	110	-	4	18
	40	+	4	18
	60	+	4	18
	80	+	4	18
	100	+	4	18
	120	+	4	18*

*: 染色体異常を評価した。

試験結果:

以上の濃度について、細胞生存率、有糸分裂指数および染色体異常を調べたところ、以下のとおりであった。なお、検体の沈殿は認められなかった。

1) 細胞生存率

S9-Mix 非存在下

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、溶媒対照と比較して統計学的に有意な減少がみられた。

S9-Mix 存在下

80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、溶媒対照と比較して統計学的に有意な減少を示した。

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

2) 有糸分裂指数

S9-Mix 非存在下

70µg/mL 以上で、溶媒対照と比較して統計学的に有意に減少した。

S9-Mix 存在下

100µg/mL 以上で、溶媒対照と比較して統計学的に有意に減少した。

3) 染色体異常

細胞生存率および有糸分裂指数の結果をもとに、検体については以下の濃度について、染色体異常を検索した。

S9 mix- 処理 4 + 回収 18 時間 : 70µg/mL

S9 mix+ 処理 4 + 回収 18 時間 : 120 µg/mL

染色体異常の結果を表 2 に示した。

S9-Mix 非存在下

生物学的に有意で、統計学的に有意な異常を有する分裂中期像の増加は認められなかった。

S9-Mix 存在下

生物学的に有意で、統計学的に有意な異常を有する分裂中期像の増加は認められなかった。

以上の結果より、代謝活性化を含む本試験条件下でのチャイニーズハムスター由来 V79 細胞に対して、本検体による染色体異常誘発性は陰性と判断された。

表 2

実験群 濃度 µg/mL	S9- Mix	回収 時間	観察 細胞 数	ギャップ		構造異常の分類									構造異常細胞 ^a			
				g	ig	染色分体型			染色体型			その他			ギャップ 含む	除外	交換	
						b	f	d	ib	if	id	ex	maE	ma				cd
DMSO	-	18	200	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2.0	1.0	0.0
検体 70			200	3	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3.0	2.0	0.0
DMSO	+	18	200	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2.5	2.0	0.0
検体 120			200	0	0	1	0	0	0	2	1	1	0	0	0	2.5	2.5	0.5

* : p ≤ 0.05, ** : p ≤ 0.01 (Fisher の正確確率検定)

A: 百分率

g : 染色分体型ギャップ ig : 染色体型ギャップ

b : 染色分体型切断 ib : 染色体型切断

f : 染色分体型断片 if : 染色体型断片

d : 染色分体型欠失 id : 染色体型欠失

ex : 交換, maE : 交換を含む重複異常

ma : 重複異常, cd : 染色体破損

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

3) V79-HPRT (前進突然変異) 法による *in vitro* 変異原性誘発試験 (毒性資料 No. 原体-30)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2002 年 12 月 3 日

検体の純度 :

試験系 : チャイニーズハムスター由来 V79 細胞

試験方法 : チャイニーズハムスターの継代培養した V79 細胞の HPRT 遺伝子座における変異原性を代謝活性化または非活性化条件下で検定した。

用量設定の根拠:

コロニー形成率と突然変異試験;

フラスコあたり 4×10^6 細胞の V79 由来細胞を、各処理濃度あたり 2 個の 250mL のフラスコの培養用培地に入れた。接着後 (16~24 時間後) に、細胞を低血清量 (2%) の培地を用い、非代謝活性下及び代謝活性下条件で 5 時間各濃度の検体に暴露させた。各対照群は同じ条件下で培養した。その後、単層細胞を PBS で洗浄してトリプシン処理した。これをフラスコ中の培地に約 1.5×10^6 細胞の密度で、また 3 枚のペトリ皿それぞれに 200 個の細胞を、再播種した。ペトリ皿を 6 日間培養し、コロニー数を算定することにより細胞毒性を判定した。一方、フラスコに再播種した細胞は、細胞増殖と誘発変異株の発現のために培養し、3 日と 6 日に継代した。最初の継代では、各処理群および対照群の 2 個の培養を各々 2 個の 250mL のフラスコに、約 1.5×10^6 個の細胞を再播種し、約 7

日間培養した。突然変異株細胞分離のために、10 μ g/mL の 6-チオグアニン (6-TG) を添加したヒポキサンチン無含有培養液のペトリ皿 (合計 8 皿) に 3×10^5 個の細胞を播種した。さらに、3 枚のペトリ皿には各用量群のコロニー形成率を求めるために、ペトリ皿あたり 200 個の細胞を播種した。約 5% 炭酸ガスを含んだ加湿された空気中で、37 $^{\circ}$ C で 6~8 日間の培養後、コロニーを固定してギムザ液で染色した。突然変異株分離用のペトリ皿では 6-TG 抵抗性コロニー数を、コロニー形成率測定用ペトリ皿ではコロニー数を測定した。

結果及び考察：

1. コロニー形成率

変異原性試験における溶媒対照群のコロニー形成率は、非活性化の条件下で 51.7% から 105.5% まで、活性化の条件下で 82.2% から 114.0% の範囲であった。試験におけるコロニー形成率は良好であった。

2. 非代謝活性化条件における突然変異原性試験

非活性化条件下で 3 試験を実施した。相対生存率および相対増殖とも、用量に関連した細胞毒性が観察された。また、突然変異の頻度には増加は認められなかった。全体的な統計学的解析においても、処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。陽性対照群の EMS は、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。したがって、検体は非活性化試験において非変異原性物質と判断された。

3. 代謝活性化条件における突然変異原性試験

活性化条件下で 3 試験が実施された。全試験において、相対生存率および相対増殖ともに用量に関連した細胞毒性が観察された。また、突然変異の頻度には増加は認められなかった。陽性対照物質の DMBA は、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。したがって、検体は代謝活性化試験において非変異原性物質と判断された。

以上の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず、V79-HPRT 前進突然変異原性試験において非変異原性物質であると判断された。

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

表 1 非代謝活性化

群	濃度 μg/mL	1 回目試験									
		相対生存率	相対増殖 ^A	総変異株数 ^B	コロニー形成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶					
陰性 対照	—	121.5	96.6	1	98.2	0.4					
		139.3	65.0	3	89.0	1.4					
溶媒対照 (DMSO)	—	100.0	100.0	1	103.0	0.4					
		100.0	100.0	1	105.5	0.4					
陽性対照 EMS	900	81.9	20.3	391	83.5	195.1 [*]					
		78.3	22.6	303	83.0	152.1					
検体	2.5	119.0	55.4	1	88.8	0.5					
		120.3	43.3	3	90.7	1.4					
	5	166.2	69.3	1	90.2	0.5					
		196.1	68.7	1	86.8	0.5					
	10	207.0	101.7	1	81.8	0.5					
		234.9	97.2	1	88.7	0.5					
	20	158.2	69.3	2	109.0	0.8					
		163.0	55.5	4	89.2	2.1					
	40	94.5	26.7	3	64.7	2.2					
		120.9	15.9	1	74.2	0.6					
	80	7.2	—	—	—	—					
		13.2	—	—	—	—					
群	濃度 μg/mL	2 回目試験					3 回目試験				
		相対生存率	相対増殖 ^A	総変異株数 ^B	コロニー形成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶	相対生存率	相対増殖 ^A	総変異株数 ^B	コロニー形成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性 対照	—	126.8	82.2	3	96.3	1.3	87.9	126.4	5	63.8	3.7
		157.7	107.5	4	70.8	2.4	132.7	140.3	4	67.3	2.5
溶媒対照 (DMSO)	—	100.0	100.0	1	104.2	0.4	100.0	100.0	12	51.7	9.7
		100.0	100.0	3	102.0	1.2	100.0	100.0	13	66.8	8.1
陽性対照 EMS	900	69.3	40.3	551	46.5	493.7 [*]	34.1	57.9	859	42.3	966.3 [*]
		75.9	56.3	654	32.0	851.6	60.8	45.4	853	62.8	565.6
検体	20	114.6	81.8	5	111.5	1.9	65.2	114.9	12	59.0	9.7
		124.7	98.7	4	101.7	1.6	123.5	117.4	10	60.2	6.9
	30	75.5	69.5	3	71.7	1.7	67.3	57.5	21	71.5	12.2
		99.3	108.3	17	71.8	9.9	78.7	113.4	17	58.8	12.1
	40	28.7	76.7	5	84.2	2.5	49.3	82.3	5	62.3	3.8
		65.6	128.2	5	85.5	2.4	47.3	81.8	10	64.0	6.5
	50	17.2	16.2	8	78.3	4.3	28.8	42.5	11	65.0	8.1
		34.0	26.3	21	61.5	14.2	30.4	45.3	6	77.0	3.2
	60	11.5	32.6	8	112.5	3.4	16.0	26.0	9	79.0	5.4
		21.6	16.2	12	97.5	6.8	21.5	34.8	21	58.0	15.1
	70	15.5	—	—	—	—	9.4	5.8	8	47.5	7.0
		14.1	—	—	—	—	10.1	4.2	13	52.3	10.4

A: 溶媒対照に対する百分率 B: 8ペトリ皿のコロニーの合計 C: 細胞200個あたりのコロニー形成率
 EMS : エチルメタンサルホネート 統計学的処理 : Dunnett 検定 * ; P ≤ 0.05

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

表2 代謝活性化

群	濃度 μg/mL	1回目試験				
		相対生存率	相対増殖 ^A	総変異株数 ^B	コロニー形成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対照	—	110.3	72.0	4	105.3	1.6
		119.3	53.1	8	100.2	3.3
溶媒対照 (DMSO)	—	100.0	100.0	6	101.2	2.5
		100.0	100.0	5	98.5	2.1
陽性対照 DBMA	20	71.9	37.7	328	107.5	* 127.1
		68.0	34.7	202	121.0	69.6
検体	20	107.3	54.3	1	116.8	0.4
		99.2	52.3	9	120.3	3.1
	40	89.9	25.9	5	126.7	1.6
		84.6	36.2	3	124.8	1.0
	60	157.3	45.3	1	99.0	0.4
		148.7	30.0	8	105.0	3.2
	80	119.1	56.1	3	86.8	1.4
		100.8	58.8	2	99.8	0.8
	100	76.4	64.3	7	83.8	3.5
		64.6	63.5	3	118.8	1.1
	120	52.0	34.3	4	78.2	2.1
		57.0	47.0	9	107.2	3.5
	140	9.8	17.9	27	103.0	* 10.9
		7.6	17.9	73	110.3	27.6

群	濃度 μg/mL	2回目試験					3回目試験				
		相対生存率	相対増殖 ^A	総変異株数 ^B	コロニー形成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶	相対生存率	相対増殖 ^A	総変異株数 ^B	コロニー形成率 ^C	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対照	—	109.1	74.2	2	93.2	0.9	139.6	115.8	6	72.8	3.4
		72.4	111.8	4	72.2	2.3	103.3	99.7	8	79.2	4.2
溶媒対照 (DMSO)	—	100.0	100.0	8	101.5	3.3	100.0	100.0	4	83.0	2.0
		100.0	100.0	7	114.0	2.6	100.0	100.0	1	82.2	0.5
陽性対照 DBMA	900	89.0	43.4	189	69.5	* 113.3	97.2	138.0	100	58.8	* 70.8
		51.8	56.9	153	83.3	76.5	63.7	109.3	90	54.5	68.8
検体	92	109.1	52.6	34	73.0	19.4	45.6	87.4	2	71.2	1.9
		65.0	52.3	8	96.2	3.5	37.3	96.1	1	59.3	1.1
	100	70.8	29.9	2	81.5	1.0	27.3	57.4	2	64.7	2.1
		47.3	36.7	4	88.3	1.9	29.3	74.0	2	55.3	2.4
	108	112.7	23.0	5	101.3	2.1	40.4	81.8	10	72.2	5.8
		88.8	29.7	18	105.8	7.1	22.2	86.0	4	46.2	3.6
	116	112.7	19.2	3	145.8	0.9	20.8	58.4	1	77.0	0.5
		66.3	23.9	14	101.3	5.8	13.6	89.6	3	60.2	2.1
	124	99.3	31.0	21	132.2	6.6	17.5	58.4	6	62.3	4.0
		83.3	39.0	15	90.8	6.9	10.0	42.8	1	52.8	0.8
	132	101.7	30.5	26	138.5	7.8	16.5	43.3	2	57.2	1.5
		92.8	27.4	12	117.0	4.3	4.7	23.0	1	49.8	0.8
	140	0.0	—	—	—	—	5.3	23.4	3	55.8	2.2
		0.0	—	—	—	—	1.6	13.1	5	47.5	4.4

A: 溶媒対照に対する百分率
 B: 8ペトリ皿のコロニーの合計
 C: 細胞200個あたりのコロニー形成率
 DBMA: ジメチルベンゾアントラセン
 統計学的処理: Dunnett 検定
 *: P ≤ 0.05

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

4) マウスにおける小核試験

(毒性資料 No. 原体-31)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2002 年 10 月 24 日

検体の純度 :

供試動物 : Hsd-Win NMRI 系マウス、(試験開始時: 6~12 週齢、体重 雄 38~44g)

1 群雄各 5 匹 (500mg/kg 群のみ 1 群 5 匹の代替群も用意した。)

投与方法 : 検体を 0.5% クレモホア水溶液に懸濁し、0、125、250 および 500mg/kg の投与レベルで腹腔内に投与した。シクロホスファミドは脱イオン水に溶解し、同一の方法で投与した。陰性対照には 0.5% クレモホア水溶液を同一の方法で投与した。検体投与群、陰性対照群についての投与回数は 24 時間間隔で 2 回行い、シクロホスファミドについては 1 回とした。投与用量はいずれの場合も 10mL/kg 体重とした。最終投与 24 時間後に動物を屠殺し、各動物の大腿骨から骨髓を採取して Schmid の方法を用いて検査用の塗抹標本作製した。標本を染色後、光学顕微鏡を用いて評価した。各動物につき 2000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計測した。同時に正染性赤血球数も計測した。

用量設定の根拠:

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

試験結果：

1) 一般症状

全投与群で屠殺時まで次のような検体に関連した症状が認められた：無気力、粗毛、体重減少、横臥位、痙攣、伸張性痙攣、間代性痙攣、筋攣縮、呼吸困難、半閉眼および下痢。死亡は500mg/kg群の2/10例、250mg/kg群の1/5例に認められた。対照群では何の症状も死亡も認められなかった。

2) 突然変異誘発性

骨髓標本の観察結果を表に示した。

小核を有する多染性赤血球の発現頻度に関して、陰性対照群と検体投与群の間に生物学的に重要あるいは統計学的に有意な差は認められなかった。500mg/kg群では多染性赤血球と正染性赤血球の比が変化したことから、骨髓に対する細胞毒性が示唆された。

陽性対照であるシクロホスファミドは、小核を有する多染性赤血球数を溶媒対照群に比べ統計学的に有意に増加させた。

投与群	評価した多染性赤血球総数	2000個の多染性赤血球あたりの正染性赤血球数	小核を有する細胞数	
			2000個の正染性赤血球あたり	2000個の多染性赤血球あたり
陰性対照 0.5%クレモリン水溶液	10000	1264±353	3.8±1.6	2.0±1.6
検体 125mg/kg×2回	10000	1722±720	3.8±2.9	1.6±2.1
検体 250mg/kg×2回	8000	4202±1098	4.8±2.1	3.5±1.7
検体 500mg/kg×2回	10000	4948*±1943	4.7±2.3	5.4±3.2
陽性対照 シクロホスファミド	10000	1071±169	5.3±2.7	31.0**±6.2

**：Wilcoxonの順位和検定で有意差あり (p < 0.01)

以上の結果から本試験条件下において、検体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た。

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

5) マウスの骨髄細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験 (毒性資料 No. 原体-32)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2003年3月24日

検体の純度:

供試動物: NMRI系マウス、(試験開始時: 8~10週齢、体重雄 38.2±3.2g)

1群雄各5匹

試験期間: 48時間

試験方法: 検体を0.5%クレモホア溶液に懸濁し、1群5匹の雄マウスに検体125、250および500mg/kgを10ml/kg容量で腹腔内投与した。

試験群は次に示す通りで、各検体投与後24および48(500mg/kg群のみ)時間後に動物を屠殺し、摘出した大腿骨から骨髄塗沫標本を作製し、ギムザ染色した。一群5匹の動物について、動物当たり100個の中期分裂像を検査した。なお動物を屠殺する2.5時間前に2.0mg/kgのコルセミドを全動物に腹腔内注射し有糸分裂を中期で停止させた。

試験群	投与量 mg/kg	投与経路	屠殺時間
溶媒対照	0	腹腔内	24
検体	125	腹腔内	24
検体	250	腹腔内	24
検体	500	腹腔内	24 および 48
陽性対照(シクロホスファミド*)	40	腹腔内	24

用量設定の根拠:

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

試験結果：

1) 一般症状

全投与群に、自発運動の低下、閉眼、立毛および無関心が認められ、500mg/kg 群では腹臥位および振戦も認められた。

2) 染色体の評価

いずれの投与群においても、染色体異常出現頻度に溶媒対照群と比較して統計学的に有意なまたは生物学的に意味のある増加は認められなかった。

陽性対照であるシクロホスファミドは統計学的に有意で生物学的に意味のある染色体異常の増加が認められた。

以上のことから、本検体によるマウスの骨髄細胞の染色体異常誘発性は陰性と判断された。

染色体の評価

投与群 mg/kg	屠殺 時間	観察 細胞数	ギャップ		構造異常の分類								構造異常細胞 ^c		有糸 分裂 指数 ^d	
					染色体型		その他				ギャップ					
			g	ig	b	f	ib	if	d	ma	ex	cd	含む	除外		
溶媒 ^A		500	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0.6	6.92
検 体	125	24	500	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0.8	0.4	7.38
	250	500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	8.38
	500	500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	5.50
	500	48	500	1	0	4	0	0	0	0	0	0	1	1.0	0.8	7.54
陽性 ^B	24	250	11	0	26	34	0	1	0	43	16	6	36.4	36.0*	3.92	

* : $p \leq 0.01$ (non-parametric Mann-Whitney test)

A : 0.5%クレモホア溶液、 B : シクロホスファミド(40mg/kg) C : 百分率 D : 観察細胞数 5000 個

g ; 染色体型ギャップ ig ; 染色体型ギャップ
 b ; 染色体型切断 ib ; 染色体型切断
 f ; 染色体型断片 if ; 染色体型断片
 d ; 欠失 ex ; 交換, ma ; 重複異常, cd ; 染色体破損

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

6) ラットの肝細胞を用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成試験

(毒性資料 No. 原体-33)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2003 年 7 月 10 日

検体の純度:

供試動物: ウィスター(Cr1:(WI)BR)系ラット (入荷時: 5~7 週齢、体重 101~150g)

1 群雄各 4 匹

試験方法: 検体を 0.5%クレモホア溶液に懸濁し、1 群 4 匹の雄ラットに検体 1000 および 2000mg/kg を 20ml/kg 容量で強制経口投与した。試験群は次に示す通りで、各検体投与後 4 または 16 時間後に動物を屠殺し、肝細胞を調製した。

溶媒対照として、0.5%クレモホア溶液を同様に投与し、同時間に屠殺した。

陽性対照として、コーンオイルに懸濁した 2-アセチルアミノフルオレン(2-AFF)を 100mg/kg の用量で投与し 16 時間後に屠殺、0.9%食塩水に溶解した N,N'-ジメチルヒドラジン(DMH)を 40mg/kg の用量で投与し 4 時間後に屠殺して、それぞれ肝細胞を調製した。

試験群	投与量 mg/kg	投与経路	屠殺時間
溶媒対照	0	経口	4 および 16
検体	1000	経口	4 および 16
検体	2000	経口	4 および 16
陽性対照(2-AFF)	100	経口	16
陽性対照(DMH)	40	経口	4

用量設定の根拠:

肝細胞の調製: 各動物をネブタール麻酔下で生体位灌流し、肝臓摘出後単離肝細胞を調製した。単離した肝細胞は、L-グルタミン、硫酸ゲンタマイシン、デキサメタゾンおよび不活性ウシ胎児血清を添加した WilliamsE 培養液で、37°Cのインキュベーター内で 5%炭酸ガスを含む加湿空気下で 90 分間培養した。なお、生存細胞の検査は灌流後の細胞懸濁液を用いてトリパンプルー色素排除法により調べた。

UDS 標本の作製: その後各培養を培地で洗浄し、10 μ Ci/ml の ³H-チミジンを添加した培養液で 4 時間培養した。非標識チミジンを加えた培地で肝細胞を 2 回洗浄し、一晚培養した。その後 PBS で 2 回洗浄、1%クエン酸ナトリウムで核の膨化処理、酢酸と純エ

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

タノール混液で細胞を固定、水洗後に風乾した。

オートラジオグラフィ処理のためにスライドガラスを NTB-2 写真乳剤で処理し暗箱中-20°Cで14日間の保持後、現像し、固定、風乾後、ヘマトキシリン・エオシンで染色した。

動物1匹あたり3枚のスライドを作製し、各50細胞、合計150細胞を観察した。

^3H -チミジンの取り込みを反映する細胞中の粒子を顕微鏡に接続した TV カラーモニターを用いて評価した。

観察結果の表示：

正味粒子数 (NNG) = 核内粒子数 - 核面積に相当する細胞質領域3カ所平均粒子数
修復中の細胞 (5個以上の粒子を有する核) (%) = 検査細胞数に対する5個以上の粒子を有する核 (細胞) 数の百分率

判定基準：検体投与群平均正味粒子数が+2以上の場合、陽性と判定する。

検体投与群平均正味粒子数が0以下の場合、陰性と判定する。

正味粒子数が0~2の場合、それぞれのケースに応じて判定する。

群平均の正味粒子数は0を超えないのに1匹の動物が0より大きく、用量依存性を否定できない場合、それぞれのケースに応じて判定する。

試験結果：

1) 一般症状

全投与群に被毛粗剛および呼吸数亢進が認められ、2000mg/kg群に蒼白が認められた。

2) 細胞毒性

いずれの投与群においても、投与に関連した細胞毒性影響は認められなかった。陽性対照群においても細胞毒性影響は認められなかった。

3) UDS 試験

2000および1000mg/kg群において、4時間および16時間屠殺でも、正味粒子数 (NNG) は0以下であった。また、修復中の細胞は観察されなかった。

以上の結果から本試験条件下において、検体は不定期 DNA 合成を誘発せず、陰性と判断された。

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

試験結果

屠殺時間	投与群	投与量 (mg/kg)	正味粒子数	核上粒子数	細胞質粒子数	細胞修復率(%)	生存細胞(%)
16時間	溶媒対照	0	-2.01	2.67	4.68	0.0	79.0
	検体	1000	-1.28	3.60	4.88	0.0	72.1
	検体	2000	-1.38	4.20	5.58	0.0	71.7
	陽性対照 2-AAF	100	5.81	9.90	4.09	59.33*~66.00*	71.2
4時間	溶媒対照	0	-1.57	3.46	5.04	0.0	79.6
	検体	1000	-0.86	4.57	5.43	0.0	76.2
	検体	2000	-0.84	4.13	4.97	0.0	75.2
	陽性対照 DMH	40	4.63	10.12	5.49	38.00*~50.67*	77.9

溶媒対照 : 0.5%クレモホア溶液

陽性対照 2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン、DMH : N,N'-ジメチルヒドラジン(DMH)

* : $P \leq 0.05$ (Chi² test)

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

(15) 生体機能への影響

スピロテトラマトにおける薬理試験

(毒性資料 No. 原体-34)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2007 年 11 月 13 日

検体の純度:

用量設定の根拠:

ラットを用いる試験

マウスを用いる試験

1. ラットにおける一般症状の観察

供試動物: Br1Han:WIST@Jcl (GALAS) 雄ラット, 171.2~180.4g, 一群各 5 匹

投与方法: 検体を乳鉢内で微粉碎後、0.5%メチルセルロース (MC) /0.4%Tween80 水溶液に懸濁して 0(0.5%MC/0.4%Tween80 水溶液)、80、400 および 2000mg/kg を経口投与した。

検体投与前、投与後 15、30、60、120、180、360 分および 24 時間に Irwin の多次元観察法を参考に観察した。

結果: 対照群を含む全ての投与群において体位、行動、自律神経系および反射等のいずれの観察項目にも異常は認められなかった。また、身づくろい、あくび、脱糞および排尿の発現数についても対照群と投与群との間に差は認められなかった。

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

2. マウスにおける自発運動量に及ぼす影響

供試動物：Cr1j:CD-1(ICR)雄マウス， 23.7～30.9g， 一群各6匹

投与方法：検体を乳鉢内で微粉碎後、0.5%メチルセルロース(MC)/0.4%Tween80水溶液に懸濁して0(0.5%MC/0.4%Tween80水溶液)、80、400および2000mg/kgを経口投与した。検体投与前30分および投与直後から投与後360分まで継続して自発運動量を測定し、30分毎に自発運動量を集計した。

結果：いずれの集計時間においても対照群と投与群との間に差は認められなかった。

3. マウスにおける痙攣誘発作用

供試動物：Cr1j:CD-1(ICR)雄マウス， 25.0～27.8g， 一群各6匹

投与方法：検体を乳鉢内で微粉碎後、0.5%メチルセルロース(MC)/0.4%Tween80水溶液に懸濁して0(0.5%MC/0.4%Tween80水溶液)、80、400および2000mg/kgを経口投与した。検体投与後90分に両耳介より小型動物用電撃刺激装置を用いて10mA、0.8秒間通電した。電撃刺激後に発現する後肢の痙攣および死亡の有無を観察した。

結果：全群に間代性痙攣、強直性屈曲痙攣、強直性伸展痙攣および死亡が認められたが、いずれの投与群においても痙攣および死亡の発現は、対照群と同等であった。

4. ラットにおける正常体温に及ぼす作用

供試動物：BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)雄ラット， 191.6～215.5g， 一群各5匹

投与方法：検体を乳鉢内で微粉碎後、0.5%メチルセルロース(MC)/0.4%Tween80水溶液に懸濁して0(0.5%MC/0.4%Tween80水溶液)、80、400および2000mg/kgを経口投与した。検体投与前、投与後30、60、120、180および360分にデジタル温度計を用いて直腸温を測定した。

結果：400mg/kg群において、投与360分後の測定値が対照群と比較して統計学的に有意に増加したが、同群の他の測定時点、80および2000mg/kg群のいずれの測定時点においても統計学的な有意差は認められなかったことから、投与に関連のない偶発的な変化と考えられた。

5. 循環器系に対する作用/無麻酔ラットの血圧および心拍数の測定

供試動物：BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)雄ラット， 163.2～208.9g， 一群各5匹

投与方法：検体を乳鉢内で微粉碎後、0.5%メチルセルロース(MC)/0.4%Tween80水溶液に懸濁して0(0.5%MC/0.4%Tween80水溶液)、80、400および2000mg/kgを経口投与した。検体投与前、投与後60、120、180および360分に収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧および心拍数を測定した。

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

結果：血圧測定において、収縮期血圧では対照群と比較して 80 および 2000mg/kg 群で投与 120 分後の測定値に統計学的に有意な高値が認められた。拡張期血圧では 400mg/kg 群で投与 120 分後の測定値および投与前値からの変化値、2000mg/kg 群で投与 120 分後の測定値に有意な高値が認められた。平均血圧では、対照群と比較して 400 および 2000mg/kg 群で投与 120 分後の測定値が有意に増加した。しかしながら、いずれも投与前値からの変化値には用量との関連性が認められないことから、投与による影響とは考えなかった。

心拍数では、対照群と比較して 80mg/kg 群で投与 360 分後の測定値、400mg/kg 群では投与 120 および 360 分後の投与前値からの変化値、2000mg/kg 群では投与 120、180 および 360 分後の測定値ならびに投与 120 および 360 分後の投与前値からの変化値に有意な高値が認められた。しかしながら、対照群も含めた全群における投与前値との変化値は-31~+37 回/分の間で推移していることから、検体投与が心拍数に明らかに影響を及ぼしたものは考えられなかった。

6. ラットの腎機能に対する作用/尿量、尿中電解質(ナトリウム、カリウム、塩素)および尿浸透圧の測定

供試動物：BrlHan:WIST@Jcl (GALAS)雄ラット, 184.1~218.2g, 一群各 5 匹

投与方法：検体を乳鉢内で微粉碎後、0.5%メチルセルロース(MC)/0.4%Tween80 水溶液に懸濁して 0(0.5%MC/0.4%Tween80 水溶液)、80、400 および 2000mg/kg を経口投与した。検体投与前に生理食塩水を体重 100g あたり 2.5mL の割合で経口投与した。検体投与後、無給餌、無給水条件下で検体投与後 6 時間まで尿を採取した。

結果：400mg/kg 群において、対照群と比較して尿中 Na⁺および Cl⁻の排泄量の増加が認められたが、2000mg/kg 群では同様の変化が認められず、用量に関連した変化ではないことから、投与による変化とは判断しなかった。2000mg/kg 群において浸透圧が統計学的に有意な高値を示したが、2000mg/kg 群における他の項目、尿量および尿電解質の排泄量には、対照群との差が認められないことから、投与との関連性は不明であった。

尿量では、対照群と投与群の間に統計学的な有意差は認められなかった。

7. ラットの自律神経系に対する作用/瞳孔径の測定

供試動物：BrlHan:WIST@Jcl (GALAS)雄ラット, 199.5~221.2g, 一群各 5 匹

投与方法：検体を乳鉢内で微粉碎後、0.5%メチルセルロース(MC)/0.4%Tween80 水溶液に懸濁して 0(0.5%MC/0.4%Tween80 水溶液)、80、400 および 2000mg/kg を経口投与した。検体投与前、投与後 30、60、120、180 および 360 分後に瞳孔径を測定した。

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

結 果：いずれの観察時間においても対照群と投与群の間に差は認められなかった。

以上の結果から、本検体は投与後の症状、中枢神経系、循環器系および自律神経系に対する作用は認められなかった。腎機能に対しては 2000mg/kg 群において尿浸透圧の増加が認められたが、投与との関連については不明であった。

スピロテトラマトの「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

項目	投与経路	投与量 mg/kg	動物数/ 群	作用量 mg/kg	無作用量 mg/kg	結果の 概要	
中 枢 神 経 系	ラットの一般 症状 (Irwin 法)	経口	0, 80, 400, 2000	♂:5	—	♂:2000	影響なし
	マウスの自発運 動量	経口	0, 80, 400, 2000	♂:6	—	♂:2000	影響なし
	マウス痙攣誘発 電撃刺激	経口	0, 80, 400, 2000	♂:6	—	♂:2000	影響なし
	ラットの体温	経口	0, 80, 400, 2000	♂:5	—	♂:2000	影響なし
循 環 系	ラットの循環器 系 血圧, 心拍数	経口	0, 80, 400, 2000	♂:5	—	♂:2000	影響なし
腎 機 能	ラットの尿量, 尿 中電解質, 尿浸透圧	経口	0, 80, 400, 2000	♂:5	2000	♂:400	2000mg/kg 群で 尿浸透圧の増加
自 律 神 経 系	ラットの瞳孔径	経口	0, 80, 400, 2000	♂:5	—	♂:2000	影響なし

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

(16) その他

1) 雄ラットを用いた連続経口投与による繁殖毒性の評価

(資料 No. 原体-35)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2005年5月23日

試験目的：

検体純度：

試験動物：

投与期間：

試験方法：

観察・検査項目及び結果：

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

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

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

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

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

2)雄ラットを用いた代謝物エノール体の連続経口投与による繁殖毒性の評価

(資料 No. 原体-36)

試験機関：

報告書作成年月日：2006年6月30日

試験目的：

検体純度：

試験動物：

投与期間：

試験方法：

投与用量設定の根拠；

観察・検査項目及び結果：

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

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

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

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

3) 雄ラットを用いた飼料混入投与による 28 日間反復経口投与免疫毒性試験

(資料 No. 原体-37)

試験機関：Bayer CropScience

[GLP 対応]

報告書作成年：2011 年

検体純度：

供試動物：Rj:WI (IOPS HAN) 系 Wistar 雄ラット、1 群各 10 匹

投与開始時 約 8 週齢、体重 314~371g

投与方法：検体を 0 (対照群)、500、2500 および 12000 ppm の濃度で飼料に混入し 28 日間にわたり随時摂食させた。

陽性対照群にはシクロホスファミドを滅菌水に溶解して 3.5mg/kg/日で 28 日間強制経口投与した。投与液量は 5mL/kg とした。

用量の選択根拠：

観察・検査項目及び結果：

一般症状及び死亡率；全動物について毎日 2 回 (週末および休日は 1 回)、死亡および瀕死状態について確認し、一般状態については少なくとも毎日 1 回記録した。詳細な身体検査は少なくとも週 1 回実施した。

検体投与に起因した一般症状および死亡は陽性対照群も含めいずれの群でも認められなかった。

体重；全動物の体重を、投与前は少なくとも週 1 回、投与開始日 (試験 1 日目)、投与期間中週 1 回、および剖検前に測定した。

12000ppm 群では、平均体重が試験 8 日目以降に平均体重が対照群を統計学的に有意に 5~7% 下回った ($p \leq 0.05$, Dunnett's test)。試験 1 日~29 日の体重増加量は 74g で対照群の 103g と比較し統計学的に有意に低下 ($p \leq 0.01$, Dunnett test) した。2500 および 500ppm 群では投与による体重への影響は認められなかった。

陽性対照群では試験 1 日~29 日の体重増加量が 85g で対照群と比較し統計学的に有意に低下 ($p \leq 0.05$, T-test) 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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

摂餌量； 全動物の摂餌量を毎週測定した。

12000ppm 群において、試験 8 日目の摂餌量が対照群を約 14% ($p \leq 0.01$, Dunnet's test) 下回り、その後は 4~7% 下回ったが統計学的には有意ではなかった。2500 および 500 ppm 群では、投与による摂餌量への影響は認められなかった。

陽性対照群では、試験 15 日以降対照群を 6~8% 統計学的に有意に ($p \leq 0.05$ / $p \leq 0.01$, T-test) 下回った。

検体摂取量； 投与期間中における平均検体摂取量は以下のとおりであった。

表 1 検体摂取量

用量 (ppm)	500	2500	12000
検体摂取量 (mg/kg/日)	33	164	795

免疫毒性； 試験 26 日に、羊赤血球 (SRBC) の PBS 溶液 (5×10^8 細胞/mL) を 0.5mL/動物の用量で全動物に静注し、免疫性を付与した。SRBC 投与 4 日後 (検体投与 30 日後) に、全動物の眼窩後静脈叢から採血し、血清を得た。血清中の SRBC 特異的 IgM を ELISA 法により測定した。

各群における SRBC 特異的 IgM 濃度を下表に示す。

SRBC 特異的 IgM 濃度は、個体別の変動が対照群、検体処理群共に大きかったものの対照群の平均濃度は高く、試験動物の SRBC に対する感受性が確認された。

検体処理群では SRBC 特異的 IgM 濃度の意義のある変化は認められなかった。12000ppm 群では SRBC 特異的 IgM 濃度が対照群と比較しやや低下したが、本試験機関で実施された以前の試験で観察された範囲内であり、さらに全動物が SRBC による免疫性付与に対して良好な応答を示したことから、投与に関連した変化とは考えられなかった。一方、陽性対照群は顕著に SRBC 特異的 IgM 濃度を低下させた。

表 2 平均 SRBC 特異的 IgM 濃度 (u/mL)

対照群	検体			シクロホスファミド [*] 3.5mg/kg/日
	500 ppm	2500 ppm	12000 ppm	
13354 (± 19295)	11564 (± 7557)	13294 (± 17077)	9825 (± 7050)	**1021 (± 665)

** : $p < 0.01$ (Mann-Whitney U-test)

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

剖検および臓器重量；投与 30 日後に、全動物について剖検（主要臓器、組織および体腔）を行った。脾臓および胸腺重量を測定し、対体重比を算出した。

各群の臓器重量、最終体重および臓器重量の対照群に対する割合を次表に示す。12000ppm 群において最終体重が対照群より減少したが統計学的有意差は認められなかった。胸腺の実重量が対照群と比較して統計学的に有意に低下した。この変化は、外因性抗原の注射に反応する免疫系において、SRBC 特異的 IgM 濃度の意義のある変化が認められなかったように、関連する機能的変化がない場合、最終体重が減少したことからも示されるような全身毒性に起因する非特異的なストレス反応を反映していると考えられ、直接の免疫毒性影響によるものとは考えられなかった。脾臓では投与による変化はいずれの用量においても認められなかった。

一方、陽性対照群は脾臓および胸腺重量を有意に低下させた。

表 3 臓器重量

試験群	検体			シクロホスファミド 3.5mg/kg/日
	500 ppm	2500 ppm	12000 ppm	
最終体重	101	102	94	96
脾臓	実重量	100	110	↓71
	対体重比	99	117	↓74
胸腺	実重量	103	↓78	↓70
	対体重比	100	82	↓72

↓：p<0.05、↑↓：p<0.01、検体は Dunnett's test、シクロホスファミドは T-test
表中の数値は対照群に対する割合(%)

脾臓および胸腺で認められた肉眼的変化を次表に示す。

12000ppm 群において、胸腺の萎縮・小型化が 10 匹中 2 匹に認められた。

一方、陽性対照群では、脾臓および胸腺の萎縮/小型化が多くの動物で認められた。

表 4 脾臓および胸腺における肉眼的変化

試験群	対照群	検体			シクロホスファミド 3.5mg/kg/日
		500 ppm	2500 ppm	12000 ppm	
検査動物数	10	10	10	10	10
脾臓	萎縮/小型化	1	1	0	6*
胸腺	萎縮/小型化	0	0	2	5*

*：p<0.05 (Fisher's exact test、申請者の計算による)

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

以上の結果から、検体の免疫毒性は認められず、試験した免疫毒性検査項目に関する無毒性量は12000 ppm (795 mg/kg/日)と判断された。

[申請者追記]

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

2. 原体混在物および代謝物の毒性

(1) 急性毒性

1)

の

ラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 No. 代・混-1)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2005 年 10 月 14 日

検体純度:

供試動物: ウィスター (HsdCpb:Wu)系ラット、10~12 週齢、

体重 141~165g、1 群雌 3 匹

観察期間: 14 日間

試験方法: OECD ガイドライン No. 423

投与方法: 検体を所定量秤量し、2%クレモホア EL を加えた水道水で懸濁液を調製、10ml/kg の投与容量で経口投与した。投与前に一晩絶食した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重測定は、投与直前、投与後 7 日および 14 日に行った。全動物について肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌 >2000
死亡開始および 終了時間	死亡は認められなかった。
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった。
死亡例の認められなかった最 高投与量(mg/kg)	2000

中毒症状および死亡は認められなかった。

投与に関連する体重の変化は認められなかった。

剖検において、検体に起因する所見は認められなかった。

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

2)

の

ラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 No. 代・混-2)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2006年4月6日

検体純度：

供試動物：ウィスター (HsdCpb:Wu)系ラット、10～12週齢、

体重 180～194g、1群雌3匹

観察期間：14日間

試験方法：OECD ガイドライン No. 423

投与方法：検体を所定量秤量し、2%クレモホア EL を加えた水道水で懸濁液を調製、10ml/kg の

投与容量で経口投与した。投与前に一晩絶食した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を14日間観察した。体重測定は、投与直前、投与後7日

および14日に行った。全動物について肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌 >2000
死亡開始および 終了時間	死亡は認められなかった。
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった。
死亡例の認められなかった最 高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状および死亡は認められなかった。

投与に関連する体重の変化は認められなかった。

剖検において、検体に起因する所見は認められなかった。

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

3)

の

ラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 No. 代・混-3)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2005 年 12 月 8 日

検体純度：

供試動物：ウィスター (HsdCpb:Wu)系ラット、10～12 週齢、

体重 171～182g、1 群雌 3 匹

観察期間：14 日間

試験方法：OECD ガイドライン No. 423

投与方法：検体を所定量秤量し、2%クレモホア EL を加えた水道水で懸濁液を調製、10ml/kg の投与容量で経口投与した。投与前に一晩絶食した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重測定は、投与直前、投与後 7 日および 14 日に行った。全動物について肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌 >2000
死亡開始および 終了時間	死亡は認められなかった。
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった。
死亡例の認められなかった最 高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状および死亡は認められなかった。

投与に関連する体重の変化は認められなかった。

剖検において、検体に起因する所見は認められなかった。

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

4) の
ラットを用いた急性経口毒性試験 (資料 No. 代・混-4)

試験機関：
[GLP 対応]
報告書作成年月日：2006年5月5日

検体純度：

供試動物：ウィスター (HsdCpb:Wu)系ラット、10～12週齢、
体重 159～191g、1群雌3匹

観察期間：14日間

試験方法：OECD ガイドライン No. 423

投与方法：検体を所定量秤量し、0.5%メチルセルロース水溶液で懸濁液を調製、10ml/kgの投
与容量で経口投与した。投与前に一晩絶食した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を14日間観察した。体重測定は、投与直前、投与後7日
および14日に行った。全動物について肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌 >2000
死亡開始および 終了時間	死亡は認められなかった。
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった。
死亡例の認められなかった最 高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状および死亡は認められなかった。

投与に関連する体重の変化は認められなかった。

剖検において、検体に起因する所見は認められなかった。

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

(2) 変異原性

1)

の細菌を用いた

復帰突然変異試験

(資料 No. 代・混-5)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2005 年 12 月 15 日

検体の純度:

試験系: 細菌 (サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102))

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 5 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下、非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は DMSO に溶解し、16~5000 μ g/プレートの範囲の 6 濃度で実施した。試験は各菌株あたり 3 プレートとし、2 回行った (初回; プレートインコーポレーション法、第二回目; プレインキュベーション法)。陽性対照としてアジ化ナトリウム (NaN_3)、ニトロフラントイン (NF)、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン (4-NPDA)、マイトマイシン C (MMC)、クメンヒドロペルオキシド (Cumene)、2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

なお、用量設定試験は行わなかった。

結果及び考察

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。1581 μ g/プレートまでの濃度では、生育阻害は認められなかった。生育阻害の程度から、5000 μ g/プレートではプレートインコーポレーション法のみを評価の対象とした。

一方、陽性対照として用いた非代謝活性化条件下での NaN_3 、NF、4-NPDA、MMC および Cumene では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化条件下での 2-AA は、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断された。

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

表 1. 1 回目試験(プレート インコーポレーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照(DMSO)		—	118	8	233	60	6
検体	16	—	103	10	207	58	4
	50	—	131	9	245	59	6
	158	—	131	8	210	54	5
	500	—	136	8	215	56	6
	1581	—	124	10	212	54	5
	5000	—	104	6	161	60	4
対照(DMSO)		+	148	11	257	63	6
検体	16	+	152	11	266	62	5
	50	+	181	8	273	62	5
	158	+	162	8	287	58	6
	500	+	137	9	261	69	8
	1581	+	162	12	251	70	4
	5000	+	123	7	252	69	6
陽 性 対 照	NaN ₃	10	—		666		
	NF	0.2	—	331			
	4-NPDA	10/0.5*	—			189	90
	MMC	0.2	—		644		
	2-AA	3	+	1631	109	647	1454

* : TA1537:10μg/プレート, TA98:0.5μg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

MMC : マイトマイシンC

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及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 2. 2 回目試験(ブレインキューベーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	143	17	238	26	8
検体	16	—	149	14	285	27	8
	50	—	142	20	250	32	5
	158	—	135	18	254	35	9
	500	—	138	18	235	41	6
	1581	—	127	15	194	46	3
	5000	—	40B	-B	136B	5B	-B
対照 (DMSO)		+	140	13	289	45	7
検体	16	+	131	14	301	49	6
	50	+	164	9	299	53	7
	158	+	171	12	309	48	7
	500	+	163	12	325	51	8
	1581	+	149	11	325	53	8
	5000	+	91	3B	175B	22B	-B
陽 性 対 照	NaN ₃	10	—		573		
	NF	0.2	—	442			
	4-NPDA	10/0.5*	—			167	112
	Cumene	50	—		468		
	2-AA	3	+	1739	142	646	1304

B : 背景細菌濃の減少

* : TA1537; 10μg/プレート, TA98; 0.5μg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

Cumene : クメンヒドロペルオキシド

2-AA : 2-アミノアントラセン

2)

の細菌を用いた

復帰突然変異試験

(資料 No. 代・混-6)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2006 年 5 月 9 日

検体の純度:

試験系: 細菌 (サルモネラ菌 (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA102))

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 5 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下、非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は DMSO に溶解し、16~5000 μ g/プレートの範囲の 6 濃度で実施した。試験は各菌株あたり 3 プレートとし、2 回行った (初回; プレートインコーポレーション法、第二回目; プレインキュベーション法)。陽性対照としてアジ化ナトリウム (NaN_3)、ニトロフラントイン (NF)、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン (4-NPDA)、マイトマイシン C (MMC)、クメンヒドロペルオキシド (Cumene)、2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

なお、用量設定試験は行わなかった。

結果及び考察

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。1581 μ g/プレート以上の濃度では、生育阻害が認められた。高用量区でも生育阻害の程度は弱かったので、5000 μ g/プレートまでを評価の対象とした。一方、陽性対照として用いた非代謝活性化条件下での NaN_3 、NF、4-NPDA、MMC および Cumene では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化条件下での 2-AA は、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断された。

表 1. 1 回目試験(プレート インコーポレーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	118	16	201	35	4
検体	16	—	104	15	181	35	5
	50	—	114	16	179	36	6
	158	—	126	12	208	34	5
	500	—	108	14	180	29	4
	1581	—	112	14	171	36	4
	5000	—	107	11B	183	32	3
対照 (DMSO)		+	154	9	237	47	8
検体	16	+	133	9	243	41	4
	50	+	145	12	237	40	5
	158	+	150	8	237	41	6
	500	+	125	9	242	43	7
	1581	+	126	8	213	46	6
	5000	+	107	5	224	40	4
陽 性 対 照	NaN ₃	10	—		653		
	NF	0.2	—	275			
	4-NPDA	10/0.5*	—			156	78
	MMC	0.2	—		646		
	2-AA	3	+	1435	129	582	904

B : 背景細菌叢の減少

* : TA1537; 10µg/プレート, TA98; 0.5µg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

MMC : マイトマイシンC

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及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 2. 2 回目試験(ブレインキューベーション法)

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 µg/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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照(DMSO)		—	160	15	216	31	9
検体	16	—	149	17	189	33	8
	50	—	138	22	197	29	5
	158	—	155	16	260	30	5
	500	—	177	13	246	26	8
	1581	—	139	18	201	34	9
	5000	—	145	14	174	27	7
対照(DMSO)		+	155	10	279	45	8
検体	16	+	148	12	266	32	7
	50	+	132	10	265	34	6
	158	+	140	11	283	48	7
	500	+	131	10	315	39	10
	1581	+	135	11	288	40	9
	5000	+	106	8	242	34	5
陽 性 対 照	NaN ₃	10	—		435		
	NF	0.2	—	426			
	4-NPDA	10/0.5*	—			183	122
	Cumene	50	—		402		
	2-AA	3	+	1532	206	576	944

* : TA1537:10µg/プレート, TA98:0.5µg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

Cumene : クメンヒドロペルオキシド

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及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

3)

の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No. 代・混-7)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2005 年 12 月 13 日

検体の純度:

試験系: 細菌 (サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102))

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の 5 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下、非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は DMSO に溶解し、16~5000 μ g/プレートの範囲の 6 濃度で実施した。試験は各菌株あたり 3 プレートとし、2 回行った (初回; プレートインコーポレーション法、第二回目; プレインキュベーション法)。陽性対照としてアジ化ナトリウム (NaN_3)、ニトロフラントイン (NF)、4-ニトロ-1, 2-フェニレンジアミン (4-NPDA)、マイトマイシン C (MMC)、クメンヒドロペルオキシド (Cumene)、2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

なお、用量設定試験は行わなかった。

結果及び考察

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。すべての菌株で 5000 μ g/プレートまでの濃度で、生育阻害は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた非代謝活性化条件下での NaN_3 、NF、4-NPDA、MMC および Cumene では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化条件下での 2-AA は、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断された。

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

表 1. 1 回目試験(プレート インコーポレーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照(DMSO)		—	149	16	249	46	6
検体	16	—	156	19	212	51	7
	50	—	171	14	238	52	6
	158	—	147	17	264	47	6
	500	—	141	15	245	59	5
	1581	—	133	17	219	51	7
	5000	—	164	16	235	44	7
対照(DMSO)		+	162	12	242	61	7
検体	16	+	169	10	251	56	4
	50	+	188	10	244	55	7
	158	+	171	9	228	68	6
	500	+	179	11	250	48	5
	1581	+	167	10	223	46	7
	5000	+	166	9	236	54	5
陽 性 対 照	NaN ₃	10	—		610		
	NF	0.2	—	340			
	4-NPDA	10/0.5*	—			150	94
	MMC	0.2	—		704		
	2-AA	3	+	1690	122	880	1321

* : TA1537:10μg/プレート, TA98:0.5μg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

MMC : マイトマイシンC

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及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 2. 2 回目試験(ブレインキューベーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		-	110	11	244	53	9
検体	16	-	107	8	210	59	7
	50	-	120	9	229	50	7
	158	-	143	13	278	57	7
	500	-	143	10	247	59	9
	1581	-	112	10	252	59	6
	5000	-	99	8	240	54	6
対照 (DMSO)		+	191	12	278	59	8
検体	16	+	188	12	275	60	8
	50	+	175	10	285	47	8
	158	+	191	8	258	56	9
	500	+	180	10	265	58	8
	1581	+	180	8	266	53	6
	5000	+	155	7	290	50	6
陽 性 対 照	NaN ₃	10	-		570		
	NF	0.2	-	379			
	4-NPDA	10/0.5*	-			178	121
	Cumene	50	-		479		
	2-AA	3	+	1631	145	662	1297

* : TA1537; 10μg/プレート, TA98; 0.5μg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

Cumene : クメンヒドロペルオキシド

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及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

4)

の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No. 代・混-8)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2006年5月24日

検体の純度：

試験系：細菌（サルモネラ菌〈TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA102〉）

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の5株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下、非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体はDMSOに溶解し、16~5000 μ g/プレートの範囲の6濃度で実施した。試験は各菌株あたり3プレートとし、2回行った(初回；プレートインコーポレーション法、第二回目；プレインキュベーション法)。陽性対照としてアジ化ナトリウム(NaN_3)、ニトロフラントイン(NF)、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン(4-NPDA)、マイトマイシンC(MMC)、クメンヒドロペルオキシド(Cumene)、2-アミノアントラセン(2-AA)を用いた。

なお、用量設定試験は行わなかった。

結果及び考察

表1、2に示したように、2回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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に溶媒対照の2倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。すべての菌株で5000 μ g/プレートまでの濃度で、生育阻害は認められなかった。

一方、陽性対照として用いた非代謝活性化条件下での NaN_3 、NF、4-NPDA、MMCおよびCumeneでは、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、代謝活性化条件下での2-AAは、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断された。

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

表 1. 1 回目試験(プレート インコーポレーション法) (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照(DMSO)		-	129	17	195	36	6
検体	16	-	137	20	185	33	5
	50	-	131	24	193	52	6
	158	-	135	21	213	38	6
	500	-	124	24	153	32	6
	1581	-	129	22	169	40	7
	5000	-	131	25	171	30	3
対照(DMSO)		+	146	10	233	43	7
検体	16	+	121	6	254	49	6
	50	+	116	6	230	53	6
	158	+	150	6	251	49	6
	500	+	140	8	221	44	6
	1581	+	132	7	241	39	5
	5000	+	122	3	259	44	5
陽 性 対 照	NaN ₃	10	-		689		
	NF	0.2	-	281			
	4-NPDA	10/0.5*	-			157	65
	MMC	0.2	-		526		
	2-AA	3	+	1344	81	590	960

* : TA1537;10μg/プレート, TA98;0.5μg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

MMC : マイトマイシンC

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及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 2. 2 回目試験(ブレインキューベーション法)

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 μg/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	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
対照 (DMSO)		—	120	18	164	26	8
検体	16	—	107	15	168	29	7
	50	—	127	19	176	26	7
	158	—	132	16	168	30	5
	500	—	136	23	170	25	6
	1581	—	119	25	167	23	6
	5000	—	119	19	171	26	6
対照 (DMSO)		+	158	10	245	34	8
検体	16	+	139	8	253	41	6
	50	+	154	6	254	35	6
	158	+	169	8	240	42	8
	500	+	166	7	243	39	6
	1581	+	152	9	253	40	7
	5000	+	145	6	258	28	5
陽 性 対 照	NaN ₃	10	—		678		
	NF	0.2	—	460			
	4-NPDA	10/0.5*	—			174	107
	Cumene	50	—		392		
	2-AA	3	+	1190	90	410	1013

* : TA1537:10μg/プレート, TA98:0.5μg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

Cumene : クメンヒドロペルオキシド

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及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

3. 製剤

(1) ラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 No. 製剤-1)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2005年7月1日

検体純度：スピロテトラマト水和剤 (22.4%)

供試動物：ウィスター (HsdCpb:Wu)系ラット、10~12週齢、

体重 161~177g、1群雌3匹

観察期間：14日間

試験方法：OECD ガイドライン No. 423

投与方法：検体を水道水に懸濁させて 10ml/kg の投与容量で経口投与した。投与前に 16~24 時間絶食した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重測定は、投与直前、投与 7 日および 14 日に行った。全動物について肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌 >2000
死亡開始および 終了時間	死亡は認められなかった。
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった。
死亡例の認められなかった最 高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状および死亡は認められなかった。

順調な体重増加が認められた。

剖検において、検体に起因する所見は認められなかった。

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

(2) ラットを用いた急性経皮毒性試験

(資料 No. 製剤-2)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2005年7月1日

検体純度: スピロテトラマト水和剤 (22.4%)

供試動物: ウィスター (HsdCpb:Wu)系ラット、9~13週齢、

体重 雄: 206~222g、雌: 208~225g、1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

投与方法: 投与前日に剃毛した背部皮膚(体表面積の約10%)に検体を24時間塗布した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重測定は、投与直前、投与後7日および14日に行った。全動物について肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	4000
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 >4000 雌 >4000
死亡開始および 終了時間	死亡は認められなかった。
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった。
死亡例の認められなかった最 高投与量 (mg/kg)	4000

局所的な一般状態の変化として、投与部位が黄色に変色していたが、毒性学的に意味のない変化と考えられた。

雌の第1週で体重増加量のわずかな減少が認められたが、投与方法のストレスによるもので被験物質に関連したものとは考えられなかった。

剖検において、検体に起因する所見は認められなかった。

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

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

1) 皮膚刺激性

ウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 No. 製剤-3)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日：2005年8月19日

検体純度：スピロテトラマト水和剤

組成 スピロテトラマト原体：22.4%

界面活性剤、水等：77.6%

供試動物：白色ウサギ (Cr1:KBL (NZW)BR)、若齢成獣、1群雌3匹、試験開始時体重 2.3~2.7kg

観察期間：3日間

投与方法：投与1日前に動物の背部刈毛した。検体 0.5ml を 2.5×2.5cm 四方に投与後ガーゼパッチで覆い、適用部位を非刺激性の包帯で固定した。曝露時間は4時間とし、適用部位を水で洗浄した。反対側の処理しない皮膚を対照とした。

観察項目：曝露終了後1時間、24時間、48時間、72時間に塗布部位の刺激性変化（紅斑、痂皮、浮腫）の有無等を観察し、評価した。
体重測定は、検体投与直前に行った。

結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

動物番号	項目	最高評点*	曝露後時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
1	紅斑/痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫形成	4	0	0	0	0
2	紅斑/痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫形成	4	0	0	0	0
3	紅斑/痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫形成	4	0	0	0	0
合計	紅斑/痂皮形成	12	0	0	0	0
	浮腫形成	12	0	0	0	0
平均	紅斑/痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫形成	4	0	0	0	0

*：判定基準の最高点

投与後1時間、24時間、48時間及び72時間の観察において、検体に起因する所見は認められなかった。

以上の結果から、本検体はウサギの皮膚に対して刺激性がないものと判定した。

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

2) 眼刺激性

ウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 No. 製剤-4)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年月日: 2005 年 8 月 19 日

検体純度: スピロテトラマト水和剤

組成 スピロテトラマト原体: 22.4%

界面活性剤、水等 : 77.6%

供試動物: 白色ウサギ (Cr1:KBL(NZW)BR)、若齢成獣、1 群雌 3 匹、試験開始時体重 2.8~3.0kg

観察期間: 3 日間

投与方法: 検体 0.1ml を一方の眼の結膜嚢内に投与した。検体の損失を防ぐため、約 1 秒間、眼瞼を緩やかに合わせ保持した。もう一方の眼は未処理の対照眼とした。

観察項目: 検体投与後 1 時間、24 時間、48 時間および 72 時間に、角膜、虹彩及び結膜の刺激性変化を観察し、Draize の判定基準に従って採点した。投与 24 時間および 7 日後にフルオレセイン液を用いて検査した。体重測定は、検体投与直前に行った。

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

結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

動物 番号	項 目		最高評点	適 用 後 時 間					評価*
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	24、48、72 時間の平均	
1	角膜	混濁程度	4	0	0	0	0	0	-
		面積	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	-
	結膜	発赤	3	1	1	0	0	0.3	-
		浮腫	4	0	0	0	0	0	-
	合計**		110	2	2	0	0		
2	角膜	混濁程度	4	0	0	0	0	0	-
		面積	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	-
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	0	-
		浮腫	4	0	0	0	0	0	-
	合計**		110	2	0	0	0		
3	角膜	混濁程度	4	0	0	0	0	0	-
		面積	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	-
	結膜	発赤	3	1	2	0	0	0.7	-
		浮腫	4	0	0	0	0	0	-
	合計**		110	2	4	0	0		
合 計**		330	6	6	0	0			
平 均**		110	2	2	0	0			

*：評価 角膜混濁：<2=-, ≥2<3=+, ≥3=++

虹彩：<1=-, ≥1<2=+, =2=++

結膜発赤：<2.5=-, ≥2.5=+

結膜浮腫：<2=-, ≥2=+

**：合計/平均は Draize の基準に従って申請者が計算した。

結膜の発赤が1時間に全動物に、1日後では2匹に認められたが、48時間後には消失した。また、中毒症状は認められなかった。

以上の結果から、本検体はウサギの眼に対して刺激性がないものと判定した。

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

(5) モルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 No. 製剤-5)

試験機関:

報告書作成年月日: 2005年2月25日

検体純度: スピロテトラマト水和剤

組成 スピロテトラマト原体: 22.4%

界面活性剤、水等 : 77.6%

供試動物: SPF-bred モルモット (Cr1:HA)、約4~5週齢、体重265~348g、

感作群: 雌20匹、対照群: 雌10匹

試験期間: 約5週間

試験操作: Buehler 法

投与量設定根拠: 被験物質を0、25、50および100%の濃度で滅菌生理食塩水に懸濁した被験液0.5mlを6時間閉塞貼付した。いずれの濃度においても皮膚反応は認められなかった。したがって、100%を感作および惹起濃度とした。

感作: 左側腹部を剃毛し、100%被験液0.5mlを6時間閉塞貼付した。

この操作を7日間隔で3回行った。非感作群は滅菌生理食塩水0.5mlを同様に閉塞貼付した。

惹起: 最終感作2週間後に剃毛した右腹に100%被験液0.5mlを含むパッチを6時間貼付した。

対照として、各動物の右腹頭側に被験液を含まないドライパッチを同様に貼付した。

観察・検査項目: 惹起開始30時間及び54時間後に適用部位の皮膚を観察し、Magnusson & Kligmanの基準にしたがって採点した。

反応の判定基準を以下に示す。

0 = 反応なし

1 = 軽度の部分的な紅斑

2 = 中程度の融合性の紅斑

3 = 強い紅斑及び浮腫

対照群と比較して陽性反応の動物が15%以上みられた場合、その被験物質は感作性があると判断した。

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

結果：各観察時間における感作変化が認められた動物数を下表に示す。

	感 作	惹 起	供試 動物 数	感作反応動物数								陽性率	
				30 時間後				54 時間後				30 時間	54 時間
				皮膚反応評点				皮膚反応評点					
				0	1	2	3	0	1	2	3		
検 体	100%検体	100%検体	20 匹	13	7	0	0	14	6	0	0	35	30
		ドライパッチ		20	0	0	0	20	0	0	0	0	0
	生理食塩 水	100%検体	10 匹	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
		ドライパッチ		10	0	0	0	10	0	0	0	0	0

体重増加において、感作群と対照群との差は認められなかった。

惹起後の皮膚反応では、感作群において 7/20 例に皮膚反応が認められた。非感作群ではいずれの動物においても、皮膚反応は認められなかった。

以上の結果から本検体の皮膚感作性は陽性であると判断した。

なお、陽性対照物質 Alpha hexyl cinnamic aldehyde を用いて、別に実施した Buehler 法による試験結果を次に示す。

皮膚反応を示した動物数

群	感作濃度 (%)	惹起濃度 (%)	陽性率 (%)
投与群	30	20	60
対照群	0	20	0

上記に示すように、既知の皮膚感作性陽性物質 Alpha hexyl cinnamic aldehyde には明らかな感作性が認められ、動物の感作性物質に対する感受性が確認された。