

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

2) 細菌(ネズミチフス菌/大腸菌)を用いた復帰突然変異試験 (資料No.毒 A40)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2002 年

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537) およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 mix)の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて、OECD ガイドラインおよびドイツ化学物質法にしたがって、変異原性を検定した。試験は、標準プレート法およびプレインキュベーション法で行なった。検体は DMSO に溶解し、標準プレート法では 20~5000 μg /プレートの 5 用量、プレインキュベーション法では 4~2500 μg /プレートの 5 用量とした。両試験とも 3 連制とした。陽性対照としては、MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、AAC (塩化 9-アミノアクリジン)、NOPD (4-ニトロ-o-フェニレンジアミン)、4-NQO (4-ニトロキノリン-N-オキシド) および 2-AA (2-アミノアントラセン) を用いた。

判定基準: 少なくとも 1 種類の試験菌株で復帰コロニー数が溶媒対照の約 2 倍の増加をし、かつ用量依存性を示す結果が再現される場合を陽性とした。

試験結果: 結果を次頁以降の表に示した。両試験とも S-9 Mix の有無にかかわらず、菌株の生育阻害を起こさない最高用量において、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いた MNNG、AAC、NOPD、4-NQO および 2-AA では、すべての検定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、検体は本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

標準プレート法 (表中の数値は3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				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	111	16	29	28	10
検体	20	-	103	14	32	25	12
	100	-	99	12	28	25	8
	500	-	100	13	35	27	7
	2500	-	99	11	33	36	4
	5000	-	27	9	20	36	3
対照 (DMSO)	-	+	106	18	37	31	8
検体	20	+	107	15	33	30	9
	100	+	105	17	28	30	9
	500	+	97	17	35	31	10
	2500	+	91	12	25	35	4
	5000	+	*67	*11	*19	*24	*2
陽性 対照	MNNG	5	-	674	722		
	AAC	100	-				350
	NOPD	10	-				562
	4-NQO	5	-			657	
	2-AA	2.5	+	647	106		575
	2-AA	60	+			213	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 抗菌性が認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

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 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	110	17	30	31	11
検体	4	-	105	17	28	30	13
	20	-	120	16	30	27	8
	100	-	111	16	30	19	7
	500	-	105	17	25	24	9
	2500	-	97	14	25	25	5
対照 (DMSO)	-	+	109	17	29	38	9
検体	4	+	108	16	27	29	8
	20	+	117	16	28	28	9
	100	+	110	15	22	26	12
	500	+	106	13	28	26	7
	2500	+	*76	*6	*15	*28	*2
陽性 対照	MNNG	5	-	566	621		
	AAC	100	-				342
	NOPD	10	-			633	
	4-NQO	5	-			618	
	2-AA	2.5	+	562	126		609 139
	2-AA	60	+			234	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 抗菌性が認められた。

3) 細菌(ネズミチフス菌/大腸菌)を用いた復帰突然変異試験 (資料No.毒 A41)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2002 年

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537) およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラット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試験を実施した。試験は、標準プレート法およびプレインキュベーション法で行なった。検体は DMSO に溶解し、標準プレート法では 20~5000 µg/プレートの 5 用量、プレインキュベーション法では 4~2500 µg/プレートの 5 用量とした。両試験とも用量あたり 3 プレートを使用した。陽性対照として、S9 mix 非存在下で MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、AAC (9-アミノアクリジン)、NOPD (4-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン)、4-NQO (4-ニトロキノリン-N-オキシド) を、S9 mix 存在下で 2-AA (2-アミノアントラセン) を用いた。

判定基準: S9 mix の有無にかかわらず、少なくとも 1 種類の試験菌株で復帰コロニー数が溶媒対照の約 2 倍に増加し、かつ用量依存性を示す結果が再現される場合を陽性とした。

試験結果: 結果を次頁以降の表に示した。両試験とも S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても設定したすべての用量で復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いた MNNG、AAC、NOPD、4-NQO および 2-AA 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、検体 (バッチ番号: 30786/22) は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

標準プレート法 (表中の数値は3プレートの平均値)

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				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	106	16	33	26	9
検体	20	-	113	16	31	23	9
	100	-	126	16	27	21	8
	500	-	95	16	30	25	7
	2500	-	97	13	27	18	8
	5000	-	81	13	22	5	4
対照 (DMSO)	-	+	111	17	32	33	11
検体	20	+	105	17	32	34	9
	100	+	100	16	28	28	10
	500	+	64	20	29	30	10
	2500	+	76	14	22	14	7
	5000	+	50	11	17	7	2
陽性 対照	MNNG	5.0	-	666	538		
	AAC	100	-				447
	NOPD	10	-			763	
	4-NQO	5.0	-			705	
	2-AA	2.5	+	862	102		772
	2-AA	60	+			239	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

プレインキュベーション法 (表中の数値は3プレートの平均値)

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				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	108	18	31	33	13
検体	4	-	102	17	32	24	11
	20	-	95	16	28	24	13
	100	-	86	13	35	27	11
	500	-	81	11	32	24	10
	2500	-	66	12	29	21	6
対照 (DMSO)	-	+	111	18	37	34	13
検体	4	+	100	15	34	27	12
	20	+	104	17	25	31	10
	100	+	95	16	25	27	12
	500	+	84	14	25	23	9
	2500	+	48	9	21	16	4
陽性 対照	MNNG	5	-	920	534		
	AAC	100	-				485
	NOPD	10	-			582	
	4-NQO	5	-			543	
	2-AA	2.5	+	735	128		573
	2-AA	60	+			213	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

4) 細菌(ネズミチフス菌/大腸菌)を用いた復帰突然変異試験 (資料 No. 毒 A42)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1999 年

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537) およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラット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試験を実施した。試験は、標準プレート法およびプレインキュベーション法で行なった。検体は DMSO に溶解し、標準プレート法では 20~5000 µg/プレートの 5 用量、プレインキュベーション法では 4~2500 µg/プレートの 5 用量とした。両試験とも用量あたり 3 プレートを使用した。陽性対照として、S9 mix 非存在下で MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、AAC (9-アミノアクリジン)、NOPD (4-ニトロ-o-フェニレンジアミン)、4-NQO (4-ニトロキノリン-N-オキシド) を、S9 mix 存在下で 2-AA (2-アミノアントラセン) を用いた。

判定基準: S9 mix の有無にかかわらず、少なくとも 1 種類の試験菌株で復帰コロニー数が溶媒対照の約 2 倍に増加し、かつ用量依存性を示す結果が再現される場合を陽性とした。

試験結果: 結果を次頁以降の表に示した。両試験とも S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても設定したすべての用量で復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いた MNNG、AAC、NOPD、4-NQO および 2-AA 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、検体 (バッチ番号: N14) は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

標準プレート法 (表中の数値は3プレートの平均値)

薬物	濃度 (μg / プレート)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	127	21	25	26	10
検体	20	-	106	19	21	23	10
	100	-	114	19	23	20	9
	500	-	93	21	23	20	9
	2500	-	104	18	30	21	8
	5000	-	72*	8*	18	16*	4*
対照 (DMSO)	-	+	126	20	29	32	10
検体	20	+	117	23	26	31	9
	100	+	125	17	23	25	6
	500	+	124	16	25	25	7
	2500	+	140	5	21	37	6
	5000	+	128*	3*	17	34*	4*
陽性 対照	MNNG	5.0	-	838	556		
	AAC	100	-				657
	NOPD	10	-				704
	4-NQO	5.0	-			1053	
	2-AA	2.5	+	1175	153		861
	2-AA	60	+			253	174

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 抗菌性が認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

プレインキュベーション法 (表中の数値は3プレートの平均値)

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				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	125	21	30	25	9
検体	4	-	120	22	27	22	10
	20	-	107	20	27	23	8
	100	-	118	22	26	25	8
	500	-	111	21	24	22	7
	2500	-	40	15	19	20	7
対照 (DMSO)	-	+	120	18	27	28	11
検体	4	+	135	17	24	27	7
	20	+	126	17	22	22	8
	100	+	109	16	20	22	7
	500	+	106	13	21	21	7
	2500	+	90*	7*	12*	15*	5*
陽性 対照	MNNG	5	-	1198	1318		
	AAC	100	-				419
	NOPD	10	-			796	
	4-NQO	5	-			728	
	2-AA	2.5	+	588	103		538
	2-AA	60	+			229	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenylendiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 抗菌性が認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

5) チャイニーズハムスターの肺由来の V79 細胞を用いた in vitro 染色体異常試験
(資料 No.A43)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの肺細胞由来 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。試験は 1 回行った。先に実施された V79 細胞を用いた in vitro 染色体異常試験 (試験番号：32M0124/984174) において、細胞毒性および染色体構造異常誘発性に関するデータが得られていたため、用量設定試験は行わなかった。その知見に基づき、OECD ガイドラインで推奨されている最高濃度 10 mM 相当の 3600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量とし、以下公差 900 を用いて希釈した。S9 mix 存在下および非存在下ともに、900、1800、2700 および 3600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 用量について処理し、1800、2700 および 3600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 濃度について、1 濃度あたり 200 個の分裂中期像を観察した (ただし、陽性対照については 100 個)。陽性対照としては、EMS (エチルメタンサルフォネート) および CPP (シクロフォスファミド) を用いた。

判定基準：染色体異常を有する細胞数が、陰性対照およびその背景データの範囲を超えて増加し、かつ用量依存性を示す結果が再現される場合を陽性とした。

試験結果：結果を次頁以降の表に示した。S9 mix 存在下において、検体は染色体構造異常数の用量依存性のある増加を示し、統計学的な有意差が認められた。数的異常を有する細胞数には増加は認められなかった。また、陽性対照では明らかな染色体構造異常細胞の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下で染色体異常誘発性を有するものと判断された。

薬物	濃度 μg/mL	処理 時間	標 本作 製時 間	観 察細 胞数	S9 の 有 無	染色体異常を有する細胞数								判定
						F ¹⁾	E ²⁾	切 断	その他			合計 ⁶⁾		
									MA ³⁾	P ⁴⁾	数的 異常	+G ⁵⁾	-G	
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	-	0	3	0	0	0	5	6 (3.0)	3 (1.5)	-
検体	1800	4	22	200	-	0	2	2	0	0	2	11 (5.5)	4 (2.0)	-
	2700	4	22	200	-	0	2	4	0	0	0	18 (9.0*)	6 (3.0)	-
	3600	4	22	200	-	0	3	2	0	0	0	15 (7.5)	5 (2.5)	-
陽性対照 (EMS)	350	4	22	100	-	0	10	18	0	0	0	23 (23.0**)	18 (18.0**)	+
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	+	0	4	5	0	0	0	17 (8.5)	9 (4.5)	-
検体	1800	4	22	200	+	1	1	2	0	0	2	14 (7.0)	4 (2.0)	-
	2700	4	22	200	+	2	9	7	0	0	2	24 (12.0)	18 (9.0)	-
	3600	4	22	200	+	1	14	14	0	1	3	42 (21.0**)	29 (14.5**)	+
陽性対照 (CPP)	0.5	4	22	100	+	0	20	27	1	0	0	30 (30.0**)	27 (27.0**)	+

1) F：断片化

2) E：交換

3) MA：複数の異常

4) P：細分化

5) G：ギャップ

6) ギャップを含む場合 (+G) と含まない場合 (-G)、括弧内は異常を示した細胞の割合 (%)

* : $P \leq 0.05$, ** : $P \leq 0.01$ (Bonferroni-Holm で調整した Fisher 直接確率検定、片側)

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EMS : Ethyl methanesulfonate

CPP : Cyclophosphamide

判定の欄の+は陽性、-は陰性を示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

6) チャイニーズハムスターの肺細胞由来の V79 細胞を用いた in vitro 染色体異常試験
(資料 No.A44)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1999 年

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスターの 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。試験は 2 回行った。

したがって、3600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量とし、以下公比 2 を用いて希釈し、1 回目の実験では S9 mix 存在下および非存在下 (4 時間暴露, 18 時間回復) とともに、225、450、900、1800、3600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 5 用量を設定した。2 回目の実験では 1800、2700、3600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量を設定し、S9 mix 存在下でのみ試験を実施した。1 濃度あたり 200 個の分裂中期像を観察した (ただし、陽性対照については 100 個)。陽性対照としては、EMS (エチルメタンスルフォネート) および CPP (シクロフォスファミド) を用いた。

試験結果: 結果を次頁以降の表に示した。S9 mix 存在下において、検体は最高用量でのみ染色体構造異常数の増加を示し、統計学的な有意差が認められた。また、陽性対照では期待通り染色体構造異常の誘発が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下で弱い染色体異常誘発性を有するものと判断された。

1 回目の試験

薬物	濃度 μg/mL	処理 時間	標本 作製 時間	観察 細胞 数	S9 の 有 無	染色体異常を有する細胞数								判定
						F ¹⁾	E ²⁾	切 断	その他			合計 ⁶⁾		
									MA ³⁾	P ⁴⁾	数的 異常	+G ⁵⁾	-G	
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	-	0	2	6	0	0	1	11 (5.5)	8 (4.0)	-
検体	900	4	22	200	-	4	9	1	0	0	4	15 (7.5)	14 (7.0)	-
	1800	4	22	200	-	0	6	2	0	0	2	16 (8.0)	8 (4.0)	-
	3600	4	22	200	-	0	2	1	0	0	3	9 (4.5)	4 (2.0)	-
陽性対照 (EMS)	350	4	22	100	-	0	10	20	1	0	0	20 (20.0**)	20 (20.0**)	+
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	+	0	4	3	0	0	1	12 (6.0)	7 (3.5)	-
検体	900	4	22	200	+	1	3	2	2	0	2	11 (5.5)	6 (3.0)	-
	1800	4	22	200	+	0	1	4	0	0	3	10 (5.0)	5 (2.5)	-
	3600	4	22	200	+	0	16	4	0	0	0	24 (12.0**)	20 (10.0**)	+
陽性対照 (CPP)	0.5	4	22	100	+	0	15	17	0	0	0	17 (17.0**)	17 (17.0**)	+

1) F：断片化

2) E：交換

3) MA：複数の異常

4) P：細分化

5) G：ギャップ

6) ギャップを含む場合 (+G) と含まない場合 (-G)、括弧内は異常を示した細胞の割合 (%)

*：P ≤ 0.05，**：P ≤ 0.01 (Bonferroni-Holm で調整した Fisher 直接確率検定、片側)

DMSO：ジメチルスルフォキシド

EMS：エチルメタンサルフォネート

CPP：シクロフォスファミド

判定の欄の+は陽性、-は陰性を示す。

2 回目の試験

薬物	濃度 μg/mL	処理 時間	標 本作 製時 間	観 察 細 胞 数	S9 の 有 無	染色体異常を有する細胞数							判定	
						F ¹⁾	E ²⁾	切 断	その他			合計 ⁶⁾		
									MA ³⁾	P ⁴⁾	数的 異常	+G ⁵⁾		-G
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	+	0	1	1	0	0	2	8 (4.0)	2 (1.0)	-
検体	1800	4	22	200	+	4	2	3	0	0	0	7 (3.5)	5 (2.5)	-
	2700	4	22	200	+	5	3	4	0	0	0	9 (4.5)	8 (4.0)	-
	3600	4	22	200	+	5	12	4	0	0	1	19 (9.5**)	17 (8.5**)	+
陽性対照 (CPP)	0.5	4	22	100	+	5	14	19	0	0	0	19 (19.0**)	19 (19.0**)	+

1) F：断片化

2) E：交換

3) MA：複数の異常

4) P：細分化

5) G：ギャップ

6) ギャップを含む場合 (+G) と含まない場合 (-G)、括弧内は異常を示した細胞の割合 (%)

*：P ≤ 0.05，**：P ≤ 0.01 (Bonferroni-Holm で調整した Fisher 直接確率検定、片側)

DMSO：ジメチルスルフォキシド

CPP：シクロフォスファミド

判定の欄の+は陽性、-は陰性を示す。

7) マウスを用いた小核試験

(資料 No.A45)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1999 年

検体純度:

試験動物: NMRI 系マウス、体重 約 29g、1 群雄各 5 匹

試験方法: 検体を 0.5%CMC 水溶液に懸濁し、375、750 および 1500 mg/kg の投与レベルで、24 時間間隔で 2 回腹腔内投与した。陰性対照群には 0.5%CMC を同様に投与した。陽性対照としては、Cyclophosphamide (CPP) および Vincristine (VCR) を用い、1 回腹腔内投与した。最終投与 24 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髓を採取してスライドグラス上に風乾固定後、エオジンとメチレンブルーの溶液 (ライト液) およびギムザ液で染色し、骨髓標本作製した。陽性対照群は 24 時間後に動物を屠殺した。原則として 1 動物あたり 2000 個の多染性赤血球について、小核の有無を検査するとともに以下の項目を記録した。

- ・多染性赤血球の数
- ・小核を有する多染性赤血球の数
- ・正染性赤血球の数
- ・小核を有する正染性赤血球の数
- ・正染性赤血球に対する多染性赤血球の比率
- ・「小さい小核」($d < D/4$) および「大きい小核」($d \geq D/4$) の数

[d: 小核の直径、D: 細胞の直径]

用量設定根拠:

判定基準: 小核を有する多染性赤血球の数が、同時陰性対照およびその背景データの範囲を超えて増加し、かつ用量依存性を示す結果が再現される場合を陽性とした。

試験結果: 骨髓標本の観察結果を次頁以降の表 (総括表および結果表) に示した。すべての投与群においてうずくまり姿勢、立毛が認められ、1500 mg/kg 群では一般状態の悪化も認められた。溶媒対照群および陽性対照群では臨床症状はみられなかった。

検体では、いずれの投与群においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。陽性対照群である CPP および VCR 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。

以上の結果より、検体は本試験条件下で骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

総括表

群	投与量 (mg/kg)	A	B	C	D
溶媒対照	—	10000	5686	1.3	0.4
検体	375	10000	4911	1.3	0.4
	750	10000	4735	1.2	0.6
	1500	10000	5009	1.9	1.6
陽性対照 C	20	10000	4921	14.5*	1.0
陽性対照 V	0.15	10000	5212	62.7*	2.1

* : $P \leq 0.01$ (Wilcoxon 検定、片側)

溶媒対照 : 0.5%CMC 水溶液

陽性対照 C : Cyclophosphamide

陽性対照 V : Vincristine

A : 検査した多染性赤血球数

B : 検査した多染性赤血球数あたりの正染性赤血球数

C : 多染性赤血球 1000 個あたりの小核を有するもの (平均)

D : 正染性赤血球 1000 個あたりの小核を有するもの (平均)

結果表

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	MNPCE% (平均値±SD)	PCE / (PCE+NCE) % (平均値±SD)
24*	陰性対照 (DMSO)	0	雄	5	1.3±1.0	64.3±6.4
	検体	375	雄	5	1.3±0.8	67.2±2.7
		750	雄	5	1.2±0.4	69.4±10.5
		1500	雄	5	1.9±0.7	67.7±9.1
24	陽性対照 (CPP)	20	雄	5	4.5±3.2	67.5±5.9
	陽性対照 (VCR)	0.15	雄	3	2.7±8.1	62.9±9.8

* : 2回目投与後

CPP : Cyclophosphamide

VCR : Vincristine

PCE : 多染性赤血球数

NCE : 正染性赤血球数

MNPCE : 多染性血球数 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

8) チャイニーズハムスターの卵巣 (CHO) 細胞を用いた in vitro 遺伝子突然変異試験 (HPRT 座位試験)

(資料 No.A46)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2000 年

検体純度: 95.8% (バッチ番号: N26)

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣細胞由来の培養細胞 (CHO) を用い、代謝活性化および非活性化の条件下でヒポキサンチン-グアニンホスフォリボシル転移酵素 (HPRT) 座位に遺伝子突然変異を誘発するか否か検定した。

検体は DMSO に溶解して用いた。

したがって、

突然変異試験は、1 回目の実験で 93.75、187.5、375.0、750.0、1500、3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 6 用量を用いた。2 回目の実験は -S9 では 1 回目と同じ濃度を用い、+S9 では 78.13、156.25、312.5、625.0、1250、2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 6 用量を用いた。

検体処理時間は4時間とし、その後約1週間の発現時間をおいた。発現時間終了後、選択培地 (グルタミンと牛胎児血清を加え、ヒポキサンチンを除いた Ham's F12 培地に 6-チオグアニンを最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加した培地) 中に再播種し、約1週間培養してコロニーを形成させた。検体処理後の最初の継代時および発現時間後の再播種時に細胞毒性検索のための細胞毒性試験を実施した。なお、結果が陰性であったため、統計学的評価は行なわなかった。

試験結果: 結果を次頁以降の表に示した。-S9 では実験 1 の 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のみ、+S9 では実験 1 の 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および実験 2 の 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上でコロニー形成率の抑制が認められた。両試験とも S-9 mix の有無にかかわらず、突然変異頻度の増加は認められず、同時陰性対照および背景データの範囲内であった。一方、陽性対照として用いた Ethylmethanesulfonate (EMS)、3-Methylcholanthrene (MCA) では明らかな突然変異頻度の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、本試験条件下で遺伝子突然変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

表 1 試験結果 (代謝活性化系非存在下: 1 回目の実験)

濃度 μg/mL	S-9 の 有無	継代 1 回目 の細胞密度 ($\times 10^3$ 個/mL)		細胞毒性試験 1*		細胞毒性試験 2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	-	A	250.8	81.4	100.0	96.3	100.0	0, 0, 0, 0, 0, 1	6.39	6.03
		B	225.4					1, 2, 3, 4, 5, 7		
93.75	-	A	245.2	77.7	95.5	100.4	104.3	0, 0, 1, 2, 6, 7	12.78	12.44
		B	326.3					3, 4, 4, 5, 6, 8		
187.5	-	A	287.2	81.3	99.9	91.3	94.8	0, 0, 1, 1, 1, 2	4.45	4.78
		B	357.3					0, 1, 1, 2, 3, 4		
375	-	A	292.7	71.9	88.3	99.4	103.2	1, 2, 2, 2, 3, 4	6.67	6.95
		B	337.7					0, 1, 1, 2, 2, 4		
750	-	A	295.5	82.2	101.0	111.0	115.3	1, 1, 2, 4, 4, 7	11.95	10.84
		B	348.0					2, 2, 3, 5, 5, 7		
1500	-	A	277.2	95.0	116.7	89.3	92.7	0, 0, 0, 0, 0, 0	6.39	5.93
		B	297.8					2, 4, 4, 4, 4, 5		
3000	-	A	229.4	29.7	36.5	98.9	102.7	1, 1, 3, 3, 4, 4	7.50	7.72
		B	254.1					1, 1, 1, 2, 2, 4		
300 EMS	-	A	239.9	64.8	79.6	90.2	93.7	82, 91, 94, 96, 99, 101	302.78	340.68
		B	208.4					82, 82, 83, 90, 92, 98		

- a: 選択培地中に 300000 細胞/フラスコで播種し、選択培地中で 7 日間培養した後のコロニー数
 b: 細胞 10^6 個あたりの頻度
 c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率 ("細胞毒性試験 2") に基づく補正を行った。
 *: 細胞毒性試験 1: 暴露終了時、細胞毒性試験 2: 発現期間終了時
 EMS: Ethylmethanesulfonate

表 2 試験結果 (代謝活性化系存在下: 1 回目の実験)

濃度 μg/mL	S-9 の 有無 ¹⁾	継代 1 回目 の細胞密度 ($\times 10^3$ 個/mL)		細胞毒性試験 1*		細胞毒性試験 2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	+	A	389.5	100.4	100.0	94.8	100.0	2, 3, 3, 5, 6, 6	9.45	10.09
		B	340.7					0, 0, 1, 1, 2, 5		
93.75	+	A	364.7	94.4	94.0	91.5	96.5	1, 1, 2, 2, 3, 5	8.89	9.82
		B	388.8					2, 2, 2, 3, 4, 5		
187.5	+	A	381.4	98.4	98.0	99.2	104.6	1, 1, 1, 2, 2, 3	3.89	4.14
		B	392.8					0, 0, 1, 1, 1, 1		
375	+	A	384.2	100.2	99.8	98.9	104.3	0, 0, 0, 0, 1, 1	2.78	2.60
		B	382.7					1, 1, 1, 1, 1, 3		
750	+	A	366.5	104.4	104.0	96.4	101.7	0, 0, 0, 0, 0, 1	3.06	3.16
		B	398.1					0, 1, 1, 2, 3, 3		
1500	+	A	365.2	95.3	94.9	106.9	112.8	3, 4, 4, 4, 7, 9	15.00	14.42
		B	384.0					1, 3, 3, 4, 6, 6		
3000	+	A	43.6	0.0	0.0	-	-	~~~~~	-	-
		B	59.9					~~~~~		
10 MCA	+	A	392.2	92.8	92.4	91.2	96.2	18, 23, 27, 34, 34, 35	117.5	130.51
		B	387.4					33, 35, 38, 46, 47, 53		

- a: 選択培地中に 300000 細胞/フラスコで播種し、選択培地中で 7 日間培養した後のコロニー数
 b: 細胞 10^6 個あたりの頻度
 c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率 ("細胞毒性試験 2") に基づく補正を行った。
 *: 細胞毒性試験 1: 暴露終了時、細胞毒性試験 2: 発現期間終了時
 1): S-9 mix の組成; S9: 補酵素=3:7
 MCA: 3-Methylcholanthrene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

表 3 試験結果 (代謝活性化系非存在下: 2 回目の実験)

濃度 μg/mL	S-9 の 有無	継代 1 回目 の細胞密度 ($\times 10^3$ 個/mL)		細胞毒性試験 1*		細胞毒性試験 2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	-	A	211.7	106.7	100.0	106.2	100.0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0.00	0.00
		B	181.8					0, 0, 0, 0, 0, 0		
93.75	-	A	253.6	102.0	95.6	99.0	93.2	0, 0, 0, 0, 0, 0	0.56	0.61
		B	283.3					0, 0, 0, 0, 1, 1		
187.5	-	A	263.2	105.3	98.7	94.1	88.6	0, 0, 0, 2, 2, 3	2.78	2.86
		B	294.6					0, 0, 0, 0, 1, 2		
375	-	A	262.1	101.9	95.5	100.4	94.5	0, 0, 0, 0, 0, 0	0.00	0.00
		B	302.9					0, 0, 0, 0, 0, 0		
750	-	A	282.4	98.6	92.4	97.9	92.2	1, 2, 2, 3, 3, 4	4.17	4.07
		B	287.1					0, 0, 0, 0, 0, 0		
1500	-	A	268.3	104.1	97.6	100.6	94.7	0, 1, 1, 2, 3, 5	6.12	6.08
		B	279.1					0, 1, 1, 2, 2, 4		
3000	-	A	203.8	84.2	78.9	100.1	94.3	0, 0, 0, 0, 0, 0	2.50	2.80
		B	204.1					0, 0, 1, 2, 3, 3		
300 EMS	-	A	213.6	72.7	68.1	99.7	93.9	61, 66, 69, 74, 77, 83	253.89	260.49
		B	216.5					58, 78, 80, 84, 85, 99		

a: 選択培地中に 300000 細胞/フラスコで播種し、選択培地中で 7 日間培養した後のコロニー数

b: 細胞 10^6 個あたりの頻度

c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率 ("細胞毒性試験 2") に基づく補正を行った。

*: 細胞毒性試験 1: 暴露終了時、細胞毒性試験 2: 発現期間終了時

EMS: Ethylmethanesulfonate

表 4. 試験結果 (代謝活性化系存在下: 2 回目の実験)

濃度 μg/mL	S-9 の 有無 ¹⁾	継代 1 回目 の細胞密度 ($\times 10^3$ 個/mL)		細胞毒性試験 1*		細胞毒性試験 2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	+	A	320.4	96.8	100.0	89.5	100.0	0, 0, 0, 0, 3, 3	4.17	4.70
		B	336.9					0, 0, 1, 2, 2, 4		
78.13	+	A	345.9	98.1	101.3	92.4	103.2	0, 1, 1, 2, 2, 4	6.39	6.93
		B	371.5					1, 1, 2, 2, 3, 4		
156.25	+	A	375.9	101.1	104.4	95.9	107.2	0, 0, 0, 0, 0, 0	2.78	2.77
		B	361.4					0, 0, 1, 2, 3, 4		
312.5	+	A	358.9	94.7	97.8	100.4	112.2	0, 0, 0, 0, 1, 1	2.22	2.18
		B	355.5					0, 0, 1, 1, 2, 2		
625.0	+	A	336.5	82.8	85.5	94.4	105.5	0, 0, 1, 2, 3, 4	2.78	3.05
		B	348.8					0, 0, 0, 0, 0, 0		
1250	+	A	263.7	28.4	29.3	91.0	101.7	0, 1, 1, 1, 1, 2	1.67	1.75
		B	223.7					0, 0, 0, 0, 0, 0		
2500	+	A	141.5	0.0	0.0	101.8	113.7	0, 0, 0, 0, 0, 0	2.22	2.25
		B	122.9					0, 1, 1, 2, 2, 2		
10 MCA	+	A	333.9	102.4	105.8	85.7	95.8	32, 41, 44, 48, 51, 67	166.39	195.25
		B	306.4					38, 49, 50, 53, 60, 66		

a: 選択培地中に 300000 細胞/フラスコで播種し、選択培地中で 7 日間培養した後のコロニー数

b: 細胞 10^6 個あたりの頻度

c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率 ("細胞毒性試験 2") に基づく補正を行った。

*: 細胞毒性試験 1: 暴露終了時、細胞毒性試験 2: 発現期間終了時

1): S-9 mix の組成: S9: 補酵素 = 3: 7

MCA: 3-Methylcholanthrene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

⑭ 生体機能への影響に関する試験

(資料 No. 毒 A48)

試験機関：財団法人 残留農薬研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2010 年

検体純度 :

1) マウスおよびラットの中樞神経系に対する作用

① 雌雄マウスにおける一般状態 (多次元観察法による観察)

供試動物 : ICR 系 SPF マウス (Crj:CD1(ICR))、7 週齢、

体重 雄 29.4~33.6 g、雌 22.2~26.3 g、1 群雌雄各 3 匹

投与方法 : 検体を注射用水に懸濁させ、500、1000 および 2000 mg/kg を 3~4 時間絶食させたマウスに単回経口投与し、一般状態を観察した。詳細な症状観察は、検体投与前日、投与 1、4 時間、1、2 および 3 日後に行った。

結果 : いずれの用量群の雌雄においても死亡および検体投与に起因すると思われる著しい体重変化は認められなかった。多次元観察法を用いて、いくつかの項目で極軽微あるいは軽度なスコア変動が認められたが、偶発的な変化であると考えられた (有意差検定は行わなかった)。よって、500、1000 および 2000 mg/kg 群の雌雄ともに、いずれの観察時点においても検体投与による影響は認められなかったと判断した。

② 雌雄ラットにおける一般状態 (多次元観察法による観察)

供試動物 : Sprague-Dawley 系 SPF ラット (CrI:CD(SD))、8 週齢、

体重 雄 251~296 g、雌 173~203 g、1 群雌雄各 5 匹

投与方法 : 検体を注射用水に懸濁させ、500、1000 および 2000 mg/kg を一晩絶食させたラットに単回経口投与し、一般状態を観察した。詳細な症状観察は、検体投与前日、投与 1、4 時間、1、2 および 3 日後に行った。

結果 : 2000 mg/kg 群の雄で粘液便 (投与 4 時間後) が、雌で糞の個数の増加 (投与 1、2 および 3 日後) が認められた (糞の個数のみ Dunnett の多重比較法実施、有意水準 $P < 0.05$)。500 mg/kg および 1000 mg/kg 群では、雌雄ともに検体投与による影響は認められなかった。

用量 (mg/kg, p.o.)	500	1000	2000
粘液便	-	-	+ (雄のみ、4 時間後)
糞の個数の増加	-	-	+ (雌のみ、1, 2, 3 日後)

- ; 影響なし、+ ; 影響あり (糞の個数のみ、 $P < 0.05$ 、Dunnett の多重比較法)

2) 呼吸・循環器系に対する作用

① 雄ラットの呼吸器系に対する作用 (呼吸状態の観察および呼吸回数測定)

試験動物 : Sprague-Dawley 系 SPF ラット (CrI:CD(SD))、8 週齢、

体重 雄 262~294 g、1 群 5 匹

投与方法 : 検体を注射用水に懸濁させ、500、1000 および 2000 mg/kg を一晩絶食させたラットに単回経口投与した。呼吸状態の観察および呼吸回数 (回/分) は検体投与前日、投与 1、4 時間および 1 日後に無拘束呼吸機能解析装置を用いて行った。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

結 果 : 投与 1,4 時間および 1 日後に呼吸状態を観察し、呼吸数を測定した結果、500、1000 および 2000 mg/kg 群のいずれの観察時点においても検体投与による影響は認められなかった (Dunnett の多重比較法、有意水準 $P < 0.05$)。

②雄ラットの循環器系に対する作用 (血圧および心拍数測定)

試験動物 : Sprague-Dawley 系 SPF ラット (CrI:CD(SD))、8 週齢、
体重 雄 218~260 g、1 群 5 匹

投与方法 : 検体を注射用水に懸濁させ、500、1000 および 2000 mg/kg を一晩絶食させたラットに単回経口投与した。尾静脈血圧測定は検体投与前日、投与 1、4 時間および 1 日後にプレシスモグラフ法 (非観血式) にて行った。

結 果 : 投与 1、4 時間および 1 日後に血圧および心拍数を測定した結果、500、1000 および 2000 mg/kg 群のいずれの観察時点においても検体投与による影響は認められなかった (Dunnett の多重比較法、有意水準 $P < 0.05$)。

以上のように、本剤の生体機能に及ぼす試験に関してラットあるいはマウスを用いて検討した結果、ラットの症状観察において粘液便および糞の個数の増加が、2000 mg/kg 群で投与 4 時間後から 3 日後にかけて認められた。マウスの症状観察、ラットの呼吸器系および循環器系に対する影響検査では、急性薬理作用に基づく有害性は認められなかった。

生体の機能に及ぼす影響試験の総括表

試験項目	動物種 (動物数 /群)	投与経路 (溶媒)	用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	無作 用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 一般状態 (多次元 観察法)	マウス 雄(3) 雌(3)	経口 (蒸留水)	500, 1000, 2000	—	2000	2000 mg/kg : 雄雌とも影響なし
	ラット 雄(5) 雌(5)	経口 (蒸留水)	500, 1000, 2000	2000	1000	2000 mg/kg : 雄 粘液便、雌 糞の個 数の増加。これらの症状は投与 4 時間後から 3 日後にかけて認めら れた。 1000 mg/kg : 雌雄ともに影響なし 500 mg/kg : 雌雄ともに影響なし
呼吸器系 (呼吸状態、 呼吸数)	ラット 雄(5)	経口 (蒸留水)	500, 1000, 2000	—	2000	2000 mg/kg : いずれも影響なし
循環器系 (血圧、 心拍数)	ラット 雄(5)	経口 (蒸留水)	500, 1000, 2000	—	2000	2000 mg/kg : いずれも影響なし

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

⑱ その他（機序検討試験）

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

2. 代謝物を用いた試験成績

① 反復投与毒性試験

1) のラットを用いた 4 週間混餌投与
亜急性毒性試験

(資料 No. 毒 B1)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2001 年

目的:

検体純度:

供試動物: Wistar (CrI Glx Bri Han: WI) 系ラット、1 群雌雄各 5 匹
開始時約 6 週齢 (個別飼育)

投与期間: 29 日間 (2000 年 11 月 15 日 ~ 2000 年 12 月 14 日)

投与方法: 検体は 0、100、500、3000 および 12800 ppm の濃度で直接飼料に混合し、29 日間にわたって随時摂食させた。検体を混合した飼料は投与開始時に 1 回調製した。これらの飼料は適切に調製されており、目標濃度の 94.0% から 98.5% の範囲にあった。

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; 一般状態および生死を 1 日に 1~2 回観察した。

投与期間中に死亡例は認められず、一般状態への影響も認められなかった。

体重変化; 投与期間開始前に体重を測定した。投与期間中は、投与 0 日 (投与期間開始日) およびその後は週 1 回体重を測定した。各測定日の体重と投与 0 日の体重の差を算出し、体重変化量とした。
体重変化に検体投与による影響は認められなかった。

摂餌量および摂餌効率; 週 1 回全動物の摂餌量を測定し、摂餌効率を計算した。
摂餌量、摂餌効率ともに、検体投与による影響は認められなかった。

摂水量; 毎日全動物の摂水量を目視で確認した。

検体摂取量; 体重および摂餌量から算出した投与期間中の 1 日当たり平均検体摂取量

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

を次頁の表に示す。

投与量 (ppm)		100	500	3000	12800
検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	9.4	47.2	283.9	1197.3
	雌	10.2	51.5	312.3	1304.4

眼科学的検査；投与開始前に全例および投与 29 日に対照群と 12800 ppm 群の全例を対象として眼科学検査を行った。
観察された所見はいずれも自然発生なものであり、投与群、対照群に同等に認められたことから、検体投与による影響はなかった。

血液学検査；投与最終日（29 日）に全動物を対象として、絶食し、無麻酔下で眼窩静脈叢から血液を採取し、以下の項目を測定した。

白血球数、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数、白血球百分比、血液凝固検査（プロトロンビン時間）

各測定項目に投与と関連した変化は認められなかった。

血液生化学検査；血液学的検査と同時期に採取した血液より得られた血清を用いて以下の項目を測定した。

ALT、AST、ALP、 γ -GTP、ナトリウム、カリウム、塩素、無機リン、カルシウム、尿素、クレアチニン、グルコース、総ビリルビン、総タンパク、アルブミン、グロブリン、トリグリセリド、総コレステロール、マグネシウム、チロシン

以下に有意差の認められた項目を示す。

性別	雄				雌			
	100	500	3000	12800	100	500	3000	12800
投与量 (ppm)	100	500	3000	12800	100	500	3000	12800
検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5
カリウム*		↑114						
チロシン**	93	127	105	↑193	104	99	157	↑206

*Kruskal-Wallis + Wilcoxon 検定 (両側) \uparrow : $P \leq 0.05$

**Kruskal-Wallis + Mann-Whitney U 検定 (両側) \uparrow : $P \leq 0.01$ 、有意水準 $P \leq 0.05$

数値は対照群を 100 とした場合の値。空欄は有意差無しを示す。

500 ppm 群の雄にカリウムの増加が認められたが、偶発的または（他方の性と比較して）一貫性がないか、もしくは用量反応関係がみられなかった。したがって、これらの所見には毒性学的意義がないと考えられた。血清チロシン濃度の有意な増加が 12800 ppm 群の雌雄で認められた。その他の血液化学的検査項目には、投与に関連した変化は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

尿検査； 全動物を対象として絶食、絶水下で一晩尿（投与 27～28 日）を採取し、以下の項目を測定した。

尿量、色調、濁度、pH、タンパク、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血、比重、沈渣

尿検査項目には検体投与に関連した変化はみられなかった。

病理学的検査：

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

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、脾臓、脳、心臓、胸腺

以下に有意差の認められた臓器を示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		100	500	3000	12800	100	500	3000	12800
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	5
脾臓	絶対重量							↓82	

Kruskal-Wallis + Wilcoxon 検定（両側）↓：P ≤ 0.05

数値は対照群を 100 とした場合の値。空欄は有意差無しを示す。

600 ppm 群の雌で絶対脾臓重量が有意に減少したが、

偶発的な所見と考

えられた。本所見を含め、検体投与による影響は認められなかった。

（下線部、申請者註）

肉眼的病理検査； 投与終了後に全動物を対象として、剖検を行った。

単発性に認められた所見は全て自然発生性であり、検体投与に関連のある異常は認められなかった。

病理組織学的検査； 肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の主要器官・組織を 4% 中性緩衝ホルマリンで固定した。

保存器官・組織； 全肉眼病変、脳、下垂体、甲状腺および上皮小体、胸腺、気管、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、子宮、膈、精巣上体、前立腺、精嚢、胃（腺胃を含む）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、下顎および腸間膜リンパ節、坐骨神経、骨髓（大腿骨）、眼球、脊髓（頸髄、胸髄、腰髄）

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

固定後、以下の器官・組織について病理組織標本（ヘマトキシリン・エオジン染色）を作製後、光学顕微鏡検査および所見の評価を以下の表にしたがって行った。なお、上皮小体ならびに卵管がスライド上に存在した場合には併せて検査対象とした。

器官・組織	投与量 (ppm)				
	0	100	500	3000	12800
全肉眼病変	A2	A2	A2	A2	A2
肝臓	A1				A1
腎臓	A1				A1

A = ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色 1 = その群の全動物
2 = その群の全異常動物

性別		雄					雌				
投与量 (ppm)		0	100	500	3000	12800	0	100	500	3000	12800
臓器	所見/検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		(5)	(1)	(-)	(-)	(5)	(5)	(-)	(-)	(-)	(5)
肝臓	リンパ球浸潤	5				5	5				4
	限局性狭窄		1								
腎臓		(5)	(-)	(-)	(1)	(5)	(5)	(-)	(-)	(-)	(5)
	嚢胞				1						
	慢性腎症	2				2	1				1

Fisher の直接確率検定 (両側) 有意差なし、有意水準: $P \leq 0.05$

数値は所見を有する動物数を示す。

(): 組織検査動物数。 -: 検査対象外。空欄は異常動物無しを示す。

いずれの所見も単発的なものであるか、あるいは投与群と対照群とが生物学的に同等なものだったことから、偶発的なものであるか、あるいは自然発生的なものであり、検体投与による影響ではないものと考えられる。

結論として、検体に関連した所見は、肝臓における HPPD (4-ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素) 活性のわずかな阻害に起因したと考えられる、雌雄における血清チロシンのわずかな増加だった。本所見は毒性影響とはならないものと考えられることから、本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は、雌雄共に 12800 ppm (雄 1197.3 mg/kg、雌 1304.4 mg/kg) であった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

2)
性
毒性試験

のラットを用いた 28 日間混餌投与亜急

(資料 No. 毒 B2)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

目的:

検体純度:

供試動物: Wistar (CriGlxBrlHan: WI) 系ラット、
1 群雌雄各 5 匹、開始時約 6 週齢 (個別飼育)

投与期間: 28 日間 (2003 年 7 月 7 日~2003 年 8 月 4 日)

投与方法: 検体は 0、6、60、600 および 6000 ppm の濃度で直接飼料に混合し、28 日間にわたって随時摂食させた。検体を混合した飼料は投与開始時に 1 回調製した。これらの飼料は適切に調製されており、目標濃度の 94.2% から 110.4% の範囲にあった。

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; 一般状態および生死を 1 日に 1~2 回観察した。オープンフィールド内での詳細な状態観察を投与開始前およびその後は週 1 回行った。

投与期間中に死亡例は認められなかった。

600 ppm 群の雄 1 匹で投与 28 日の詳細な状態の観察時に角膜混濁が認められた。この単発性の所見は検体に関連したものではないと判断された。

体重変化; 投与期間開始前に体重を測定した。投与期間中は、投与 0 日 (投与期間開始日) およびその後は週 1 回体重を測定した。各測定日の体重と投与 0 日の体重の差を算出し、体重変化量とした。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

投与終了時の平均体重および体重変化量を次頁の表に示す。

検体投与による影響として、6000 ppm 群の雌で体重および体重変化量が投与期間全体を通じて減少し、投与 28 日には統計学的にも有意であった。

投与量 (ppm)		6	60	600	6000
平均体重 (g) 投与 28 日	雄	282.4 (106.0)	264.7 (99.7)	271.8 (102.4)	257.7 (97.1)
	雌				
平均体重変化量 (g) 0~28 日	雄	127.1 (111.0)	112.7 (98.6)	118.3 (103.5)	104.1 (91.1)
	雌				

Dunnett 検定 (両側) ↓: P ≤ 0.05、↓↓: P ≤ 0.01

() 内の数値は対照群を 100 とした場合の値

摂餌量および摂餌効率；週 1 回全動物の摂餌量を測定し、摂餌効率を計算した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた平均摂餌量および摂餌効率を下表に示す。

摂餌量では、6 および 600 ppm 群の雄では摂餌量が投与 7 日から 21 日まで統計学的に有意に増加した。しかし、用量反応関係がみられないことから、検体投与による影響ではなかった。

摂餌効率では、6000 ppm 群の雌で投与 28 日に統計学的に有意に低下した。しかし、単発性の発現であり、用量反応関係もみられなかったことから、検体投与に関連したものとは考えなかった。

投与量 (ppm)		6	60	600	6000
摂餌量 (g)	投与 7 日	雄	↑22.5 (109.0)		↑22.9 (111.2)
		雌			
	投与 14 日	雄	↑24.0 (109.0)		↑24.5 (111.4)
		雌			
	投与 21 日	雄	↑22.4 (107.7)		↑22.9 (110.1)
		雌			
摂餌効率 (%)	投与 28 日	雄			
		雌			↓0.5 (6.0)

Dunnett 検定 (両側) ↑↓: P ≤ 0.05、↑: P ≤ 0.01、

() 内の数値は対照群を 100 とした場合の値

摂水量；週 1 回、4 日間にわたって全動物の摂水量を測定した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた平均摂水量を次頁の表に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

600 および 6000 ppm 群の雄では摂水量が投与期間を通じて増加し、一部の測定日には統計学的にも有意であった。この所見は検体投与に関連したものと判断された。

投与量 (ppm)		6	60	600	6000	
摂水量 (g)	投与 7 日	雄			↑22.8 (117.5)	↑23.5 (121.1)
		雌				
	投与 14 日	雄				↑24.8 (120.4)
		雌				
	投与 21 日	雄			↑25.0 (118.5)	
		雌				

Dunnett 検定 (両側) ↑ : $P \leq 0.05$, ♂ : $P \leq 0.01$

() 内の数値は対照群を 100 とした場合の値。空欄は有意差無しを示す。

検体摂取量；体重および摂餌量から算出した投与期間中の 1 日当たり平均検体摂取量を下表に示す。

投与量 (ppm)		6	60	600	6000
検体摂餌量 (mg/kg 体重/日)	雄	0.6	5.8	59.7	576.3
	雌	0.6	6.1	62.0	595.2

機能観察バッテリー (FOB)；投与 23 および 24 日目に、各群の全例を対象に以下の項目について検査した。検査は無作為な順序で実施した。

ホームケージ内での観察；姿勢、振戦、痙攣、異常な動き、歩行異常、その他の所見

オープンフィールドでの観察；ケージから取り出した時の行動、被毛、皮膚、流涎、鼻分泌物、流涙、眼球/瞳孔径、姿勢、眼瞼閉鎖、呼吸、振戦、痙攣、異常行動、歩行異常、活動性/覚醒度、糞 (糞の数/外觀/硬さ)、尿 (量/色)、立ち上がり回数

感覚運動/反射試験；接近反応、接触反応、視覚 (視覚性置き直し反応)、瞳孔反射、耳介反射、聴覚 (驚愕反応)、運動協調性 (正向反射)、取扱時の行動、発声、痛覚 (テイルピンチ法)、前肢の握力、後肢の握力、着地時フットスプレイ検査、その他の所見

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

ホームケージ内およびオープンフィールドでの観察所見ならびに感覚運動/反射試験の観察所見に検体投与による影響は認められなかった。また、着地時フットスプレイ検査成績にも検体の影響は認められなかった。対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。6、60および6000 ppm 群の雌で、後肢握力が統計学的に有意に増加した。しかし、600 ppm 群では有意な増加は認められず、さらに、一般状態の観察およびFOBにおいて他の運動機能項目に検体に関連した変化がみられなかったことから、上記の所見は検体投与とは無関係と判断された。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		6	60	600	6000	6	60	600	6000
検査動物数		5	5	5	5	5	5	5	5
後肢の握力	23日					-	-	-	-
	24日	-	-	-	-	↑138	↑138		↑138

Kruskal-Wallis + Wilcoxon 検定 (両側) ↑: P ≤ 0.05, ⤴: P ≤ 0.01

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値。

- : 検査実施せず。空欄は有意差無しを示す。

自発運動量測定 ; FOB と同日 (投与 23 および 24 日目) に、全例の運動活性を自発運動量測定装置で 5 分間隔で、計 12 回計測した。測定は無作為な順序で実施した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

総自発運動量 (第 1~12 区間の合計) には、検体投与群の雌雄に統計学的に有意な変化は認められなかった。

対照群との区間ごとの比較では、60、600 および 6000 ppm 群の雌で統計学的に有意な増加が単発性に認められた。しかし、各 1 区間のみの変化であることから、これらの所見は偶発的なものと判断された。

性別		雌			
投与量 (ppm)		6	60	600	6000
検査動物数		5	5	5	5
24日	1				
	2				
	3		↑149		↑130
	4			↑163	
	5				
	6				
	7				
	8				
	9				
	10				
	11				
	12				
	総計				

Kruskal-Wallis + Wilcoxon 検定 (両側) ↑: P ≤ 0.05

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値。空欄は有意差無しを示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

眼科学的検査；投与開始前に全例および投与 25 日に対照群と 6000 ppm 群の全例を対象として眼科学検査を行った。投与 28 日の詳細な一般状態観察時に角膜の混濁がみられたため、同日に全例を対象として追加の眼科学検査を行った。

観察された所見はいずれも単発性であるか、用量反応関係がみられなかったことから、検体投与による影響ではなかった。

血液学検査；投与終了後（29 日）に全動物を対象として、絶食し、無麻酔下で眼窩静脈叢から血液を採取し、以下の項目を測定した。

白血球数、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）、血小板数、白血球百分比、網状赤血球数、血液凝固検査（プロトロンビン時間）

各測定項目に投与と関連した変化は認められなかった。

血液生化学検査；血液学的検査と同時期に採取した血液より得られた血清を用いて以下の項目を測定した。また、チロシン濃度測定のため、投与 15 日にも血液学検査と同様の採血を行なった。さらに、投与終了時（29 日）には、ホルモンおよびチロシン濃度測定のため、剖検時の断頭後にも採血を行なった。

ALT、AST、ALP、 γ -GTP、ナトリウム、カリウム、塩素、無機リン、カルシウム、尿素、クレアチニン、グルコース、総ビリルビン、総タンパク、アルブミン、グロブリン、トリグリセリド、総コレステロール、マグネシウム、チロシン（投与 15 および 29 日）

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次頁の表に示す。

60 および 600 ppm 群の雄に、ALT 活性の上昇が認められたが、雌に認められていないことならびに用量反応関係がみられなかったことから、検体投与による影響ではなかった。

投与期間終了時には、血清クレアチニン濃度の有意な増加が 600 および 6000 ppm 群の雄ならびに 6000 ppm 群の雌で認められた。また、投与 15 日および 29 日に、血清チロシン濃度の有意な増加が全投与群の雌雄で認められたが、用量反応関係はみられなかった。6 および 60 ppm 群のラットでは血清チロシン濃度が急激に増加した一方で、600 および 6000 ppm 群の雌雄では血清チロシン濃度はプラトーに達していた。その他の血液化学的検査項目には投与に関連した変化は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	6	60	600	6000	6	60	600	6000
検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5
ALT		↑149	↑142						
クレアチニン			↑121	↑130					↑124

Kruskal-Wallis + Wilcoxon 検定 (両側) ↑ : $P \leq 0.05$, ↑↑ : $P \leq 0.01$

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

血清チロシン濃度									
性別	雄				雌				
	投与量 (ppm)	6	60	600	6000	6	60	600	6000
検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5
15 日	↑748	↑2286	↑3135	↑3281	↑274	↑811	↑1140	↑986	
29 日	↑512	↑1438	↑2050	↑2166	↑214	↑549	↑812	↑785	

Kruskal-Wallis + Wilcoxon 検定 (両側) ↑ : $P \leq 0.01$ 有意水準 : $P \leq 0.05$

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

ホルモン測定 ; 投与 15 日および投与終了後 (29 日) に全動物から採取した血液より血清を分離した。この血清を用いて、総トリヨードサイロニン (T_3)、総サイロキシシン (T_4) および甲状腺刺激ホルモン (TSH) をラジオイムノアッセイ法で測定した。

血清総トリヨードサイロニン (T_3) および総サイロキシシン (T_4) の測定結果を下表に示す。

性別	総トリヨードサイロニン (T_3) [nmol/L]				総サイロキシシン (T_4) [nmol/L]			
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
	検査動物数	5	5	5	5	5	5	5
投与量 (ppm)	投与 15 日		29 日		投与 15 日		29 日	
0	1.27 (100)	1.28 (100)	1.16 (100)	0.93 (100)	62.38 (100)	42.19 (100)	64.72 (100)	40.74 (100)
6	1.42 (112)	1.38 (108)	1.12 (97)	1.22 (131)	56.32 (90)	37.83 (90)	55.97 (86)	40.25 (99)
60	1.42 (112)	1.35 (105)	1.18 (102)	1.00 (108)	50.89 (82)	36.18 (86)	50.96 (79)	34.83 (85)
600	1.19 (94)	1.34 (105)	0.94 (81)	↑1.38 (148)	50.60 (81)	31.65 (75)	↓49.70 (77)	37.86 (93)
6000	1.28 (101)	1.47 (115)	0.93 (80)	0.95 (102)	45.18 (72)	39.29 (93)	↓45.35 (70)	28.97 (71)

Kruskal-Wallis + Wilcoxon 検定 (両側) ↑↓ : $P \leq 0.01$ 有意水準 : $P \leq 0.05$

() 内の数値は対照群を 100 とした場合の値

甲状腺刺激ホルモン (TSH) の測定結果を下表に示す。

甲状腺刺激ホルモン (TSH) [$\mu\text{g/L}$]				
性別	雄	雌	雄	雌
検査動物数	5	5	5	5
投与量 (ppm)	投与 15 日		29 日	
0	11.32 (100)	8.50 (100)	7.98 (100)	8.33 (100)
6	12.68 (112)	8.59 (101)	8.50 (107)	8.09 (97)
60	10.56 (93)	8.81 (104)	8.85 (111)	7.67 (92)
600	10.17 (90)	↓6.17 (73)	8.17 (102)	6.63 (80)
6000	14.51 (128)	10.03 (118)	10.30 (129)	8.50 (102)

Kruskal-Wallis + Wilcoxon 検定 (両側) ↓: $P \leq 0.05$

() 内の数値は対照群を 100 とした場合の値

投与 15 日には、6000 ppm 群の雄で総サイロキシン濃度の減少傾向が認められたが、雌では総サイロキシン濃度に影響はみられなかった。29 日には、600 および 6000 ppm 群の雄で総サイロキシン濃度の有意な減少が認められた。同時期には、6000 ppm 群の雌でも総サイロキシン濃度の減少傾向が認められた。一方、雌雄の総トリヨードサイロニンおよび甲状腺刺激ホルモン濃度には検体投与による影響はなかった。

尿検査； 全動物を対象として絶食、絶水下で一晩尿 (投与 24~25 日) を採取し、以下の項目を測定した。

尿量、色調、濁度、pH、タンパク、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血、比重、沈渣

対照群と比べ投与群で顕著に認められた異常項目を次頁の表に示す。ケトン体の有意な増加が 60、600 および 6000 ppm 群の雌雄に認められた。また、6000 ppm 群の雌では、対照群と比較して比重の増加を伴う尿量の減少が認められたが、統計学的有意差はなかった。その他の尿検査項目には検体投与に関連した変化はみられなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

性別	ケトン体*		尿量 (mL)		尿比重 (g/L)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
検査動物数	5	5	5	5	5	5
投与量 (ppm)	投与 25 日		投与 25 日		投与 25 日	
0	0	0	4.2 (100)	3.5 (100)	1041 (100)	1038 (100)
6	2	0	4.5 (107)	3.4 (97)	1053 (101)	1044 (101)
60	↑5	↑4	5.1 (121)	2.2 (63)	1045 (100)	1071 (103)
600	↑5	↑5	5.0 (119)	3.6 (103)	1047 (101)	1052 (101)
6000	↑5	↑5	4.1 (98)	1.7 (49)	1055 (101)	1095 (105)

Fisher の直接確率検定 (片側) (↑: $P \leq 0.05$, ↑↑: $P \leq 0.01$)

*: 数値は判定基準 (5 mmol/l) 以上の値を示した動物数を示す。

() 内の数値は対照群を 100 とした場合の値

病理学的検査:

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

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、脾臓、脳、心臓、胸腺

性別	雄				雌			
投与量 (ppm)	6	60	600	6000	6	60	600	6000
検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5
最終体重	107	99	101	96	96	94	96	90
肝臓	絶対重量	↑121	↑116	↑123	115			
	相対重量	↑114	↑117	↑122	↑120			
腎臓	絶対重量							
	相対重量				↑112			
脾臓	絶対重量				↓83	↓84		↓72
	相対重量							
胸腺	絶対重量							↓65
	相対重量							
精巣	絶対重量				-	-	-	-
	相対重量				↑116	-	-	-

Kruskal-Wallis + Wilcoxon 検定 (両側) ↑↓: $P \leq 0.05$, ↑↑↓: $P \leq 0.01$

数値は対照群を 100 とした場合の値

- : 該当せず。

空欄は有意差無しを示す。

6~600 ppm 群の雄では絶対肝臓重量が軽度ながら有意に増加した。この増加は用量依存性ではなかったが、少なくとも同じ傾向が 6000 ppm 群でも認められた。雌では脾臓の絶対重量が 6、60 および 6000 ppm 群で有意に減少した。高用量群におけるやや重度な減少は、最終体重の軽度な減少に関連したものと考えられた。同じく 6000 ppm 群における胸腺絶対重量の有意な減少も、最終体重の軽度な減少による二次的影響と考えられた。

相対重量では、雄で肝臓重量が全用量群で有意に増加した。また、6000 ppm 群の雄のみで腎臓および精巣についても有意な増加が認められた。雌では有意な変化は認められなかった。

肉眼的病理検査；投与終了後に全動物を対象として、剖検を行った。

単発性に認められた所見は全て自然発生性であり、検体投与に関連のある異常は認められなかった (Fisher の直接確率検定 (片側)、有意水準： $P \leq 0.05$)。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の主要器官・組織を 4% 中性緩衝ホルマリンで固定した。

保存器官・組織：全肉眼病変、脳、下垂体、甲状腺および上皮小体、胸腺、気管、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、子宮、陰、精巣上体、前立腺、精囊、胃 (腺胃を含む)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、下顎および腸間膜リンパ節、坐骨神経、骨髓 (大腿骨)、眼球、脊髄 (頸髄、胸髄、腰髄)、脾臓

固定後、以下の器官・組織について病理組織標本 (ヘマトキシリン・エオジン染色) を作製後、光学顕微鏡検査および所見の評価を次頁の表にしたがって行った。なお、上皮小体ならびに卵管がスライド上に存在した場合には併せて検査対象とした。

器官・組織	投与量 (ppm)				
	0	6	60	600	6000
全肉眼病変	A2	A2	A2	A2	A2
脳	A1				A1
甲状腺	A1				A1
胸腺	A1				A1
気管	A1				A1
肺	A1				A1
心臓	A1				A1
肝臓	A1				A1
脾臓	A1				A1
腎臓	A1				A1
副腎	A1				A1
精巣	A1				A1
精巣上体	A1				A1
卵巣	A1				A1
子宮	A1				A1
前立腺	A1				A1
胃 (腺胃を含む)	A1				A1
十二指腸、回腸	A1				A1
空腸 (パイエル板を含む)	A1				A1
盲腸、結腸、直腸	A1				A1
膀胱	A1				A1
リンパ節 (腸間膜および下顎リンパ節)	A1				A1
坐骨神経	A1				A1
骨髄 (大腿骨)	A1				A1
脊髄 (頸部、胸部、腰部)	A1				A1
膵臓	A1				A1

A = ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色

1 = その群の全動物 2 = その群の全異常動物

免疫関連の器官および組織については以下の項目を評価した。

胸腺： 皮質：髄質比の増減 (面積比のみ)、星空 (starry sky) 細胞の増加、皮質における細胞密度の変化、髄質における細胞密度の変化

脾臓： 濾胞の細胞組成の変化、動脈周囲リンパ組織 (PALS)、リンパ濾胞、辺縁帯、赤脾髄の細胞密度の変化、胚中心数の変化

リンパ節 (腸間膜および下顎リンパ節)：濾胞、濾胞間領域、傍皮質領域、髄質の細胞密度の変化、胚中心数の変化、傍皮質の細胞組成の変化、洞の細胞密度の変化

パイエル板 (空腸)： 濾胞の細胞密度の変化 (マントル層および胚中心を含む)、濾胞間領域の細胞密度の変化

検体投与に起因すると考えられる病理所見を次頁の表に示す。

甲状腺では「濾胞上皮細胞肥大」が雄の全検体投与群の全例で認められ、雌でも全検体投与群で2例ずつ観察された。また、濾胞上皮細胞肥大がみられた例の多くで「薄片状コロイド」が認められた。肉眼所見に対応した所見が観察されたが、いずれも自然発生性と考えられ、検体投与に関連しない所見と判断された。また、雄の全検体投与群で認められた有意な絶対および相対肝臓重量の増加に対応する組織形態学的所見は観察されなかった。ならびに、脾臓および胸腺絶対重量の減少についても、検体投与に関連した対応する組織形態学的変化は認められなかった。

性別 投与量 (ppm)	雄					雌				
	0	6	60	600	6000	0	6	60	600	6000
甲状腺/検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
濾胞上皮細胞肥大	0	5	5	5	5	0	2	2	2	2
薄片状コロイド	0	4	5	4	5	0	1	3	0	2

Fisher の直接確率検定 (片側) 有意差なし、有意水準: $P \leq 0.05$

数値は所見を有する動物数を示す。

以上のように、全身毒性としては 6000 ppm 群の雌において、軽度の体重および体重変化量の減少のみが認められた。また、600 および 6000 ppm 群の雄では摂水量の増加が投与期間を通じて認められた。血液生化学検査では、血清クレアチニン濃度の増加が 600 および 6000 ppm 群の雄ならびに 6000 ppm 群の雌で認められた。また、この群の雌は濃縮尿を少量しか排泄しなかった。これらの所見は投与に関連したものと判断され、おそらく軽度な腎臓機能障害によるものと考えられた。

尿検査ではケトン体排泄例の有意な増加が 60、600 および 6000 ppm 群の雌雄で認められた。親化合物と同様に、検体の作用機序は動物のチロシン異化に関わる酵素 p-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼの阻害であると推察される。本酵素阻害により検体投与動物では血中チロシン濃度が増加し、その結果、ケト酸である p-ヒドロキシフェニルピルビン酸の尿中への排泄量が増加したため、試験紙法では尿中のケトン体が陽性となった。

血清総サイロキシン濃度の軽度な減少が 600 および 6000 ppm 群の雄ならびに 6000 ppm 群の雌で認められた。この変化は検体に関連したものと考えられた。この血清サイロキシン濃度の減少は、サイロキシン-グルクロン酸抱合体の胆汁中への排泄速度が増加したことによる可能性がある。ただし、甲状腺刺激ホルモンの代償性の増加は認められなかった。

さらに、血清チロシン濃度の急激な増加が6および60 ppm群の全ラットで認められた一方で、600および6000 ppm群の雌雄では血清チロシン濃度はプラトーに達していた。

病理学的検査では、絶対および相対肝臓重量の増加が全検体投与群の雄で認められ、対応する組織形態学的所見は観察されなかったものの、検体投与に関連した影響と考えられた。その機序として、肝臓の代謝酵素が生じている可能性が高かった。その他の重量変化(腎臓、精巣、脾臓および胸腺)はいずれも偶発的で生物学的意味のないものと判断された。

組織形態学的には、部分的なコロイドの変化(薄片状コロイド)を伴う「濾胞上皮細胞肥大」が雄の全検体投与動物および雌の全検体投与群で各2例に認められた。これらの形態学的変化は投与に関連するものと考えられた。

結論として、明確な無作用量は求められなかった。標的器官は、肝臓、甲状腺および腎臓であった。ただし、肝臓重量の増加と、甲状腺の濾胞上皮細胞肥大およびコロイドの変化(薄片状)は、検体投与に対する適応反応と考えられたため、これらの所見は、検体に関連するものではあるが、有害ではないと判断された。したがって、本試験条件下における無毒性量(NOEL)は、雄60 ppm、雌600 ppmであった。

② 変異原性試験

1)
試験

の細菌を用いる復帰突然変異試

(資料No.毒B3)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2001 年

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537) およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (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。試験は、標準プレート法およびプレインキュベーション法で行なった。検体は DMSO に溶解し、標準プレート法では 10~5000 µg/プレート の 5 用量、プレインキュベーション法では 2~500 µg/プレート の 5 用量で実施した。両試験とも用量あたり 3 プレートを使用した。陽性対照としては、MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、AAC (9-アミノアクリジン)、NOPD (4-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン)、4-NQO (4-ニトロキノリン-N-オキシド) および 2-AA (2-アミノアントラセン) を用いた。

用量設定根拠: 報告書に記述がない。

判定基準: S9 mix の有無にかかわらず、少なくとも 1 種類の試験菌株で復帰変異コロニー数が溶媒対照の約 2 倍の増加を示し、かつ用量依存性を示す結果が再現される場合を陽性とした。

試験結果: 結果を次頁以降の表に示した。両試験とも S9-mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。一方、陽性対照として用いた MNNG、AAC、NOPD、4-NQO および 2-AA 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、検体は本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

標準プレート法（表中の数値は3プレートの平均値）1回目

薬物	濃度 (μg /プレート)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	110	19	35	31	9
検体	20	-					
	100	-					
	500	-					
	2500	-					
	5000	-					
対照 (DMSO)	-	+	107	19	40	34	10
検体	20	+					
	100	+					
	500	+					
	2500	+					
	5000	+					
陽性 対照	MNNG	5	-	954	952		
	AAC	100	-				350
	NOPD	10	-			782	
	4-NQO	5	-			626	
	2-AA	2.5	+	1038	201		583
	2-AA	60	+			284	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 背景菌の生育阻害が認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

標準プレート法（表中の数値は3プレートの平均値）2回目

薬物	濃度 (μg /プレート)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	133	18	26	28	12
検体	10	-					
	30	-					
	100	-					
	300	-					
	1000	-					
対照 (DMSO)	-	+	130	19	27	36	12
検体	10	+					
	30	+					
	100	+					
	300	+					
	1000	+					
陽性 対照	MNNG	5	-	630	679		
	AAC	100	-				391
	NOPD	10	-			611	
	4-NQO	5	-		729		
	2-AA	2.5	+	552	137		624
	2-AA	60	+			271	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenylendiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

プレインキュベーション法 (表中の数値は3プレートの平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	108	18	32	34	10
検体	2	-					
	10	-					
	50	-					
	250	-					
	500	-					
対照 (DMSO)	-	+	107	18	28	32	9
検体	2	+					
	10	+					
	50	+					
	250	+					
	500	+					
陽性対照	MNNG	5	-	894	826		
	AAC	100	-				567
	NOPD	10	-			919	
	4-NQO	5	-			520	
	2-AA	2.5	+	607	116		520
	2-AA	60	+			206	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 背景菌の生育阻害が認められた。

: 検体の析出が認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

2) 用いる復帰突然変異試験

の細菌(ネズミチフス菌/大腸菌)を

(資料 No. 毒 B4)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2003 年(2003 年改訂)

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537) およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (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。試験は、標準プレート法およびプレインキュベーション法で行なった。検体は DMSO に溶解し、標準プレート法では 20~5000 µg/プレートの 5 用量、プレインキュベーション法では 4~2500 µg/プレートの 5 用量で実施した。両試験とも用量あたり 3 プレートを使用した。陽性対照としては、MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、AAC (9-アミノアクリジン)、NOPD (4-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン)、4-NQO (4-ニトロキノリン-N-オキシド) および 2-AA (2-アミノアントラセン) を用いた。

用量設定根拠:

判定基準: S9 mix の有無にかかわらず、少なくとも 1 種類の試験菌株で復帰変異コロニー数が溶媒対照の約 2 倍の増加をし、かつ用量依存性を示す結果が再現される場合を陽性とした。

試験結果: 結果を次頁以降の表に示した。両試験とも S9-mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いた MNNG、AAC、NOPD、4-NQO および 2-AA 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、検体は本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

標準プレート法 (表中の数値は3プレートの平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	107	18	30	29	12
検体	20	-					
	100	-					
	500	-					
	2500	-					
	5000	-					
対照 (DMSO)	-	+	112	19	35	40	11
検体	20	+					
	100	+					
	500	+					
	2500	+					
	5000	+					
陽性 対照	MNNG	5	-	1096	860		
	AAC	100	-				363
	NOPD	10	-			880	
	4-NQO	5	-		726		
	2-AA	2.5	+	962	127		778
	2-AA	60	+			224	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 背景菌の生育阻害が認められた。

: 検体の析出が認められた。

† : 技術上のミスにより3プレート目のデータが得られなかったため、2プレートのみ平均値を示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

プレインキュベーション法 (表中の数値は3プレートの平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	104	16	33	27	13
検体	4	-					
	20	-					
	100	-					
	500	-					
	2500	-					
対照 (DMSO)	-	+	99	18	33	33	11
検体	4	+					
	20	+					
	100	+					
	500	+					
	2500	+					
陽性 対照	MNNG	5	-	864	654		
	AAC	100	-				439
	NOPD	10	-			707	
	4-NQO	5	-			696	
	2-AA	2.5	+	693	156		589
	2-AA	60	+			249	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenyldiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 背景菌の生育阻害が認められた。

: 検体の析出が認められた。

3) の細菌(ネズミチフス菌/大腸菌)を用いた復帰突然変異試験

(資料 No. 毒 B5)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2003 年

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537) およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (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。試験は、標準プレート法およびプレインキュベーション法で行なった。検体を DMSO に溶解し、標準プレート法では 22~5500 μg /プレートの 5 用量、プレインキュベーション法では 4.4~2750 μg /プレートの 5 用量で実施した。両試験とも用量あたり 3 プレートを使用した。陽性対照としては、MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、AAC (9-アミノアクリジン)、NOPD (4-ニトロ-o-フェニレンジアミン)、4-NQO (4-ニトロキノリン-N-オキシド) および 2-AA (2-アミノアントラセン) を用いた。

用量設定根拠:

判定基準: 少なくとも 1 種類の試験菌株で復帰コロニー数が溶媒対照の約 2 倍の増加をし、かつ用量依存性を示す結果が再現される場合を陽性とした。

試験結果: 結果を次頁以降の表に示した。両試験とも S-9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。一方、陽性対照として用いた MNNG、AAC、NOPD、4-NQO および 2-AA 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、検体は本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

標準プレート法 (表中の数値は3プレートの平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{プレート}$)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	108	17	30	25	10
検体	22	-					
	110	-					
	550	-					
	2750	-					
	5500	-					
対照 (DMSO)	-	+	106	17	35	34	10
検体	22	+					
	110	+					
	550	+					
	2750	+					
	5500	+					
陽性 対照	MNNG	5	-	767	698		
	AAC	100	-				374
	NOPD	10	-			1044	
	4-NQO	5	-			694	
	2-AA	2.5	+	729	133		1192
	2-AA	60	+			273	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenylendiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

* : 背景菌の生育阻害が認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

プレインキュベーション法 (表中の数値は3プレートの平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9-Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	-	-	102	17	29	26	9
検体	4.4	-					
	22	-					
	110	-					
	550	-					
	2750	-					
対照 (DMSO)	-	+	112	16	31	34	11
検体	4.4	+					
	22	+					
	110	+					
	550	+					
	2750	+					
陽性 対照	MNNG	5	-	818	820		
	AAC	100	-				547
	NOPD	10	-			683	
	4-NQO	5	-		524		
	2-AA	2.5	+	526	159		595
	2-AA	60	+			207	

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

AAC : 9-aminoacridine

NOPD : 4-nitro-o-phenylendiamine

4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide

2-AA : 2-aminoanthracene

4)

のヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体

異常試験

(資料 No. 毒 B6)

試験機関：RCC Cytotest Cell Research GmbH (ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年：2004 年

検体純度：

試験方法：薬物療法を受けていない健康なドナーから得たヒトリンパ球を用い、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 に懸濁して用いた。実験は 2 回行った。実験 I において、OECD ガイドラインで推奨されている最高濃度の約 10 mM (3100 µg/mL) を最高用量とし、S9 mix 存在下 (4 時間暴露) および非存在下 (4 時間および 22 時間暴露) とともに、61.7、107.9、188.9、330.5、578.4、1012.2、1771.4、3100 µg/mL の 8 用量を設定した。その結果、S9mix 非存在下の 1012.2 µg/mL および S9mix 存在下の 578.4 µg/mL の処理 4 時間後において明らかな細胞毒性作用 (有糸分裂指数の低下) が認められた。さらに、S9mix 非存在下の 330.5 µg/mL の処理 22 時間後において強い細胞毒性作用が認められた。これらの結果をもとに実験 II は、S9mix 非存在下 (22 時間暴露) の場合 1000 µg/mL、S9 mix 存在下 (4 時間暴露) の場合 800 µg/mL をそれぞれ最高用量に設定した。S9 mix 存在下では、最高用量においても細胞毒性が認められなかったため、本試験の 1 回目は 2000 µg/mL、2 回目は 3100 µg/mL をそれぞれ最高用量とした。実験 I の S9mix 非存在下 (4 時間暴露) では、330.5、578.4、1012.2 µg/mL、S9mix 非存在下 (22 時間暴露) では、107.9、188.9、330.5 µg/mL、S9mix 存在下 (4 時間暴露) では、

330.5、578.4 µg/mL、実験 II の S9 mix 非存在下 (22 時間暴露) では、186.6、326.5 µg/mL、S9mix 存在下 (4 時間暴露) では、188.9、330.5、578.4 µg/mL のそれぞれ 2 または 3 用量について、染色体構造異常の評価のために 1 培養器あたり 100 個 (1 濃度あたり 200 個) の分裂中期像を観察した。また、1 培養器あたり 250 個 (1 濃度あたり 500 個) の分裂中期像中の倍数体細胞数を記録した。有糸分裂指数決定のために 1 培養器あたり 1000 個の細胞を観察した。陽性対照としては、Ethylmethane sulfonate (EMS) および Cyclophosphamide (CPA) を用いた。

判定基準：染色体構造異常を有する細胞の数が背景データの範囲 (異常細胞の割合が 0.0 ~ 3.0%、ギャップを含まない) を超えて増加し、かつ、その増加に用量相関性または同時陰性対照と比較して統計学的有意差が認められる場合を陽性とした。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

試験結果：結果を次頁以降の表に示した。

S9mix 存在下の実験 I の 2 用量においてのみ統計学的に有意な増加が認められた。しかしながら、これは、溶媒対照群の値が極端に低かったことが原因であり、また、その値は、試験施設の背景データの範囲内 (0.0~3.0%、ギャップを含まない) であったことから生物学的に重要で無いものと考えられた。一方、陽性対照では明らかな染色体異常細胞の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下で染色体異常誘発性は有しないものと判断される。

実験 I

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間 (h)	S9mix の有無 (+/-)	有糸分裂 指数 (%) [#]	異常細胞 (%)		倍数体細胞 (%)
					ギャップ を含む	ギャップを 含まない	
陰性対照	—	4	—	100.0	0.5	0.0	0.4
溶媒対照 (DMSO)	—	4	—	100.0	1.0	1.0	0.0
陽性対照 EMS	660.0	4	—	79.4	12.0	↑10.5	0.2
検体	330.5	4	—	120.8	0.5	0.0	0.4
	578.4 ^P	4	—	106.7	0.5	0.5	0.2
	1012.2 ^P	4	—	47.1	0.5	0.0	0.0
陰性対照	—	4	+	100.0	2.5	2.0	0.2
溶媒対照 (DMSO)	—	4	+	100.0	0.0	0.0	0.2
陽性対照 CPA	22.5	4	+	89.8	12.5	↑11.0	0.2
検体	107.9	4	+	82.6	3.0	↑2.0	0.0
	330.5	4	+	62.3	3.0	↑2.5	0.2
	578.4 ^P	4	+	49.4	1.0	0.5	0.0
陰性対照	—	22	—	100.0	1.0	1.0	0.0
溶媒対照 (DMSO)	—	22	—	100.0	0.5	0.5	0.2
陽性対照 EMS	660.0	22	—	41.9	20.5	↑18.0	0.0
検体	107.9	22	—	77.1	0.5	0.5	0.2
	188.9	22	—	69.0	2.0	1.5	0.0
	330.5	22	—	34.3	3.5	2.5	0.2

Fisher の直接確率検定 (片側) ↑ : $P \leq 0.05$ 、↑↑ : $P \leq 0.01$

検定は、検体と溶媒対照、陽性対照と陰性対照とをそれぞれ比較した。

: 検体は、溶媒対照に対する相対値、陽性対照は、陰性対照に対する相対値。

P : 検体の析出が認められた。

DMSO : Dimethylsulfoxide

EMS : Ethylmethane sulfonate

CPA : Cyclophosphamide

実験 II

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間 (h)	S9mix の有無 (+/-)	有糸分裂 指数 (%) [#]	異常細胞 (%)		倍数体細胞 (%)
					ギャップ を含む	ギャップを 含まない	
陰性対照	—	22	—	100.0	1.5	1.0	0.6
溶媒対照 (DMSO)	—	22	—	100.0	0.0	0.0	0.8
陽性対照 EMS	550.0	22	—	22.4	9.0	↑8.5	0.0
検体	186.6	22	—	91.5	1.0	0.5	0.0
	326.5	22	—	79.8	1.5	1.0	0.4
陰性対照	—	4	+	100.0	1.5	1.0	0.2
溶媒対照 (DMSO)	—	4	+	100.0	1.5	0.5	0.0
陽性対照 CPA	15.0	4	+	37.1	20.5	↑19.0	0.0
検体	188.9	4	+	90.4	3.5	1.5	0.0
	330.5	4	+	77.7	2.5	2.5	0.2
	578.4 ^P	4	+	93.2	0.5	0.0	0.4

Fisher の直接確率検定 (片側)、↑ : $P \leq 0.01$ 、有意水準 : $P \leq 0.05$

検定は、検体と溶媒対照、陽性対照と陰性対照とをそれぞれ比較した。

: 検体は、溶媒対照に対する相対値、陽性対照は、陰性対照に対する相対値。

P : 検体の析出が認められた。

DMSO : Dimethylsulfoxide

EMS : Ethylmethane sulfonate

CPA : Cyclophosphamide

- 5) のチャイニーズハムスター由来の V79
細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No. 毒 B7)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター由来の 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。実験は 3 回行った。

1 回目の試験では、125、250、500、1000、1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (S9 mix 非存在下 4 時間暴露、回復時間 18 時間) および 250、500、1000、2000、3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (S9 mix 存在下 4 時間暴露、回復時間 18 時間) を設定し、細胞の状態の観察に基づき、それぞれ 250、500、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 濃度について評価した。1 回目の試験において、中部動原体染色体および次中部動原体染色体の 3 および 4 番に部位特異的に染色体異常が認められたため、2 回目の試験では、250、500、750、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (S9 mix 非存在下 4 時間暴露、回復時間 18 時間) の 4 濃度を設定し、細胞の状態の観察に基づき、250、500、750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 濃度について非ランダムな染色体異常の所見を確認した。3 回目の試験では、31.25、62.5、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (S9 mix 非存在下 18 時間暴露、回復時間 18 時間)、500、750、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (S9 mix 非存在下 18 時間暴露、回復時間 28 時間) および 250、500、750、1000、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (S9 mix 存在下 4 時間暴露、回復時間 28 時間) を設定し、細胞の状態の観察に基づいてそれぞれ、62.5、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 濃度、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 1 濃度および 250、500、750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 濃度について評価した。1 濃度あたり 200 個の分裂中期像を観察した (ただし、染色体損傷細胞の数が明らかに増加していたため、陽性対照については 100 個、2 回目の試験の 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ については 50 個とした)。陽性対照としては、Ethyl methanesulfonate (EMS) および Cyclophosphamide (CPP) を用いた。

試験結果: 結果を次々頁以降の表に示した。すべての実験で S9 Mix の有無にかかわらず、染色体構造異常数の増加が認められたが、そのほとんどが特異的な部位における染色体異常細胞であった。観察結果より、特異的異常細胞を除外した細胞のみで評価した場合、S9 Mix の有無および暴露時間、回復時間の長短にかかわらず、陰性対照群と同程度を示し、かつその値は陰性対照の背景データ内であった。非ランダムに分布する特異的切断部位として、中部動原体および次中部動原体染色体の 3 および 4 番のみが関係しており、部位特異性が高かった。

本試験で認められた特異的部位における染色体構造異常の傾向は、いわゆる染色体脆弱部位による異常と考えられる。染色体脆弱部位は、特定の化学物質による処理など、様々な特異的条件に暴露された場合に非ランダムに切断される傾向がある染色体座である。大部分の染色体脆弱部位の染色体異常は、細胞内核酸プールの攪乱により直接的または間接的に調節されており、核酸プールの不均衡により突然変異、組換え、交換などの多様な染色体異常が発生することが考えられている。したがって、非ランダムに分布する染色体異常の増加が認められるのは、細胞系特異的現象と考えられる間接的機序が原因であり、本来の染色体構造異常誘発性を示していない可能性が高い。

染色体の数的異常を有する細胞の数には増加は認められなかった。一方、陽性対照では明らかな染色体異常細胞の増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下における検体による染色体異常誘発性は、本来の染色体構造異常誘発事象を示すものではないと推測される。

1 回目の実験 (ランダムに分布する染色体異常細胞のみ)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間	標 本作 製時 間	観 察 細 胞 数	S9mix の 有無 (+/-)	染色体異常を有する細胞数			数的 異常	判定 ²⁾
						交換	合計 ¹⁾			
							+ギャ ップ	-ギャ ップ		
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	-	0 (0.0)	6 (3.0)	4 (2.0)	2 (0.01)	-
検体	250	4	22	200	-					
	500	4	22	200	-					
	1000	4	22	200	-					
陽性対照 (EMS)	350	4	22	100	-	11 (\uparrow 11.0)	13 (\uparrow 13.0)	11 (\uparrow 11.0)	0 (0)	+
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	+	0 (0.0)	16 (8.0)	7 (3.5)	7 (0.04)	-
検体	250	4	22	200	+					
	500	4	22	200	+					
	1000	4	22	200	+					
陽性対照 (CPP)	0.5	4	22	100	+	12 (\uparrow 12.0)	25 (\uparrow 25.0)	21 (\uparrow 21.0)	0 (0)	+

Bonferroni-Holm の補正を行った Fisher の直接確率検定 (片側) \uparrow : $P \leq 0.01$ 、有意水準:
 $P \leq 0.05$

1) ギャップを含む場合 (+ギャップ) と含まない場合 (-ギャップ)

2) - : 陰性 / + : 陽性

() 内は異常を示した細胞の割合 (%)

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EMS : Ethyl methanesulfonate

CPP : Cyclophosphamide

1 回目の実験 (特異的異常細胞を含む染色体異常細胞)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処 理 時 間	標 本 作 製 時 間	観 察 細 胞 数	S9mix の 有 無 (+/-)	染色体異常を有する細胞数			判定 ²⁾
						交 換	合計 ¹⁾		
							+ギャップ	-ギャップ	
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	-	0 (0.0)	6 (3.0)	4 (2.0)	-
検体	250	4	22	200	-				
	500	4	22	200	-				
	1000	4	22	200	-				
陽性対照 (EMS)	350	4	22	100	-	11 (\uparrow 11.0)	13 (\uparrow 13.0)	11 (\uparrow 11.0)	+
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	+	0 (0.0)	17 (8.5)	8 (4.0)	-
検体	250	4	22	200	+				
	500	4	22	200	+				
	1000	4	22	200	+				
陽性対照 (CPP)	0.5	4	22	100	+	12 (\uparrow 12.0)	25 (\uparrow 25.0)	21 (\uparrow 21.0)	+

Bonferroni-Holm の補正を行った Fisher の直接確率検定 (片側) \uparrow : $P \leq 0.05$ 、 \uparrow : $P \leq 0.01$

1) ギャップを含む場合 (+ギャップ) と含まない場合 (-ギャップ)

2) - : 陰性 / + : 陽性

() 内は異常を示した細胞の割合 (%)

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EMS : Ethyl methanesulfonate

CPP : Cyclophosphamide

2 回目の実験 (ランダムに分布する染色体異常細胞のみ)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間	標 本作 製時 間	観 察細 胞数	S9mix の 有無 (+/-)	染色体異常を有する細胞数			数的 異常	判定 ²⁾
						交 換	合計 ¹⁾			
							+ギャップ	-ギャップ		
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	-	0 (0.0)	7 (3.5)	3 (1.5)	2 (0.01)	-
検体	250	4	22	200	-					
	500	4	22	200	-					
	750	4	22	50	-					
陽性対照 (EMS)	350	4	22	100	-	8 (\uparrow 8.0)	16 (\uparrow 16.0)	14 (\uparrow 14.0)	0 (0)	

2 回目の実験 (特異的異常細胞を含む染色体異常細胞)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間	標 本作 製時 間	観 察細 胞数	S9mix の 有無 (+/-)	染色体異常を有する細胞数			判定 ²⁾
						交 換	合計 ¹⁾		
							+ギャップ	-ギャップ	
溶媒対照 (DMSO)	—	4	22	200	-	0 (0.0)	7 (3.5)	3 (1.5)	-
検体	250	4	22	200	-				
	500	4	22	200	-				
	750	4	22	50	-				
陽性対照 (EMS)	350	4	22	100	-	8 (\uparrow 8.0)	16 (\uparrow 16.0)	14 (\uparrow 14.0)	+

Bonferroni-Holm の補正を行った Fisher の直接確率検定 (片側) \uparrow : $P \leq 0.05$, \uparrow : $P \leq 0.01$

1) ギャップを含む場合 (+ギャップ) と含まない場合 (-ギャップ)

2) - : 陰性 / + : 陽性

() 内は異常を示した細胞の割合 (%)

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EMS : Ethyl methanesulfonate

3 回目の実験 (ランダムに分布する染色体異常細胞のみ)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間	標 本作 製時 間	観 察 細 胞 数	S9mix の 有無 (+/-)	染色体異常を有する細胞数			判定 ²⁾
						交換	合計 ¹⁾		
							+ギャップ	-ギャップ	
溶媒対照 (DMSO)	—	18	36	200	-	2 (1.0)	20 (10.0)	6 (3.0)	-
検体	62.5	18	36	200	-				
	125	18	36	200	-				
	250	18	36	200	-				
陽性対照 (EMS)	350	18	36	100	-	14 (\uparrow 14.0)	20 (\uparrow 20.0)	19 (\uparrow 19.0)	+
溶媒対照 (DMSO)	—	18	46	200	-	1 (0.5)	29 (14.5)	8 (4.0)	-
検体	500	18	46	200	-				
陽性対照 (EMS)	350	18	46	100	-	18 (\uparrow 18.0)	27 (\uparrow 27.0)	25 (\uparrow 25.0)	+
溶媒対照 (DMSO)	—	4	32	200	+	5 (2.5)	15 (7.5)	7 (3.5)	-
検体	250	4	32	200	+				
	500	4	32	200	+				
	750	4	32	200	+				
陽性対照 (CPP)	0.5	4	32	100	+	8 (8.0)	19 (\uparrow 19.0)	16 (\uparrow 16.0)	+

Bonferroni-Holm の補正を行った Fisher の直接確率検定 (片側) \uparrow : $P \leq 0.05$, \uparrow : $P \leq 0.01$

1) ギャップを含む場合 (+ギャップ) と含まない場合 (-ギャップ)

2) - : 陰性 / + : 陽性

() 内は異常を示した細胞の割合 (%)

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EMS : Ethyl methanesulfonate

CPP : Cyclophosphamide

3 回目の実験 (特異的異常細胞を含む染色体異常細胞)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間	標 本作 製時 間	観 察 細 胞 数	S9mix の 有無 (+/-)	染色体異常を有する細胞数			判定 ²⁾
						交換	合計 ¹⁾		
							+ギャップ	-ギャップ	
溶媒対照 (DMSO)	—	18	36	200	-	2 (1.0)	21 (10.5)	6 (3.0)	-
検体	62.5	18	36	200	-				
	125	18	36	200	-				
	250	18	36	200	-				
陽性対照 (EMS)	350	18	36	100	-				
溶媒対照 (DMSO)	—	18	46	200	-	1 (0.5)	31 (15.5)	9 (4.5)	-
検体	500	18	46	200	-				
陽性対照 (EMS)	350	18	46	100	-	18 (\uparrow 18.0)	27 (\uparrow 27.0)	25 (\uparrow 25.0)	+
溶媒対照 (DMSO)	—	4	32	200	+	5 (2.5)	15 (7.5)	7 (3.5)	-
検体	250	4	32	200	+				
	500	4	32	200	+				
	750	4	32	200	+				
陽性対照 (CPP)	0.5	4	32	100	+	8 (8.0)	19 (\uparrow 19.0)	16 (\uparrow 16.0)	+

Bonferroni-Holm の補正を行った Fisher の直接確率検定 (片側) \uparrow : $P \leq 0.05$, \uparrow : $P \leq 0.01$

1) ギャップを含む場合 (+ギャップ) と含まない場合 (-ギャップ)

2) - : 陰性 / + : 陽性

() 内は異常を示した細胞の割合 (%)

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EMS : Ethyl methanesulfonate

CPP : Cyclophosphamide

6)

のマウスを用いた小核試験

(資料 No. 毒 B8)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2001 年

検体純度:

供試動物: NMRI系マウス、約5~8週齢、平均体重 約28 g、1群雄各5匹

試験方法: 検体を 0.5%CMC 水溶液に懸濁し、200、400 および 800 mg/kg/体重の用量で、単回腹腔内投与した。なお、溶媒対照群には 0.5%CMC 水溶液を同様に投与した。

800 mg/kg 群および溶媒対照群については、投与 24 および 48 時間後に動物を屠殺し、200 および 400 mg/kg 群ならびに陽性対照群については、24 時間後に屠殺した。各動物から大腿骨の骨髓を採取してスライドグラス上に風乾固定後、エオジンとメチレンブルーの溶液およびギムザ液で染色し、骨髓標本を作製した。陽性対照には Cyclophosphamide (CPP) を 20 mg/kg 体重、Vincristine (VCR: 硫酸ビンクリスチン) を、0.15 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した。原則として 1 動物あたり 2000 個の多染性赤血球について、小核の有無を検査するとともに以下の項目を記録した。

- ・多染性赤血球の数
- ・小核を有する多染性赤血球の数
- ・正染性赤血球の数
- ・小核を有する正染性赤血球の数
- ・正染性赤血球に対する多染性赤血球の比率
- ・「小さい小核」($d < D/4$) および「大きい小核」($d \geq D/4$) の数
[d: 小核の直径、D: 細胞の直径]

用量設定根拠:

判定基準: 小核を有する多染性赤血球の数が用量に相関した有意な増加を示し、かつ、小核を有する細胞の出現頻度が同時陰性対照群およびその背景データの範囲を超えて増加した場合を陽性とした。

試験結果: 骨髓標本の観察結果を次頁以降の表 (総括表および結果表) に示した。

検体群では、いずれの投与群においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。陽性対

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

照群である CPP および VCR 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。

投与後の一般状態観察では、溶媒対照群もしくは陽性対照群には毒性徴候は認められなかった。検体投与群では毒性徴候が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下で骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

総括表 1.

群	採取時間 (時間)	投与量 (mg/kg)	A	B	C	D
溶媒対照	24	—	10000	2135	2.2	1.4
検体		200				
		400				
		800				
陽性対照 C		20	10000	3079	↑15.6	1.3
陽性対照 V		0.15	10000	4626	↑53.9	1.9
溶媒対照	48	—	10000	2122	1.2	0.5
検体		800				

Wilcoxon 検定 (片側) ↑: $P \leq 0.01$ 、有意水準: $P \leq 0.05$

溶媒対照: 0.5% CMC 水溶液

陽性対照 C: Cyclophosphamide

陽性対照 V: Vincristine

A: 検査した多染性赤血球数

B: 検査した多染性赤血球 10000 個あたりの正染性赤血球数

C: 多染性赤血球 1000 個あたりの小核を有するもの (平均)

D: 正染性赤血球 1000 個あたりの小核を有するもの (平均)

総括表 2.

群	採取時間 (時間)	投与量 (mg/kg)	A	B	C
溶媒対照	24	—	10000	2.2	0.0
検体		200			
		400			
		800			
陽性対照 C		20	10000	↑15.6	0.0
陽性対照 V		0.15	10000	↑44.5	↑9.4
溶媒対照	48	—	10000	1.2	0.0
検体		800			

Wilcoxon 検定 (片側) ↑: $P \leq 0.01$ 、有意水準: $P \leq 0.05$

溶媒対照: 0.5% CMC 水溶液

陽性対照 C: Cyclophosphamide

陽性対照 V: Vincristine

A: 検査した多染性赤血球数

B: 多染性赤血球 1000 個あたりの直径が核の 1/4 未満の小核を有するもの (平均)

C: 多染性赤血球 1000 個あたりの直径が核の 1/4 以上の小核を有するもの (平均)

結果表

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	MNPCE% (平均値±SD)	PCE / (PCE+NCE) % (平均値±SD)
24	溶媒対照 (0.5% CMC 水溶液)	0	雄	5	0.22±0.09	82.6±4.0
	検体	200	雄	5		
		400	雄	5		
		800	雄	5		
	陽性対照 (CPP)	20	雄	5	↑ 1.56±0.33	77.1±7.9
	陽性対照 (VCR)	0.15	雄	5	↑ 5.39±1.37	68.8±6.0
48	溶媒対照 (0.5% CMC 水溶液)	0	雄	5	0.12±0.10	82.6±3.35
	検体	800	雄	5		

Wilcoxon 検定 (片側) ↑: $P \leq 0.01$ 、有意水準: $P \leq 0.05$

CPP: Cyclophosphamide

VCR: Vincristine

PCE: 多染性赤血球数

NCE: 正染性赤血球数

MNPCE: 多染性赤血球数 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

7)

のマウスを用いた小核試験
(資料 No. 毒 B9)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2003 年

検体純度:

供試動物: NMRI系マウス、約5~8週齢、平均体重 約27 g、1群雄各5匹

試験方法: 検体を DMSO に溶解し、75、150 および 300 mg/kg/体重の用量で、単回腹腔内投与した。なお、溶媒対照群には DMSO を同様に投与した。

300 mg/kg 群および溶媒対照群については、投与 24 および 48 時間後に動物を屠殺し、150 および 75 mg/kg 群ならびに陽性対照群については、24 時間後に屠殺した。各動物から大腿骨の骨髓を採取してスライドグラス上に風乾固定後、エオジンとメチレンブルーの溶液およびギムザ液で染色し、骨髓標本を作製した。陽性対照には Cyclophosphamide (CPP) を 20 mg/kg 体重、Vincristine (VCR: 硫酸ビンクリスチン) を、0.15 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した。原則として 1 動物あたり 2000 個の多染性赤血球について、小核の有無を検査するとともに以下の項目を記録した。

- ・多染性赤血球の数
- ・小核を有する多染性赤血球の数
- ・正染性赤血球の数
- ・小核を有する正染性赤血球の数
- ・正染性赤血球に対する多染性赤血球の比率
- ・「小さい小核」($d < D/4$) および「大きい小核」($d \geq D/4$) の数

[d: 小核の直径、D: 細胞の直径]

用量設定根拠:

判定基準: 小核を有する多染性赤血球の数が用量に相関した有意な増加を示し、かつ、小核を有する細胞の出現頻度が同時溶媒対照群およびその背景データの範囲を超えて増加した場合を陽性とした。

試験結果: 骨髓標本の観察結果を次頁以降の表 (総括表および結果表) に示した。

検体では、いずれの投与群においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。陽性対照群である CPP および VCR では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。
投与後の一般状態観察では、溶媒対照群もしくは陽性対照群については、毒性徴候は認められなかった。検体投与群では、うずくまり姿勢が認められたのみであった。

以上の結果より、検体は本試験条件下で骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

総括表

群	採取時間 (時間)	投与量 (mg/kg)	A	B	C	D
溶媒対照	24	—	10000	4271	1.6	0.9
検体		75				
		150				
		300				
陽性対照 C		20	10000	3951	↑17.8	0.5
陽性対照 V		0.15	10000	4611	↑51.7	1.5
溶媒対照	48	—	10000	3176	1.7	0.3
検体		300				

Wilcoxon 検定 (片側) ↑: $P \leq 0.01$ 、有意水準: $P \leq 0.05$

溶媒対照: DMSO

陽性対照 C: Cyclophosphamide

陽性対照 V: Vincristine

A: 検査した多染性赤血球数

B: 検査した多染性赤血球あたりの正染性赤血球数

C: 多染性赤血球 1000 個あたりの小核を有するもの (平均)

D: 正染性赤血球 1000 個あたりの小核を有するもの (平均)

結果表

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	MNPCE% (平均値±SD)	PCE / (PCE + NCE) % (平均値±SD)
24	溶媒対照 (DMSO)	0	雄	5	0.16±0.02	70.5±5.9
	検体	75	雄	5		
		150	雄	5		
		300	雄	5		
	陽性対照 (CPP)	20	雄	5	↑ 1.78±0.34	72.2±6.7
	陽性対照 (VCR)	0.15	雄	5	↑ 5.17±1.35	69.2±7.5
48	溶媒対照 (DMSO)	0	雄	5	0.17±0.16	76.1±4.8
	検体	300	雄	5		

Wilcoxon 検定 (片側) ↑: $P \leq 0.01$ 、有意水準: $P \leq 0.05$

CPP: Cyclophosphamide

VCR: Vincristine

PCE: 多染性赤血球数

NCE: 正染性赤血球数

MNPCE: 多染性血球数 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

- 8) 1のチャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験 (HPRT座位試験)

(資料No.毒B10)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2003年(2004年改訂)

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣細胞由来の培養細胞(CHO)を用い、代謝活性化および非活性化の条件下でヒポキサンチン-グアニンホスホリボシル転移酵素(HPRT)座位に遺伝子突然変異を誘発するか否か検定した。

検体はDMSOに溶解して用いた。

したがっ

て、突然変異試験は、1回目の実験で-S9では、125、250、500、1000、1500、2000 µg/mLの6用量を、+S9では、250、500、1000、1500、2000、2500 µg/mLの6用量を用いた。2回目の実験は-S9では、250、500、1000、1500、2000、2500 µg/mLの6用量を、+S9では500、1000、1500、2000、2500、3000 µg/mLの6用量を用いた。

検体処理時間は4時間とし、その後約1週間の発現時間をおいた。発現時間終了後、選択培地(グルタミンと牛胎児血清を加え、ヒポキサンチンを除いたHam's F12培地に6-チオグアニンを最終濃度10 µg/mLで添加した培地)中に再播種し、約1週間培養してコロニーを形成させた。検体処理後の最初の継代時および発現期間後の再播種時に細胞毒性検索のための細胞毒性試験を実施した。

試験結果: 結果を次頁以降の表に示した。-S9では1000~1500 µg/mL以上、+S9では2500 µg/mL(実験1)および1500 µg/mL以上(実験2)でコロニー形成率の抑制が認められた。両実験ともS-9 mixの有無にかかわらず、突然変異頻度の増加は認められず、同時陰性対照値の範囲に近く、背景データの範囲内であった。一方、陽性対照として用いたEthylmethanesulfonate(EMS)、3-Methylcholanthrene(MCA)では明らかな突然変異頻度の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、本試験条件下で遺伝子突然変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

表1 試験結果 (代謝活性化系非存在下: 1回目の実験)

濃度 μg/mL	S-9の 有無	継代1回目 の細胞密度 (×10 ³ 個/mL)		細胞毒性試験1*		細胞毒性試験2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	-	A	157.7	72.3	100.0	82.9	100.0	0, 0, 0, 0, 0, 1	1.12	1.33
		B	182.8					0, 0, 0, 0, 1, 2		
125	-	A	158.8							
		B	204.8							
250	-	A	158.6							
		B	214.8							
500	-	A	161.7							
		B	226.0							
1000	-	A	164.8							
		B	192.2							
1500	-	A	153.2							
		B	174.8							
2000	-	A	144.5							
		B	174.3							
300 EMS	-	A	110.7							
		B	162.0							

- a: 選択培地中に300000細胞/フラスコで播種し、選択培地中で7日間培養した後のコロニー数
 b: 細胞10⁶個あたりの頻度
 c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率(“細胞毒性試験2”)に基づく補正を行った。
 *: 細胞毒性試験1: 暴露終了時、細胞毒性試験2: 発現期間終了時
 EMS: Ethylmethanesulfonate

表2 試験結果 (代謝活性化系存在下: 1回目の実験)

濃度 μg/mL	S-9の 有無 ¹⁾	継代1回目 の細胞密度 (×10 ³ 個/mL)		細胞毒性試験1*		細胞毒性試験2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	+	A	233.6	84.0	100.0	80.9	100.0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0.56	0.69
		B	246.1					0, 0, 0, 0, 1, 1		
250	+	A	232.5							
		B	246.8							
500	+	A	223.8							
		B	242.3							
1000	+	A	231.8							
		B	230.6							
1500	+	A	239.0							
		B	241.8							
2000	+	A	236.1							
		B	230.3							
2500	+	A	213.1							
		B	222.1							
10 MCA	+	A	198.6							
		B	204.1							

- a: 選択培地中に300000細胞/フラスコで播種し、選択培地中で7日間培養した後のコロニー数
 b: 細胞10⁶個あたりの頻度
 c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率(“細胞毒性試験2”)に基づく補正を行った。
 *: 細胞毒性試験1: 暴露終了時、細胞毒性試験2: 発現期間終了時
 1): S-9 mixの組成: S9: 補酵素=3:7
 MCA: 3-Methylcholanthrene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

表 3 試験結果 (代謝活性化系非存在下: 2 回目の実験)

濃度 μg/mL	S-9 の 有無	継代 1 回目 の細胞密度 (×10 ³ 個/mL)		細胞毒性試験 1*		細胞毒性試験 2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	-	A	226.0	88.3	100.0	88.8	100.0	0, 1, 1, 1, 3, 4	3.62	4.10
		B	251.9					0, 0, 0, 1, 1, 1		
250	-	A	223.7							
		B	255.0							
500	-	A	231.9							
		B	256.3							
1000	-	A	239.2							
		B	249.6							
1500	-	A	201.7							
		B	226.3							
2000	-	A	141.2							
		B	183.5							
2500	-	A	60.5							
		B	89.9							
300 EMS	-	A	192.4							
		B	238.0							

- a: 選択培地中に 300000 細胞/フラスコで播種し、選択培地中で 7 日間培養した後のコロニー数
 b: 細胞 10⁶ 個あたりの頻度
 c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率 ("細胞毒性試験 2") に基づく補正を行った。
 *: 細胞毒性試験 1: 暴露終了時、細胞毒性試験 2: 発現期間終了時
 EMS: Ethylmethanesulfonate

表 4. 試験結果 (代謝活性化系存在下: 2 回目の実験)

濃度 μg/mL	S-9 の 有無 ¹⁾	継代 1 回目 の細胞密度 (×10 ³ 個/mL)		細胞毒性試験 1*		細胞毒性試験 2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	+	A	267.8	91.0	100.0	84.8	100.0	0, 0, 0, 0, 0, 0	1.67	2.01
		B	296.1					0, 0, 0, 1, 2, 3		
500	+	A	282.9							
		B	315.3							
1000	+	A	278.1							
		B	319.3							
1500	+	A	316.9							
		B	305.8							
2000	+	A	272.2							
		B	308.3							
2500	+	A	156.4							
		B	218.3							
3000	+	A	53.4							
		B	77.7							
10 MCA	+	A	346.4							
		B	351.6							

- a: 選択培地中に 300000 細胞/フラスコで播種し、選択培地中で 7 日間培養した後のコロニー数
 b: 細胞 10⁶ 個あたりの頻度
 c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率に基づく補正 ("細胞毒性試験 2") を行った。
 *: 細胞毒性試験 1: 暴露終了時、細胞毒性試験 2: 発現期間終了時
 -: 強い細胞毒性のため、以後の培養が継続できなかった。
 1): S-9 mix の組成: S9: 補酵素=3:7
 MCA: 3-Methylcholanthrene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

- 9) のチャイニーズハムスターの卵巣 (CHO)
細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験 (HPRT 座位試験)

(資料 No. 毒 B11)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2003 年

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣細胞由来の培養細胞 (CHO) を用い、代謝活性化および非活性化の条件下でヒポキサンチン-グアニンホスホリボシル転移酵素 (HPRT) 座位に遺伝子突然変異を誘発するか否か検定した。
検体はDMSOに溶解して用いた。

したがって、突然変異試験は、1回目の実験で-S9では、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の6用量を、+S9では、62.5、125.0、250.0、500.0、1000.0、1500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の6用量を用いた。2回目の実験は-S9では、9.38、18.75、37.5、75.0、150.0、300.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の6用量を、+S9では125.0、250.0、500.0、1000.0、1250.0、1500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の6用量を用いた。

検体処理時間は4時間とし、その後約1週間の発現時間をおいた。発現時間終了後、選択培地 (グルタミンと牛胎児血清を加え、ヒポキサンチンを除いたHam's F12培地に6-チオグアニンを最終濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加した培地) 中に再播種し、約1週間培養してコロニーを形成させた。検体処理後の最初の継代時および発現時間後の再播種時に細胞毒性検索のための細胞毒性試験を実施した。なお、結果が陰性であったため、統計学的評価は行なわなかった。

試験結果: 結果を次頁以降の表に示した。-S9 では 150~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、+S9 では 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上でコロニー形成率の抑制が認められた。両試験とも S-9 mix の有無にかかわらず、突然変異頻度の増加は認められず、同時陰性対照値の範囲に近く、背景データの範囲内であった。一方、陽性対照として用いた Ethylmethanesulfonate (EMS)、3-Methylcholanthrene (MCA) では明らかな突然変異頻度の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化系の有無にかかわらず、本試験条件下で遺伝子突然変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

表 1 試験結果 (代謝活性化系非存在下: 1 回目の実験)

濃度 µg/mL	S-9 の 有無	継代 1 回目 の細胞密度 ($\times 10^3$ 個/mL)		細胞毒性試験 1*		細胞毒性試験 2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	-	A	301.8	99.7	100.0	96.3	100.0	0, 0, 0, 0, 0, 1	1.95	2.03
		B	299.6							
12.5	-	A	304.1							
		B	300.8							
25.0	-	A	300.7							
		B	291.4							
50.0	-	A	277.8							
		B	275.3							
100.0	-	A	232.5							
		B	237.0							
200.0	-	A	158.0							
		B	144.4							
400.0	-	A	78.3							
		B	94.0							
300.0 EMS	-	A	280.4							
		B	262.8							

- a: 選択培地中に 300000 細胞/プラスチックで播種し、選択培地中で 7 日間培養した後のコロニー数
 b: 細胞 10^6 個あたりの頻度
 c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率 ("細胞毒性試験 2") に基づく補正を行った。
 *: 細胞毒性試験 1: 暴露終了時、細胞毒性試験 2: 発現期間終了時
 EMS: Ethylmethanesulfonate

表 2 試験結果 (代謝活性化系存在下: 1 回目の実験)

濃度 µg/mL	S-9 の 有無 ¹⁾	継代 1 回目 の細胞密度 ($\times 10^3$ 個/mL)		細胞毒性試験 1*		細胞毒性試験 2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	+	A	333.1	103.2	100.0	92.7	100.0	0, 0, 0, 0, 1, 1	1.39	1.50
		B	330.2							
62.5	+	A	359.9							
		B	361.9							
125.0	+	A	288.1							
		B	350.0							
250.0	+	A	318.5							
		B	340.2							
500.0	+	A	312.6							
		B	333.8							
1000.0	+	A	192.9							
		B	204.3							
1500.0	+	A	129.6							
		B	125.6							
10.0 MCA	+	A	309.4							
		B	309.9							

- a: 選択培地中に 300000 細胞/プラスチックで播種し、選択培地中で 7 日間培養した後のコロニー数
 b: 細胞 10^6 個あたりの頻度
 c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率 ("細胞毒性試験 2") に基づく補正を行った。
 *: 細胞毒性試験 1: 暴露終了時、細胞毒性試験 2: 発現期間終了時
 1): S9 mix の組成; S9: 補酵素=3:7
 MCA: 3-Methylcholanthrene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

表3 試験結果 (代謝活性化系非存在下: 2回目の実験)

濃度 µg/mL	S-9の 有無	継代1回目 の細胞密度 ($\times 10^3$ 個/mL)		細胞毒性試験1*		細胞毒性試験2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	-	A	265.3	97.1	100.0	91.7	100.0	1, 1, 1, 2, 3, 3	3.34	3.48
		B	239.9					0, 0, 0, 0, 0, 1		
9.38	-	A	253.7							
		B	259.1							
18.75	-	A	246.1							
		B	241.3							
37.5	-	A	241.1							
		B	225.0							
75.0	-	A	223.5							
		B	218.5							
150.0	-	A	157.7							
		B	158.6							
300.0	-	A	108.2							
		B	101.2							
300.0 EMS	-	A	204.1							
		B	205.1							

- a: 選択培地中に300000細胞/フラスコで播種し、選択培地中で7日間培養した後のコロニー数
 b: 細胞 10^6 個あたりの頻度
 c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率(“細胞毒性試験2”)に基づく補正を行った。
 *: 細胞毒性試験1: 暴露終了時、細胞毒性試験2: 発現期間終了時
 EMS: Ethylmethanesulfonate

表4. 試験結果 (代謝活性化系存在下: 2回目の実験)

濃度 µg/mL	S-9の 有無 ¹⁾	継代1回目 の細胞密度 ($\times 10^3$ 個/mL)		細胞毒性試験1*		細胞毒性試験2*		突然変異試験		
				コロニー形成率 (%)		コロニー形成率 (%)		変異コロニー数 ^a	変異頻度 ^b	
				絶対値	相対値	絶対値	相対値		補正前	補正後 ^c
溶媒対照 (DMSO)	+	A	237.8	99.8	100.0	95.3	100.0	0, 0, 0, 1, 1, 1	2.78	2.96
		B	253.4					0, 0, 1, 1, 2, 3		
125.0	+	A	296.1							
		B	274.4							
250.0	+	A	258.1							
		B	273.9							
500.0	+	A	270.3							
		B	261.0							
1000.0	+	A	198.8							
		B	196.0							
1250.0	+	A	167.7							
		B	152.0							
1500.0	+	A	142.6							
		B	133.5							
10.0 MCA	+	A	227.1							
		B	229.2							

- a: 選択培地中に300000細胞/フラスコで播種し、選択培地中で7日間培養した後のコロニー数
 b: 細胞 10^6 個あたりの頻度
 c: 発現期間の終わりの絶対的コロニー形成率(“細胞毒性試験2”)に基づく補正を行った。
 *: 細胞毒性試験1: 暴露終了時、細胞毒性試験2: 発現期間終了時
 1): S9 mixの組成: S9: 補酵素=3:7
 MCA: 3-Methylcholanthrene