

## 8. 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

ラットにおける繁殖試験

(資料 No. 8-1)

試験機関 : Istituto di Ricerche Biomediche(伊)

報告書作成年 : 1999年[GLP]

検体純度 :

試験動物 : Cr1:CD(SD) BR系ラット、1群雌雄各28匹、投与開始時雄8週齢、雌11週齢

投与期間 : P世代 : 交配期間の70日前から哺育21日まで (1997年9月10日 ~

F1世代 : 離乳から屠殺日 (F2世代の離乳) まで 1998年5月27日)

投与方法 : 検体を60、1000及び5000ppmの濃度で飼料に混入し、自由に摂取させた。

投与量設定根拠 :

方法及び試験項目 : 概要を表1にまとめた。

### 1. 親動物

一般状態及び死亡率 ; 全動物の一般状態及び生死を毎日観察した。

交配及び妊娠の確認 ; 雌の発情周期を膣スメアの検査で確かめ、雌雄1:1で同居させて交配した。翌日膣スメア中の精子により交尾を確認した。精子が確認された日を妊娠0日とした。

体重 ; 雄は投与開始日 (投与0日) の前日から屠殺まで1週間に1回体重を測定した。

雌は投与開始日 (投与0日) の前日から交配前及び交配期間中を通して1週間に1回、妊娠期間中は妊娠0、7、14、17及び21日、哺育期間中は哺育0、7、14及び21日に体重を測定した。膣スメアに精子が認められずに妊娠した雌の妊娠期間中の体重は平均体重の計算から除外した。

摂餌量及び食餌効率 ; 交配前期間中は雌雄とも1週間に1回、妊娠7、14及び21日、哺育7及び14日に摂餌量を測定した。膣スメアに精子が認められずに妊娠した雌の妊娠期間中の摂餌量は平均摂餌量の計算から除外した。

雌雄とも交配前の期間中1週間毎の食餌効率を計算した

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

・雌雄同居から交尾成立までの日数

$$\cdot \text{交尾率} (\%) = \frac{\text{スマア精子陽性で妊娠した雌} + \text{スマア精子陰性で妊娠した雌}}{\text{同居動物数}} \times 100$$

$$\cdot \text{妊娠率} (\%) = \frac{\text{妊娠が確認された雌}}{\text{スマア精子陽性で妊娠した雌} + \text{スマア精子陰性で妊娠した雌}} \times 100$$

$$\cdot \text{出産率} (\%) = \frac{\text{生存児を出産した雌}}{\text{妊娠した雌}} \times 100$$

・妊娠期間：膣スマアに精子が認められてから分娩開始までの期間

$$\cdot \text{着床後胚損失率} (\%) = \frac{\text{着床痕数} - \text{0日の出産生児数}}{\text{着床痕数}} \times 100$$

$$\cdot \text{出生率} (\%) = \frac{\text{出生児数}}{\text{着床痕数}} \times 100$$

$$\cdot \text{4日間生存率} (\%) = \frac{\text{出生後4日目の生存児数}}{\text{出産児数}} \times 100$$

$$\cdot \text{離乳率} (\%) = \frac{\text{生存離乳児数}}{\text{出生後4日目の生存児数}} \times 100$$

肉眼的病理検査；雄及び分娩した雌は哺育期間終了後に、スマアに精子が認められず妊娠も認められない雌は交配期間終了後25日に、スマアに精子が認められて分娩をしなかった雌は妊娠したと仮定した場合の妊娠25日に屠殺した。肉眼的病理検査を行い、着床痕を数えた。変化の認められた臓器は必要により病理組織学的検査に供した。

臓器重量；以下の臓器について重量を測定した。

雄：精巣、精巣上体（全体及び尾部）、精嚢（凝固腺及び内容液を含む）、前立腺

雌：子宮（卵管及び子宮頸を含む）、卵巣

雌雄：脳、下垂体、肝臓、腎臓、副腎、脾臓

病理組織学的検査；対照群と5000ppm投与群の以下の臓器及び肉眼的病変部について病理標本を作製し鏡検した。

雄：精巣（右）、精巣上体（右）、精嚢、凝固腺及び前立腺、下垂体及び副腎

雌：卵巣、子宮、卵管、子宮頸、膣、下垂体及び副腎

精液検査；精巣及び精巣上体から精液を採取し、均質化抵抗精子細胞数及び尾部精巣上体に蓄えられた精子数を数えた。さらに、尾部精巣上体から採取した精液は、精子の運動能及び形態についても測定した。

## 2. F1世代

出産0日目の観察；出生時の外表異常、出産生存児及び死産児の数、0日における性別

死亡及び同腹児数；生存出生後の死亡について毎日確認し、死亡した児動物の外表及

び内部の検査をして可能な限り死因を確認した。4日目に同腹児を8匹に調整した。

体 重；出生児の個体別体重を、哺育0、4（選別前）、8、12及び21日ならびに膣開口または亀頭-包皮腺分離時に測定した。

出生児に関する指標；

- ・形態的及び身体的発育の平均時間  
(皮膚毛生、切歯萌出、眼瞼開裂、耳介開展、平面立ち直り反射、耳介反射、角膜反射、瞳孔反射、牽引反射、把握反射)

- ・Chimneyテスト

- ・肛門-生殖突起間指数 (%) =  $\frac{\text{肛門-生殖突起間距離}}{\text{体 重}} \times 100$

出生児の剖検；離乳時に無作為に選抜した雌雄各1匹を残して他は剖検した。肉眼的に異常の認められた組織は必要に応じて病理組織学的検査を行った。さらに同腹児の少なくとも雌雄1匹について、脳、脾臓及び胸腺の重量を測定した。

離乳後生存させたF1世代は1週間に1度体重を測定し、一般状態及び生死を毎日観察した。また亀頭-包皮腺分離（25日目以降毎日）及び膣開口（30日以降毎日）について観察した。12週齢以降に交配し以後はP世代と同様の日程で検査を実施した。

### 3. F2世代

出産0日目の観察；F1世代と同様に行った。

死亡及び同腹児数；F1世代と同様に行った。4日の同腹児調整は行わなかった。

体 重；出生児の個体別体重を、哺育0、4（選別前）、8、12及び21日に測定した。

出生児の剖検；離乳時（哺育21日）に出生児はすべて屠殺し、親動物とともに剖検した。肉眼的に異常の認められた組織は病理組織学的検査を行った。さらに同腹児の雌雄各1匹について、脳、脾臓及び胸腺の重量を測定した。

表1 試験実施概要

世代	期間（週間）	作業手順	試験項目
P	生育（10週間）		一般状態及び死亡の観察、体重・餌を週1回測定、摂餌効率の算出
	交配（2週以内）	雌雄1:1で交配。交配はスメア中の精子で確認（妊娠0日）	同居から交配成立までの日数 交尾率
	妊娠（3週間）		妊娠0、7、14、17及び21日に体重測定（雄は1週間に1回） 妊娠7、14及び21日に摂餌量測定
	出産		出産状況の観察、妊娠期間、出産率、妊娠率、新生児数、死産児数、外表面異常、性別検査
	哺育（3週間）	出産後4日目に同腹児数を8匹に調整	出生児の一般状態及び死亡の観察 4日生存率 出生児の個体別体重を、哺育0、4（淘汰前）、8、12及び21日、ならびに臍開口または亀頭-包皮腺分離時に測定 F1出生児について、形態的及び身体的発育指標の測定 途中死亡、4日目屠殺の新生児について剖検
	離乳	継代用のF1を各群の各腹から雌雄1匹ずつ無作為に選抜	離乳率 P動物の剖検、臍器重量、母動物の対照群と最高用量群について病理組織学的検査、雄で精子検査 継代用以外の児動物の剖検、臍器重量
	生育（9週以上）		(P世代に準ずる)
F1	交配（2週以内）	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	妊娠（3週間）		(P世代に準ずる)
	出産		(P世代に準ずる) F2出生児について、肛門-生殖器指数の測定
	哺育（3週間）		(P世代に準ずる)
	離乳		(F1世代に準ずる)
			離乳時に出生児をすべて屠殺し、親動物とともに剖検した。異常の認められる組織は病理組織学的検査を行った。
F2			

結・果：表 2に示した。

### 親動物

#### 一般状態及び死亡：

P 動物：5000ppm投与群の雌 1例で、難産が妊娠22日に観察され翌日2匹出産後に死亡した。剖検の結果、肺に白変部位等の軽度の病巣が認められ、子宮に胎児 11匹の残留が認められた。難産は1例のみに認められたことから、検体に起因する変化ではないと考えられた。

また、5000ppm投与群の雌 1例で、投与 2週目から計画屠殺日まで頸に腫脹が認められた。これは、自然発生的で偶発的な所見と考えられた。

F1動物：毒性徴候及び死亡は認められなかった。

#### 体 重：

P 動物：交配前の期間、5000ppm投与群の雌雄において、対照群と比較して体重の低値傾向が認められた。統計学的に有意な低値が最初に認められたのは、雌雄とも3週目であった。統計学的に有意な体重の低値が、雄では7週目に再び認められ、また雌では5週目に再び認められ、その後、雌雄とも交配前期間の終了まで継続した。

交配後、5000ppm投与群の雄で屠殺（哺育21日）まで体重の低値が認められた。交配後の最終体重に統計学的有意差は認められなかつたが、交配後1, 3, 5, 6, 7, 8及び9週目に統計学的有意差が認められた。

妊娠及び哺育期間中、5000ppm投与群の雌で体重の低値が続いた。しかしながら、体重増加量は対照群と同等であったことから、体重に対して検体投与はこれらの期間影響を及ぼさなかつたと考えられた。

1000ppm投与群及び60ppm投与群に変化は認められなかつた。

F1動物：離乳から交配までの期間、5000ppm投与群で雌雄共に体重は有意に低かつた。1000ppm投与群の雄では有意な高値を示すことがあつた。

交配後の雄の体重は5000ppm投与群で屠殺まで低値を示したが、有意な変化ではなかつた。

妊娠及び哺育期間中では、5000ppm投与群でやや低い値を示し、妊娠21日には有意差が認められた。1000ppm投与群では哺育0日の体重は対照群と同等であったが、その後低値を示した。しかし、有意差は認められなかつた。

摂餌量：

P 動物：交配前の期間、5000及び1000ppm投与群で雌雄共に摂餌量の有意な減少が認められた。60ppm投与群の雌で、2週目のみに有意な減少が認められたが、期間を通して認められたものではなく、偶発的なものと考えられた。妊娠及び哺育期間中には、対照群と投与群の間に有意差は認められなかった。

F1動物：交配前の期間、5000ppm投与群で摂餌量が全体的に低かったが、有意差は認められなかった。妊娠期間では最後の1週間に5000ppm投与群で有意な減少が認められ、哺育期間の最初の1週間には5000及び1000ppm投与群で有意な減少が認められた。

食餌効率：

P 動物：5000ppm投与群の雌雄及び1000ppm投与群の雄で、食餌効率の有意な低下が認められた。

F1動物：5000及び1000ppm投与群の雄で食餌効率の有意な低下が認められたが、翌週には逆に有意な増加が認められたことから、生物学的に意義のある変化ではないと考えられた。それ以外に有意な変化は認められなかった。

検体摂取量：下表に、P及びF1世代の交配前期間中における検体摂取量 (mg/kg/day) を示す。

性 別	雄			雌		
	60	1000	5000	60	1000	5000
P 世代	3.90	63.8	328.3	5.15	84.4	459.6
F1世代	4.0	68.6	353.2	5.4	89.2	438.3

生 殖 能 力：P動物及びF1動物共に発情周期に対照群との差は認められず、交尾率、妊娠率、出産率、雌雄同居から交尾成立までの日数にも差は認められなかった。また、1腹当たりの着床数、出産仔数及び着床後胚損失率についても変化は認められなかった。

精 液 檢 查：P雄動物及びF1雄動物共に、精子数、精子の運動能及び精子の形態に検体投与の影響は認められなかった。

肉眼的病理検査：P動物では雌の1例で下顎部の腫瘍が認められ、組織学的検査の結果、歯牙腫と診断された。これはラットに自然発生的に起こる病変であり、検体投与に起因するものではないと考えられた。F1動物では検体投与に起因した変化は認められなかった。

臓器重量：

P 動物：5000ppm投与群の雄において肝臓の絶対重量及び相対重量（体重比）に用量相関性のある増加が認められたが、有意差が認められたのは相対重量のみであった。また脾臓の相対重量の有意な増加が認められた。雌では肝臓、腎臓及び脾臓の相対重量に有意な増加が認められた。

5000ppm投与群の生児を出産した雌において、卵巢の相対重量（対体重比）の増加が認められた。しかしながら、対照群の卵巢の相対重量において、生児を出産した雌の平均値が全生存雌の平均値と比較して低かったためであり、また病理組織学的検査において変化が認められなかった。従って、この卵巢相対重量の増加は検体投与に関連するものではないと考えられた。

F1動物：5000ppm投与群では、肝臓の絶対重量が雌で、肝臓の相対重量、脾臓の絶対及び相対重量が雌雄で有意に高かった。1000及び5000ppm投与群の雌で脳の絶対重量が有意に低かったが、屠殺時体重及び相対重量に有意差は認められなかった。

病理組織学的検査：P動物及びF1動物共に、検体投与に起因する変化は認められなかった。

#### 児動物

出生後生存率：F1及びF2共に、出産生児数及び生存率に検体投与の影響は認められなかった。

性 比：F1及びF2共に性比は対照群と同等であった。

#### 出生児の体重：

F1動物：哺育期間中の児の体重は、対照群と比較し5000ppm投与群の雌雄で低い傾向が認められたが、統計学的有意差は認められなかった。

F2動物：5000ppm投与群の雌雄で統計学的に有意な低値が認められたが、わずかな変化であった。1000ppm投与群の雌でもわずかに有意な低値を示した。出生児に認められた体重の変化は、親動物に認められた体重または摂餌量の低下によるものと考えられた。

#### 出生児の発育指標：

F1児：膣開口、眼瞼開裂、角膜反射及び瞳孔反射の統計学的に有意な遅延が、5000ppm投与群の雌に認められた。5000ppm投与群の雌に認められた膣開口、眼瞼開裂、角膜反射及び瞳孔反射の値を、試験実施機関における背景対照データと比較した結果を下表に示す。

	資料No.8-1		背景対照データ（計9試験、1993～1998年）	
	0ppm	5000ppm	最小値(群平均値)	最大値(群平均値)
膣開口(日)	33.33	35.87	31.35	36.62
眼瞼開裂(日)	14.76	15.19	13.99	14.49
角膜反射(日)	14.76	15.19	13.99	14.49
瞳孔反射(日)	14.76	15.19	13.99	14.49

5000ppm投与群雌の膣開口は背景対照データの範囲内にあったが、眼瞼開裂、角膜反射及び瞳孔反射は対照群及び5000ppm投与群とも背景対照データの範囲外であった。

成長の指標として、哺育期間における雌の体重増加量を算出したところ、次表に示すとおり5000ppm投与群において児及び腹当たりの値に統計学的有意差が認められた。

		雌一投与量 (ppm)					
		60		1000		5000	
		児	腹	児	腹	児	腹
体重増加量 (哺育期間)	第0~12日	99	97	103	106	↓88	↓87
	第0~21日	98	98	106	111	↓87	↓88

統計学的手法 : Kruskal-Wallis, Anova又はDunnett test, ↑↓ : p<0.05, ⇧⇨ : p<0.01

数値は、変動の目安として対照群を100とした場合の値を示したもの。

従って、統計学的有意差が認められた膣開口遅延及び発育指標（眼瞼開裂、角膜反射、瞳孔反射）の遅延は、体重及び体重増加抑制で表される5000ppm投与群児（雌）の成長の遅れが関与した二次的な影響であると考えられた。

なお、5000ppm投与群雌で最も遅かった膣開口、眼瞼開裂、瞳孔反射及び角膜反射の各個体別値は、何れも対照群の各個体雌が示した変動の範囲より遅延することはなかった。

1000ppm投与群雌の皮膚毛出の値に統計学的有意差が認められたが、対照群と比較して早まっていることから毒性学的意義は無いものと考えられた。

F2児 : 発育指標に有意な差は認められなかった。

#### 出生児の臓器重量 :

F1児 : 5000ppm投与群で脳の相対重量に有意に高かったが、絶対重量に有意差がないことから、この差は体重差に基づくものと考えられた。

F2児 : 5000ppm投与群で、雄の胸腺及び脾臓の絶対重量が有意に低かったが、相対重量に低下なく、雌に変化は認められなかった。したがって、これらの変化に毒性学的に意義がないと考えられた。1000及び5000ppm投与群で雌の脳の絶対重量が低下したが、相対重量は増加しており、検体投与とは関係がないと考えられた。

以上の結果、親動物では1000ppm以上の投与群で摂餌量の減少が認められ、また5000ppm投与群で体重の減少が認められた。児動物でも1000ppm以上の投与群で体重の減少が認められた。従って、無毒性量は親動物及び児動物いずれも60ppm (P : 雄3.9mg/kg/day、雌5.15mg/kg/day、F1 : 雄4mg/kg/day、雌5.4mg/kg/day) と判断された。繁殖に対する影響は最高投与群でも認められなかった。

表2 試験結果

世代		親:P				児:F1		親:F1				児:F2	
投与量 (ppm)		0	60	1000	5000	0	60	1000	5000	0	60	1000	5000
動物数		雄	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
		雌	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
一般状態			—	—	—	下頸腫脹 (1例)	—	—	—	—	—	—	—
死 亡			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
親	最終体重	雄	(生育期間)			↓ 93							↓ 90
			(生育期間)			↓ 91							↓ 93
		雌	(妊娠期間)			↓ 93							
			(哺育期間)										
	摂餌量	雄	(生育期間)		注 1	注 2	注 3						
			(生育期間)		注 4	注 5	注 6						
		雌	(妊娠期間)										注 10 注 11
			(哺育期間)										注 12
動物	食餌効率	雄	(生育期間)			注 7	注 8						注 13
		雌	(生育期間)			注 9							注 14
	検体採取量	雄	(mg/kg/day)	3.9	63.8	328.3		4.0	68.6	353.2			
		雌		5.2	84.4	459.6		5.4	89.2	438.3			
	肉眼的病理検査					下頸腫脹 (1例)							
	臓器重量 a)	肝臓	雄	(相対)			↑ 117		↓ 92				↑ 110
			雌	(絶対)			↑ 115						↑ 115
				(相対)			↑ 109						↑ 120
		腎臓	雌	(相対)									
物	重量 b)	脾臓	雄	(絶対)			↑ 106						↑ 115
			(相対)				↑ 111						↑ 119
		雌	(絶対)				↑ 116						↑ 116
			(相対)										↑ 126
	臓器重量	脳	雌	(絶対)						↓ 93			↓ 91
			(相対)										
		肝臓	雄	(絶対)			↑ 114						↑ 115
			(相対)				↑ 109						↑ 121
	b)	腎臓	雌	(相対)			↑ 110						↑ 116
		脾臓	(絶対)				↑ 116						↑ 126
		脳	(絶対)				↑ 124						
		卵巣	(相対)										
病理組織学的検査						検体投与に起因する変化は認められなかった。							検体投与に起因する変化は認められなかった。

統計学的検定法 : Dunnett' 検定または Mann-Whitney 検定 ↑ ↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01、↓↑ : P<0.001  
表中の↑↓、↑↓ 及び ↓↑ の後に付した数値は、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。

臓器重量 a) : 全生存動物の平均値、臓器重量 b) : 生児出産雌の平均値

- 注 1: 有意な増加が2週目に認められた。
- 注 2: 有意な減少が3週目、5週目、6週目に認められた。
- 注 3: 有意な減少が3週目、6週目、10週目に認められ、有意な増加が4週目に認められた。
- 注 4: 有意な減少が2週目に認められた。
- 注 5: 有意な減少が4週目、6週目に認められた。
- 注 6: 有意な減少が2週目、7週目に認められた。
- 注 7: 有意な減少が6週目に認められた。
- 注 8: 有意な減少が6週目、7週目、9週目に認められた。
- 注 9: 有意な減少が4週目、6週目、9週目に認められた。
- 注10: 有意な減少が14～21日に認められた。
- 注11: 有意な減少が1～7日に認められた。
- 注12: 有意な減少が1～7日に認められた。
- 注13: 有意な減少が12週目に認められた。
- 注14: 有意な減少が12週目に認められた。

表2 試験結果（続き）

世 代		親:P 児:F1				親:F1 児:F2				
投与量 (ppm)		0	60	1000	5000	0	60	1000	5000	
動 物 数	雄	28	28	28	28	28	28	28	28	
	雌	28	28	28	28	28	28	28	28	
親 液 検 査	精子の形態		検体投与に起因する変化は認められなかった。				検体投与に起因する変化は認められなかった。			
	精子数 (精巣上体)	221.27	218.75	198.69	219.37	218.51	197.89	220.00	225.49	
	精子数 (精巣)	131.48	134.83	132.56	138.37	231.99	220.73	209.43	203.83	
	VSL (直線速度)	87.7	92.5	90.8	93.3	84.9	84.4	83.1	84.6	
	VCL (曲線速度)	257.4	269.7	260.1	264.4	277.2	275.4	273.5	270.5	
	ALH (頭部振幅)	16.1	16.9	16.3	16.8	17.9	17.6	17.4	17.1	
	運動精子数 (%)	84.4	87.3	79.0	85.4	76.3	76.3	78.4	72.9	
	発情周期		検体投与に起因する変化は認められなかった。				検体投与に起因する変化は認められなかった。			
	交尾率 (%)	100.0	100.0	96.4	100.0	100.0	100.0	96.2	100.0	
	交尾成立日数	1.25	1.56	2.96	1.41	1.30	1.52	2.33	1.52	
物	妊娠率 (%)	85.7	96.4	96.3	100.0	90.5	100.0	88.0	81.8	
	出産率 (%)	100.0	100.0	100.0	96.4	100.0	100.0	100.0	100.0	
	妊娠期間		検体投与に起因する変化は認められなかった。				検体投与に起因する変化は認められなかった。			
	生児出産雌数	24	27	26	27	19	22	22	18	
児 動	検査親動物数	24	27	26	27	19	22	22	18	
	出産生児数	13.3	13.1	12.4	13.2	14.6	14.7	14.4	14.0	
	死産児数	0.00	0.15	0.04	0.00	0.16	0.05	0.00	0.00	
	着床後胚損失率 (%)	11.2	13.3	10.9	6.9	7.5	4.5	5.0	7.6	
	出生率 (%)	88.8	86.7	89.1	93.1	92.5	95.6	95.0	92.4	
	4日目生存率 (%)	92.2	95.2	96.0	90.9	95.8	98.4	94.4	94.8	
	離乳率 (%)	79.5	70.5	73.1	79.8	90.9	98.9	94.3	96.5	
物	外表異常		検体投与に起因する異常は認められなかった。				検体投与に起因する異常は認められなかった。			
	性比 (雄/雌)	1/0.87	1/0.92	1/1.15	1/0.97	1/0.93	1/0.83	1/1.04	1/1.19	
	同腹生存児体重 (g)	雄	6.47	6.65	6.85	6.41	6.37	6.41	6.44	6.42
		雌	6.13	6.24	6.41	6.12	6.00	6.01	6.06	6.07
	哺育期間体重 (第21日) (g)	雄	32.70	33.61	36.96	29.26	41.38	39.82	36.74	32.76(↓)
		雌	32.96	32.84	36.28	29.71	41.04	38.46	35.99(↓)	32.50(↓)
	肛門-生殖突起間距離 (mm)	雄				3.03	3.07	3.04	3.06	
物		雌				1.50	1.49	1.49	1.48	
	肛門-生殖突起間指數	雄				0.48	0.48	0.48	0.48	
		雌				0.25	0.24	0.24	0.25	

統計学的検定法 : Dunnett' 検定または Mann-Whitney 検定 ↑ ↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01、↓↑ : P<0.001

表中の↑↓、↑↓及び↓↑の後に付した数値は、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。

表2 試験結果（続き）

世 代		親:P 児:F1				親:F1 児:F2				
投与量 (ppm)		0	60	1000	5000	0	60	1000	5000	
動物数		雄	28	28	28	28	雄	28	28	
		雌	28	28	28	28	雌	28	28	
児 育 動 指 標 物	耳介反射	雄	11.00	11.00	11.18	11.00				
	(日)	雌	11.02	11.06	11.06	11.03				
	正向反射	雄	4.04	4.03	4.00	4.10				
	(日)	雌	4.08	4.07	4.06	4.08				
	耳介開展	雄	4.04	4.03	4.00	4.10				
	(日)	雌	4.08	4.06	4.06	4.08				
	皮膚毛生	雄	5.96	5.99	5.64(↓)	5.89				
	(日)	雌	6.00	5.92	5.67(↓)	5.88				
	切歯萌出	雄	8.21	8.20	7.90	8.40				
	(日)	雌	8.12	8.28	7.81	8.39				
	眼瞼開裂	雄	14.87	14.41	14.70	15.23				
	(日)	雌	14.76	14.60	14.81	15.19(↑)				
	角膜反射	雄	14.89	14.73	14.70	15.23				
	(日)	雌	14.76	14.60	14.75	15.19(↑)				
臓 器 重 量	瞳孔反射	雄	14.89	14.73	14.70	15.23				
	(日)	雌	14.76	14.60	14.75	15.19(↑)				
	牽引反射	雄	5.35	5.69	5.63	5.93				
	(日)	雌	5.46	5.46	5.73	6.32				
	把握反射	雄	5.05	5.38	5.10	5.53				
	(日)	雌	5.11	5.05	5.00	5.74				
	精巣下降(日)		25.38	25.57	25.50	26.09				
	亀頭包皮分離(日)		27.43	27.14	26.61	28.15				
	膣開口(日)		33.33	34.27	33.86	35.87(↑)				
	Chimneyテスト (成功率, %)		89.68	78.57	90.36	79.50				
肉眼的病理検査			検体投与に起因する変化は認められなかつた。				検体投与に起因する変化は認められなかつた。			
臓 器 重 量	脳	雄 (相対)				↑129				
		(絶対)								
		雌 (相対)				↑122				
	脾臓	雄 (絶対)								
病理組織学的検査			検体投与に起因する変化は認められなかつた。				検体投与に起因する変化は認められなかつた。			

統計学的検定法 : Dunnett' 検定、 Mann-Whitney 検定又は Kruskal-Wallis test 検定

↑↓ : P<0.05、 ↑↓ : P<0.01、 ↓↑ : p<0.001

表中の↑↓、↑↓ 及び ↓↑ の後に付した数値は、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。

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

### 催奇形性

#### (1) ラットにおける催奇形性試験

(資料No. 8-2)

試験機関 : Rhone-Poulenc Sophia Antipolis (仏)  
報告書作成年 : 1999年 [GLP]

検体純度 :

試験動物 : CD (Sprague-Dawley Crl:CD(SD) BR) 系雌雄成熟ラット、1群交配確認雌25匹

試験期間 : 妊娠期間20日 (1996年10月14日～1998年11月8日)、

投与期間 : 妊娠6日～15日

試験方法 : 検体を0.5%メチルセルロース400水溶液に懸濁させ、0(溶媒対照), 25, 150及び1000mg/kg/dayの投与レベルで妊娠6日から15日まで10日間、毎日1回経口投与した。なお、対照群に媒体を同様に投与した。  
交配は雌雄を1:1で同居させ、腫栓または膣垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。

投与量設定根拠 ;

試験項目及び方法 :

親動物 ; 一般状態および生死を毎日観察し、妊娠0日、妊娠6～16日は毎日、妊娠20日に体重を測定した。摂餌量は妊娠0～6日、妊娠6日から15日は毎日、妊娠16～20日について測定した。

妊娠20日に屠殺し、内臓の肉眼的検査を行った。妊娠子宮重量の測定を測定し、黄体数、着床数、早期及び後期吸収の数及び位置、生存及び死亡胎児の数及び分布を検査した。

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

生存胎児；性別、体重、胎盤重量および外表異常の観察を行った。

各同腹児群の約1/2については内臓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製し骨格異常の有無を検査した。胎児の変化は以下のように定義した。

奇 形：希にしか認められず、及び/又はおそらく致死的であると思われる主要な異常。

異 常：正常からの軽度な変化で、比較的高頻度で認められるもの。

変 異：対照群でも一般的に認められる変化で、連続的な変化と定義されるもの。

結果：次表に示した。

投与群 (mg/kg/day)		0	25	150	1000
一群当たり動物数		25	25	25	25
親 動 物	一般状態	脱毛	2	0	2
		膿分泌物	1	4	3
	死亡率 [( ) 内は%を示す]		0 (0)	0 (0)	0 (0)
	体重増加量	妊娠 0~6日			
		妊娠 6~9日			↓ (-51)
		妊娠 6~12日			↓ 39
		妊娠 6~16日			↓ 75
		妊娠 16~20日			
	補正体重増加量				↓ 84
	摂 餌 量	妊娠 1~6日			
		妊娠 6~9日			↓ 62
		妊娠 9~12日			↓ 85
		妊娠 12~16日			
		妊娠 16~20日			
	剖 檢 所 見	胎盤癒合	0	1	0
		子宮角赤色液	0	1	0
		子宮水腫	0	2	0
		水腎症	0	0	1
		腹膜炎	1	0	0
	妊娠数 [( ) 内は%を示す]		25 (100)	24 (96)	22 (88)
着床所見 (平均値)	検査親動物数		25	24	22
	黄体数		18.6	17.4	18.2
	着床数		16.2	15.8	16.8
	着床前胚損失率 (%)		13.0	10.9	7.2
	早期吸収胚数		0.72	0.67	0.55
	後期吸収胚数		0.12	0.04	0.09
	死亡胎児数		0.00	0.00	0.00
	生存胎児数		15.4	15.1	16.2
	着床後胚損失率 (%)		5.0	4.3	3.7

統計学的検定法 : Dunnett 検定または Mann-Whitney 検定 ↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01

投与群 (mg/kg/day)		0	25	150		1000				
一群当たり動物数		25	25	25		25				
体重	雄					↓ 96				
	雌					↓ 95				
胎盤重量	雄		↓ 95		↓ 95	↓ 96				
	雌		↓ 95		↓ 96	↓ 95				
生存児数	雄	202	180	170		190				
	雌 雄	384	363	356		378				
雄性比率 (%)		53	50	48		50				
児検査	所見\検査例数		胎児数	腹数	胎児数	腹数	胎児数	腹数		
		384	25	363	24	356	22	378	24	
	変異	矮小児	4	3	6	5	2	2	2	
	異常	浮腫(頭部・胸部及び腹部)	0	0	1	1	0	0	0	
		短吻	0	0	3	2	0	0	0	
	奇形	索状尾	0	0	0	0	1	0	0	
		ドーム状頭部・過伸展後肢 ・尾の血腫	0	0	1	1	0	0	0	
		口蓋裂・後脚異常弯曲・ 後脚短指・後脚血腫	0	0	0	0	0	1	1	
	所見\検査例数		胎児数	腹数	胎児数	腹数	胎児数	腹数		
		201	25	186	23	184	22	195	24	
動物検査	骨格化骨遅延	胸骨分節未骨化	1	1	2	2	0	0	0	
		恥骨未骨化	2	2	4	4	1	1	0	0
		坐骨不完全骨化	0	0	1	1	0	0	0	0
		頭頂間骨不完全骨化	3	3	6	5	6	4	11	6
		舌骨不完全骨化	7	5	7	6	8	5	15	11
		第5胸骨分節未骨化	54	20	54	16	51	18	78	19
		第6胸骨分節未骨化	4	4	8	6	3	3	6	5
	異常	頭頂骨-裂溝	0	0	0	0	1	1	0	0
		胸骨分節癒合	1	1	0	0	0	0	0	0
		胸椎体位置異常	0	0	1	1	0	0	0	0
	奇形	頸 肋	0	0	0	0	0	0	2	1
		口蓋骨変化	0	0	0	0	0	0	1	1
		胸椎変化	0	0	0	0	0	1	1	1
		椎骨変化	0	0	0	0	1	1	0	0
内臓検査	所見\検査例数		胎児数	腹数	胎児数	腹数	胎児数	腹数		
		183	25	177	24	172	22	183	24	
	変異	胸腺肥大	2	1	2	2	7	3	8	6
		腎盂拡張	5	4	15	7	15	9	8	4
	奇形	腎臓形態異常	0	0	1	1	0	0	0	0
		大血管位置異常	0	0	0	0	1	1	0	0
		内臓奇形	0	0	1	1	0	0	0	0

統計学的検定法 : Dunnett 検定または Mann-Whitney 検定

↑ ↓ : P<0.05, ▲ ▼ : P<0.01

### 親動物

一般状態および死亡；対照群を含む数匹の動物で、数日間脱毛（足、頸および腹部）が認められた。また、全群で数例に、何れも妊娠13日～15日のほぼ同じ期間に褐色または赤色の膣分泌物が認められた。

膣分泌物が認められた動物のうち、0、25、150及び1000mg/kg/day投与群でそれぞれ1/1、3/4、3/3および1/4例で胚吸収が認められたことから、高用量群を除くと、膣分泌物と子宮内死亡の間に強い関連があると考えられた。

しかしながら、着床後胚損失率または吸収数には投与との関連が認められなかつたことから、この所見は検体投与に関連した変化ではないと考えられた。

その他の一般状態の変化は、対照群と比較して差が認められないことから、検体投与とは関連がないと判断された。試験期間中に死亡例は認められなかつた。

体重変化；1000mg/kg/day投与群において、対照群と比較して、妊娠7日～最終日（妊娠20日）の体重が低く、妊娠6日～9日の体重変化量に統計学的に有意な低下が認められた。その後の回復が認められなかつたことから、妊娠6日～12日及び6日～16日の期間の体重変化量が統計学的に有意に低下した。また、母体毒性を反映する補正体重〔妊娠20日の体重－（妊娠0日の体重+妊娠子宮重量）〕も有意に低下した。

摂餌量；1000mg/kg/day投与群に、妊娠6日～9日及び9日～12日の期間における平均1日摂餌量に統計学的に有意な減少が認められた。

肉眼的病理検査；子宮角の赤色液が、25および150mg/kg/day投与群でそれぞれ1及び2例に認められた。また、子宮水腫（子宮角に着床が認められず、液体のみが認められる）が25mg/kg/day投与群で2例（片側性または両側性）に認められた。これらの変化はいずれも検体投与の影響ではないと考えられた。

また、対照群で腹膜炎が1例に、150mg/kg/day投与群で水腎症が1例に、25及び1000mg/kg/day投与群で胎盤癒合が各1例に（それぞれ2箇所）認められたが、いずれも自然発生性の変化であると考えられた。

したがって、肉眼的病理検査において、検体投与の影響は認められなかつた。

生殖に関する指標；いずれの群においても、22匹以上で妊娠が認められた。妊娠率は対照群、25、150及び1000mg/kg/day投与群でそれぞれ100、96、88及び96%であり、妊娠率には検体投与の影響は認められなかつた。

また、黄体数、着床数、着床前胚損失率、早期吸収胚数、後期吸収胚数、死亡胎児数及び生存胎児数に検体投与の影響は認められなかつた。着床後胚損失率は投与群においてやや低い傾向が認められたが、有意差は認められなかつた。

### 胎児

体重、胎盤重量および性比；性比には対照群と検体投与群の間に顕著な差は認められなかつた。胎児重量は1000mg/kg/day投与群で雌雄とも有意な減少が認められた。胎盤重量は全検体投与群で有意な減少が認められた。

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

しかしながら試験実施機関における胎盤重量の背景対象データの範囲は、雄：0.64～0.69 g、雌：0.60～0.66 gと示されている。従って、対照群と比して各検体投与群で認められた胎盤重量の減少は、対照群の値（雄：0.677 g、雌：0.666 g）がやや高かったことによるもので、生物学的変動内の変化であると考えられた。

#### 胎盤重量：各投与群における群平均値及び背景対照データの範囲

	雄 投与量 (mg/kg/day)				雌 投与量 (mg/kg/day)			
	0	25	150	1000	0	25	150	1000
胎盤重量群平均値 (g)	0.677	0.644 (**)	0.644 (**)	0.649 (**)	0.666	0.630 (**)	0.639 (**)	0.631 (**)
胎盤重量 (g) 背景対照データ範囲	0.64～0.69				0.60～0.66			

統計学的手法 Dunnett検定またはMann-Whitney検定、(\*) :  $p \leq 0.05$ , (\*\*) :  $p \leq 0.01$

外観検査；各検体投与群で少数例の奇形または異常が認められたが、発現例数も少なく、変化の発現部位も異なっており、胎児当たり及び1腹当たりの発現頻度に差がないことから、検体投与による影響ではないと考えられた。

骨格検査；多発性奇形を有する胎児が認められた。1000mg/kg/day投与群では、外観検査で口蓋裂が確認された胎児に口蓋骨変化が、他の胎児1匹に胸椎変化が認められた。150mg/kg/day投与群では、外観検査で索状尾が認められた胎児に、椎骨変化が認められた。

その他の奇形として、0、25及び150mg/kg/day投与群で胸骨分節および恥骨の未骨化が認められた。これらの変化はいずれも自然発生的な変化であり、検体投与との関連性はないと考えられた。

異常では、1000mg/kg/day投与群の1腹で頸肋を有する胎児2匹が認められた。この変化は1腹のみで認められたことから明らかに検体投与に関連した変化であるとは言えないが、この母動物では妊娠6～10日の間に体重の減少が認められたことから、母体毒性に関連した変化である可能性が高いと考えられた。

その他に、裂溝を有する頭頂骨、胸骨分節癒合、胸椎体位置異常、坐骨の不完全骨化等の異常が認められたが、発現頻度も極めて低く、自然発生的変化であると考えられた。

変異では、1000mg/kg/day投与群で頭頂間骨及び舌骨の不完全骨化、胸骨分節未骨化の発現頻度に増加が認められた。しかし、これらの変化はこの群で認められた胎児重量の減少に関連した変化であると考えられた。その他の変異はいずれも投与群と対照群で発生頻度に差はなく、検体投与に関連した増加は認められなかった。

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

内臓検査；奇形では、25mg/kg/day投与群の胎児1匹（外表検査で浮腫が認められた胎児）で内臓奇形が認められた。

また、150mg/kg/day投与群の胎児1匹に大血管位置異常、25mg/kg/day投与群の胎児1匹に腎臓形状異常が認められた。これらの発現頻度に投与に関連した増加は認められなかった。

変異では、胸腺肥大が全投与群で認められた。150及び1000mg/kg/day投与群では発現頻度に軽度の増加（対照群の1.1%に対してそれぞれ4.1及び4.4%）が認められたが、これは対照群の平均が低かったためであり（背景データの平均は8.5%）、検体投与の影響ではないと考えられた。

また、腎孟拡張の発現頻度に軽度の増加が認められた。腎孟拡張の認められた腹数は、対照群、25、150及び1000mg/kg/day投与群でそれぞれ4腹、7腹、9腹及び4腹であり、用量との関連が認められず、また対照群と1000mg/kg/day投与群で差がないことから、検体投与の影響はなかったと考えられた。

以上の結果、親動物では、1000mg/kg/dayの用量で体重及び摂餌量の有意な減少が認められ、補正体重にも有意な減少が認められたことから、親動物に対する無毒性量は150mg/kg/dayと判断された。

胎児に対しては、1000mg/kg/dayの用量で胎児重量の減少が認められ、これに関連した軽度の化骨遅延が認められたことから、胎児に対する無毒性量は、150mg/kg/dayと判断された。

また、最高投与量である1000mg/kg/dayでも催奇形性は認められなかった。

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

(2) ウサギにおける催奇形性試験

(資料No. 8-3)

試験機関 : Rhone-Poulenc Sophia Antipolis(仏)  
報告書作成年 : 1999年 [GLP]

検体純度 :

試験動物 : New Zealand White種ウサギ (Cr1:Kbi/BR)、1群雌30匹 (性成熟未経産)。  
妊娠動物は同系統の雄の精液を人工授精して作製した。

試験期間 : 投与期間23日 (妊娠6日～28日) (1998年11月1日～1998年12月18日)

投与方法 : 検体を0.5%メチルセルロース400水溶液に懸濁させ、0(溶媒対照), 10, 30及び  
100mg/kg/dayの投与用量で妊娠6日から28日まで23日間、毎日1回経口投与した。  
なお、対照群に溶媒を同様に投与した。(精液注入日を妊娠0日とした)。

投与量設定根拠 :

試験項目及び方法 :

親動物 ; 一般状態及び生死を妊娠0日から29日まで毎日観察し、妊娠0、6、8、10、12、14、  
16、18、20、22、24、26および29日に体重を測定した。摂餌量は毎日測定した。

妊娠29日に屠殺し、内臓の肉眼的検査を行い、肋骨の数を記録した。肝臓の重量及び生殖器官(妊娠子宮)重量を測定した。黄体数、着床数、生存及び死亡・吸収胎児数を検査した。流産した動物及び死亡した動物は剖検し、着床数、黄体数を検査し肋骨の数を記録した。

生存胎仔 ; 性別、体重及び外表異常の観察を行った。

頸部の検査の後、各同腹児のうち約半数の頭部を固定し、内部構造を検査した。全胎児の胴体を切開し、軟組織の異常を検査した。さらに骨格標本を作製し骨格検査を行った。胎児の変化は以下のように定義した。

奇形 : 極めて希であるか、又は明らかに致死的な変化。

異常 : 軽度で比較的希な構造変化であるが、明らかに有害とは言えない構造変化。

変異 : 対照集団の中で約5%以上発生する構造変化。

結果 : 次表に示した。

投与群 (mg/kg/day)		0	10	30	100					
動物数 (雌)		30	30	30	30					
親 動 物	一般状態		検体投与による変化は認められなかった。							
	死亡数	0	0	1	0					
	流産	1	0	2	0					
	体重変化量 <sup>1)</sup>				↓20 (妊娠 6~10日)					
	摂餌量 <sup>1)</sup>				↓85 (妊娠 6~8日)					
	肝臓重量 <sup>1)</sup>			↑118.9	↑136.6					
	剖検所見		検体投与による変化は認められなかった。							
	妊娠数 [( ) 内は%]	29 (97)	24 (80)	25 (83)	22 (73)					
	生存胎児あり	28	24	21	22					
	吸收胚のみ	0	0	1	0					
胎 児 動 物	検査親動物数	28	24	22	22					
	着床数	11.0	10.5	10.0	10.1					
	着床率 (%)	8.2	8.6	8.2	7.5					
	着床前胚損失率 (%)	25.2	18.6	17.0	27.2					
	早期吸收胚数	0.3	0.6	0.1	0.4					
	後期吸收胚数	0.0	0.0	0.0	0.0					
	死亡胎児数	0.3	0.1	0.2	0.2					
	生存胎児数	7.4	7.8	7.6	6.9					
	着床後胚損失率 (%)	9.5	10.1	12.3	8.1					
	体重 (g)	雌 雄 雄 雌	37.5 37.8 36.3	37.8 37.7 37.2	37.0 37.6 35.3	38.4 38.7 37.3				
内 臓 検 査	性比 (雄 / 雌)	0.52	0.52	0.45	0.60					
	外表検査	所見 \ 検査数	胎児数 208	腹数 28	胎児数 187	腹数 24	胎児数 167	腹数 21	胎児数 151	腹数 22
	奇形	鈍端尾	1	1	0	0	0	0	0	0
	二分脊椎		0	0	1	0	0	0	0	0
	骨格検査	所見 \ 検査数	胎児数 208	腹数 28	胎児数 187	腹数 24	胎児数 167	腹数 21	胎児数 151	腹数 22
	奇形	脊椎多発奇形	3	3	3	3	0	0	1	1
		第8~10尾椎骨癒合・ 第11~15椎骨欠損	1	1	0	0	0	0	0	0
	内臓検査	所見 \ 検査数	胎児数 208	腹数 28	胎児数 187	腹数 24	胎児数 167	腹数 21	胎児数 151	腹数 22
	奇形	胸郭多発性奇形	1	1	2	2	0	0	0	0
		騎乗大動脈・心室中隔欠損	5	5	2	2	0	0	0	0
		腎臓・尿細管欠損	1	1	0	0	0	0	0	0
		精巣・精巣上体・輸精管欠損	0	0	0	0	0	0	1	1

統計学的検定法 : Dunnett' 検定または Mann-Whitney 検定 ↑↓ : P<0.05、 ⇧↓ : P<0.01  
 1) 表中の数字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

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

#### 親動物

一般状態および死亡；検体投与に起因すると考えられる毒性徴候は認められなかった。

妊娠後半期に、全群で糞の減少が多数例認められたが、これはこの時期の摂餌量が減少したことによるものであった。

30mg/kg/day投与群の1例が妊娠22日に死亡したが、これは誤投与によるものであった。流産が対照群の1例で妊娠23日に、30mg/kg/day投与群の2例で妊娠21及び22日に認められたが、検体投与との関連性は認められなかった。

体重変化；100mg/kg/day投与群で妊娠6～10日の体重変化量に統計学的に有意な低下が認められた。この期間(妊娠6～10日)の個体別の体重変化量は、対照群では体重の減少した妊娠雌が2匹であったのに対し、100mg/kg/day投与群では8匹であった。補正体重には、何れの検体投与群においても影響は認められなかった。

摂餌量；100mg/kg/day投与群で妊娠6日～8日の摂餌量に統計学的に有意な低下が認められた。妊娠8～10日の間の摂餌量にも統計学的有意差は認められなかつたが、低下が認められた。

肉眼的病理検査及び臓器重量；剖検で検体投与に起因すると考えられる所見は認められなかつた。30及び100mg/kg/day投与群で肝臓重量の有意な増加が認められた。

生殖に関する指標；いずれの群も計画屠殺時に22匹以上の妊娠雌が得られ、妊娠率は対照群、10、30及び100mg/kg/day投与群でそれぞれ97、80、83及び73%であり、妊娠率には検体投与の影響は認められなかつた。

また、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胎児数、前期及び後期吸收胚数、着床前及び着床後胚損失率などの着床所見に検体投与の影響は認められなかつた。

#### 胎 児

体重および性比；平均胎児重量（雌、雄及び雌雄）及び性比に検体投与の影響は認められなかつた。

外表検査；外表所見に検体投与の影響は認められなかつた。

骨格検査；検体投与群に奇形及び異常の発現頻度の増加は認められなかつた。検体投与による骨化遅延は認められず、変異に検体投与による増加は認められなかつた。

内臓検査；奇形、異常及び変異の発現頻度に検体投与による増加は認められなかつた。

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

以上の結果、親動物に対する無影響量は、30及び100mg/kg/day投与群で肝臓重量が増加したことから10mg/kg/day、無毒性量（NOAEL）は100mg/kg/day投与群で摂餌量及び体重変化量に影響が認められたことから30mg/kg/dayと判断された。

胚一胎児に対する毒性は、いずれの投与群にも認められなかったことから、最高投与量である100mg/kg/dayが無毒性量（NOAEL）と判断された。また、最高投与量である100mg/kg/day投与群でも催奇形性は認められなかった。

申請者注：

申請者は「親動物に対する無毒性量は10mg/kg/day」であると考える。

## 9. 変異原性

### 1) 遺伝子突然変異原性

細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 No. 9-1)

試験機関 : Rhone-Poulenc Sophia Antipolis (仏)  
報告書作成年 : 1996年 [GLP]

検体の純度 :

試験方法 : サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535及びTA102菌株[以上、塩基対置換型]、TA98及びTA1537菌株[以上、フレームシフト型])を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix, Aroclor 1254誘導ラット肝ホモジネート) の存在下及び非存在下で、変異原性を検定した。  
検体は DMSO に溶解した。

### 投与量設定

。

これら予備試験の結果に基づき、本試験で行ったプレート混和法（試験 I）及び液体プレインキュベーション法（試験 II）の用量を次のとおり設定した。

#### プレート混和法（試験 I）

S9 mix +/− : 50、100、250、500、1000及び2500  $\mu$  g /プレート  
液体プレインキュベーション法（試験 II）

S9 mix − : 10、25、50、100、250、500及び1000  $\mu$  g /プレート  
S9 mix + : 50、100、250、500、1000及び2500  $\mu$  g /プレート  
試験は 1用量につき 3プレートで行った。

試験結果 : 結果を表1（試験 I）及び2（試験 II）に示した。

検体は 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を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた sodium-azide、9-aminoacridine、2-nitro-fluorene、cumene hydro-peroxyde (以上、S9 mix −) 及び2-aminoanthracene (S9 mix +) は、すべての供試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る。

表1 (試験 I)

(n = 3の平均値)

薬物	用 量 (μ g/ プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数／プレート[plate] (3プレートの平均値)				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
試験	溶媒対照 (DMSO)	-	116	12	348	30	13
	50		112 [0.97]	13 [1.08]	304 [0.87]	38 [1.27]	9 [0.69]
	100		115 [0.99]	13 [1.08]	305 [0.88]	35 [1.17]	11 [0.85]
	250		131 [1.13]	15 [1.25]	310 [0.89]	33 [1.10]	12 [0.92]
	500		139 [1.20]	13 [1.08]	297 [0.85]	34 [1.13]	12 [0.92]
	1000		128 [1.10]	15 [1.25]	297 [0.85]	28d [0.93]	7d [0.54]
	2500		NR	NR	NR	NR	NR
	陽性対照		sodium azide (1 μ g/plate)	sodium azide (1 μ g/plate)	cumene hydroperoxyde (150 μ g/ plate)	2-nitro- fluorene (1 μ g/plate)	9-amino- acridine (50 μ g/ plate)
			583 [5.03]	505 [42.08]	695 [2.00]	311 [10.37]	386 [29.69]
	溶媒対照 (DMSO)		138	11	405	36	17
I	50	+	136 [0.99]	10 [0.91]	413 [1.02]	40 [1.11]	17 [1.00]
	100		147 [1.07]	10 [0.91]	396 [0.98]	48 [1.33]	16 [0.94]
	250		153 [1.11]	13 [1.18]	426 [1.05]	49 [1.36]	16 [0.94]
	500		145 [1.05]	10 [0.91]	394 [0.97]	47 [1.31]	18 [1.06]
	1000		136a [0.99]	9d [0.82]	415 [1.02]	44e [1.22]	7a/d [0.41]
	2500		NR	NR	NR	NR	NR
	陽性 対照		2-amino- anthracene (2 μ g/plate)	2-amino- anthracene (2 μ g/plate)	2-amino- anthracene (5 μ g/plate)	2-amino- anthracene (5 μ g/plate)	2-amino- anthracene (5 μ g/plate)
			2418 [17.52]	293 [26.64]	1448 [3.58]	2,284 [62.44]	298 [17.53]

注) [ ]内は、R比(「検体又は陽性対照の復帰変異コロニー数平均値」÷「溶媒対照の復帰変異コロニー数平均値」)を示す。

a : 背景細菌叢の生育不良(軽度から中程度), b : 背景細菌叢の生育不良(極度)

c : ミクロコロニー形成を伴う背景細菌叢の生育不良(極度)

d : 肉眼で析出を確認, e : 多量の析出のため、計測が不可能であった。

NR : 結果が得られず。

表2 (試験 II)

(n = 3の平均値)

薬物	用 量 (μg/ プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート[plate] (3プレートの平均値)				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537
試験 II	溶媒対照 (DMSO)	-	125	13	319	30	13
	10		107 [0.86]	12 [0.92]	315 [0.99]	30 [1.00]	10 [0.77]
	25		125 [1.00]	12 [0.92]	316 [0.99]	28 [0.93]	13 [1.00]
	50		120 [0.96]	12 [0.92]	316 [0.99]	30 [1.00]	14 [1.08]
	100		143 [1.14]	15 [1.15]	307 [0.96]	34 [1.13]	13 [1.00]
	250		93a [0.74]	15a [1.15]	340 [1.07]	31 [1.03]	13 [1.00]
	500		88b [0.70]	10b [0.77]	336a [1.05]	21 [0.70]	8b [0.62]
	1000		90b/d[0.72]	10b/d[0.77]	359a/d[1.13]	16a/d[0.53]	6b/d[0.46]
	陽性対照		sodium azide (1 μg/plate)	sodium azide (1 μg/plate)	cumenc hydro-peroxyde (150 μg/ plate)	2-nitro- fluorene (1 μg/plate)	9-amino- acridine (50 μg/ plate)
			584 [5.46]	531 [40.85]	936 [2.93]	276 [9.20]	349 [26.85]
試験 II	溶媒対照 (DMSO)	+	120	11	407	39	17
	50		138 [1.15]	7 [0.64]	396 [0.97]	40 [1.03]	15 [0.88]
	100		139 [1.16]	14 [1.27]	422 [1.04]	51 [1.31]	15 [0.88]
	250		136 [1.13]	10 [0.91]	444 [1.09]	48 [1.23]	15 [0.88]
	500		143 [1.19]	11 [1.00]	436 [1.07]	50 [1.28]	12 [0.71]
	1000		137a [1.14]	10a [0.91]	434 [1.07]	43 [1.10]	15a [0.88]
	2500		101b/d[0.84]	8bd [0.73]	N R	31d [0.79]	4bd [0.24]
	陽性対照		2-amino-anthracene (2 μg/plate)	2-amino-anthracene (2 μg/plate)	2-amino-anthracene (5 μg/plate)	2-amino-anthracene (5 μg/plate)	2-amino-anthracene (5 μg/plate)
			1438 [11.98]	255 [23.18]	782 [1.92]	1303 [33.41]	200 [11.76]

注) [ ]内は、R比（「検体又は陽性対照の復帰変異コロニー数平均値」÷「溶媒対照の復帰変異コロニー数平均値」）を示す。

a : 背景細菌叢の生育不良（軽度から中程度）， b : 背景細菌叢の生育不良（極度）

c : ミクロコロニー形成を伴う背景細菌叢の生育不良（極度）

d : 肉眼で析出を確認, e : 多量の析出のため、計測が不可能であった。

N R : 結果が得られず。

マウスリンパ腫 L5178Y 細胞を用いた突然変異誘発性試験

(資料 No. 9-2)

試験機関 : Covance Laboratories Limited (英)  
報告書作成年 : 1999年 [GLP]

検体の純度 :

試験方法 : ウェル数が96のマイクロプレートを用いて、Aroclor1254誘導ラット肝臓ポストミトコンドリア画分 (S9) の存在下 (S9mix +) 及び非存在下 (S9mix -) において、マウスリンパ腫 L5178Y 細胞の tk (5-トリフルオロチミジン耐性) 遺伝子座における検体の突然変異誘発性 ( $tk^{+/-} \rightarrow tk^{-/-}$ ) を評価した。

本試験に先立ち、細胞毒性－用量設定試験を実施した。

細胞毒性－用量設定根拠

本試験は試験 I と試験 II から構成され、用いた用量は細胞毒性－用量設定試験に基づき次とおり設定した。

試験 I ;

S9mix - : 7濃度 (12.5, 25, 50, 75, 100, 125及び150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

S9mix + : 6濃度 (3.125, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

試験 II ; 試験 II における濃度は、試験 I で得られた細胞毒性が細胞毒性－用量設定試験の結果から予想されたものより弱かったため、次のとおり設定した。

S9mix - : 7濃度 (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

S9mix + : 7濃度 (6.25, 12.5, 18.75, 25, 31.25, 37.5, 43.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

また、溶媒対照及び陽性対照群を設けた。

上記の用量で3時間処理した後、細胞を培地で洗浄した。

検体処理細胞の一部 (8細胞/ $\text{ml}$ ) をマイクロプレートに播種し、8日間培養して生育コロニーを含むウェルを計数し、相対生存率 (溶媒対照群に対する%) を算出した。

残りの細胞は、2日間の突然変異発現期間中に継代培養して細胞濃度を $1 \times 10^6$ 細胞/ $\text{ml}$ に保った。突然変異発現期間後にトリフルオロチミジン (TFT) 存在下及び非存在下でマイクロプレートに播種して培養 (TFT 存在下 : 12~13日、TFT 非存在下 : 10~12日) した。培養後、

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

TFT 耐性変異体コロニー（突然変異体）及び生育コロニーを含むウェルを計数し、相対総増殖率（RTG）及び突然変異頻度（MF）を算出した。TFT 耐性変異体コロニーを含むウェルは、コロニーの大小別に計数した。

試験結果：結果を表 1（試験 I）及び表 2（試験 II）に示した。

#### 細胞毒性：

試験 I では、S9mix + の高用量（37.5 及び 50 μg/ml）において強い細胞毒性が認められ、相対生存率が 10% 以下（それぞれ 7.24% 及び 5.62%）となった。S9mix - では、検体各用量において相対生存率は 40% 以上であった。

試験 II では、10% 以下の相対生存率が認められた用量は、S9mix + では 25～43.75 μg/ml、S9mix - では 175 及び 200 μg/ml であった。

#### 突然変異：

試験 I 及び試験 II において、S9mix - では突然変異頻度に有意差は認められなかった。一方、S9mix + では高用量（試験 I : 12.5 及び 25 μg/ml、試験 II : 12.5 及び 18.5 μg/ml）の突然変異頻度に有意差が認められ、また用量相関性（直線性傾向）が認められた。

従って検体は、S9mix + において突然変異誘発性を有すると考えられた。

突然変異頻度に統計学的有意差が認められた検体用量群では、小コロニー及び大コロニーとも增加が認められたが、小コロニーの発現頻度の増加はより顕著であった。このことから、検体は染色体（構造）異常誘発性を有すると示唆された。

表 1 (試験 I )

処理用量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		S9mix の有無	相対生存率 (RS) %	相対総増殖率 (RTG) %	突然変異頻度 (MF) ( $\times 10^6$ )	傾向検定	小コロニー変異 体の占める割合		
溶媒対照 0		-	100.00	1.00	78.46	有意差 な し	0.50		
12.5			107.95	突然変異発現期間以降の培養を行わず。			—		
25			109.42	突然変異発現期間以降の培養を行わず。			—		
50			112.91	1.10	70.44		—		
75			93.56	0.80	67.42		—		
100			77.55	0.77	73.42		—		
125			75.93	0.90	72.93		—		
150			44.96	0.48	77.80		—		
陽性 対照 (NQO)	0.05	+	64.62	0.53	596.50	* * *	0.52		
0.1			41.47	0.21	1073.99		0.55		
溶媒対照 0		+	100.00	1.00	68.55	* * *	0.48		
3.125			90.87	0.84	77.61		—		
6.25			79.00	0.71	85.68		—		
12.5			62.08	0.39	118.75 (↑)		0.62		
25			32.76	0.14	240.87 (↑)		0.65		
37.5			6.19	(0.00)	(377.91)		—		
50			5.12	突然変異発現期間以降の培養を行わず。			—		
陽性 対照 (BP)	2		64.62	0.53	596.50		0.55		
3			41.47	0.21	1073.99		0.55		

(\*) : 強い細胞毒性のため、統計学的検定から除外した。

統計学的検定： 突然変異発現頻度 - Dunnett の多重比較検定, ↑↓ :  $p < 0.05$ , ⇧↓ :  $p < 0.01$ , ⇧↑ :  $p < 0.001$

傾向検定(正) - 加重回帰分析、\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$

表 2 (試験 II)

処理用量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9mix の有無	相対生存率 (RS) %	相対総増殖率 (RTG) %	突然変異頻度 (MF) ( $\times 10^6$ )	傾向検定	小コロニー変異 体の占める割合	
溶媒対照 0	-	100.00	1.00	106.54		0.55	
50		88.75	1.10	111.08		—	
75		74.92	[0.74]	[123.21]		—	
100		60.46	0.70	105.66		—	
125		40.66	0.31	97.03	有意差 な し	—	
150		10.88	0.17	120.16		—	
175		1.69	突然変異発現期間以降の培養を行わず。			—	
200		0.93	突然変異発現期間以降の培養を行わず。			—	
陽性対照 (NQO) 0.05		84.48	0.78	499.20		0.53	
0.1		77.08	0.87	442.46		0.53	
溶媒対照 0	+	100.00	1.00	84.99		0.55	
6.25		88.80	0.64	71.91		—	
12.5		63.81	0.41	234.92 (↑)		0.59	
18.75		37.07	0.08	391.77 (↑)		0.75	
25		4.81	(0.01)	(529.64)	***	0.84	
31.25		7.17	(0.01)	(410.87)		0.82	
37.5		6.06	突然変異発現期間以降の培養を行わず。			—	
43.75		7.66	突然変異発現期間以降の培養を行わず。			—	
陽性対照 (BP) 2		75.07	0.41	729.60		0.61	
3		37.11	0.36	752.75		0.63	

( ) : 強い細胞毒性のため、除外した。

[ ]: 系列間で顕著な不均一性が認められたため、統計学的検定から除外した。

統計学的検定： 突然変異発現頻度 - Dunnett の多重比較検定, ↑↓ :  $p < 0.05$ , ↑↓ :  $p < 0.01$ , ↑↓ :  $p < 0.001$

傾向検定 (正) - 加重回帰分析、\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$

陽性対照 ; BP : ベンゾ(a)ピレン、NOQ : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

2) 染色体異常

ヒト末梢血リンパ球培養細胞を用いた *in vitro* 染色体異常誘発試験

(資料No. 9-3)

試験機関 : Covance Laboratories Limited (英)

[GLP]

報告書作成年 : 1999年

検体の純度 :

試験方法 : *in vitro*において、男女のドナーから提供されたヒトリンパ球培養細胞を用いて、代謝非活性化 (S9 mix-) 及び活性化 (S9 mix+) における独立した2回の試験 (試験 I 及び試験 II) を行い、検体の染色体異常誘発性を評価した。

用いた代謝活性化系は、Arochlor1254で誘導した雄ラット肝臓のポストミトコンドリア画分 (S9) であった。検体はDMSOに溶解した。本試験は独立した2試験 (試験 I および試験 II) から構成されている。

ヘパリン処理したヒト血液にフィトヘマグルチニンを加え、37°Cで48時間培養した。

染色体異常観察に供する検体の最高濃度は、試験 I および試験 II において、分裂指数を50~80%抑制する濃度または検体の溶媒に対する溶解限度 ( $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) とした。染色体異常観察に供した検体濃度は、次のとおりであった。

試験 I :

S9- (処理20時間+回復0時間) : 2.907, 4.152, 5.932  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
S9+ (処理3時間+回復17時間) : 147, 210, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$

試験 II :

S9-①(処理20時間+回復0時間) : 22.53, 30.03, 40.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
S9-②(処理3時間+回復17時間) : 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
S9+ (処理3時間+回復17時間) : 168.8, 225, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$

陽性対照として、S9-では4-ニトロキノリン 1-オキシド (NQO) を $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9+ではシクロホスファミド (CPA) を $252.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ を供した。

陰性対照として、溶媒 DMSOを用いた。陽性対照および陰性対照の細胞採取までの時間は、各検体処理群と同様に行った。

試験結果 : 結果を表 1 (試験 I) 及び表 2 (試験 II) に示した。

構造異常

S9 mix-で検体をヒトリンパ球培養細胞に処理したところ、試験 I 及び試験 II とも染色体異常を有する細胞が、統計学的に有意に増加した。3時間処理及び20時間処理とも、影響が認められた。

S9 mix+で検体をヒトリンパ球培養細胞に処理したところ、全ての濃度で大きなかつ再現性のある染色体異常を有する細胞の増加が認められた。

数的異常

試験 II の S9 mix+において、検体を処理した細胞に数的異常を有する細胞数の軽度の増加がみとめられた。これらの変化は、用量相関性が低く、試験 I では認められなかったことから、生物学的意義がないと考えられた。

以上の結果から、検体は、本試験条件下でヒトリンパ球培養細胞に対して染色体異常の誘発を示した。代謝活性化では、最も明瞭な影響が認められた。

表 1 (試験 I)

薬物	用 量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	S9 mix の有無	処理 時間 + 回復 時間	観察 細胞数	分裂 指 数	構造異常				ギャップ を含めた 異常細胞 総 数	ギャップ を除いた 異常細胞 総 数	ギャップを 除いた異常 細胞の割合	数的異常				
						ギャ ップ	染色体型	染色分体型	その 他				観 察	異常(高二倍、核 内倍化、倍数体) 細胞数	細 胞 (%)		
						欠失	交換	欠失	交換								
溶媒 (DMSO)	2.97	-	20 hr	400	3.6	5	2	0	8	2	0	17	12	0.030	402	0.5	
				200	3.0	6	3	0	3	0	0	11	5	0.025	200	0	
	4.152		+	200	1.8	7	0	0	10	0	0	16	10	0.050	200	0	
			0 hr	200	1.2	17	2	0	14	0	0	23	12	0.060(*)	202	1.0	
	5.932			50	-	2	3	0	10	3	0	11	11	0.220(**)	50	0	
陽性対照 (NQO)	2.5	+	3 hr	200	5.9	2	2	0	2	0	0	6	4	0.020	200	0	
				200	3.2	24	3	0	46	1	3	46	35	0.175(***)	201	0.5	
	210		+	200	3.1	25	8	1	51	1	0	57	43	0.215(***)	202	1.0	
			17 hr	200	1.6	32	3	1	60	1	0	64	42	0.210(***)	201	0.5	
	25			50	-	10	6	1	43	2	4	29	28	0.560(***)	50	0	

(\*) :  $p \leq 0.05$ , (\*\*):  $p \leq 0.01$ , (\*\*\*) :  $p \leq 0.001$  (Fisherの直接確率検定),

陽性対照 NQO : 4-ニトキナリン 1-オキド, CPA : シクロホスファミド

表 2 (試験 II)

薬物	用 量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	S9 mix の有無	処理 時間 + 回復 時間	観察 細胞数	分裂 指 数	構造異常					ギャップ を含めた 異常細胞 総 数	ギャップ を除いた 異常細胞 総 数	ギャップを 除いた異常 細胞の割合	数的異常		
						ギャ ップ	染色体型 欠失	染色分体型 交換	その 他	観 察 細胞数	異常(高二倍、核 内倍化、倍数体) 細胞 (%)					
溶媒 (DMSO)	22.53	—	20 hr	200	4.1	8	1	0	4	0	0	10	4	0.020	204	2.0
				200	2.3	8	3	1	5	0	0	14	8	0.040	202	1.0
	30.03		+	200	2.3	5	2	0	8	0	0	12	9	0.045	200	0
	40.05		0 hr	200	1.5	15	0	0	15	0	0	25	13	0.065(**)	203	1.5
陽性対照 (NQO)	2.5	—	3 hr	50	—	5	2	0	19	7	3	18	17	0.340(***)	52	3.8
溶媒 (DMSO)				200	5.7	3	0	0	1	0	0	4	1	0.005	203	1.5
検 体	300		17 hr	200	2.7	6	0	1	16	0	0	21	16	0.080(***)	206	2.9
溶媒 (DMSO)	168.8	+ —	3 hr	200	5.6	2	2	1	2	0	0	7	5	0.025	204	2.0
				200	3.6	13	2	1	33	3	0	32	26	0.130(***)	208	3.8
	225		+	200	3.0	21	5	0	24	0	0	36	24	0.120(***)	205	2.4
	300		17 hr	200	1.3	12	5	0	25	1	0	30	23	0.115(***)	207	3.4
陽性対照 (CPA)	25	—	3 hr	50	—	15	7	0	32	2	1	24	20	0.400(***)	54	7.4

(\*) :  $p \leq 0.05$ , (\*\*) :  $p \leq 0.01$ , (\*\*\*) :  $p \leq 0.001$  (Fisherの直接確率検定) ,

陽性対照 NQO : 4-ニトキノリン 1-オキド, CPA : シクロヌスマミド

マウスを用いた腹腔内投与後的小核試験

(資料No. 9-4)

試験機関 : Covance Laboratories Limited(英)  
報告書作成年 : 1999年[GLP]

検体の純度 :

試験動物 : CD-1系マウス、5~6週齢、1群雌雄各10匹

体重(投与1日目) 雄26~32 g、雌21~28 g

試験方法 : 予備試験

従って、本試験では500、1000及び2000mg/kgの用量を、毎日1回の割合で2日間、マウスに腹腔内投与した。第2回の投与後24及び48時間に群当たり雌雄5匹ずつ屠殺し、大腿骨から骨髄の塗沫標本を作製した。

溶媒対照として0.5%カルボキシメチルセルロースを、マウス雌雄各10匹に毎日1回の割合で2日間腹腔内投与した。第2回の投与後24及び48時間目に、検体投与群と同様に標本を作製した。

陽性対照としてシクロホスファミドを40mg/kgの用量で、マウス雌雄各5匹に単回腹腔内投与し、投与後24時間で屠殺して検体投与群と同様に標本を作製した。

塗沫標本は、無水メタノール固定後にギムザ染色し、次のとおり検査した。

- 1) 各動物につき、1000個の総細胞数（多染性赤血球：PCE+正染性赤血球：NCE）を計測し、多染性赤血球（PCE）と正染性赤血球（NCE）の相対比（多染性赤血球/正染性赤血球比：PCE/NCE比）を求める。
- 2) 2000個の多染性赤血球のうち、このうち小核を有する多染性赤血球の数
- 3) 多染性赤血球1000個当たりのうち、小核を有する多染性赤血球数の頻度（MNPCE頻度）

結果の判定に際して、次の項目に該当する場合は陽性とした。

- ① 標本作製時点において、少なくとも1用量で、MNPCE頻度に統計学的に有意な増加が認められる場合。
- ② 上記①の場合、MNPCE頻度が、溶媒対照の歴史的背景データを越える場合。

試験結果 : 結果を次頁の表に示した。

検体投与群に、死亡は認められなかった。

2000mg/kg投与群では、毒性徵候として嗜眠、円背位、閉瞼及び腹部膨満が認

められた。

検体投与群におけるMNPCE頻度の群平均は、溶媒対照群と同様であり、有意差は認められなかった。一方、陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球の頻度が増加した。

PCE/NCE比は、第2回投与後24時間目において、用量に相関して減少した。さらに最高用量(2000mg/kg)群の雄では、第2回投与後48時間目において、PCE/NCE比が減少した。

以上の結果から、マウスに明確な骨髓毒性が認められる2000mg/kgの用量まで検体を投与しても、骨髓における多染性赤血球に小核を誘発しないと考えられ、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

#### マウスを用いた小核試験の結果

薬物	投与後 経過時間	投与量 mg/kg	性別	観察 動物数	PCE/NCE比	MNPCE頻度	
						性別	群
陰性対照	24	0	雄	5	1.22	0.40	0.65
			雌	5	1.26	0.90	
		500	雄	5	0.80	0.30	0.55
			雌	5	1.25	0.80	
		1000	雄	5	0.80	0.80	0.60
			雌	5	1.10	0.40	
		2000	雄	5	0.68	0.20	0.70
			雌	5	0.47	1.20	
	48	0	雄	5	0.99	1.00	0.80
			雌	5	1.29	0.60	
		500	雄	5	0.95	0.30	0.40
			雌	5	1.08	0.50	
		1000	雄	5	0.85	0.20	0.35
			雌	5	1.28	0.50	
		2000	雄	5	0.62	0.10	0.20↓
			雌	5	0.90	0.30	
陽性対照	24	40	雄	5	1.06	14.10	14.75↑↑
			雌	5	1.06	15.40	

↑↑ :  $P \leq 0.001$  (2×2分割  $\chi^2$  検定)

↓ :  $P \leq 0.05$  (2×2分割  $\chi^2$  検定), 統計学的に有意差が認められたに過ぎず、生物学的有意差は無いものと考えられる。

陽性対照: シクロホスファミド

### 3) DNA損傷誘発性

#### 細菌を用いたDNA修復試験

(資料No. 9-5)

試験機関：(財)食品農医薬品安全性評価センター  
報告書作成年：2000年[GLP]

#### 検体の純度：

試験方法：枯草菌*Bacillus subtilis* の組換修復機構保有の野生株(H17, Rec+)と欠損株(M45, Rec-)を用い、代謝活性化系の存在下(S9mix+)及び非存在下(S9mix-)でDNA損傷の誘発性を検討した。検体を溶解させるため、アセトニトリルを用いた。

#### 用量設定試験

従って、代謝活性化系の非存在下では $4305\text{ }\mu\text{g}/\text{ディスク}$ を最高用量とし、代謝活性化系の存在下では $2153\text{ }\mu\text{g}/\text{ディスク}$ を最高用量として、それぞれ各6用量(公比2)を設定した。

陰性対照としてカナマイシンを用いた。陽性対照として、代謝活性化系の非存在下ではマイトマシンCを、代謝活性化系の存在下ではTrp-P-1を用いた。

各用量及び各対照群は3ディスクで実施した。

結果の解析：M45株のH17株に対する生育阻止円直径の比が1.2以上、かつ生育阻止円直径の差が2mm以上4mm未満を擬陽性、4mm以上を陽性と判定した。

試験結果：結果を次表に示した。

溶解限度濃度まで検討した結果、代謝活性化系の非存在下及び存在下において、検体処理による試験菌株に対する生育阻害作用が認められなかった。一方、陽性対照群における生育阻止円直径の差は、マイトマシンCで10.8mm、Trp-P-1で12.9mmであり、生育阻止円直径の比はそれぞれ1.2以上であった。

なお代謝活性化系の有無に係わらず、 $538\text{ }\mu\text{g}/\text{ディスク}$ 以上の用量でディスク上に析出物が観察されたが、培地中への検体の拡散量は十分であると考えられた。

以上の結果から、検体は、本試験条件下において枯草菌に対しDNA損傷の誘発性を示さないと考えられた。

(n=3の平均値)

化合物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	S9の 有無	阻止帯の径 (mm)		差 # (mm)
			M-45(Rec+)	H17(Rec-)	
<hr/>					
溶媒対照 アセトニトリル	0	-	0.0	0.0	0.0
検 体	135	-	0.0	0.0	0.0
	269	-	0.0	0.0	0.0
	538 *	-	0.0	0.0	0.0
	1076 *	-	0.0	0.0	0.0
	2153 *	-	0.0	0.0	0.0
	4305 *	-	0.0	0.0	0.0
陰性対照 カナマイシン	0.3	-	6.4	4.9	1.6
陽性対照 マイトマイシンC	0.02	-	10.8	0.0	10.8
<hr/>					
溶媒対照 アセトニトリル	0	+	0.0	0.0	0.0
検 体	67.3	+	0.0	0.0	0.0
	135	+	0.0	0.0	0.0
	269	+	0.0	0.0	0.0
	538 *	+	0.0	0.0	0.0
	1076 *	+	0.0	0.0	0.0
	2153 *	+	0.0	0.0	0.0
陽性対照 Trp-P-1	20	+	12.9	0.0	12.9

\* : 析出物が確認された。

# : 「M-45(Rec+)の阻止帯の径」 - 「H17(Rec-)の阻止帯の径」

分離ラット肝培養細胞を用いた *in vitro* 不定期DNA合成試験

(資料No. 9-6)

試験機関 : Covance Laboratories Limited(英)  
報告書作成年 : 1999年[GLP]

検体の純度 :

試験方法 : Wister系ラット雄3匹を屠殺し、その肝臓をコラゲナーゼで灌流し、肝細胞懸濁液を得た。平均生存率が70%以上で1ml当たりの生存細胞数が最も高い懸濁液を用いて初代培養細胞を調製した。

溶媒(DMSO)、陽性対照化合物2-アセトアミドフルオレン(2-AAF)又は検体溶液を及び<sup>[3]H</sup>チミジンを培養細胞に処理した。一夜培養した後、肝細胞を固定してスライドを作成し、写真用乳化剤に浸漬してオートラジオグラムを作成した。現像及び染色した後に、鏡検下で各濃度群のスライド別に核上の正味銀粒子数(NNG)、即ち「核上の銀粒子数」から「細胞質上における3領域の平均銀粒子数」を減じた値」を鏡検下で測定/算出した。また修復細胞率、即ち正味銀粒子数(NNG)が5以上である細胞の百分率を算出した。

なお、検体処理群及び陽性対照群のスライドは3枚、溶媒対照群のスライドは5枚を用い、スライド当たり細胞50個について調査した。

試験は2試験(試験I及びII)を行った。

試験Iでは、最終濃度0.064、0.32、1.6、8.0、40、200、1000及び5000μg/mlの8濃度群で試験した。

高濃度の4群(40~5000μg/ml)で極めて強い細胞毒性が認められたことから、不定期DNA合成の評価は低濃度の5群(最終濃度: 0.064、0.32、1.6、8.0及び40μg/ml)について行った。

試験IIでは、最終濃度1.25、2.5、5、10、20及び30μg/mlの6濃度群で試験した。高濃度群の3群(10~30μg/ml)で細胞毒性が認められたことから、不定期DNA合成の評価は低濃度の4群(最終濃度: 1.25、2.5、5及び10μg/ml)について行った。

試験の判定として、次II該当する場合は陽性と判断した。

- 1) 検体投与群で、群平均の正味銀粒子数が0以上を示し、かつ修復細胞率が20%以上である場合。
- 2) 正味銀粒子数及び修復細胞率に、濃度に関連した増加が認められる場合。
- 3) 別個に独立した試験で、不定期DNA合成の誘導に再現性が認められる場合。

試験結果: 結果を次表に示した。

試験Iにおいて、検体を40μg/mlまでの濃度で処理しても、群平均の正味銀粒子数は陽性反応の閾値である0を下回り、-8.0~-5.7であった。各検体処理群の修復細胞率は1.3%以下であった。

試験IIにおいて、検体を10μg/mlまでの濃度で処理しても、群平均の正味銀粒子数は陽性反応の閾値である0を下回り、-6.9~-2.0であった。各検体処理群の修復細胞率は4.7%以下であった。

溶媒対照群では、群平均の正味核上銀粒子数が試験Ⅰで-8.6、試験Ⅱで-7.3と両方とも0以下であった。

陽性対照群では、群平均の正味核上銀粒子数が試験Ⅰで17.1、試験Ⅱで16.6であり、また修復細胞率は試験Ⅰで93.3%、試験Ⅱで96.7%であった。

以上の結果から、検体は本試験条件下の不定期DNA合成試験において陰性であると判断される。

(n=5の平均値)

	用量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	核上銀粒子数	細胞質上銀粒子数	核上正味銀粒子数	細胞修復率
試験 I	溶媒対照 (DMSO)	13.74	22.34	-8.6	1.6
	0.064	9.91	17.91	-8.0	-
	0.32	6.24	12.29	-6.1	1.3
	1.6	8.47	16.10	-7.6	0.7
	8	8.32	16.04	-7.7	-
	40	10.27	15.97	-5.7	-
試験 II	陽性対照 (2-AAF)	31.89	14.78	17.1	93.3
	溶媒対照 (DMSO)	7.28	14.59	-7.3	1.2
	1.25	8.63	15.53	-6.9	0.7
	2.5	8.38	14.06	-5.7	2.0
	5	8.89	13.72	-4.8	4.7
	10	3.38	5.41	-2.0	2.7
陽性対照 (2-AAF)		31.01	14.38	16.6	96.7

*in vivo / in vitro* 法を用いた分離ラット肝細胞における不定期DNA合成試験(資料No. 9-7)

試験機関: Covance Laboratories Limited(英)

[GLP]

報告書作成年: 1999年

検体の純度:

試験動物: Wister系雄ラット、6~7週齢、体重: 190~263 g、1群5匹

試験方法: 予備試験として、検体を2000mg/kgの用量で単回経口投与した。投与後4日間の観察で、毒性症状は認められなかった。

従って、本試験の最高用量を2000mg/kg、低用量を800mg/kgとした。

溶媒として0.5%カルボキシメチルセルロースを用いた。

本試験は2試験(試験I及び試験II)実施した。

試験Iでは、単回経口投与後12~14時間でラットを屠殺し、各群5匹中3匹から肝臓を採取した。肝臓をコラゲナーゼで灌流して初代肝細胞を得た。また試験Iにおける陽性対照として、コーン油で懸濁させた2-アセトアミドフルオレン(2-AFF)を75mg/kgの用量でラットに経口投与した。

試験IIでは、投与後2~4時間でラットを屠殺し、試験Iと同様に初代肝細胞を得た。また試験IIにおける陽性対照として、純水に溶解したジメチルニトロソアミン(DMN)を10mg/kgの用量でラットに経口投与した。

肝初代細胞は、約4時間培養した後に<sup>3</sup>H]チミジン0.25mMで3回洗浄した。固定された細胞を用いて、各動物につき6枚のスライドを作成し、このうち3枚についてオートラジオグラムを作成した。現像及びヘマラム/エオジンYで染色した後、鏡検下で正味銀粒子数(NNG)を及び修復細胞率を求めた。

正味銀粒子数 = “核上の銀粒子数” - “細胞質上における3領域の平均銀粒子数”

修復細胞率 = 正味銀粒子数(NNG)が5以上である細胞の百分率

試験の判定として、次に該当する場合は陽性と判断した。

- 1) 検体投与群で、正味銀粒子数が0以上を示し、かつ修復細胞率が20%以上である場合。
- 2) 正味銀粒子数及び修復細胞率に、濃度に関連した増加が認められる場合。

試験結果：結果を次表に示した。

試験Ⅰ及び試験Ⅱにおいて、検体を800及び2000mg/kgの用量で投与した場合、検体投与群の正味銀粒子数は0以下であり、その範囲は-6.4～-2.4であった。また修復細胞率は、1.0%以下であった。

陽性対照群の正味銀粒子数は、試験Ⅰで18.5(2-AAF)、試験Ⅱで15.0(DMN)であった。また修復細胞率は、試験Ⅰで97.7%(2-AAF)、試験Ⅱで94.3%(DMN)であった。

以上の結果から、検体は本試験条件下の不定期DNA合成試験において陰性であると判断される。

(n=3の平均値)

	用量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	屠殺時間 (hr)	核上銀 粒子数	細胞質上 銀粒子数	核上正味 銀粒子数	細胞修復率
試験Ⅰ	溶媒対照 (0.5%CMC)	12～14	3.82	7.19	-3.4	0.3
	800		5.88	10.71	-4.8	1.0
	2000		6.48	12.87	-6.4	0.7
	陽性対照(2-AAF)		27.51	9.05	18.5	97.7
試験Ⅱ	溶媒対照 (0.5%CMC)	2～4	2.53	5.36	-2.8	-
	800		3.17	5.61	-2.4	0.7
	2000		2.64	6.27	-3.6	0.3
	陽性対照(DMN)		20.27	5.28	15.0	94.3

CMC : カルボキシメチルセルロース

2-AAF : 2-アセトアミドフルオレン

DMN : ジメチルニトロソアミン