

9. 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

(1) トルクロホスメチル原体のラットを用いた繁殖毒性試験

(資料 9-1)

試験機関：Hazleton Laboratories America

[GLP 対応]

報告書作成年：1985年

検 体： トルクロホスメチル原体

検体純度：

供試動物： Sprague-Dawley 系ラット、P 世代；1 群雌雄各 30 匹、F₁ および F₂ 世代；1 群雌雄各 25 匹、投与開始時 6 週齢

投与開始時体重

P 世代；雄 155.9~234.6 g、雌 115.9~169.6 g

F₁ 世代；雄 58.7~132.1 g、雌 57.7~117.0 gF₂ 世代；雄 27.5~115.5 g、雌 24.6~102.7 g投与期間： P 世代：投与開始から F_{1b} 児離乳時までの 35 週間F₁ 世代：離乳時から F_{2b} 児離乳時までの 33 週間F₂ 世代：離乳時から F_{3b} 児離乳時までの 33 週間

(1981年12月9日~1983年11月21日)

投与方法： 検体を 0、100、300、1000 ppm 含有した飼料を自由に摂取させた。

[投与量設定根拠]

交配・調整・選抜及び観察・検査項目：概要を次頁の表にまとめた。

一般状態及び死亡率：試験期間中、全動物の一般状態および生死を毎日観察した。

体重及び摂餌量：生育期間中は、すべての動物について体重及び摂餌量を週 1 回測定した。

交配後には、母動物について妊娠 0 および 20 日、哺育 1、4、7、14 及び 21 日の体重を、雄親動物については交配後 4、8、12 および 16 週の体重を記録した。また、児動物については哺育 1、4、7、14 および 21 日に個体別の体重を記録した。

交配及び妊娠の確認：同群内の雄と雌を 1 対 1 で同居させ、膣栓また精子の発見により交尾を確認した。交尾の証拠が認められた日を妊娠 0 日とした。7 日間の同居期間が過ぎても交尾の徴候が認められない雌については、同じ群の別の雄と交配した。

妊娠の確認は出産をもって行った。

繁殖性に関する指標：交配、妊娠及び哺育期間の観察に基づき、次の指標を算出した。

雄の交尾率 (%) = (交尾を認めた雄数/雌と同居させた雄数) × 100

雌の交尾率 (%) = (交尾を認めた雌数/雄と同居させた雌数) × 100

妊娠率 (%) = (妊娠雌数/雄と同居させた雌数) × 100

出産率 (%) = (生存児出産雌数/妊娠雌数) × 100

哺育1日性比 (%) = (雄産児数/総産児数) × 100

哺育4、7、14、21日性比 (%) = (生存雄児数/総生存児数) × 100

哺育1、4日生存率 (%) = (哺育1、4日の生存児数/産児数) × 100

哺育7、14、21日生存率 (%) =

(哺育7、14、21日の生存児数/哺育4日の調整後児数) × 100

病理組織学的検査：F₂世代親動物の全雌動物及び各群10匹の雄親動物、F_{1b}、F_{2b}及びF_{3b}児動物から選抜された各群雌雄各5匹、ならびに各世代の不妊娠雌から次の組織を採取し、病理標本を作成して検鏡した。

副腎、すべての肉眼的病変、大動脈、骨髄、脳、盲腸、結腸、十二指腸、食道、眼、心臓、回腸、空腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、胸部脊髄、乳腺、坐骨神経、卵巢、膵臓、下垂体、前立腺、唾液腺、精囊、皮膚、脾臓、胃、精巣および精巣上体、胸腺、甲状腺、舌、気管、膀胱、子宮

臓器重量：病理組織学的検査に供したF_{1b}、F_{2b}およびF_{3b}児動物について、次の臓器重量を測定し、対体重比を求めた。

脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胸腺、精巣および精巣上体、副腎、卵巢

また、各世代の不妊娠雌について、次の臓器重量を測定し、対体重比を求めた。

脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胸腺、副腎、卵巢

試験の概要

世代	期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	生育(15週)		死亡と瀕死の有無(毎日) 体重および摂餌量測定、外貌/行動観察を週1回
	1回目交配(最高18日)	雌1対雄1で交配。交配は膣栓または精子で確認(妊娠0日)	交配状況の観察
	妊娠(3週)		妊娠0、20日の体重測定
	出産		産児数(生存及び死亡)、外表異常、性別を記録
	哺育(21日)	出産後4日に各同腹児数を10匹に調整(可能な場合5匹/性)	哺育1、4、7、14、21日の母動物体重測定 生後1、4、7、14、21日の生存児数、児動物体重測定
	離乳		F _{1b} 児の肉眼的病理検査
	2回目交配(最高18日)	(1回目交配に準ずる)	(1回目交配に準ずる)
	妊娠(3週)		(1回目交配に準ずる)
	出産		(1回目交配に準ずる)
	哺育(21日)	(1回目交配に準ずる)	(1回目交配に準ずる)
F ₁	離乳	F _{1b} 離乳児から継代用の各群雌雄各25匹、病理組織学的検査用の各群雌雄各5匹を選抜	親動物および離乳児の肉眼的病理検査 選抜離乳児の臓器重量測定、病理組織学的検査 不妊娠雌動物の臓器重量測定
	生育(15週)		(P世代に準ずる)
	1回目交配(最高18日)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	妊娠(3週)		(P世代に準ずる)
	出産		(P世代に準ずる)
	哺育(3週)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	離乳	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	2回目交配(最高18日)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	妊娠(3週)		(P世代に準ずる)
	出産		(P世代に準ずる)
F ₂	哺育(3週)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	離乳	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	生育(15週)		(F ₁ 世代に準ずる)
	1回目交配(最高18日)	(F ₁ 世代に準ずる)	(F ₁ 世代に準ずる)
	妊娠(3週)		(F ₁ 世代に準ずる)
	出産		(F ₁ 世代に準ずる)
	哺育(21日)	(F ₁ 世代に準ずる)	(F ₁ 世代に準ずる)
	離乳	(F ₁ 世代に準ずる)	(F ₁ 世代に準ずる)
	2回目交配(最高18日)	(F ₁ 世代に準ずる)	(F ₁ 世代に準ずる)
	妊娠(3週)		(F ₁ 世代に準ずる)
出産		(F ₁ 世代に準ずる)	
哺育(21日)	(F ₁ 世代に準ずる)	(F ₁ 世代に準ずる)	
離乳	F _{1b} 離乳児から病理組織学的検査用の各群雌雄各5匹を選抜	全親動物および離乳児の肉眼的病理検査 全雌親動物及び各群10匹の雄の病理組織学的検査 選抜離乳児の臓器重量測定、病理組織学的検査 不妊娠雌動物の臓器重量測定	

結 果： 概要を次表に示した。

試験期間中、いずれの親動物にも検体投与に関係のある臨床症状はみられなかった。

生育期間中の親動物の体重、摂餌量等は投与群と対照群で差がなかった。妊娠および哺育期間中の母動物の体重変化も各世代、各群でほぼ同じであった。検体投与によると考えられるような一貫性のある剖検所見はいずれの親動物でもみられなかった。

2 回の繁殖期とも不妊であった F_2 世代高用量群雌の卵巢の平均絶対および相対重量が対照群の値より高かった。しかしながら、卵巢に異常な組織形態学的な変化は認められなかった。

妊娠率、交尾率および出産率は各世代の各群でほぼ同じであった。

いずれの児動物においても、体重と生存率に関するデータに検体投与による差は認められなかった。臨床観察において、高用量群 F_{2a} で哺育 21 日に目および鼻の異常が、また F_{2b} の中間および高用量群で哺育 7 日に体型小型がいずれも高頻度に認められた。しかしながら、これらの変化に検体投与との関連はなかった。剖検所見においては各世代において自然発生的な所見を認めたのみであり、高頻度に認められた腎盂の拡張は、投与群と対照群でほぼ同じであった。臓器重量では F_{1b} 世代のすべての投与群で卵巢の絶対重量および相対重量の増加傾向がみられ、 F_{2b} 世代では胸腺、肝臓、心臓の重量あるいは相対重量が低い例が認められた。また、副腎重量の有意な増加 (F_{1b} 世代 300 ppm 群雌)、心臓重量の有意な減少 (F_{2b} 世代 1000 ppm 群雄) が観察されたが、いずれも一貫性のある変化ではなく、検体投与との関連はないと考えられた。病理組織学的検査では各世代において肺、肝臓、腎臓、心臓、胸腺などに種々の病変がみられたが、いずれも自然発生的もしくは偶発的なもので、検体投与との関連は認められなかった。

以上の結果より、3 世代にわたってトルクロホスメチル原体を飼料中に混入して投与した場合、最高投与量の 1000 ppm でも一般毒性および繁殖能力に対して何ら影響がみられなかった。

したがって、無毒性量は親動物及び児動物に対して 1000 ppm (P: 雄 70.6 mg/kg/日、雌 90.5 mg/kg/日、 F_1 : 雄 79.6 mg/kg/日、雌 98.5 mg/kg/日、 F_2 : 雄 78.2 mg/kg/日、雌 96.1 mg/kg/日) と判断される。繁殖については最高投与量の 1000 ppm でも影響がなかった。

[申請者注]

臨床観察において、高用量群 F_{2a} で哺育 21 日に目および鼻の異常が、また F_{2b} の中間および高用量群で哺育 7 日に体型小型がいずれも高頻度に認められた。しかしながら、いずれも世代間で一貫した変化がみられないことから、検体投与との関連はないと考えられた。

また、2 回の繁殖期とも不妊であった F_2 世代高用量群雌の卵巢の平均絶対および相対重量が対照群の値より高かった。しかしながら、卵巢に組織形態学的な変化は認められず、 F_{2b} 世代児動物の卵巢重量にも変化がみられないこと、ならびに世代間で一貫した変化がみられないことから、検体投与との関連はないと考えられた。

結果の概要

世代		親 : P 児 : F _{1a} , F _{1b}				親 : F ₁ 児 : F _{2a} , F _{2b}				親 : F ₂ 児 : F _{3a} , F _{3b}					
投与量 (ppm)		0	100	300	1000	0	100	300	1000	0	100	300	1000		
動物数	雄	30	30	30	30	25	25	25	25	25	25	25	25		
	雌	30	30	30	30	25	25	25	25	25	25	25	25		
一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった													
死亡数	雄	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0		
	雌	2	1	1	2	2	0	3	1	1	2	1	0		
生育期体重	雄	—	有意差なし			—	有意差なし			—	有意差なし	↓開始時	↓開始時		
	雌	—	有意差なし			—	↓開始時	有意差なし		—	有意差なし	↓開始時	↓開始時		
妊娠中体重増加量	a	—	有意差なし			—	有意差なし			—	有意差なし				
	b	—	有意差なし			—	有意差なし			—	有意差なし				
哺育期間体重増加量	a	—	有意差なし			—	有意差なし			—	有意差なし				
	b	—	有意差なし			—	有意差なし			—	有意差なし				
摂餌量	雄	—	有意差なし			—	有意差なし			—	有意差なし				
	雌	—	有意差なし			—	有意差なし			—	有意差なし				
検体摂取量 (mg/kg/日) ^{a)}	雄	—	6.9	20.5	70.6	—	7.9	23.4	79.6	—	7.6	23.8	78.2		
	雌	—	8.9	26.2	90.5	—	9.2	26.9	98.5	—	9.0	28.4	96.1		
肉眼的病理検査		検体投与に起因する異常は認められなかった													
卵巣重量 ^{b)}	検査数	11	10	15	10	7	8	9	5	8	8	8	6		
	絶対(g)	0.0966	0.1284	0.1098	0.1135	0.0888	0.3220	0.0816	0.0763	0.099	0.108	0.109	↑0.118		
	相対(%)	0.0318	0.0433	0.0372	0.0381	0.0301	0.1166	0.0268	0.0259	0.0307	0.0347	0.0354	0.0449		
病理組織学的検査 ^{c)}		検体投与に起因する異常なし													
副腎皮質 : 細胞質微細空胞化	雄	/										0/10	0/10	0/10	0/10
	妊娠雌											5/16	6/14	6/16	11/19
	不妊雌											0/8	2/9	1/8	0/6
雄交尾率	a	75.9	86.7	76.7	72.4	91.7	92.0	92.0	96.0	66.7	88.0	84.0	84.0		
	b	79.3	86.7	86.2	86.2	75.0	96.0	60.0	83.3	79.2	87.5	87.5	88.0		
雌交尾率	a	86.7	100.0	86.7	93.1	95.8	100.0	100.0	96.0	96.0	96.0	92.0	92.0		
	b	96.6	96.7	93.1	100.0	95.8	100.0	91.7	92.0	83.3	91.7	91.7	92.0		

— : 対照群 / : 検査せず。
 a) : 申請者が、被験物質濃度、摂餌量および体重から、生育期間 (15 週) の平均値を算出した。
 b) : 不妊妊娠雌について測定 c) : 所見発現動物数/検査動物数

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05)
 多重対比較法 : 体重、摂餌量、臓器重量、臓器重量/体重比
 Cochran-Armitage 検定及び Fisher の 2 標本直接確率計算法 : 副腎の細胞質空胞化の出現頻度

(つづく)

世代		親 : P 児 : F _{1a} , F _{1b}				親 : F ₁ 児 : F _{2a} , F _{2b}				親 : F ₂ 児 : F _{3a} , F _{3b}					
投与量 (ppm)		0	100	300	1000	0	100	300	1000	0	100	300	1000		
親動物	妊娠率	a	66.7	80.0	56.7	69.0	92.0	88.0	72.0	88.0	80.0	72.0	68.0	80.0	
		b	58.6	66.7	51.7	79.3	70.8	68.0	62.5	80.0	67.0	70.1	75.0	80.0	
	出産率	a	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
		b	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
	出産母動物数	a	20	24	17	20	22	22	18	22	20	18	17	20	
		b	16	20	15	22	16	17	13	19	16	16	18	20	
一般状態 ^{c)}		検体投与に起因する異常は認められなかった													
眼脂 (哺育21日)	a	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	3/1	7/1	31/5	0/0	0/0	0/0	0/0		
	b	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		
鼻汁 (哺育21日)	a	0/0	0/0	0/0	0/0	10/1	1/1	10/2	31/4	2/1	0/0	0/0	10/1		
	b	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		
体型小型 (哺育7日)	a	9/3	4/2	11/2	3/3	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	4/3	1/1	1/1		
	b	0/0	1/1	1/1	3/2	2/2	0/0	7/3	5/4	3/2	8/4	9/4	10/4		
平均生存児数	a	11.6	12.2	11.6	11.9	11.9	11.1	9.4	12.5	11.7	11.4	12.0	11.7		
	b	12.5	11.7	11.7	11.6	11.2	10.5	9.6	12.7	11.8	13.0	10.7	12.2		
児動物	性比 (%)	哺育1日	a	50.5	50.6	49.2	53.6	45.0	50.9	53.9	50.3	45.9	47.1	50.9	44.1
			b	49.8	46.7	48.1	56.0	51.3	47.9	53.3	43.1	47.7	52.9	50.1	56.4
	哺育4日 ^{d)}	a	51.9	48.8	47.7	54.7	44.4	52.9	53.7	49.3	46.4	43.8	50.6	44.7	
		b	49.8	48.9	48.4	54.5	52.1	47.9	54.8	43.7	46.8	53.6	51.1	58.7	
	哺育4日 ^{e)}	a	52.8	50.5	46.8	55.9	45.4	51.9	52.7	50.8	49.0	45.3	50.2	46.6	
		b	47.4	50.4	48.0	54.4	51.3	48.8	54.9	45.6	46.7	51.9	54.0	↑58.2	
	哺育7日	a	52.5	50.3	46.6	56.2	44.8	52.5	51.6	50.7	49.3	45.3	50.2	46.6	
		b	47.4	51.0	48.4	54.7	53.1	49.1	54.9	45.3	46.8	51.5	53.5	↑56.9	
	哺育14日	a	51.9	50.3	47.4	56.6	44.5	53.6	51.6	50.5	49.3	46.1	50.2	46.6	
		b	47.4	51.3	48.4	54.2	52.3	49.6	54.7	45.3	48.8	50.3	51.0	56.2	
	哺育21日	a	51.9	50.1	47.4	57.0	44.1	53.6	51.6	51.2	49.7	46.1	49.8	46.6	
		b	47.0	51.3	48.4	53.7	52.5	49.6	54.7	45.0	48.4	49.9	50.6	56.0	

c) : 所見が認められた児動物数/腹数

d) : 児数調整前

e) : 児数調整後

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05)

Fisher の直接確率法 : 繁殖性の指標

Kruskal-Wallis のノンパラメトリック法 : 性比、生存率

(つづく)

世代		親:P 児:F _{1a} , F _{1b}				親:F ₁ 児:F _{2a} , F _{2b}				親:F ₂ 児:F _{3a} , F _{3b}						
投与量 (ppm)		0	100	300	1000	0	100	300	1000	0	100	300	1000			
生存率 (%)	哺育1日	a	98.2	98.5	96.5	98.7	97.8	96.1	95.3	98.0	98.9	98.1	99.1	98.9		
		b	98.4	96.4	98.1	99.4	95.6	99.5	98.3	94.7	98.3	96.6	94.7	96.8		
	哺育4日	a	90.5	96.4	93.7	86.8	99.1	94.6	98.7	96.9	97.2	92.8	98.7	98.6		
		b	95.3	99.2	99.5	99.0	97.9	100.0	99.4	98.9	100.0	99.4	89.2	93.3		
	哺育7日	a	98.3	99.6	97.3	99.4	99.0	98.4	97.6	97.1	99.5	100.0	98.8	100.0		
		b	100.0	99.0	99.3	99.5	100.0	99.4	100.0	99.5	98.8	99.4	98.8	98.5		
	哺育14日	a	97.7	96.5	96.4	97.8	98.6	96.9	97.6	96.6	99.5	93.4	98.8	100.0		
		b	100.0	98.5	98.0	98.6	98.8	98.8	99.2	99.5	95.6	93.8	81.5	96.9		
	哺育21日	a	97.7	96.0	96.4	97.2	98.0	96.9	97.6	95.3	99.0	93.4	98.2	100.0		
		b	99.4	98.5	98.0	97.7	97.5	98.8	99.2	98.9	94.9	93.1	80.8	95.8		
	児動物	哺育1日	a	雄	6.4	6.3	6.5	6.4	6.2	6.0	6.3	5.8	6.2	6.0	6.2	6.1
				雌	6.0	6.0	6.2	5.9	6.0	5.7	5.9	5.6	5.9	5.8	5.9	5.8
b			雄	6.0	5.9	6.3	6.3	6.5	6.1	6.5	6.0	6.4	5.9	5.9	6.1	
			雌	5.6	5.6	6.0	5.7	6.1	5.7	6.2	5.6	6.1	5.6	5.4	5.8	
哺育4日 ^{d)}		a	雄	8.2	8.6	9.0	8.3	8.1	8.5	8.6	7.6	8.4	8.7	8.3	8.4	
			雌	8.0	8.3	8.7	7.9	8.1	8.0	7.9	7.2	8.0	8.1	8.0	8.1	
		b	雄	8.6	8.3	8.7	8.6	9.1	8.9	8.5	8.0	8.4	7.8	8.0	8.3	
			雌	8.2	8.0	8.4	7.9	8.5	8.5	8.2	7.7	8.3	7.4	7.6	8.0	
哺育7日		a	雄	12.1	12.7	12.0	11.9	12.3	12.6	12.6	11.5	13.1	12.9	12.7	12.7	
			雌	11.6	12.1	11.7	11.5	12.0	12.1	11.5	10.9	12.3	12.0	12.1	12.1	
		b	雄	12.7	12.2	12.9	12.9	13.0	13.0	12.2	12.2	13.4	11.7	11.6	12.2	
			雌	12.2	11.8	12.7	11.8	12.4	12.4	11.8	11.4	12.9	11.4	11.0	11.7	
哺育14日	a	雄	24.1	25.5	25.3	23.8	24.0	25.1	24.7	23.3	25.2	24.0	24.2	24.0		
		雌	23.6	24.2	24.4	23.3	23.4	24.3	23.1	21.9	23.9	22.2	23.2	23.0		
	b	雄	24.2	24.6	26.4	24.1	24.9	24.8	23.5	23.9	27.4	24.1	23.7	24.5		
		雌	23.7	23.9	25.5	22.9	23.8	23.8	22.7	22.2	26.2	23.5	↓22.1	23.0		

d) : 児数調整前

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05)

多重対比較法 : 体重

Kruskal-Wallis のノンパラメトリック法 : 生存率

(つづく)

世代		親 : P 児 : F _{1a} 、F _{1b}				親 : F ₁ 児 : F _{2a} 、F _{2b}				親 : F ₂ 児 : F _{3a} 、F _{3b}					
投与量 (ppm)		0	100	300	1000	0	100	300	1000	0	100	300	1000		
児動物 体重 (g)	哺育 21日	a	雄	34.8	36.4	37.9	33.4	37.0	38.1	38.0	35.4	37.2	36.1	36.4	35.3
			雌	34.5	34.5	35.9	32.1	36.1	36.8	36.2	34.1	35.5	33.6	34.8	33.7
		b	雄	38.4	38.2	41.7	38.1	38.0	38.1	35.9	37.4	41.5	38.0	38.0	38.0
			雌	36.8	36.3	40.2	35.4	36.0	36.3	35.7	34.4	39.3	36.7	35.3	35.9
	肉眼的病理検査 ^{f)}		検体投与に起因する異常は認められなかった												
	腎盂拡張	a	雄	7/89	14/106	6/69	12/93	3/91	5/100	1/75	7/99	4/90	1/68	3/82	4/88
			雌	19/84	18/111	12/76	18/70	5/109	8/89	4/67	5/101	7/90	5/79	1/83	4/95
		b	雄	4/41	3/66	9/39	14/73	2/50	9/52	1/31	5/57	10/66	8/74	7/60	7/105
雌			5/49	9/63	8/43	9/63	4/44	9/54	3/23	6/73	8/69	8/74	7/62	5/80	
臓器重量 —雄児動物	胸腺	絶対	0.346	0.266	0.340	0.398	0.363	0.419	0.256	0.217	0.28	0.24	0.31	0.29	
		相対	0.375	0.290	0.373	0.387	0.4076	0.4484	0.3531	0.2808	0.325	0.326	0.446	0.432	
	肝臓	絶対	4.710	4.452	4.700	5.010	3.41	3.49	2.62	2.66	2.64	2.22	2.63	2.89	
		相対	5.134	5.023	5.105	4.915	3.765	3.725	3.667	3.492	3.312	3.132	3.854	4.281	
	心臓	絶対	0.430	0.384	0.414	0.462	0.419	0.409	0.327	↓0.295	0.38	0.30	0.35	0.36	
		相対	0.472	0.440	0.452	0.452	0.4645	0.4365	0.4685	0.3856	0.505	0.449	0.508	0.536	
	臓器重量 —雌児動物	卵巣	絶対	0.0298	0.0392	0.0612	0.0488	0.0273	0.0197	0.0226	0.0201	0.032	0.036	0.035	0.031
			相対	0.0379	0.0487	0.0642	0.0649	0.0346	0.0289	0.0327	0.0361	0.0504	0.0640	0.0525	0.0584
胸腺		絶対	0.354	0.318	0.394	0.308	0.344	0.270	0.262	0.214	0.30	0.27	0.38	0.21	
		相対	0.443	0.398	0.422	0.423	0.4516	0.3984	0.3761	0.3478	0.472	0.459	0.571	0.379	
肝臓		絶対	4.074	4.288	4.766	3.560	3.09	2.37	2.58	2.23	2.62	2.44	3.04	2.39	
		相対	5.048	5.330	5.069	4.872	3.973	3.689	3.724	3.884	4.093	3.913	4.577	4.296	
心臓		絶対	0.350	0.370	0.430	0.334	0.366	0.311	0.327	0.263	0.34	0.29	0.35	0.30	
		相対	0.430	0.458	0.460	0.484	0.4784	0.4951	0.4755	0.4583	0.538	0.489	0.526	0.550	
副腎	絶対	0.0202	0.0196	↑0.0296	0.0210	0.0226	0.0194	0.0232	0.0198	0.028	0.024	0.029	0.028		
	相対	0.0255	0.0242	0.0315	0.0314	0.0290	0.0309	0.0337	0.0365	0.0436	0.0431	0.0430	0.0524		
病理組織学的検査		検体投与に起因する異常は認められなかった													

f) : 病理組織学的検査用児動物を含む所見発現児動物数/検査児動物数

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05)

多重対比較法 : 体重、摂餌量、臓器重量、臓器重量体重比

(2) トルクロホスメチル原体のラットを用いた1世代繁殖毒性試験

(資料 9-2)

試験機関：DIMS 医科学研究所

報告書作成年：2005年

試験目的：雌雄ラットのP世代交配前からF₁世代成熟まで検体を混餌投与し、発情周期、交尾、受胎、分娩、哺育等の生殖機能および出生児の成育に及ぼす影響を検索する目的で実施した。

検体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

供試動物：Crj:CD(SD)IGS系ラット、1群雌雄各10匹、開始時約8週齢

投与期間：P世代；投与開始からF₁児動物離乳までの約8週間、F₁世代；離乳時から生後8週まで。(2004年9月20日～2005年1月4日)

投与方法：検体を0、2500、5000および10000 ppm含有した飼料を自由に摂食させた。

[投与量設定根拠]

交配・調整・選抜および観察・検査項目：概要を次頁の表にまとめた。

一般状態および死亡率；試験期間中、全動物について、生死および一般状態を毎日観察した。妊娠21日からは分娩状況について、授乳期間は母動物の哺育状況についても観察した。

F₁世代動物については、生後0日に出産児数、死産児数、性別、外表異常を観察し、肛門-生殖突起間距離を測定した。また、生後28日から臍開口、生後35日から陰茎龜頭と包皮の分離を毎日観察し、それぞれの完了日には体重を測定した。

体重；P世代動物は雌雄とも投与開始日およびその後剖検日までは週1回測定し、さらに剖検時に最終体重を測定した。交配後の雌は、妊娠0、4、7、14、18および21日、哺育0、4、7、14および21日に測定した。

F₁世代動物については、生後0、4、7、14および21日に測定した。離乳後は週1回測定し、さらに剖検時に最終体重を測定した。

摂餌量；P世代動物は雌雄とも交配前2週間は週1回、交配後の雌は妊娠2~4、5~7、12~14、16~18および19~21日と、哺育2~4、5~7、12~14および19~21日に体重測定日までの2日間の摂餌量を測定した。

F₁世代動物については、離乳後に週1回、体重測定日までの2日間の摂餌量を測定した。

申請者注1)：申請者が追記した。

交配および妊娠の確認；P 世代動物は交配前 2 週間の投与期間後、同群内の雄 1 匹と雌 1 匹を同居させ、膣垢塗抹を毎日観察し、精子の有無によって交尾を確認した（妊娠 0 日）。

繁殖性に関する指標；交配、妊娠および哺育期間の観察に基づき、次の指標を算出した。

性周期（P 世代雌について交配 2 週間前から交尾成立まで発情周期を観察）

妊娠期間（膣垢塗抹標本中に精子が確認された日から生存児出産日まで）

雌の交尾率 (%) = (交尾成立雌数 / 同居させた雌数) × 100

妊娠率 (%) = (妊娠雌数 / 交尾成立雌数) × 100

出産率 (%) = (生存児出産雌数 / 妊娠雌数) × 100

出生率 (%) = (出産児数 / 着床痕数) × 100

死産児率 (%) = (死産児数 / 出産児数) × 100

生後 4 日生存率 (%) = (生後 4 日生存児数 / 出産児数) × 100

生後 21 日生存率 (%) = (生後 21 日生存児数 / 生後 4 日調整後生存児数) × 100

性比 (%) = (雄生産児数 / 生産児数) × 100

試験の概要

世代	期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	生育(2週間)	雌1対雄1で交配。交尾は膣垢中の精子で確認(妊娠0日) 交配終了後、雄親動物の屠殺	一般状態および生死を毎日観察 体重および摂餌量測定を週1回 交配状況の観察 雄親動物の肉眼的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査 妊娠0、4、7、14、18、21日に体重測定、妊娠2-4、5-7、12-14、16-18、19-21日の摂餌量測定
	交配(最長2週間)		
	妊娠(3週間)		
	出産		
F ₁	哺育(21日)	生後4日に各同腹児を8匹(雌雄各4匹)に調整	分娩状況の観察、妊娠期間を記録 産児数(生存および死亡)、性別、外表異常を記録 児動物の肛門-生殖突起間距離の測定 母動物の哺育0、4、7、14、21日の体重測定、哺育2-4、5-7、12-14、19-21日の摂餌量測定 児動物の生後0、4、7、14、21日の体重測定 生後4日屠殺の新生児について肉眼的病理検査
	離乳	生後21日に離乳、F ₁ 動物として各群1腹当たり雌雄各1匹を選抜 雌親動物、選抜されなかった児動物の屠殺	雌親動物の肉眼的病理検査、臓器重量測定 選抜されなかった児動物の肉眼的病理検査、各腹雌雄各1匹の臓器重量測定
	生育(8週間)	8週経過後に屠殺	一般状態および生死を毎日観察 体重および摂餌量測定を週1回 生後28日から膣開口観察 生後35日から陰茎龟头と包皮の分離観察 全動物について肉眼的病理検査、臓器重量測定、対照群と10000 ppm 群の病理組織学的検査

病理検査：全ての動物について肉眼的病理検査を行った。P世代の全動物およびF₁世代の生後8週剖検動物(各腹雌雄各1匹)について以下の臓器重量を測定した。

子宮(子宮頸部および卵管を含む)、卵巢、精巢、精巢上部、前立腺腹葉、前立腺背葉、精囊(凝固腺を含む)、肝臓、腎臓、脳

また、F₁世代の生後21日剖検動物(各腹雌雄各1匹)については、以下の臓器重量を測定した。

脳、胸腺、脾臓、子宮

さらに、F₁世代の生後8週剖検動物(各腹雌雄各1匹)の子宮、精巢、精巢上部、前立腺および精囊について病理標本作製し、10000 ppm 群および対照群についてのみ鏡検した。また、F₁世代の生後8週剖検雌動物全例の卵巢について病理標

本を作製し、原始卵胞（一次卵胞含む）、二次卵胞および成熟卵胞数について計測した。

生化学的検査；P 世代の全動物の脳について、重量測定後、脳中コリンエステラーゼ活性を測定した。

結 果：概要を表に示した。

P 世代動物；試験期間中、雌雄ともいずれの投与群においても検体投与に関連した一般状態の変化および死亡は認められなかった。

5000 ppm 以上の群で体重増加および摂餌の抑制が認められた。

脳中コリンエステラーゼ活性は、5000 ppm 以上の群で軽度な阻害が認められた²⁾。臓器重量では、肝臓の絶対重量の高値が 2500 ppm 以上の群、腎臓の相対重量の高値が 5000 ppm 以上の群でそれぞれ認められた。その他の臓器重量変化は体重増加抑制に起因する二次的な変化と考えられた。

性周期、生殖能力検査および分娩観察において、検体投与による影響は認められなかった。

F₁ 世代動物；外表異常の発現はなく、授乳期間中および離乳後を通じて、検体投与に関連した一般状態の変化も認められなかった。

体重増加および摂餌の抑制が 2500 ppm 以上の群で認められた。

臓器重量では、生後 56 日に肝臓の相対重量および腎臓の相対重量の高値が 2500 ppm 以上の群で認められた。また、前立腺の相対重量の高値が 10000 ppm 群で認められたが、器質的な変化を伴わない重量のみの変化であり、毒性学的意義は低いと考えられた。その他の臓器重量変化は体重増加抑制に起因する二次的な変化と考えられた。

肛門-生殖突起間距離には検体投与による影響は認められなかった。

陰茎龟头包皮の分離および膣開口では、5000 ppm 以上の群で完了日の体重に低値が認められたが、体重増加抑制に起因する二次的な変化と考えられた。

また、卵胞検査を含む生殖器系器官の病理組織学的検査においては、検体投与の影響は認められなかった。

申請者注 2)：脳コリンエステラーゼ活性の変動について

FAO/WHO^{a)} の基準を参考に統計学的に有意な 20% 以上の阻害を毒性学的に意義のある変化と判断したため、5000 ppm 以上の投与群における軽度の低下は毒性学的意義のない変化と考えられた。

a)：Pesticide residues, Guideline for the preparation of toxicological working papers for the WHO Core Assessment Group of the Joint Meeting on Pesticide Residues, Geneva, December 2000

以上の結果より、1世代にわたってトルクロホスメチル原体を飼料中に混入して投与した。P世代に対しては、2500 ppm以上の群で肝臓重量の高値が認められた他、5000 ppm以上の群で体重増加および摂餌の抑制、ならびに腎臓重量の高値がそれぞれ認められた。F1世代に対しては、2500 ppm以上の群で体重増加および摂餌の抑制、ならびに肝臓および腎臓重量の高値が認められた。一方、繁殖能力に対しては何ら影響がみられなかった。

結果の概要

世代		親 : P 児 : F ₁			
投与量 (ppm)		0	2500	5000	10000
動物数	雄	10	10	10	10
	雌	10	10	10	10
一般状態		検体投与に起因する異常なし			
死亡数	雄	0	0	0	0
	雌	0	0	0	0
生育期体重	雄	—	有意差なし	有意差なし	↓:投与1週
	雌	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし
生育期 体重増加量	雄	—	有意差なし	有意差なし	↓:投与0-1週
	雌	—	有意差なし	有意差なし	↓:投与0-1週
生育期 摂餌量	雄	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし
	雌	—	有意差なし	有意差なし	↓:投与1週目
生育期検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	—	172.89	338.05	680.15
	雌	—	178.21	353.19	668.03
体重	妊娠中	—	有意差なし	↓:7日	↓:0、4、14、18、 21日 ↓:7日
	哺育期間	—	有意差なし	↓:21日 ↓:4、7、14日	↓:0日 ↓:4、7、14、21 日
体重増加量	妊娠中	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし
	哺育期間	—	有意差なし	↓:0-14日	↓:0-7、0-14、 0-21日
摂餌量	妊娠中	—	有意差なし	有意差なし	↓:2-4日 ↓:5-7日
	哺育期間	—	有意差なし	↓:12-14、 19-21日	↓:2-4、5-7、 12-14、 19-21日
検体摂取量 (mg/kg/日)	妊娠中	—	174.78	341.46	642.14
	哺育期間	—	359.54	697.74	1253.71
脳コリンエステラーゼ 活性 (IU/g)	雄	11.62	11.32 (97) ^{a)}	↓10.98 (95)	↓10.30 (89)
	雌	10.53	9.95 (95)	↓9.40 (89)	↓8.60 (82)
肉眼的病理検査		検体投与に起因する異常なし			

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

— : 対照群

a) 脳コリンエステラーゼ活性についての () 内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ものの

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05、 ↓↓ : p < 0.01)

Dunnett 検定または Steel 検定 : 体重、摂餌量、脳コリンエステラーゼ活性

(つづく)

結果の概要 (つづき)

世代				親 : P 児 : F ₁				
投与量 (ppm)				0	2500	5000	10000	
親動物	雄	肝臓	絶対	16.5282	16.9876	17.5913	↑19.2905	
			相対	3.6125	3.7220	3.8619	↑4.3569	
		腎臓	相対	0.6945	0.7052	0.7117	↑0.7588	
	臓器重量	最終体重			311.9	303.2	295.1	↓260.4
			肝臓	絶対	14.2980	↑15.5104	↑17.2994	↑17.9198
		相対		4.5669	5.0594	↑5.8223	↑6.8902	
		脳	相対	0.5950	0.6103	0.6291	↑0.6907	
		腎臓	相対	0.6401	0.6604	↑0.7217	↑0.7584	
		卵巣	絶対	0.0901	0.0846	0.0826	↓0.0591	
			相対	0.0289	0.0271	0.0274	↓0.0229	
		子宮	絶対	0.4006	0.3988	0.3424	↓0.2094	
			相対	0.1309	0.1324	0.1179	↓0.0804	
		性周期				検体投与に起因する異常なし		
	交尾率 (%)				90	100	100	100
	妊娠動物数				9	10	10	9
	妊娠率 (%)				100	100	100	90
	出産率 (%)				100	100	100	100
	妊娠期間 (日)				22.2	22.2	22.1	22.1
	平均着床痕数				13.1	14.1	14.2	13.8
	児動物	出生率 (%)				94.4	91.6	97.3
死産児率 (%)				0.0	0.0	0.7	0.0	
平均児動物数				12.3	12.9	13.8	13.0	
性比 (%)				49.6	55.2	45.4	53.3	
生後4日生存率 (%)				99	100	99	98	
生後21日生存率 (%)				100	100	100	100	

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

— : 対照群

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05, ↓↑↑ : p < 0.01)

Dunnett 検定または Steel 検定 : 臓器重量、着床痕数

Steel 検定 : 妊娠期間、性比、出生率、死産児率、生存率

χ²検定 : 交尾率、妊娠率、出産率

(つづく)

結果の概要 (つづき)

世代			親 : P 児 : F ₁				
投与量 (ppm)			0	2500	5000	10000	
一般状態			検体投与に起因する異常なし				
体重 (g)	哺育0日	雄	7.07	6.77	6.22	↓ 6.03	
		雌	6.79	6.25	5.97	↓ 5.66	
	哺育4日	雄	11.71	11.22	10.14	↓ 9.42	
		雌	11.21	10.71	↓ 9.63	↓ 8.90	
	哺育7日	雄	19.18	18.65	↓ 16.96	↓ 14.64	
		雌	18.03	18.18	↓ 15.96	↓ 13.91	
	哺育14日	雄	37.46	35.60	↓ 32.57	↓ 23.87	
		雌	35.94	35.56	↓ 31.00	↓ 23.06	
	哺育21日	雄	64.07	60.73	↓ 54.34	↓ 34.79	
		雌	61.26	58.36	↓ 51.07	↓ 34.21	
	体重増加量 (g)	哺育0-4日	雄	4.64	4.45	3.92	↓ 3.38
			雌	4.42	4.46	3.66	↓ 3.24
哺育0-7日		雄	12.14	11.82	↓ 10.72	↓ 8.54	
		雌	11.29	11.87	10.03	↓ 8.22	
哺育0-14日		雄	30.42	29.56	↓ 26.33	↓ 17.77	
		雌	29.21	29.26	↓ 25.08	↓ 17.36	
哺育0-21日		雄	57.04	53.90	↓ 48.10	↓ 28.69	
		雌	54.52	52.06	↓ 45.15	↓ 28.52	
肛門-生殖突起間距離 (mm)	雄	3.162	3.150	3.057	2.869		
	雌	1.224	1.245	1.197	1.162		
21日齢肉眼的病理検査			検体投与に起因する異常なし				
21日齢臓器重量	雄	最終体重	63.91	60.88	↓ 53.08	↓ 35.09	
		脳	絶対	1.5208	1.5032	↓ 1.4300	↓ 1.3169
			相対	2.4139	2.4736	↑ 2.7039	↑ 3.7642
		胸腺	絶対	0.2790	0.2459	0.2184	↓ 0.1288
			相対	0.4382	0.4054	0.4132	↓ 0.3642
		脾臓	絶対	0.3394	↓ 0.2669	↓ 0.2234	↓ 0.1106
	相対		0.5314	↓ 0.4370	↓ 0.4220	↓ 0.3133	
	雌	最終体重	60.52	57.76	↓ 51.76	↓ 34.53	
		脳	絶対	1.4481	1.4463	1.4026	↓ 1.1434
			相対	2.4152	2.5142	↑ 2.7348	↑ 3.7062
		胸腺	絶対	0.2589	0.2442	0.2300	↓ 0.1379
		脾臓	絶対	0.3063	↓ 0.2519	↓ 0.2148	↓ 0.1141
相対			0.5088	0.4353	↓ 0.4185	↓ 0.3284	
子宮	絶対	0.0339	0.0324	0.0298	↓ 0.0221		

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

— : 対照群

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05, ↓↑ : p < 0.01)

Dunnnett 検定または Steel 検定 : 体重、体重増加量、臓器重量、肛門-生殖突起間距離

(つづく)

結果の概要 (つづき)

世代		親 : P 児 : F ₁					
投与量 (ppm)		0	2500	5000	10000		
動物数	雄	10	10	10	10		
	雌	10	10	10	10		
一般状態		検体投与に起因する異常なし					
死亡数		0	0	0	0		
体重	雄	—	↓ : 生後 21、28 日	↓ : 生後 21、28、35、42、49、56 日	↓ : 生後 21、28、35、42、49、56 日		
	雌	—	↓ : 生後 28、35、42、56 日	↓ : 生後 49 日 ↓ : 生後 21、28、35、42、56 日	↓ : 生後 21、28、35、42、49、56 日		
体重増加量	雄	—	有意差なし	↓ : 生後 21-42、21-49 日 ↓ : 生後 21-28、21-35、21-56 日	↓ : 生後 21-28、21-35、21-42、21-49、21-56 日		
	雌	—	↓ : 生後 21-35、21-49 日 ↓ : 生後 21-28 日	↓ : 生後 21-42、21-56 日 ↓ : 生後 21-28、21-35 日	↓ : 生後 21-28、21-35、21-42、21-49、21-56 日		
摂餌量	雄	—	↓ : 生後 26-28 日	↓ : 生後 33-35、54-56 日 ↓ : 生後 26-28 日	↓ : 生後 26-28、33-35、40-42、47-49、54-56 日		
	雌	—	↓ : 生後 26-28、54-56 日	↓ : 生後 26-28、33-35、54-56 日	↓ : 生後 26-28、33-35、40-42、47-49、54-56 日		
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	—	254.61	518.60	1160.84		
	雌	—	256.64	528.84	1173.99		
膣開口完了	日齢	32.6	32.7	33.1	33.7		
	体重	128.0	118.6	↓108.5	↓83.5		
包皮分離完了	日齢	43.6	44.3	43.8	↑46.0		
	体重	248.2	237.2	↓224.0	↓174.0		
56 日 齢 臓 器 重 量	雄	最終体重	357.6	336.9	↓321.9	↓246.7	
		脳	絶対	2.0404	1.9805	↓1.9300	↓1.7188
			相対	0.5712	0.5901	0.6001	↑0.7000
		肝臓	相対	4.3101	↑4.6953	↑5.0150	↑5.9989
			腎臓	絶対	2.7263	2.7781	2.8920
		相対		0.7634	0.8240	↑0.8984	↑0.9385
		精巣	相対	0.8340	0.8944	↑0.9589	↑1.1082

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

— : 対照群

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05, ↓↓↑↑ : p < 0.01)

Dunnett 検定または Steel 検定 : 体重、体重増加量、摂餌量、臓器重量、包皮分離および膣開口日齢および完了日体重

(つづく)

結果の概要 (つづき)

世代				親 : P 児 : F ₁				
投与量 (ppm)				0	2500	5000	10000	
F ₁ 動物	56日齢臓器重量	雄	精巢上体	絶対	0.5267	0.5075	0.5274	↓0.4175
				相対	0.1476	0.1509	0.1638	↑0.1696
			精囊	絶対	0.7245	0.6914	0.7367	↓0.5261
				相対	0.1823	0.2003	0.2157	↑0.2278
		雌	最終体重		229.4	211.9	↓202.6	↓172.1
			脳	絶対	1.8618	1.8158	↓1.7502	↓1.6362
				相対	0.8089	0.8653	0.8672	↑0.9535
			肝臓	相対	4.0241	4.4259	↑5.0042	↑5.8169
	腎臓	相対	0.7571	↑0.8981	↑0.9134	↑0.9242		
	卵巣	絶対	0.0811	0.0710	0.0705	↓0.0641		
	56日齢肉眼的病理検査				検体投与に起因する異常なし			
	56日齢病理組織学的検査				検体投与に起因する異常なし			
	56日齢卵胞検査				—	有意差なし	有意差なし	有意差なし

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05、↓ ↓↑ : p < 0.01)

Dunnett 検定または Steel 検定 : 臓器重量

Fisher 直接確率検定または Mann-Whitney 検定 : 病理組織学的検査

Student の t 検定または Aspin-Welch 検定 : 卵胞検査

(3) トルクロホスメチル原体のラットにおける催奇形性試験

(資料 9-3)

試験機関：Hazleton Laboratories America

[GLP 対応]

報告書作成年：1979年

検 体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

供試動物：Fisher 344系妊娠ラット、試験開始時体重132~170 g、1群30匹

投与期間：器官形成期間10日間

(交配開始1979年6月13日、帝王切開終了1979年7月11日)

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース(MC)溶液に懸濁し、5、15及び50 mg/kgの投与レベルで妊娠6日*から妊娠15日までの10日間、妊娠6日の体重に基づき1.0 mL/kgの投与液量で毎日1回経口投与した。なお、対照群には0.5%MC溶液を同様に投与した。

*)：精子または膣栓の認められた日を妊娠0日として起算した。

[投与量設定根拠]

観察・検査項目：

親動物； 全例について死亡と瀕死状態の発生をチェックし、妊娠6日から19日には一般状態を詳しく観察した。妊娠0、6、11、15及び19日に体重を測定、妊娠6、11、15および19日に摂餌量を測定した。

妊娠19日に炭酸ガス吸入により窒息死させ、開腹して卵巢当り黄体数、着床部位数、吸収部位数、生存胎児数及び死亡胎児数を調べた。また、肉眼的病理検査、子宮重量の測定を行った。

生存胎児； 外表を検査した後、性別の確認、体重および体長測定を行った。各同腹児群の1/3の胎児については内臓の異常の有無を検査し、残りの胎児については骨格標本を作成し、骨格異常の有無、化骨の進行状態を検査した。

結 果：概要を次表に示した。

親動物； 試験期間中に死亡あるいは切迫屠殺された動物はなかった。体重変化、摂餌量、一般状態あるいは肉眼的病理所見でみる限り、検体投与に関連した変化はなかった。検体投与群の妊娠率は対照群よりやや高く、また平均着床率は対照群よ

りやや低く、高用量群での低下は有意であった。¹⁾

生存胎児；吸収胚率は対照群に比較し低用量群と高用量群でやや低く、胎児死亡率は検体投与群と対照群で同程度であった。また、高用量群胎児生存率は対照群よりやや高い値を示した。高用量群の平均胎児体重は対照群よりやや高く、平均胎児体長（頭頂～臀部間距離）は対照群に比し、低用量群の及び高用量群でわずかに低い値を示した。内臓検査および骨格検査では、検体投与に起因すると考えられる発達の異常は認められなかった。高用量群では肋骨屈曲（1例）がみられ、胸骨、恥骨あるいは尾椎の化骨遅延がみられたが本系統のラットでは一般的にみられる変異であった。

以上の結果より、トルクロホスメチル原体を妊娠ラットに投与したときの母動物及び胎児における無毒性量は 50 mg/kg/day であった。また、最高投与量の 50 mg/kg/day でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

申請者注 1)：

平均着床率について、5、15 および 50 mg/kg の値は対照群よりやや低く、50 mg/kg 群での低下は有意であった。しかしながら、明らかな用量相関性がみられないこと、ならびにより高用量で実施しているラットにおける催奇形性試験（資料 9-4）において、1000 mg/kg 群においても着床数に影響がみられていないことから、投与の影響ではないと判断した。

結果の概要

投与群 (mg/kg/day)		0	5	15	50	
1 群当たり動物数		30	30	30	30	
親動物	死亡数 (率)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	妊娠数 (率)	21 (70.0%)	23 (76.7%)	26 (86.7%)	26 (86.7%)	
	一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった				
	体重変化	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	
	摂餌量	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	
	肉眼的病理検査	検体投与に起因する異常は認められなかった				
	子宮重量 (g)	36.13	34.99	34.87	37.38	
	子宮内所見	検査親動物数	21	23	26	26
		平均黄体数	11.0	11.7	11.3	11.2
		平均着床数	10.1	9.6	9.6	9.6
		着床率 ^{a)}	91.9%	83.3%	85.5%	↓86.1%
		平均生存胎児数	9.1	8.9	8.8	9.2
		胎児生存率	90.0%	92.1%	90.8%	95.2%
		死亡胎児率	0%	1.0%	0%	0.4%
吸収胚率		10.0%	7.0%	9.2%	4.4%	
胎児動物	体重 (g)	雄	2.208	2.205	2.203	2.221
		雌	2.108	2.096	2.114	2.136
	体長 (cm)	雄	3.209	3.182	3.197	3.176
		雌	3.147	3.113	3.150	3.119
	性比 ^{b)}		1.167	1.148	1.829	1.398
	骨格異常	検査胎児数	134	145	167	170
		変異胎児数 (%) ^{c)}	11 (8.2%)	25 (17.2%)	23 (13.8%)	21 (12.4%)
		肋骨屈曲	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)
		奇形胎児数 (%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	内臓異常	検査胎児数	58	59	66	68
変異胎児数 (%)		0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.5%)	
曲尾		0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.5%)	
奇形胎児数 (%)		0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
死亡胎児異常所見		死亡なし	眼瞼不完全(1)	死亡なし	精巣逸所性(1)	

a) : (着床数/黄体数) × 100

— : 対照群

b) : 雄胎児数/雌胎児数

c) : 肋骨屈曲以外には胸骨、恥骨あるいは尾椎の化骨遅延が認められた

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05、↓↑ : p < 0.01)

多重対比較法 : 母動物体重、摂餌量、子宮重量、胎児体重、胎児体長

Wilcoxon ノンパラメトリック法 : 妊娠率と胎児死亡率以外の繁殖データ及び生存能力指標

χ²検定 : 妊娠率、胎児死亡率

(4) トルクロホスメチル原体のラットにおける催奇形性試験

(資料 9-4)

試験機関 : Hazleton Laboratories America

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1987 年

検 体 : トルクロホスメチル原体

検体純度 :

供試動物 : SD 系雌ラット、試験開始時 11 週齢、体重 200.0~255.7 g、1 群 23 匹

投与期間 : 器官形成期間 10 日間

(交配開始 1986 年 2 月 11 日、帝王切開終了 1986 年 3 月 9 日)

投与方法 : 検体を 0.5%メチルセルロース (MC) 溶液に懸濁し、0、100、300 及び 1000 mg/kg/day を妊娠 6 日* から妊娠 15 日まで 10 日間、妊娠 6 日の体重に基づいて 5 mL/kg の割合で 1 日 1 回経口投与した。対照群には 0.5%MC を同様に投与した。

* : 精子または膣栓の認められた日を妊娠 0 日として起算した。

[投与量設定根拠]

観察・検査項目 :

親動物 ; 一般状態および生死を毎日観察し、体重は妊娠 0 日および妊娠 6 日から 20 日まで毎日測定した。摂餌量は妊娠 6 日から 20 日まで毎日測定した。

動物は妊娠 20 日に帝王切開し、黄体数、着床数とその部位、生存胎児数、死亡胚・児数を記録した。また肉眼的に異常の認められた臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液中に保存した。

生存胎児 ; 体重を測定し、性別及び外表異常を調べた後、約半数の胎児は Wilson 法により内臓検査を、また、残りの胎児については内臓を摘出し検査した後、アリザリンレッド S 染色により標本を作製し、骨格検査を行った。

結 果 : 概要を次表に示した。

親動物 ; 一般状態には検体投与の影響は認められず、死亡例もなかった。体重では 100 及び 1000 mg/kg 群の妊娠 6~11 日の増加量に有意な低値が認められた。これらの差は軽度であったが、妊娠子宮重量を除いた正味の体重増加量において 1000 mg/kg 群で低値を示し、1000 mg/kg 群の体重増加量の低値は検体投与と関連があると考えられた。摂餌量は、1000 mg/kg 群で妊娠 6 日以降減少傾向が認められ

た。剖検所見及び子宮内所見には各群いずれにも検体投与の影響は認められなかった。

生存胎児；体重及び性比は対照群と差を認めなかった。外表異常、内臓奇形及び骨格奇形の発生頻度には検体投与の影響はなかった。内臓変異は腎乳頭の縮小、尿管の拡張が各群に認められたが検体投与との関連性は認められなかった。

骨格変異については第 5 または第 6 胸骨核の未化骨を有する胎児の出現頻度が 1000 mg/kg 群で有意な増加を示し、投与の影響と考えられた。

以上の結果より、トルクロホスメチル原体を妊娠ラットに投与したときの母動物及び胎児における無毒性量は 300 mg/kg/day であった。また、最高投与量の 1000 mg/kg/day でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

結果の概要

投与群 (mg/kg/day)	0	100	300	1000	
1群当たり動物数	23	23	23	23	
妊娠数 (率)	19 (83)	22 (96)	23 (100)	22 (96)	
死亡数	0	0	0	0	
一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった				
体重増加	—	↓妊娠 6-11 日	有意差なし	↓妊娠 6-11 日	
摂餌量	—	有意差なし	有意差なし	減少傾向 ^{a)} : 妊娠 6-16 日、16-20 日	
子宮重量 (g)	79.9	76.7	78.6	80.9	
正味体重増加量 (g)	61.6	60.4	59.2	52.9 ^{a)}	
剖検所見	検体投与に起因する異常は認められなかった				
子宮内所見	検査母動物数	19	22	23	22
	平均黄体数	17.6 ^{b)}	16.7	16.9	17.1
	平均着床数	15.3	15.0	14.8	15.8
	着床効率 ^{c)}	90 ^{b)}	90	89	93
	平均生存胎児数	14.8	14.2	14.3	15.0
	死亡胎児数	0	0	0	0
	吸収胚率 (%)	3	5	3	5

太枠内は検体投与の影響であることを示す。 — : 対照群
 a) : Terpstra-Jonckheere 傾向検定の結果、有意な減少傾向あり。
 b) : 黄体数の完全な計測が出来なかった母動物 1 例を除く。
 c) : (着床数 / 黄体数) × 100

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05、↓↑ : p < 0.01)
 Dunnett's 検定 : 母動物体重、摂餌量、胎児体重
 Nemenyi-Kruskall-Wallis 検定 : 性比、吸収胚率

(つづく)

投与群 (mg/kg/day)		0	100	300	1000
平均体重 (g)	雄	3.4	3.5	3.6	3.4
	雌	3.3	3.4	3.4	3.3
性比 ^{d)}		52	52	51	52
外 表 異 常	検査胎児数	281	313	329	329
	変異胎児数 (%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	奇形胎児数 (%)	1 (0.4%)	1 (0.3%)	0 (0.0%)	2 (0.6%)
	口蓋裂	1 (0.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	唇裂	1 (0.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	小顎症複合奇形	1 (0.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	短尾	0 (0.0%)	1 (0.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	外脳症	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)
	繊維状尾	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)
	内 臓 異 常	検査胎児数	142	159	166
奇形胎児数 (%)		1 (0.7%)	1 (0.6%)	2 (1.2%)	0 (0.0%)
口蓋裂		1 (0.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
腎臓肥大		0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
心臓/大血管異常		0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (1.2%)	0 (0.0%)
変異胎児数 (%)		25 (18%)	40 (25%)	38 (23%)	22 (14%)
腎乳頭縮小		10 (7.0%)	17 (11%)	21 (13%)	6 (3.7%)
腎乳頭欠損		1 (0.7%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)
腎乳頭片側欠損 片側縮小		0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)
中等度尿管拡張		15 (11%)	19 (12%)	24 (14%)	15 (9.3%)
重度尿管拡張		3 (2.1%)	7 (4.4%)	5 (3.0%)	5 (3.1%)
片側中等度片側 重度尿管拡張		2 (1.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

太枠内は検体投与の影響であることを示す。 — : 対照群

d) : (雄生存胎児数/全生存胎児数) × 100

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05、↓↑ : p < 0.01)

Dunnett's 検定 : 母動物体重、摂餌量、子宮重量、胎児体重

Nemenyi-Kruskall-Wallis 検定 : 性比、吸収胚率、着床効率

(つづく)

投与群 (mg/kg/day)		0	100	300	1000
胎児 骨格異常	検査胎児数	139	154	163	168
	奇形胎児数 (%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	短尾	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	変異胎児数 (%)	73 (53%)	85 (55%)	70 (43%)	103 (61%)
	頭蓋骨不完全化骨	1 (0.7%)	6 (3.9%)	1 (0.6%)	2 (1.2%)
	舌骨未化骨	24 (17%)	30 (19%)	11 (6.7%)	31 (18%)
	舌骨二分	2 (1.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (1.2%)
	仙骨前椎骨数 25	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)
	椎体二分	2 (1.4%)	2 (1.3%)	4 (2.5%)	2 (1.2%)
	椎体未化骨	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)
	尾椎化骨数 4 未満	33 (24%)	26 (17%)	30 (18%)	43 (26%)
	半椎体	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)
	第 5 胸骨核未化骨	41 (29%)	46 (30%)	52 (32%)	↑ 75 (45%)
	第 6 胸骨核未化骨	5 (3.6%)	12 (7.8%)	4 (2.5%)	↑ 19 (11%)
	他の胸骨核未化骨	1 (0.7%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	1 (0.6%)
	第 5/6 胸骨核二分	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)
	13 肋骨片側痕跡	2 (1.4%)	3 (1.9%)	0 (0.0%)	5 (3.0%)
	13 肋骨	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)
	13 肋骨痕跡	2 (1.4%)	1 (0.6%)	1 (0.6%)	1 (0.6%)
	14 肋骨痕跡	4 (2.9%)	5 (3.2%)	2 (1.2%)	3 (1.8%)
	第 7 頸肋	2 (1.4%)	1 (0.6%)	3 (1.8%)	2 (1.2%)
	波状肋骨	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	中手骨化骨数 3 未満	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	中手骨化骨数 4 未満	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)
	恥骨未化骨	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)	3 (1.8%)
坐骨不完全化骨	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	1 (0.6%)	
腸骨未化骨	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05、↓↑ : p < 0.01)

Fisher-irwin 正確検定 : 第 5 および第 6 胸骨核未化骨の胎児発現頻度

(4) トルクロホスメチル原体のウサギにおける催奇形性試験

(資料 9-5)

試験機関：(株) 実医研

[GLP 対応]

報告書作成年：1982年、1991年改訂

検 体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

供試動物：ニュージーランドホワイト系妊娠ウサギ、試験開始時5~6ヵ月齢、
妊娠0日体重；2.14~3.64 kg、1群13~17匹

投与期間：器官形成期間13日間

(交配開始1981年6月22日、開腹終了1981年10月7日)

投与方法：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、300、1000及び3000 mg/kg/dayの投与レベルで妊娠6日から妊娠18日までの13日間、毎日の体重に基づき5 mL/kgの液量で毎日1回経口投与した。なお、対照群には0.5% CMC溶液を同様に投与した。

*) 臍垢中に精子を確認した日を妊娠0日として起算した。

[投与量設定根拠]

観察・検査項目：

親動物：生死、外観、一般状態の変化について1日1回観察し、体重を妊娠0日、妊娠6日から19日までの毎日、および妊娠21、23、25、27、29日に測定した。摂餌量は妊娠6日に6日量、妊娠7日から19日までは毎日1日量、妊娠21、23、25、27、29日には2日量をそれぞれ測定した。妊娠29日にエーテル麻酔下で開腹し、総着床数、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数を記録した。また、親動物は肉眼的病理検査を行い、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、卵巣、子宮、膀胱の重量を測定した。

生存胎児：帝王切開で摘出した胎児について未熟児数、生存児体重、生存児性比及び外表異常を観察した。各同腹児の1/3の胎児については内臓異常の有無を観察し、残りの胎児については骨格標本を作成し、骨格異常の有無および化骨の進行度について検査した。

結 果：概要を次表に示した。

親動物； 3000 mg/kg/day 群で 1 例の死亡がみられた。本動物では体重ならびに摂餌の減少がみられており、死亡は投与の影響と考えられた。

1000mg/kg/day 以上の群において体重増加抑制及び摂餌量の低値が認められた。

流産が 1000 mg/kg/day 群に 1 例、3000 mg/kg/day 群に 2 例みられたが、検体投与との関係は不明であった。

一般状態、肉眼的病理所見及び子宮内所見に検体投与の影響は認められなかった。

対照群に比較して各投与群の妊娠中の体重がいずれも有意に低値であったが、投与開始前の妊娠 0 日からみられた変化であり、検体投与の影響ではなかった。

臓器重量では、肝臓及び膀胱の変化は用量依存性のない変化であり、検体投与の影響とは考えられなかった。また、腎臓及び脾臓重量の低値は軽度の変化で最終体重も抑制されていることから、検体投与の影響とは考えられなかった。

生存胎児；胎児の外表検査、骨格検査、内臓検査においては、検体投与の影響はみられなかった。

以上の結果より、トルクロホスメチル原体を妊娠ウサギに投与したときの母動物における無毒性量は 300 mg/kg/day、胎児における無毒性量は 3000 mg/kg/day であった。また、最高投与量の 3000 mg/kg/day でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

結果の概要

投与群 (mg/kg/day)		0	300	1000	3000	
1 群当たり動物数		15	14	13	17	
親動物	死亡動物数 (率)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5.9%)	
	流産	0	0	1	2	
	一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった				
	平均体重	—	↓妊娠 0、6-9、11、13-16、18-29 日 ↓妊娠 10、12、17 日	↓妊娠 6-8、13-18、23-29 日 ↓妊娠 0、9-12、19-21 日	↓妊娠 0、7、8、21-29 日 ↓妊娠 9-19 日	
	体重増加量	—	有意差なし	↓ : 妊娠 6-19 日	↓ : 妊娠 6-19 日	
	摂餌量	—	有意差なし	↓妊娠 8、11 日 ↓妊娠 7、9、10、12 日	↓妊娠 10、11、13-15 日 ↓妊娠 8、9、12 日	
	肉眼的病理検査	検体投与に起因する異常は認められなかった				
親動物	臓器重量	最終体重 (kg)	3.68	↓3.32	↓3.26	↓3.29
		肝臓 (g)	104.54	↓92.05	94.87	106.91
		右腎臓 (g)	9.19	8.60	8.50	↓8.20
		左腎臓 (g)	9.35	8.61	↓8.22	↓8.18
		脾臓 (g)	1.47	1.52	1.76	↓1.17
		膀胱 (g)	1.84	↓1.47	↓1.45	1.63
子 宮 内 所 見	検査動物数	15	14	12	14	
	平均着床数	8.27	8.64	8.50	7.79	
	平均生存胎児数	7.53	7.79	7.83	6.36	
	死亡胎児数	0	0	0	0	
	吸収胚数 (率)	11 (8.9%)	12 (9.9%)	8 (7.8%)	20 (18.3%)	
	未熟児総数 (率)	10 (8.8%)	27 (24.8%)	7 (7.4%)	13 (14.6%)	

太枠内は検体投与の影響であることを示す。 — : 対照群

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05、↓↑ : p < 0.01)

Student の t 検定 : 平均値

順位和検定 : 胎児の腹毎の百分率データ

(つづく)

投与群 (mg/kg/day)		0	300	1000	3000
平均体重 (g)	雄	42.38	37.27	38.93	38.62
	雌	38.14	34.45	36.40	36.26
性比 ^{a)}		51.3	58.7	47.9	51.7
胎 児 動 物	検査胎児数	76	74	63	56
	奇形胎児数 (%)	0 (0.0%)	1 (1.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	14 肋骨	0 (0.0%)	1 (1.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	変異胎児数 (%)	44 (57.9%)	53 (71.6%)	29 (46.0%)	40 (71.4%)
	13 肋骨	44 (57.9%)	53 (71.6%)	29 (46.0%)	40 (71.4%)
	腰椎数 8	4 (5.3%)	2 (2.7%)	0 (0.0%)	1 (1.8%)
	胸骨核非対称	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.8%)
	化骨進行度	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし
内 臓 異 常	検査胎児数	37	35	31	30
	奇形胎児数 (%)	0 (0.0%)	2 (5.7%)	1 (3.2%)	0 (0.0%)
	心尖部二分	0 (0.0%)	1 (2.9%)	1 (3.2%)	0 (0.0%)
	心のう血腫	0 (0.0%)	1 (2.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	変異胎児数 (%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

太枠内は検体投与の影響であることを示す。 — : 対照群

a) : (雄生存胎児数 / 全生存胎児数) × 100

対照群との有意差の検定 (↓↑ : p < 0.05、↓ ↓ : p < 0.01)

Student の t 検定 : 平均値

順位和検定 : 胎児の腹毎の百分率データ

10. 変異原性

(1) トルクロホスメチル原体の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 10-1)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

報告書作成年：1981年

検体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2*hcr* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、10~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の 6 濃度で実施した。試験は 2 連制とし、1 回行った。

試験結果：結果を次表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の最高濃度まで、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた AF-2 (2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド)、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) は S9 mix 非存在下、2-AA (2-アミノアントラセン) は S9 mix 存在下において全ての試験菌株で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、トルクロホスメチル原体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断された。

(表中の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix 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	WP2 hcr	TA98	TA1537	TA1538	
対照 (DMSO)	0	-	108	9	16	48	9	8	
検体	10	-	107	12	15	46	13	10	
	50	-	91	14	12	49	5	14	
	100	-	93	10	12	41	7	15	
	500	-	57	13	12	38	7	22	
	1000	-	57	16	12	41	5	16	
	5000	-	72*	13*	12	49*	5	10*	
対照 (DMSO)	0	+	125	8	15	44	8	29	
検体	10	+	169	14	13	31	8	27	
	50	+	128	11	14	26	10	18	
	100	+	111	12	14	39	6	15	
	500	+	74	13	19	27	10	15	
	1000	+	65	11	19	35	4	14	
	5000	+	105*	10*	14*	27*	4	23	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	500					
		0.04	-			277			
		0.1	-				519		
	ENNG	10	-		>1000				
	9-AA	80	-				570 ^{a)}		
	2-NF	2	-						548
	2-AA	0.5	-	138			49		11
			+	524			322		207
		2	-		15				11
			+		254				168
40		-			14				
		+			675				

* : 菌株の生育阻害を認める。

a) : 1プレートの値

[陽性対照物質]

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

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

2-AA : 2-アミノアントラセン

(2) トルクロホスメチル原体の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 10-2)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1979年

検 体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。
検体は DMSO に溶解し、10~2000 µg/プレートの範囲の 5 濃度で 3 回試験を実施した。

試験結果：結果を次表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの濃度においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた MNNG (*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン) および AAF (2-アセチルアミノフルオレン) では試験菌株において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、トルクロホスメチル原体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断された。

(表中の数値は3試験の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型		フレームシフト型			
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	TA1538	
対照 (DMSO)	0	-	149	5	3	11	6	
検体	10	-	123	7	5	11	5	
	100	-	116	9	3	11	6	
	500	-	102	9	3	13	7	
	1000	-	122	10	4	16	12	
	2000	-	112	8	3	10	6	
対照 (DMSO)	0	+	106	13	18	23	17	
検体	10	+	124	13	19	27	16	
	100	+	127	16	20	28	18	
	500	+	108	16	21	24	16	
	1000	+	106	13	17	27	12	
	2000	+	117	16	22	31	20	
陽性 対照	MNNG	10	-	532	950	77	15	10
			+	141	120	27	34	21
		100	-	1500	1800	93	13	33
			+	292	300	33	33	20
	AAF	10	-	153	9	4	12	9
			+	638	17	590	26	800
		100	-	127	11	9	14	11
			+	1300	22	1200	28	1200

[陽性対照化合物]

MNNG : *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン

AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

(3) チャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞 (CHO-K1) を用いた染色体異常試験

(資料 10-3)

試験施設：住友化学工業株式会社

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検 体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞 (CHO-K1) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で染色体異常誘発性を評価した。検体は DMSO に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 200 個の分裂中期像について行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体処理群では、S9 mix 非存在下、存在下のいずれの用量においても、染色体異常総数及び構造異常を有する細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

陽性対照化合物のマイトマイシン C 及びシクロホスファミドは、構造異常総数及び構造異常を有する細胞の出現頻度を有意に増加させた。

以上の結果から、トルクロホスメチル原体は本試験条件下で、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-K1) に対して染色体異常誘発性を持たないと結論された。

S9 mix 有無	処理 時間 (h)	標 本作 製時 間(h)	薬 物	濃 度 (μ g /mL)	観 察 細 胞 数	構造異常/100細胞										分 裂 指 数 (%)	
						異常数					異常総数		異常細胞(%)				
						ギ ャ ッ プ	染 色 分 体 型		染 色 体 型		他	+G	-G	+G	-G		
							切 断	交 換	切 断	交 換							
無	18	18	無処理対照	—	200	1.5	0	0	0	0.5	0	2	0.5	2	0.5	5.6	
			溶媒対照(DMSO)	0.5%	200	0.5	0	0	0.5	0	0	0	1	0.5	1	0.5	5.5
			検体	10	200	0	0	0.5	0	0.5	0	0	1	1	1	1	8.1
				20	200	1	0	0.5	0	0.5	0	0	2	1	2	1	3.2
				40 #	200	1	0.5	0	0	1	0	0	2.5	1.5	2.5	1.5	7.0
			陽性対照(MMC)	0.2	100	7	19	32	0	2	0	0	60**	53**	47**	41**	1.9
無	24	24	無処理対照	—	200	0	0	0	0	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5	3.4	
			溶媒対照(DMSO)	0.5%	200	0	0.5	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	4.5	
			検体	10	200	0	0.5	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	6.0
				20	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.8
				40 #	200	0.5	0.5	0	0	0	0	0	1	0.5	1	0.5	3.7
			陽性対照(MMC)	0.1	100	8	28	60	0	1	0	0	97**	89**	71**	66**	1.3
有	2	18	無処理対照	—	200	0.5	4	0	0	0.5	0	5*	4.5*	1.5	1	4.6	
			溶媒対照(DMSO)	0.5%	200	0.5	0	0.5	0	0	0	1	0.5	1	0.5	5.0	
			検体	37.5	200	0.5	0.5	1	0	0	1	3	2.5	3	2.5	3.5	
				75 #	200	1	0.5	1.5	0	0.5	0	3.5	2.5	2.5	2	3.4	
				150 #	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.4	
			陽性対照(CP)	50	100	11	9	20	1	1	1	43**	32**	33**	27**	2.7	
有	2	24	無処理対照	—	200	0.5	0	0.5	0	1	0	2	1.5	2	1.5	9.0	
			溶媒対照(DMSO)	0.5%	200	0	0.5	0.5	0	0.5	0	1.5	1.5	1.5	1.5	9.3	
			検体	37.5	200	0.5	0	0	0	0	0	0.5	0	0.5	0	9.2	
				75 #	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	9.7	
				150 #	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	7.0	
			陽性対照(CP)	50	100	4	21	75	0	0	1	101**	97**	68**	67**	1.8	

ギャップ：染色分体ギャップおよび染色体ギャップ

他：断片化、10個以上の異常を有する細胞

+G：ギャップを含む異常

-G：ギャップを除く異常

DMSO：ジメチルスルホキシド

MMC：マイトマイシンC

CP：シクロホスファミド

#：培地の白濁が認められた

* p < 0.05

** p < 0.01 (溶媒対照値に対する検定結果)

(4) トルクロホスメチル原体のマウスを用いた *in vivo* 染色体異常試験

(資料 10-4)

試験機関:住友化学工業株式会社

報告書作成年:1985年

検体:トルクロホスメチル原体

検体純度:

供試動物:ICR系雄マウス 7~8週齢、体重27~39g、一群6匹(陽性対照群は4匹)

試験方法:検体をコーンオイルに懸濁し、1回腹腔内投与した。1000、2000および4000mg/kgを投与して6および24時間後に、また、500および1000mg/kgを投与して48時間後に動物を屠殺した。陽性対照群にはシクロホスファミドを生理食塩水に溶解して腹腔内投与し、6、24および48時間後に動物を屠殺した。屠殺2時間前にはコルヒチンを腹腔内投与した。各動物から大腿骨の骨髓を採取してメタノール:酢酸(3:1)で固定後、5%ギムザ液で染色し染色体標本を作製した。
1個体につき分裂中期像50個を観察し、染色体異常を有する細胞の割合を算出した。

投与量設定根拠:

試験結果:結果を次表に示した。

検体投与群では48時間後の1000mg/kg群を除いて、統計学的に有意な染色体異常の増加は認められなかった。同時期に実施した3試験の溶媒対照群(コーンオイル、48時間)の染色体異常出現頻度(2.0%(6/300)、0.3%(1/300)、1.0%(2/200))との比較により、統計学的には有意差の認められた48時間後における1000mg/kg群の染色体異常の出現頻度(1.7%)についても、溶媒対照群の水準であると判定した。

一方、陽性対照であるシクロホスファミドでは、染色体異常を有する細胞の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

以上の結果から本試験条件下において、トルクロホスメチル原体はマウスの骨髓細胞に染色体異常を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断された。

薬物	投与量 (mg/kg)	処 理 時 間 (hr)	動 物 数	観 察 細 胞 数	構造異常					異 常 細 胞 (%)
					異常数					
					ギ ャ ッ プ	切 断	交 換 型 異 常	多 ^{a)} 重 異 常	細 片 化	
溶媒対照 (コーンオイル)	0 ^{b)}	6	6	300	1	0	0	0	0	0.3
検体	1000	6	6	300	2	2	0	0	0	1.3
	2000	6	6	300	2	1	0	0	0	1.0
	4000	6	6	300	3	0	0	0	0	1.0
陽性対照 (シクロホスファミド [*])	60	6	4	200	13	5	0	0	0	7.5**
溶媒対照 (コーンオイル)	0 ^{b)}	24	6	300	4	1	0	0	0	1.7
検体	1000	24	6	300	3	0	0	0	0	1.0
	2000	24	6	300	1	2	0	0	0	1.0
	4000	24	6	300	6	1	0	0	0	2.3
陽性対照 (シクロホスファミド [*])	60	24	4	200	26	15	1	9	22	28.0**
溶媒対照 (コーンオイル)	0 ^{b)}	48	6	300	0	0	0	0	0	0.0
検体	500	48	6	300	3	0	0	0	0	1.0
	1000	48	6	300	3	2	0	0	0	1.7*
陽性対照 (シクロホスファミド [*])	60	48	4	200	2	0	0	4	9	7.5**

* : P < 0.05、** : P < 0.01 (χ^2 検定)

a) 多重異常 : 10個以上の異常を持つ細胞

b) コーンオイル 10 mL/kg

(5) トルクロホスメチル原体の細菌を用いる DNA 修復試験

(資料 10-1)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

報告書作成年：1981年

検 体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換修復機構野生株 (H17) と欠損株 (M45) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、20~5000 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ の範囲の 8 濃度で 1 回実施した。

試験結果：結果を次表に示した。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	S9 mix の有無	阻止帯 (mm)		差 (mm)
			M45	H17	
溶媒対照 (DMSO)	0	—	0	0	0
検体	20	—	0	0	0
	50	—	0	0	0
	100	—	0	0	0
	200	—	0	0	0
	500	—	0	0	0
	1000	—	0	0	0
	2000	—	0	0	0
	5000	—	0	0	0
陰性対照 (カナマイシン)	10	—	9	7	2
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.1	—	11	2	9

検体は 5000 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ の最高濃度まで、M45、H17 両株に全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照として用いたカナマイシンでは両株に同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、トルクロホスメチル原体は本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

(6) トルクロホスメチル原体の細菌を用いる DNA 修復試験

(資料 10-2)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1979年

検体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換え修復機構野生株 (H17) と欠損株 (M45) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、1~1000 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ の範囲の 4 濃度で 3 回試験を実施した。

試験結果：結果を次表に示した。

(表中の数値は 3 試験の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	S9 mix の有無	阻止帯 ^{a)} (mm)		差 (mm)
			M45	H17	
溶媒対照 (DMSO)	0 ^{b)}	—	0	0	0
検体	1	—	0	0	0
	10	—	0	0	0
	100	—	0	0	0
	1000	—	0	0	0
陽性対照 (MNNG)	1	—	1.0	0	1.0
	10	—	3.9	0	3.9
	100	—	16.2	5.0	11.2

a) : 阻止帯の長さは生育阻止円直径からディスクの直径 8 mm を引いた値。

(阻止円径が < 8.0 mm の場合、阻止帯は 0 mm とした)

b) : DMSO 10000 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$

検体はいずれの濃度においても、M45、H17 両株に対し全く生育阻止帯を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた MNNG (*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン) は両株の生育阻止帯に顕著な差を生じた。

以上の結果より、トルクロホスメチル原体は本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

(7) トルクロホスメチル原体のマウスを用いた宿主経路試験

(資料 10-5)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1979年

検 体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

供試動物：ICR系雄マウス（体重約30g）

試験方法：検体をコーンオイルに溶解し、870および1750 mg/kgの投与レベルで強制的に1回経口投与した。投与1時間後、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* G46株) を腹腔内投与し、その2時間後に腹腔内菌を回収して、突然変異率を求めた。

試験結果：結果を次表に示した。

薬物	投与量 (mg/kg)	突然変異率 ($\times 10^{-8}$)
溶媒対照 (コーンオイル)	0 ^{a)}	5
検 体	870	9
	1750	2
陽性対照 (DMNA)	50	300
	100	4000

(表中の数値は3反復の平均値)

a) : コーンオイル 3000 mg/kg

検体投与群では溶媒対照群と比較して、突然変異率の増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いたDMNA (ジメチルニトロソアミン) では溶媒対照群と比較して、顕著な突然変異率の増加が認められた。

以上の結果より、トルクロホスメチル原体は本試験条件下で、宿主経路試験において陰性であり、突然変異誘発性を有しないと判断された。

(8) トルクロホスメチル原体のマウスを用いた小核試験

(資料 10-6)

試験機関：(一財) 残留農薬研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2013 年

検体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

供試動物：ICR 系雄マウス (CrI:CD1) 8 週齢、体重 34.0~40.7 g、一群 5 匹

試験方法：検体をコーンオイルに懸濁し、500、1000 および 2000 mg/kg の用量で単回強制経口投与した。投与液量は 10 mL/kg とした。なお、溶媒対照群にはコーンオイルを同様に投与した。陽性対照群にはマイトマイシン C を 0.5 mg/kg の用量で腹腔内投与した。

投与 24 時間後 (500、1000、2000 mg/kg) および 48 時間後 (2000 mg/kg) に動物を安楽死させ、各動物から大腿骨の骨髓を採取し、スライドグラス上にメタノールで固定後、3%ギムザ液で染色し骨髓標本を作製した。各個体あたり 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の出現頻度を調べた。また、骨髓細胞に対する毒性を調べるため、各個体あたり 1000 個の赤血球を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した。

投与量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

いずれの検体投与群においても死亡は認められなかった。2000 mg/kg 群では自発運動の低下および立毛が認められたが、その他の投与群では毒性症状は認められなかった。検体投与群において体重増加量の低下が認められた。

検体投与群では、いずれの投与量、標本採取時間においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認めら

れなかった。全赤血球中の多染性赤血球の割合は、投与 24 時間後においては統計学的に有意な減少は認められなかったが、投与 48 時間後では溶媒対照群と比較して統計学的に有意な減少が認められた。そのため、骨髄細胞が検体に曝露されたことが示唆された。

一方、陽性対照であるマイトマイシン C 投与群では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において、トルクロホスメチル原体はマウス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た。

採取時期 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE/PCE ^{a)} (%)	PCE/(PCE+NCE) ^{b)} (%)
				平均値±SD	平均値±SD
24	溶媒対照 (コーンオイル)	0 ^{c)}	5	0.33±0.07	52.4±4.3
	検体	500	5	0.23±0.09	52.7±12.9
		1000	5	0.23±0.10	55.7±8.3
		2000	5	0.23±0.08	57.2±4.4
	陽性対照 (マイトマイシン C)	0.5	5	2.73±0.60**	54.6 ±8.2
48	溶媒対照 (コーンオイル)	0 ^{c)}	5	0.23±0.16	54.8±1.9
	検体	2000	5	0.17±0.14	45.2±6.0*

統計学的解析：小核を有する多染性赤血球の出現頻度については、検体投与群は Kastenbaum-Bowman 法、陽性対照群はカイ二乗検定を行った。全赤血球中の多染性赤血球の割合については、Wilcoxon 順位和検定を行った。

*：陰性対照群と比較し有意差あり (p≤0.05)

**：陰性対照群と比較し有意差あり (p≤0.001)

PCE：多染性赤血球数、NCE：正染性赤血球数、
MNPCE：小核を有する多染性赤血球数

a)：1 個体につき 2000 個の多染性赤血球を観察した。

b)：1 個体につき 1000 個の赤血球を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した。

c)：10 mL/kg

11. 生体の機能に及ぼす影響

(1) トルクロホスメチル原体における薬理試験

(資料 11-1)

試験機関：京都大学

報告書作成年：1985年

検 体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

マウス、ウサギの中枢神経系に対する作用

(1) マウスにおける一般行動 (Irwin 法)

供試動物：ddY 系雄マウス、体重 16~22 g、一群 5 匹

投与方法：検体をコーンオイルに溶解または懸濁して、0、125、250、500、1000 mg/kg (投与液量；10 mL/kg) を強制経口投与し、投与 60 および 120 分後に Irwin の多次元観察法に従い、一般行動を観察した。

結 果：検体 125 および 250 mg/kg 投与の 60 および 120 分後では、全ての観察項目において対照群に比較して差はなかった。500 mg/kg 投与群では 120 分後に 5 例中 1 例が自発運動の軽度抑制、体姿勢および歩行の軽度異常を示した以外は一般行動の変化はなかった。1000 mg/kg 投与の 60 分後には各項目共に変化はみられなかったが、120 分後には全ての動物の一般行動に異常 (鎮静症状) がみられた。すなわち、警戒性、位置認識、受動性、身づくろい、反応性、自発運動、触反応などが減弱し、体姿勢、四肢の位置および歩行の異常、耳介および同側屈筋反射の軽度抑制、眼球突出および呼吸数の減少を認めた。

(2) マウスの自発運動量に対する作用

供試動物：ddY 系雄マウス、体重 16~22 g、対照群 20 匹、投与群一群 10 匹

投与方法：検体をコーンオイルに溶解または懸濁して、0、125、250、500、1000 mg/kg (投与液量；10 mL/kg) を経口投与し、投与 60、120 および 180 分後までの自発回転数を、回転計自発運動測定装置を用いて測定した。

結 果：

投与量 (mg/kg)		累積自発回転数 (平均)		
		60	120	180 (分)
トルクロホスメチル	125	108	126	127
	250	95.8	104	106
	500	84.9	93.9	100
	1000	76.5	↓63.4	↓58.5

対照群との有意差検定は Student の t 検定を用いて行った。↓ ; $P < 0.05$
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もの。

検体 500 mg/kg 以下の投与群では、投与 180 分までの自発回転数はほとんど変化しなかった。1000 mg/kg 投与群では回転数は減少し、特に投与 120 および 180 分後までの回転数は対照群に比して有意に低値であった。

(3) マウスにおける睡眠増強作用

供試動物：ddY 系雄マウス、一群 8 匹あるいは 10 匹

投与方法：検体をコーンオイルに溶解または懸濁して、0、125、250、500 mg/kg (投与液量 ; 10 mL/kg) を経口投与し、30 分後に thiamylal sodium 60 mg/kg を腹腔内投与し、睡眠時間 (正向反射が 20 秒以上消失することを指標とした) を測定した。

結 果：

投与量 (mg/kg)	平均睡眠時間 (分)	
トルクロホスメチル	125	100.8
	250	114.3
	500	151.0

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もの。

Thiamylal sodium 腹腔内注射 1~2 分後より大部分のマウスは軽度の自発運動亢進、歩行異常および呼吸促進を一過性に示したが、次第に鎮静に向かい、投与 3~10 分後より正向反射は消失し、睡眠状態に入った。対照群の平均睡眠時間は 146.0 分であった。検体 125 mg/kg 投与群では平均睡眠時間は影響されなかったが、250 mg/kg 以上の投与群では睡眠時間は用量に依存して延長し、500 mg/kg 投与群では約 50% の睡眠時間延長がみられた。しかしながら、thiamylal sodium 投与初期にみられる軽度の興奮症状に対し、検体は影響しなかった。

(4) ウサギの体温に対する作用

供試動物：日本白色在来種雄ウサギ、体重 2.0~2.3 kg、一群 4 匹

投与方法：動物を無麻酔下で首かせ式測定箱に入れ、コーンオイルに溶解または懸濁した検体 0、125、250、500 mg/kg (投与液量；1 mL/kg) を強制経口投与し、15~30 分間隔で投与 3 時間後まで、直腸温を測定した。

結果：125~500 mg/kg の投与における投与 3 時間後までの体温の変動は 0.8°C 以下であり著しい変化はなく、500 mg/kg までの投与は体温に対し影響しなかった。

(5) ウサギの脳波 (自発脳波、脳波覚醒反応、脳波漸増反応) に対する作用

供試動物：日本白色在来種雄ウサギ、体重 2.6~2.9 kg、一群 6 匹あるいは 4 匹

投与方法：エーテル吸入麻酔下に気管カニューレを挿入後、ウサギの頭部を固定し Sawyer らの脳座標図に従って記録および刺激電極を埋め込んだ。脳波覚醒反応には脳幹網様体、脳波漸増反応には視床正中核を矩形波を用いて 10 秒間刺激した。無麻酔下で glycerinformal に溶解した検体 0.25、0.5、1、2、4 mg/kg を耳介静脈 (投与液量；0.1 mL/kg) に漸増投与し、投与終了後より 30~60 分脳波を測定した。比較化合物として、検体と同様の方法にて溶解、調製した TMO 0.5~4 mg/kg を静脈内投与した。

結果：[自発脳波]

検体 0.25 mg/kg では影響はなかった。0.5~2 mg/kg では一過性に覚醒波を示した。4 mg/kg (投与可能最大量) まで異常波型を示す例はなく、また、鎮静効果はみられなかった。TMO の自然脳波に対する影響は 0.5~4 mg/kg の投与で検体とほぼ同様であった。

[脳波覚醒反応]

脳幹網様体高頻度刺激による脳波覚醒反応に対し、検体 1 mg/kg 以下の投与は影響しなかった。2~4 mg/kg の投与により、覚醒反応の閾値は軽度に上昇したが、有意な変化ではなかった。TMO は 0.5~4 mg/kg の投与で覚醒反応の閾値をほとんど変えなかった。

[脳波漸増反応]

視床正中核低頻度刺激による脳波漸増反応に対し、検体 0.25~4 mg/kg の投与は無影響であった。TMO 0.5~4 mg/kg の投与も脳波漸増反応に対し無影響であった。

(6) ウサギの循環器系に対する作用

供試動物：日本白色在来種雄ウサギ、体重 2.6~2.9 kg、一群 6 匹

投与方法：エーテル吸入麻酔下に気管カニューレを挿入後、ウサギの頭部を固定し脳を手術した。上記（ウサギの脳波に対する作用）の脳波測定とともに、心電図を四肢第 II 誘導にて記録した。無麻酔下で、glycerinformal に溶解した検体 0.25、0.5、1、2、4 mg/kg を耳介静脈（投与液量；0.1 mL/kg）に漸増投与し、投与終了後より 30~60 分観察した。比較化合物として、検体と同様の方法にて溶解、調製した TMO 0.5~4 mg/kg を静脈内投与した。

結果：心拍数および心電図の波形は検体 4 mg/kg 以下の投与により変化しなかった。TMO 0.5~4 mg/kg の投与によっても心拍数および心電図の波形は変らなかった。

以上の結果から、トルクロホスメチル原体はマウスにおいて、250 mg/kg 以上の経口投与によりバルビツール酸誘導体による睡眠時間の延長、500 mg/kg で一部の、1000 mg/kg で全ての動物において自発運動量の減少などの鎮静症状を示したが、一般の有機リン殺虫剤にみられるような中枢興奮作用は認められなかった。ウサギの脳波においては、実験可能な最大投与量 4 mg/kg までの静脈内投与により一過性の覚醒波を認めたのみで鎮静効果は認められなかった。TMO でも脳波において同様の結果を示した。また、トルクロホスメチル原体はウサギの体温にほとんど変化を与えず、心拍数、心電図に対しても影響を示さなかった。

(2) トルクロホスメチル原体における薬理試験

(資料 11-2)

試験機関:住友化学工業株式会社

報告書作成年:1985年

検 体:トルクロホスメチル原体

検体純度:

モルモットの消化器系、循環器系に対する作用

(1) モルモットの摘出回腸に対する作用

供試動物: Hartley系雄モルモット、体重 270~500 g、一群 3 匹あるいは 1 匹

方 法: モルモットから摘出した回腸を、空気を飽和したタイロード液を満たしたマグヌス管中に懸垂した。回腸の収縮は FD ピックアップを介してその変位をポリグラフを用いて記録した。検体および比較対照化合物を DMSO に溶解してマグヌス管中に加え、最終濃度 10^{-7} ~ 10^{-4} M で 3~5 分間作用させた。また、検体および比較対照化合物の摘出回腸に対する作用に及ぼすアトロピン 5×10^{-8} M の影響を検討した。さらに、アセチルコリン 5×10^{-8} M、ヒスタミン 2×10^{-7} M、バリウム 5×10^{-4} M による収縮に対する検体および比較化合物の影響を 10^{-9} ~ 10^{-4} M で検討した。

結 果: 検体は 10^{-4} M の濃度においても摘出回腸に対して作用を示さなかった。TMO では 5×10^{-5} 、 10^{-4} M の高濃度においてのみ軽度の弛緩が認められた。また、アセチルコリン、ヒスタミンおよびバリウムによる摘出回腸の収縮に対して、検体および TMO は 10^{-5} 、 10^{-4} M の高濃度においてのみ抑制を示したが、これは摘出回腸に対する非特異的作用と考えられた。

(2) モルモットの摘出心房に対する作用

供試動物：Hartley 系雄モルモット、体重 300~700 g

方 法：モルモットから心房を摘出し、酸素を飽和したロックリンゲル液を満たしたマグヌス管中に懸垂した。検体および比較対照化合物を DMSO に溶解してマグヌス管中に加え、最終濃度 10^{-9} ~ 10^{-4} M で 5~60 分間作用させた。心房の拍動は FD ピックアップを介して張力の変化をポリグラフを用いて記録した。また、検体および比較対照化合物の摘出心房に対する作用に及ぼすアトロピン、PAM の影響をアトロピン 5×10^{-5} M、PAM 5×10^{-4} 、 10^{-3} M で、アセチルコリンの心房拍動抑制作用およびエピネフリンの心房拍動増強作用に対する検体および比較対照化合物の影響をアセチルコリン 5×10^{-7} M、エピネフリン 10^{-7} M で検討した。

結 果：検体は 5×10^{-5} M 以上で拍動抑制を示し、 10^{-4} M で初期に収縮の増強の後、拍動抑制作用を示した。TMO も検体と同様 5×10^{-5} M 以上で拍動の抑制を示した。アセチルコリンによる拍動抑制作用に対し、TMO は増強作用を示した。エピネフリンの拍動増強作用に対して検体および TMO は 10^{-5} M の濃度で影響を及ぼさなかった。

ウサギの血液に対する作用

(1) ウサギの赤血球に対する溶血作用

供試動物：日本在来白色種雄ウサギ、体重 2.1~2.6 kg、一群 3 匹

方 法：耳静脈より血液を採取し、3.8%クエン酸ナトリウムにより凝固防止した後、遠心して血液を分離し、10%赤血球浮遊液を調製した。

検体を DMSO に溶解後、生理食塩液により 20 倍希釈懸濁し、最終濃度 0.02、0.05、0.1% となるように調製した溶液 0.25 mL を赤血球浮遊液 0.25 mL に加え、37°C で 20 分間インキュベートした。遠心分離して得た上清の吸光度を分光光度計を用いて測定し、溶血率 (%) を求めた。

また、TMO についても、検体と同様に試験を行った。

結 果：検体および TMO は 0.02、0.05、0.1% の濃度においてウサギの赤血球に対して溶血作用を示さなかった。

(2) ウサギの血液の凝固時間に対する作用

供試動物：日本在来白色種雄ウサギ、体重 2.3~2.8 kg、一群 3 匹

方 法：Lee-White 法変法に準じて血液凝固時間を測定した。検体を DMSO に溶解して 10 倍量の生理食塩液に希釈懸濁し、心臓穿刺により採取した血液 1 mL に最終濃度 0.05、0.1% となるように加え、ただちに 37°C に加温した。この時から 30 秒後に試験管を転倒させて血液が凝固して流動しなくなった時までを凝固時間とした。

結 果：検体および TMO は 0.05、0.1% の濃度において血液の凝固時間に影響を及ぼさ

なかった。

以上の結果から、トルクロホスメチル原体はモルモット摘出回腸に対して作用を示さなかった。アセチルコリン、ヒスタミンおよびバリウムによるモルモット摘出回腸の収縮を高濃度においてのみ抑制したが、非特異的作用と考えられた。また、モルモットの摘出心房に対して、 5×10^{-5} M 以上で拍動抑制作用を示した。TMO はモルモットの摘出心房に対して、アセチルコリン様作用を有すると考えられるが、コリンエステラーゼ阻害を介した作用はないと推察された。また、トルクロホスメチル原体およびTMO はウサギの血液の溶血性および凝固時間に対して影響を及ぼさなかった。

(3) トルクロホスメチル原体における薬理試験

(資料 11-3)

試験機関：(株) 野村生物科学研究所

報告書作成年：1986年

検 体：トルクロホスメチル原体

検体の純度：

(1) ウサギの呼吸、循環器系に対する作用

供試動物：New Zealand White 系雄ウサギ、体重 2.5~3.3 kg、一群 3 匹

投与方法：検体および TMO を glycerin formal に溶解し、いずれも 1、2、4 mg/kg (投与液量 0.2 mL/kg) を α -chloralose (40 mg/kg 静脈内投与) および urethane (400 mg/kg 静脈内投与) 麻酔下で静脈内投与し、呼吸および血圧を測定した。呼吸および血圧は気管カニューレに装着した呼吸ピックアップ、大腿動脈カニューレに接続した圧トランジェューサーを介してポリグラフ上に記録した。なお、対照群には同等液量の媒体を投与した。

結 果：検体および TMO の静脈内投与は麻酔ウサギの呼吸および血圧に影響を与えなかった。

(2) ラットの末梢神経系に対する作用

ラットの神経筋接合部に及ぼす作用

供試動物：Sprague-Dawley 系雄ラット、体重 265~340 g

方 法：ラットを放血致死させ、横隔膜神経筋標本を作製した。95%O₂・5%CO₂ 混合ガスを通気し、約 37°C に保温した Krebs 液中に神経筋標本を懸垂し、筋および神経刺激による筋の収縮を F.D. ピックアップを介し記録した。刺激は電気刺激装置を用い、神経刺激では 1 msec、筋刺激では 10 msec のパルス幅とし、強度は超最大とした。検体および TMO を DMSO (dimethyl sulfoxide) に溶解し、いずれも 10⁻⁷~10⁻⁴ g/mL の濃度で収縮反応に対する作用を検討した。

結 果：検体は 10⁻⁷~10⁻⁴ g/mL の濃度でラットの横隔膜神経筋標本の収縮反応に影響を与えなかった。10⁻⁵ および 10⁻⁴ g/mL の濃度では検体の析出と見られる栄養液の白濁が認められた。TMO は 10⁻⁷~10⁻⁶ g/mL の濃度で、収縮反応に影響を与えなかった。10⁻⁴ g/mL の濃度では筋刺激による収縮反応の軽度増大と、神経刺激による収縮反応の抑制が認められた。

以上の結果より、トルクロホスメチル原体および TMO (1、2 および 4 mg/kg) の静脈内

投与は麻酔ウサギの呼吸、血圧に影響を与えなかった。トルクロホスメチル原体は 10^{-4} g/mLの濃度まで、TMOは 10^{-5} g/mLの濃度までラット摘出横隔膜神経筋標本の収縮反応に影響を与えなかった。TMO 10^{-4} g/mLの濃度では筋刺激による収縮反応の軽度増大と、神経刺激による収縮反応の抑制が認められた。

トルクロホスメチルの「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
一般行動 [Irwin 法]	マウス	経口 (コーンオイル)	0、125、250、 500、 1000	雄 5	500	250	500 mg/kg で 1/5 例に自発運動の軽度抑制、体姿勢および歩行の軽度異常、1000 mg/kg で全例に警戒性、位置認識、受動性、身づくろい、反応性、自発運動、触反応などの減少、体姿勢、四肢の位置および歩行の異常、耳介および同側屈筋反射の軽度抑制、眼球突出および呼吸数の減少を示す一般行動に異常（鎮静症状）が認められた。
自発運動量	マウス	経口 (コーンオイル)	0、125、250、 500、 1000	雄 10、 対照群は 雄 20	1000	500	1000 mg/kg で累積自発回転数に有意な低値が認められた。
睡眠増強作用 (Thiamylal sodium による睡眠)	マウス	経口 (コーンオイル)	0、125、250、 500	雄 8 または 雄 10	250	125	250 mg/kg 以上で睡眠時間に用量に依存した延長が認められた。
体温	ウサギ	経口 (コーンオイル)	0、125、250、 500	雄 4	>500	500	検体投与による影響は認められなかった。
自発脳波	ウサギ	静脈内 (glycerin- formal)	トルクロホスメチル 0.25、0.5、 1、2、4	雄 6	トルクロホスメチル 0.5	トルクロホスメチル 0.25	0.5~2 mg/kg で一過性の覚醒波が認められた。投与可能最大量 4 mg/kg で異常波型は認められなかった。 上記トルクロホスメチルと同様の影響を認めた。
			TMO 0.5、1、2、 4		TMO 0.5	TMO 0.25	
脳波覚醒反応 (脳幹網様体 高頻度刺激)	ウサギ	静脈内 (glycerin- formal)	トルクロホスメチル 0.25、 0.5、1、 2、4	雄 6	トルクロホスメチル >4	トルクロホスメチル 4	2~4 mg/kg で覚醒反応の閾値が軽度上昇したが、有意な変化ではなかった。 影響なし
			TMO 0.5、1、2、 4		TMO >4	TMO 4	
脳波漸増反応 (視床正中核 低頻度刺激)	ウサギ	静脈内 (glycerin- formal)	トルクロホスメチル 0.25、 0.5、1、 2、4	雄 4	トルクロホスメチル >4	トルクロホスメチル 4	検体投与による影響は認められなかった。 検体投与による影響は認められなかった。
			TMO 0.5、1、2、 4		TMO >4	TMO 4	

中枢神経系

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
循環器系	呼吸、血圧	ウサギ (麻醉下)	静脈内 (glycerin-formal) TMO 0、1、2、4	雄 3	>4	4	検体投与による影響は認められなかった。 検体投与による影響は認められなかった。
	心拍数、心電図	ウサギ	静脈内 (glycerin-formal) TMO 0.5、1、2、4	雄 6	トルクロホスメチル >4 TMO >4	トルクロホスメチル 4 TMO 4	検体投与による影響は認められなかった。 検体投与による影響は認められなかった。
	摘出心房	モルモット	<i>in vitro</i> (DMSO) TMO 10 ⁻⁹ ~ 10 ⁻⁴ M	—	トルクロホスメチル 5 × 10 ⁻⁵ M TMO 5 × 10 ⁻⁵ M	トルクロホスメチル 10 ⁻⁵ M TMO 10 ⁻⁵ M	5 × 10 ⁻⁵ M 以上で拍動抑制が認められた。この作用に対しアトロピン、PAMによる拮抗はなかった。 上記トルクロホスメチルと同様の影響を認めた。
消化器系	摘出回腸	モルモット	<i>in vitro</i> (DMSO) TMO 10 ⁻⁷ ~ 10 ⁻⁴ M	雄 3	トルクロホスメチル >10 ⁻⁷ M	トルクロホスメチル 10 ⁻⁷ M	直接作用は無かった。
				雄 1	TMO >10 ⁻⁷ M	TMO 10 ⁻⁷ M	直接作用は無かった。
				雄 3	トルクロホスメチル 10 ⁻⁹ ~ 10 ⁻⁴ M	トルクロホスメチル 10 ⁻⁵ M	トルクロホスメチル 10 ⁻⁶ M
雄 1	TMO 10 ⁻⁹ ~ 10 ⁻⁴ M	TMO 10 ⁻⁵ M	TMO 10 ⁻⁶ M	上記トルクロホスメチルと同様の影響を認めた。			
血液	溶血作用	ウサギ	<i>in vitro</i> (DMSO を含有する生理食塩水) TMO 0.02、0.05、0.1%	雄 3	トルクロホスメチル >0.1% TMO >0.1%	トルクロホスメチル 0.1% TMO 0.1%	検体投与による影響は認められなかった。 検体投与による影響は認められなかった。
	凝固時間	ウサギ	<i>in vitro</i> (DMSO を含有する生理食塩水) TMO 0.05、0.1%	雄 3	トルクロホスメチル >0.1% TMO >0.1%	トルクロホスメチル 0.1% TMO 0.1%	検体投与による影響は認められなかった。 検体投与による影響は認められなかった。
末梢神経系	神経筋接合部 (摘出横隔膜神経筋)	ラット	<i>in vitro</i> (DMSO) TMO 10 ⁻⁷ ~ 10 ⁻⁴ g/mL	雄	トルクロホスメチル >10 ⁻⁴ g/mL TMO 10 ⁻⁴ g/mL	トルクロホスメチル 10 ⁻⁴ g/mL TMO 10 ⁻⁵ g/mL	検体投与による影響は認められなかった。 10 ⁻⁴ g/mL で筋刺激による収縮反応の軽度増大および神経刺激による収縮反応の抑制

12. 反復投与免疫毒性

(1) トルクロホスメチル原体のマウスを用いた4週間反復経口投与免疫毒性予備試験

(資料 12-1)

試験機関：Huntingdon Life Sciences Ltd.

報告書作成年：2010年

検体：トルクロホスメチル原体

検体純度：

供試動物：CD-1 雌マウス、1群8匹、投与開始時日齢：49～55日齢、投与開始時体重：21.9～30.1g

投与期間：28日間

(2010年1月6日～2010年2月3日あるいは2010年1月7日～2010年2月4日)

投与方法：検体を0（対照群および陽性対照群）、100、2000および4500ppmの濃度で飼料に混入し、28日間にわたって随時摂食させた。陽性対照群には試験22～26日に5日間連続で免疫抑制剤シクロホスファミド（CPS）を20mg/kg/日（投与液量；10mL/kg/日、溶媒；水）の投与量で強制経口投与した。なお、検体を混入した飼料は週に約1回調製した。

投与量設定根拠；

観察・検査項目および結果：

一般状態および死亡率；対照群および検体投与群について、試験期間中は一般症状および生死を1日2回以上観察した。さらに、詳細な症状の観察を週1回行った。

試験期間中、死亡は認められず、また、検体投与に関連した症状も認められなかった。

体重変化；対照群および検体投与群の動物の体重を、投与開始1週間前から週2回および剖検前に測定した。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた検査時期を次表に示す。

群		検体		
投与量 (ppm)		100	2000	4500
体重増加量	試験 1~11 日	56↓	28↓↓	12↓↓
	試験 1~29 日	72	49↓↓	45↓↓

対照群との有意差検定は Williams 検定を用いて行った(↑↓:P<0.05, ↑↑↓↓:P<0.01)。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もの。

2000 および 4500 ppm 群において、対照群と比較して、試験期間中の総体重増加量(試験 1~29 日)に統計学的に有意な低値が認められた。これらの動物における体重増加量の低値は試験 1~11 日に特に顕著であった。

また、100 ppm 群で、対照群と比較して、試験 1~11 日までの体重増加量において、統計学的に有意な低値が認められた。しかしながら、その後の体重増加量は対照群と比べ統計学的に有意な差は認められなかったことから、この低値は有害な影響ではないと考えられた。

摂餌量；対照群および検体投与群について、投与開始 1 週間前から週 1 回、摂餌量をケージ毎に測定し、g/匹/日を算出した。

検体投与に関連した影響が認められた検査時期を次表に示す。

群		検体		
投与量 (ppm)		100	2000	4500
摂餌量	試験 1 週	105	95	76
	試験 2 週	105	100	83
	試験 3 週	111	111	84
	試験 4 週	97	106	86
	試験 1~4 週平均値	105	100	82

対照群との有意差検定は実施しなかった。

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もの。

4500 ppm 群では、対照群と比較して、試験期間中を通して、摂餌量の低値傾向が認められた。

100 および 2000 ppm 群では、検体投与に関連した影響は認められなかった。

検体摂取量；試験期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)	100	2000	4500
検体摂取量 (mg/kg/日)	19.6	413	749

コリンエステラーゼ活性；剖検日（試験 29 日）に、対照群および検体投与群について、後眼窩洞から血液を採取し、血漿および赤血球コリンエステラーゼ活性を測定した。また、剖検時、脳の左半分を採取して、脳コリンエステラーゼ活性を測定した。

結果を次表に示す。

群	検体		
	100	2000	4500
投与量 (ppm)	100	2000	4500
血漿	69↓↓	14↓↓	11↓↓
赤血球	98	88	101
脳	99	97	93↓↓

対照群との有意差検定は Williams 検定を用いて行った (↑ ↓ ↓ : $P < 0.01$)。なお、血漿コリンエステラーゼについては対数変換後、検定を実施した。

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ものの。

すべての検体投与群で、対照群と比較して、血漿コリンエステラーゼ活性の統計学的に有意な低値が認められた。いずれの検体投与群においても、赤血球コリンエステラーゼ活性に影響は認められなかった。

脳コリンエステラーゼ活性については、4500 ppm 群で、対照群と比較して、統計学的に有意な低値が認められた。100 あるいは 2000 ppm 群では影響は認められなかった¹⁾。

臓器重量；投与期間終了後（試験 29 日）、対照群および検体投与群について、以下の臓器重量を測定し、最終体重を用いた補正重量および対体重比も算出した。

副腎、脳、腎臓、肝臓、脾臓および胸腺

対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を次表に示す。

申請者注 1)：

FAO/WHO^{a)} の基準を参考に、脳あるいは赤血球コリンエステラーゼ活性の統計学的に有意な 20%以上の阻害を毒性学的に意義のある変化と判断した。従って、本試験で認められた血漿中におけるコリンエステラーゼ活性の低値、ならびに 4500 ppm 群で認められた脳コリンエステラーゼ活性の低値は毒性学的意義のない変化と判断した。

a) Pesticide residues, Guideline for the preparation of toxicological working papers for the WHO Core Assessment Group of the Joint Meeting on Pesticide Residues, Geneva, December 2000

群		検体		
投与量 (ppm)		100	2000	4500
最終体重		97	90↓	89↓↓
脳	補正重量 ^a	102	102	103
	対体重比	103	110↑↑	112↑↑

a : 最終体重を用いて補正した値。

対照群との有意差検定は Williams 検定を用いて行った (↑ ↓ : P < 0.05, ↑↑ ↓↓ : P < 0.01)

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ものを。

検体投与に関連した影響は認められなかった。

2000 および 4500 ppm 群で、対照群と比較して、脳重量の対体重比に統計学的に有意な高値が認められたが、その差は軽微なもので、絶対脳重量に影響が認められなかったことから、体重減少に起因する検体投与の二次的影響と考えられた。

肉眼的病理検査；投与期間終了後（試験 29 日）、対照群および検体投与群について、詳細な剖検を行った。

検体投与に関連した影響は認められなかった。

認められた肉眼的所見はすべて、試験機関において通常認められる所見の性質および発生頻度と一致したものであった。

免疫機能検査；全動物について、摘出した脾臓を用いてヒツジ赤血球 (sRBC) に対する脾臓における T 細胞依存性抗体産生能を検査した。各動物の sRBC 特異的 IgM 抗体産生細胞 (PFC) 数を測定し、脾臓細胞 10⁶ 個あたりの PFC 数 (PFC/脾臓細胞 10⁶ 個) および脾臓あたりの PFC 数 (PFC/脾臓) を算出した。結果を次表に示す。

群	検体			陽性対照
	100 (n=6)	2000 (n=6)	4500 (n=5)	
投与量 (ppm)				CPS 20 mg/kg/日 (n=8)
脾臓細胞	82	82	93	52↓↓
PFC/脾臓細胞 10 ⁶ 個	117	98	115	8↓↓
PFC/脾臓	87	85	110	5↓

対照群との有意差検定は検体投与群については Williams 検定、陽性対照群については Student の t 検定を用いて行った (↑ ↓ : P < 0.05, ↑↑ ↓↓ : P < 0.01)。

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ものを。

検体投与群では、対照群と比較して、いずれの項目においても検体投与に関連した影響は認められなかった。

陽性対照群では脾臓細胞数、PFC/脾臓細胞 10^6 個および PFC/脾臓のいずれにおいても、対照群と比較して、統計学的に有意な低値が認められた。

なお、操作上のミスにより、対照群、100 および 2000ppm 群の 2 匹、4500ppm 群の 3 匹のプレートでプラークが認められず、データが得られなかったが、各群少なくとも 5 匹のデータが得られたことから、評価に影響はないと考えられた。

以上の結果から、トルクロホスメチル原体をマウスに飼料混入投与により 4 週間反復経口投与した結果、T 細胞依存性抗体産生能の測定において免疫機能に影響は認められなかった。したがって、免疫毒性に関する無毒性量 (NOEL) は 4500 ppm を上回る ($> 749 \text{ mg/kg/日}$) と判断された。

(2) トルクロホスメチル原体のマウスを用いた 4 週間反復経口投与免疫毒性試験

(資料 12-2)

試験機関: Huntingdon Life Sciences Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年: 2010 年

検体: トルクロホスメチル原体

検体純度:

供試動物: CD-1 雌マウス、対照群および検体投与群: 1 群 10 匹、陽性対照群: 1 群 8 匹、

投与開始時日齢: 46~53 日齢、投与開始時体重: 20.4~28.3 g

投与期間: 28 日間

(2010 年 6 月 7 日~2010 年 7 月 5 日あるいは 2010 年 6 月 8 日~2010 年 7 月 6 日)

投与方法: 検体を 0 (対照群および陽性対照群)、500、1500 および 4500 ppm の濃度で飼料に混入し、28 日間にわたって随時摂食させた。陽性対照群には投与 22~26 日に 5 日間連続で免疫抑制剤シクロホスファミド (CPS) を 20 mg/kg/日 (投与液量; 10 mL/kg/日、溶媒; 水) の投与量で強制経口投与した。なお、検体を混入した飼料は週に約 1 回調製した。

投与量設定根拠;

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡率; 対照群および検体投与群について、試験期間中は一般症状および生死を 1 日 2 回以上観察した。さらに、詳細な症状の観察を週 1 回行った。

試験期間中、死亡は認められず、また、検体投与に関連した症状も認められなかった。

体重変化; 対照群および検体投与群の動物の体重を、投与開始 1 週間前から週 2 回および剖検前に測定した。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた検査時期を次表に示す。

群		検体		
投与量 (ppm)		500	1500	4500
体重増加量	試験 8~29 日	132	92	44↓
	試験 1~29 日	110	81	60↓

対照群との有意差検定は Williams 検定を用いて行った (↑ ↓: P < 0.05)。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もの。

4500 ppm 群において、対照群と比較して、試験期間中の総体重増加量 (試験 1~29 日) および体重増加量 (試験 8~29 日) に統計学的に有意な低値が認められた。その影響は試験 8 日から特に顕著であった。

500 および 1500 ppm 群では体重増加量に検体投与による影響は認められなかった。

摂餌量; 対照群および検体投与群について、投与開始 1 週間前から週 1 回、摂餌量をケージ毎に測定し、g/匹/日を算出した。

対照群と比較して統計学的有意差が認められた検査時期を次表に示す。

群		検体		
投与量 (ppm)		500	1500	4500
摂餌量	試験 1~4 週平均値	101	97	89↓

対照群との有意差検定は Williams 検定を用いて行った (↑ ↓: P < 0.05)。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もの。

4500 ppm 群において、対照群と比較して、試験期間中の平均摂餌量に統計学的に有意な低値が認められた。

500 および 1500 ppm 群では、摂餌量に対照群と差は認められず、検体投与による影響は認められなかった。

検体摂取量; 試験期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)	500	1500	4500
検体摂取量 (mg/kg/日)	91	273	811

飲水量；対照群および検体投与群について、投与開始1週間前から週1回、摂水量を、ケージ毎に測定した。

飲水量に検体投与による影響は認められなかった。

臓器重量；投与期間終了後（試験29日）、対照群および検体投与群について、以下の臓器重量を測定し、最終体重を用いた補正重量および対体重比も算出した。なお、両側臓器は左右を合わせて測定した。

副腎、脾臓および胸腺

副腎、脾臓および胸腺の重量に検体投与に関連した影響は認められなかった。

肉眼的病理検査；投与期間終了後（試験29日）、対照群および検体投与群について詳細な剖検を行った。

検体投与に関連した影響は認められなかった。

認められた肉眼的病理所見はすべて、試験機関において通常認められる所見の性質および発生頻度と一致したものであった。

免疫機能検査；全動物について、摘出した脾臓を用いてヒツジ赤血球（sRBC）に対する脾臓におけるT細胞依存性抗体産生能を検査した。各動物のsRBC特異的IgM抗体産生細胞（PFC）数を測定し、脾臓細胞 10^6 個あたりのPFC数（PFC/脾臓細胞 10^6 個）および脾臓あたりのPFC数（PFC/脾臓）を算出した。結果を次表に示す。

群	検体			陽性対照
投与量 (ppm)	500	1500	4500	CPS 20 mg/kg/日
脾臓細胞	101	109	118	95
PFC/脾臓細胞 10^6 個	101	102	99	15↓↓↓
PFC/脾臓	108	112	120	14↓↓↓

対照群との有意差検定は検体投与群についてはWilliams検定、陽性対照群についてはStudentのt検定を用いて行った（↑↑↑ ↓↓↓：P < 0.001）。

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ものの。

検体投与群では、対照群と比較して、いずれの項目においても検体投与に関連した影響は認められなかった。

陽性対照群では、対照群と比較して、PFC/脾臓細胞 10^6 個およびPFC/脾臓の統計学的に有意な低値が認められた。

以上の結果から、トルクロホスメチル原体をマウスに飼料混入投与により4週間反復経口投与した結果、T細胞依存性抗体産生能の測定において免疫機能に影響は認められなかった。したがって、免疫毒性に関する無毒性量 (NOAEL) は4500 ppmを上回る (>811 mg/kg/日) と判断された。

B. 原体混在物および代謝物を用いた試験成績

1. マウスにおける急性経口毒性試験

(資料 混1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1979年

検 体：

検体純度：

供試動物：dd系雄マウス、7週齢、体重20～25 g、1群10匹

観察期間：14日間

試験方法：2濃度の投与群を設け、それらの死亡率からLD₅₀を求めた。

投与方法：検体（1）および（2）をコーンオイルに溶解して100および200mg/mLの溶液を調製し、10 mL/kgの割合で経口投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を14日間観察した。

結 果：

検体	
投与方法	経 口
投与量(mg/kg)	1000、2000
LD50(mg/kg)	>2000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および終了時間	投与開始後1時間から発現 投与開始後1日以内に終了
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	全ての投与量で症状が発現
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	2000

検体	
投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	1000、2000
LD50 (mg/kg)	>2000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および終了時間	症状発現なし
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

(1)

各投与群において投与後1~2時間で自発運動減少、呼吸深大・不規則、歩行失調および四肢麻痺の中毒症状を認めたが、24時間以内には消失した。死亡例はなかった。

(2)

いずれの投与群においても中毒症状の発現はなく、死亡例もなかった。

2. 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 混2)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP対応]

報告書作成年：1985年

検 体：

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA*株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S9 mix)の存在下および非存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解し、5~5000 μ g/プレートの範囲の6濃度で実施した。試験は2連制とし、1回行った。

用量設定根拠：

試験結果：試験結果を次表に示した。

S9 mixの有無にかかわらず、ネズミチフス菌では5~1000 μ g/プレートの濃度範囲において、大腸菌では10~5000 μ g/プレートの濃度範囲において、検体は復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いたメタンスルホン酸メチル、9-アミノアクリジン塩酸塩、アジ化ナトリウム、*N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン、2-ニトロフルオレン、ベンツ (α) ピレン、2-アミノアントラセンでは、すべての試験菌株で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、
は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断された。

表中の数値は2反復の平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix	復帰変異コロニー/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (DMSO)	0	-	108	16	16	20	5	7
	5	-	99	15	NT	23	6	11
	10	-	99	15	21	24	5	7
	50	-	106	16	20	17	9	6
	100	-	104*	12	22	17*	8	9
	500	-	84*	15*	20	14*	8*	5*
	1000	-	71*	15*	23	19*	9*	6*
	5000	-	NT	NT	28	NT	NT	NT
溶媒対照 (DMSO)	0	+	97	13	19	44	23	42
	5	+	91	14	NT	57	25	45
	10	+	100	10	23	43	26	37
	50	+	105	15	22	35	24	29
	100	+	86	15	40	29	18	32
	500	+	72*	13*	26	28	17*	20*
	1000	+	45*	13*	32	26*	23*	13*
	5000	+	NT	NT	33	NT	NT	NT
陽性 対照	S9 mix 非存在 下	名称	MMS	SA	ENNG	2-NF	9-AA	2-NF
		$\mu\text{g}/\text{プレート}$	200	0.5	2	1	80	2
		コロニー数/プレート	387	314	456	462	738	832
	S9 mix 存在下	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP	BP
		$\mu\text{g}/\text{プレート}$	5	2	80	5	5	5
		コロニー数/プレート	812	153	459	573	202	248

* : 菌株の生育阻害を認める。

NT : 試験せず

[陽性対照化合物]

MMS : メタンサルホン酸メチル

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-アミノアクリジン塩酸塩

BP : ベンツ (α) ピレン

2-AA : 2-アミノアントラセン

3. 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 混3)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP対応]

報告書作成年：1985年

検体：

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100株) およ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薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。
検体はDMSOに溶解し、10~5000 μ g/プレートの範囲の6濃度で実施した。試験は2連制とし、1回行った。

用量設定根拠：

試験結果：試験結果を次表に示した。

S9 mix存在下では10~5000 μ g/プレートの範囲において、S9 mix非存在下では10~2000 μ g/プレートの範囲において使用した6菌株すべてについて、検体は復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いたメタンサルホン酸メチル、9-アミノアクリジン塩酸塩、アジ化ナトリウム、*N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン、2-ニトロフルオレン、ベンツ (α) ピレン、2-アミノアントラセンでは、すべての試験菌株で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、代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断された。

表中の数値は2反復の平均値

薬物	濃度 (μg /プレート)	S9 mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (DMSO)	0	-	113	18	17	26	8	10
	10	-	102	12	22	28	8	10
	50	-	102	12	26	28	9	13
	100	-	110	16	31	44	10	18
	500	-	113	17	26	26	13	10
	1000	-	129	18	26	26	8	12
	2000	-	114	15	21	25	10	13
	5000	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
溶媒対照 (DMSO)	0	+	102	16	30	51	29	32
	10	+	103	14	21	45	32	31
	50	+	98	18	25	45	30	31
	100	+	103	18	23	38	19	37
	500	+	105	24	27	44	26	21
	1000	+	98	15	27	34	25	30
	2000	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	5000	+	107	18	27	37	20	27
陽性 対照	S9 mix 非存在 下	名称	MMS	SA	ENNG	2-NF	9-AA	2-NF
		μg /プレート	200	0.5	2	1	80	2
		コロニー数/プレート	419	358	435	332	1237	873
	S9 mix 存在下	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP	BP
		μg /プレート	5	2	80	5	5	5
		コロニー数/プレート	711	167	499	575	258	262

NT : 試験せず

[陽性対照化合物]

MMS : メタンサルホン酸メチル

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-アミノアクリジン塩酸塩

BP : ベンツ (α) ピレン

2-AA : 2-アミノアントラセン

4. 代謝物TMO(トルクロホスメチルーオキソン)のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 代1)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP対応]

報告書作成年：；1989年

検 体：代謝物TMO(トルクロホスメチルーオキソン)

検体純度：

供試動物：SD系ラット、7週齢、体重：雄193～217g、雌137～161g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：対照群および6濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率からLD₅₀値を求めた。

投与方法：検体をコーンオイルに溶解して10、100、140、200、270および380 mg/mLの投与液を調製し、10 mL/kgの割合で単回経口投与した。

対照群にはコーンオイルを10 mL/kgの割合で経口投与した。

観察・検査項目：症状観察は、投与後10、30分、1、2、4時間および以後毎日1回行った。

体重測定は、投与直前、投与後7および14日に実施した。

途中死亡動物および観察期間終了時に生存していた全ての動物について剖検し、肉眼的病理所見を記録した。

結 果：

投与方法	経 口
投与量(mg/kg)	0、100、1000、1400、2000、2700、3800
LD50(mg/kg) (95%信頼限界)	雄 2330(1990～2730) 雌 3200(2110～4860)
死亡開始および 終了時間	投与開始後1日から開始 投与開始後6日に終了
症状発現および 消失時間	投与開始後10分から発現 投与開始後5日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌雄共 100
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌雄共 1400

雌雄ともに1000 mg/kg以上の投与群で自発運動減少、歩行失調、四肢麻痺、正向反射消失、呼吸不規則、呼吸困難、油状物の排泄および流涎が認められた。

死亡は雌雄ともに2000 mg/kg以上の投与群に認められた。

体重においては、雄では1400 mg/kg以上、雌では2700 mg/kg投与群で軽度な増加抑制が認められた。また、剖検では検体投与による影響は認められなかった。

5. 代謝物 TMO (トルクロホスメチルーオキソン) のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代2)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP対応]

報告書作成年：1989年

検 体：代謝物 TMO (トルクロホスメチルーオキソン)

検体純度：

供試動物：ICR系マウス、6週齢、体重：雄23.5～28.1 g、雌17.9～23.2 g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：対照群および6濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率からLD₅₀値を求めた。

投与方法：検体をコーンオイルに溶解して30、100、130、170、220および290 mg/mLの投与液を調製し、10 mL/kgの割合で単回経口投与した。

対照群にはコーンオイルを10 mL/kgの割合で経口投与した。

観察・検査項目：症状観察は、投与後10、30分、1、2、4時間および以後毎日1回行った。

体重測定は、投与直前、投与後7および14日に実施した。

途中死亡動物および観察期間終了時に生存していた全ての動物について剖検し、肉眼的病理所見を記録した。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	0、300、1000、1300、1700、2200、2900
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1340 (865～2080) 雌 1470 (1090～1990)
死亡開始および 終了時間	投与開始後1日から開始 投与開始後4日に終了
症状発現および 消失時間	投与開始後10分から発現 投与開始後5日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 300
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 300 雌 1000

雌雄ともに1000 mg/kg以上の投与群で自発運動減少、歩行失調、四肢麻痺、正向反射消失、呼吸不規則、呼吸困難および油状物の排泄が認められた。

死亡は雄では1000 mg/kg以上、雌では1300 mg/kg以上の投与群で認められた。

体重においては、雄では1700 mg/kg以上、雌では1300 mg/kg以上の投与群で軽度な

増加抑制が認められた。また、剖検では観察期間終了時屠殺動物において、雄では1700 mg/kg以上、雌では2200 mg/kg投与群で前胃肥厚が認められた。

C. 製剤を用いた試験成績

1. トルクロホスメチル 75%水和剤

(1) トルクロホスメチル75%水和剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 製1-1)

試験機関：(株)ボゾリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年：1988年

検 体：トルクロホスメチル75%水和剤 (グランサー水和剤)

検体純度：75%水和剤

[組 成]	トルクロホスメチル	75.0%
	物質微粉、界面活性剤等	25.0%

供試動物：CD(SD)系ラット、7週齢、体重：雄 228~240g、雌 136~146g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：対照群および2濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率からLD₅₀値を求めた。

投与方法：検体を注射用蒸留水に懸濁し、約16時間絶食したラットに2mL/100g体重の割合で強制経口投与した。対照群は注射用蒸留水のみを同様に投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を投与後6時間までは経時的に、その後は1日1回観察した。投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に体重測定を行なった。試験終了時に動物全例の組織の肉眼的病理検査を行なった。

試験結果：

動物種	ラット
投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	0、2500、5000
LD50 (mg/kg)	雄雌共 >5000
死亡開始 および終了時間	死亡例なし
症状発現 および消失時間	症状発現なし
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 5000

中毒症状、死亡は観察されなかった。体重については、各投与群の雌雄で投与後1日に増加抑制傾向が認められたが、それ以降は順調な体重増加が認められた。観察期間終了時の生存動物の剖検では、特記すべき変化はなく、検体投与の影響は認められなかった。