

(8)繁殖毒性及び催奇形性

1)繁殖性に及ぼす影響

ジノテフラン原体(MTI-446)のラットを用いた繁殖試験

(資料 6-1-1)

試験機関： 実医研

(GLP 対応)

報告書作成年： 2000 年

検体純度：

試験動物： CD(SD)IGS 系ラット(投与開始時雄 6 週齢、雌 5 週齢)

P 世代； 1 群雌雄各 30 匹、 F₁ 世代； 1 群雌雄各 25 匹

試験期間： 1997 年 10 月 30 日～1998 年 7 月 15 日

投与期間： P 世代； 投与開始から F₁ 児離乳時までの約 18 週間

F₁ 世代； 離乳時から F₂ 児離乳時までの約 18 週間

投与方法： 検体の 0、200、2000 及び 20000ppm を含有した飼料を自由摂取させた。

<投与量の設定>

試験方法及び試験項目： 概要を表にまとめた。

一般状態及び死亡率； 全動物について毎日 2 回観察した。

体重； 雄は全投与期間を通じて週 1 回、雌では育成期間中は週 1 回、交尾後は妊娠 0、7、14 及び 20 日、分娩後 0、4、7、14 及び 21 日及び剖検日に測定した。

摂餌量； 育成期間中は雌雄とも週 1 回、交尾後は雌で妊娠 7、14 及び 20 日、分娩後 7、14 及び 21 日に測定した。

検体摂取量； 体重及び摂餌量から 1 日の検体摂取量を算出した。

飲水量； 育成期間中、全動物の飲水量を週 1 回、1 日量を測定した。

交尾及び妊娠の確認； 同群内の雌雄 1 対 1 で同居させ、朝、膣垢中に精子を認めた場合に交尾成立とし、その日を妊娠 0 日とした。

繁殖性に関する項目；

性周期； 休止期、発情前期、発情期、発情後期に区分し、発情期数をカウント

雌雄の交尾率(%)； (交尾した動物数/交配に用いた動物数)×100

雌の妊娠率(%)； (妊娠した動物数/交尾雌動物数)×100

雄の妊娠率(%)； (妊娠させた動物数/交尾雄動物数)×100

出産率(%)； (生存児を出産した雌動物数/妊娠した雌動物数)×100

妊娠期間； 交尾を認めた日から分娩までの日数

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

着床数；剖検時の子宮内の着床痕数

出生率(%)；(出産生存児数/着床数)×100

性比(%)；(雄の出産生存児数/全出産生存児数)×100

哺育中の児動物の観察；全児動物について以下の項目を検査した。なお、出生日を生後 0 日とした。

出生日観察；生存児数、死産児数、外表観察、生存児体重

4 日生存率(%)；[生後 4 日(調整前)の生児数/出産生存児数×100]

離乳時の生存率(離乳率、%)；

[生後 21 日の生存児数/生後 4 日(調整後)の生児数×100]

児体重；生後 4 日、7、14 及び 21 日に個体別に測定し母体ごとに雌雄別に平均値を算出

生後の発育分化；耳介開展は生後 5 日以降、皮膚毛生は生後 10 日以降、切歯萌出及び眼瞼開裂は生後 15 日以降、陰茎と包皮の分離は生後 28 日以降、膣開口は生後 35 日以降に観察

機能検査；生後 21 日に全生存児の以下の項目について実施した。

歩行状態、自発運動、姿勢、耳介反射、角膜反射、面正向反射、空中落下正向反射、聴覚性驚愕反射、対光反射及び疼痛反射

剖検；全親動物及び全児動物について実施した。各世代の親動物は児動物の離乳後、児動物については死亡時及び次世代用の親として選抜されなかったものにつき生後 4 日または離乳時に屠殺剖検した。

臓器重量；各世代すべての親動物について剖検後に以下の臓器重量を測定し、対体重比を算出した。また、F₁ 及び F₂ 児動物については離乳時に各腹雌雄各 1 匹の脳、脾臓、胸腺の重量を測定し、対体重比を算出した。

脳、下垂体、心臓、肺、胸腺、肝臓、腎臓(左右)、副腎(左右)、脾臓、精巣(左右)、精巣上体(左右)、精囊・凝固腺、前立腺または子宮、卵巢(左右)

病理組織学的検査；各世代の対照群及び 20000ppm 投与群の全ての親動物について下記の項目を検査した。

下垂体、精巣(左右)、精巣上体(左右)、精囊・凝固腺、前立腺、膣、子宮(体部、頸管部)、卵巢(左右)、全投与群の副腎(左右)及び肉眼的異常部位

試験方法の概要:

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
P	生育(10週)	雄6週齢、雌5週齢より投与開始	体重、餌、水を週1回測定 一般状態、生死の観察:毎日2回
	交配(3週)	雌雄1対1で3週間交配、未交尾の場合は別の雌雄と1週間再交配。交尾は腔垢中の精子の存在で確認する(妊娠0日)	性周期、交尾率、妊娠率、一般状態の観察、体重の測定
	妊娠(3週)		一般状態の観察、妊娠0, 7, 14および20日に体重測定、7, 14および20日に餌測定
	出産		出産状況の観察 妊娠期間、出産率、生存児数、死産児数、外表異常、性別、出生率および生存児の個別体重測定
F ₁	哺育(3週)		親動物の一般状態の観察、分娩後0, 4, 7, 14および21日に体重測定、7, 14および21日に餌測定
		生後4日目に各同腹児を8匹に調整(可能な限り雄4匹、雌4匹)	児動物の生死の確認(4日生存率、離乳時生存率)、生後4, 7, 14および21日に個別に体重測定、発育分化の観察(耳介開展、皮膚毛生、切歯萌出、眼瞼開裂、陰茎と包皮の分離、陰開口)、途中死亡および4日目屠殺の新生児について剖検
	離乳(生後21日)	継代用の各群雌雄各25匹ずつを各腹から1~2匹を無作為に選抜	P動物雌雄の剖検(F ₁ 離乳後実施)、雌の着床痕数の計数、臓器重量測定(雌雄全例の脳、下垂体、心臓、肺、胸腺、肝臓、腎臓左右、副腎左右、脾臓、精巣左右、精巣上体左右、精囊・凝固腺、前立腺、子宮、卵巣左右)、病理組織学的検査(対照群と最高用量群の下垂体、精巣) 離乳児全例の機能検査(歩行状態、自発運動、姿勢、耳介反射、角膜反射、面正向反射、空中落下正向反射、聴覚性驚愕反射、対光反射および疼痛反射)、継代用以外の児動物を屠殺、剖検、各腹雌雄各1匹の臓器重量測定(脳、脾臓、胸腺)
	生育(10週) 交配(3週) 妊娠(3週)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
F ₂	出産 哺育(3週) 離乳	(P~F ₁ 世代に準ずる) F ₁ 親動物とF ₂ 児動物を全例屠殺	(P~F ₁ 世代に準ずる) 生殖器の分化観察は実施しなかった。 F ₂ 全児動物の剖検、各腹雌雄各1匹の臓器重量測定(脳、脾臓、胸腺)

結 果:

検体摂取量; 各投与群の育成期間中の平均検体摂取量は以下の通りである。

投与量(ppm)	世代	雄(mg/kg/day)	雌(mg/kg/day)
200	P	16.2	18.4
	F ₁	21.4	21.9
2000	P	164	190
	F ₁	210	220
20000	P	1690	1840
	F ₁	2170	2230

試験結果; 結果の概要を次頁以降の表に示した。また、投与群において検体投与によると考えられる所見は次の通りであった。

20000ppm 投与群

親動物

P 及び F₁ 親動物の雌雄で体重増加抑制、P 動物の雌、F₁ 親動物の雄及び妊娠中の F₁ 雌動物で摂餌量の減少、雌雄の P 動物で飲水量の減少が認められた。

臓器重量においては、P 動物の雌で下垂体及び胸腺の絶対及び相対重量の減少、F₁ 親動物の雌で胸腺及び心臓の絶対及び相対重量の減少が認められた。その他の雌雄で認められた臓器重量の変動は、低体重による変化あるいは絶対及び相対重量が連動しない変化であったため、検体の影響ではないと判断された。

児動物

F₁ 及び F₂ 動物とも哺育期間中の雌雄に体重増加抑制が認められた。

離乳時の臓器重量においては、F₁ 動物で雌雄に胸腺及び脾臓絶対重量の減少及び雄の脾臓相対重量の減少、F₂ 動物ではさらに雌の脾臓相対重量の減少も認められた。

2000ppm 投与群

いずれの検査においても検体投与によると考えられる変化は認められなかった。

200ppm 投与群

いずれの検査においても検体投与によると考えられる変化は認められなかった。

なお、親動物の繁殖能に対する影響は各世代とも認められなかった。

以上の結果より、ラットに 2 世代に渡りジノテフラン(MTI-446)原体を混餌投与した場合、P、F₁ 及び F₂ 動物とも 20000ppm 投与で体重増加抑制が認められたが、2000ppm 投与では変化が認められなかったことから、最大無毒性量は 2000ppm(P 世代: 雄 164mg/kg/day、雌 190mg/kg/day、F₁ 世代: 雄 210mg/kg/day、雌 220mg/kg/day)と考えられた。一方、繁殖能に対する最大無作用量は 20000ppm(P 世代: 雄 1690 mg/kg/day、雌 1840mg/kg/day、F₁ 世代: 雄 2170mg/kg/day、雌 2230mg/kg/day)と考えられた。

[腎臓の病理組織変化について]

F₁ 親動物の剖検において、対照群を含む各投与群の雄で 25 例中 5～9 例に腎盂拡張が認められた。各投与群における腎盂拡張の発現率には対照群と比べて差は認められなかったが、腎盂拡張例の病理組織学的検査においては各投与群で乳頭部の石灰化及び線維化、尿路上皮の剥離及び過形成、腎盂の出血などが対照群に比べて高頻度に認められた。しかし、これらの変化には用量反応性が認められず、また病理組織学的検査の対象となった動物数も少なく、被験物質投与との関連が不明確であった。そこで、泌尿器系への影響を体系的に見る事を目的とした本試験の追加試験(資料 No. 6-1-2)を計画・実施した。その結果、P 及び F₁ 親動物の腎臓、尿管及び膀胱の病理組織学的検査では、乳頭部の石灰化及び線維化、尿路上皮の剥離及び過形成、腎盂の出血の発現頻度及び程度に対照群及び各投与群間で差は認められなかった。従って、腎臓の組織学的変化について再現性が認められないことから、本試験でみられた腎臓の変化は被験物質投与と関連しないものと考えられた。

次表に本試験及び追加試験における腎臓の病理組織学的検査結果を示した。

2 世代繁殖試験 (PROJECT No. H-97167)

投与量 (ppm)	0	200	2000	20000	0	200	2000	20000
	P (18 週齢)				F ₁ (18 週齢)			
検査例数	0	1 ^a	1 ^b	0	6 ^a	5 ^a	9 ^a	7 ^a
乳頭部の石灰化	/	0	0	/	1	4	8	5
乳頭部の線維化	/	0	0	/	0	2	5	6
尿路上皮の剥離	/	0	0	/	1	3	4	6
尿路上皮の過形成	/	0	0	/	1	4	5	7

剖検で腎臓に異常の認められた例を観察した。 a; 腎盂拡張, b; 変色 /: 検査せず

2 世代繁殖試験追加試験 (PROJECT No. H-99019)

投与量 (ppm)	0		2000	20000	0		2000	20000
	P (18 週齢)				F ₁ (18 週齢)			
動物数	10		10	10	10		10	10
乳頭部の石灰化	0		0	0	1		1	2
乳頭部の線維化	0		0	0	0		0	1
尿路上皮の剥離	0		0	0	0		0	1
尿路上皮の過形成	0		0	0	3		1	3
					F ₁ (10 週齢)			
動物数					10		10	10
乳頭部の石灰化					1		3	0
乳頭部の線維化					1		1	1
尿路上皮の剥離					0		1	0
尿路上皮の過形成					1		4	1

全例を観察した。

繁殖試験結果概要：

世代				P				F ₁			
投与量 (ppm)				0	200	2000	20000	0	200	2000	20000
親動物	動物数		雄	30	30	30	30	25	25	25	25
			雌	30	30	30	30	25	25	25	25
	一般状態	雄		—	—	—	—	—	—	—	血尿 2 鼻出血 1
				—	—	—	—	眼脂 1	—	—	—
		雌	交配前	—	—	—	—	眼脂 1	—	—	—
			妊娠中	—	—	—	—	眼脂 1	—	眼脂 1	—
		哺育中	—	—	—	—	—	—	—	血尿 2	
	死亡	雄		0	0	0	0	0	0	0	2 事故・ 切迫殺
				0	1	0	1	0	0	2	0
		雌		0	全児死亡 切迫殺	0	全児死亡 切迫殺	0	0	全児死亡 全胚死亡 切迫殺	
	体重	雄			—	—	1-16 週 ↓ ~ ♀		1 週 ↓	1 週 ↓	0-17 週 ↓
					—	—	1-10 週 ↓		6 週 ↑	—	0-10 週 ↓
		雌	交配前		—	—	—		6 週 ↑	—	0-10 週 ↓
			妊娠中		—	—	0-3 週 ↓		1 週 ↑	—	0-3 週 ↓
		哺育中		—	4 日 ↓ 2 週 ↓	0-3 週 ↓		—	—	0-2 週 ↓ 3 週 ↓	
	摂餌量	雄			—	—	—		10 週 ↑	4 週 ↓	1-10 週 ↓ ~ ♀
				—	—	2, 4-6, 8-9 週 ↓ ~ ♀		3 週 ♀	10 週 ↑	—	
雌		交配前		—	—	—		3 週 ♀	10 週 ↑	—	
		妊娠中		—	—	1 週 ↓ 2 週 ↓		2 週 ♀	—	1 週 ↓ 3 週 ↓	
	哺育中		2 週 ↑	—	3 週 ↓		—	—	—		
飲水量	雄			—	—	3 週 ↓		1 週 ↓ 3 週 ↓	1 週 ↓ 3 週 ↓	—	
		雌		—	—	4, 8 週 ↓		—	—	—	

注) Dunnet の多重比較法、↑↓: p<0.05、↑♀: p<0.01

—: 変化が認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

世代				P				F ₁				
投与量 (ppm)				0	200	2000	20000	0	200	2000	20000	
親動物	臓器重量	雄	最終体重			—	—	95%		—	—	↓85%
			絶対	脳		—	—	—		—	—	↓97%
				胸腺		—	—	—		—	—	↓81%
				心臓		—	—	—		—	—	↓89%
				肺		↑106%	—	—		—	—	↓89%
				肝臓		—	—	—		—	—	↓82%
				脾臓		—	—	—		—	—	↓91%
				右腎臓		—	—	—		—	—	↓91%
				左腎臓		—	—	—		—	—	↓91%
			相対	脳		—	—	—		—	—	↑114%
				右腎臓		—	—	—		—	—	↑107%
				左腎臓		—	—	—		—	↑106%	↑107%
				左副腎		—	—	—		—	—	↑116%
				右精巣		—	—	—		—	—	↑114%
				左精巣		—	—	—		—	—	↑112%
				右精巣上体		—	—	—		—	—	↑112%
				左精巣上体		—	—	—		—	—	↑113%
			精囊		—	—	—		—	—	↑121%	
		雌	最終体重			—	—	↓94%		—	—	↓95%
			絶対	脳		—	—	↓98%		—	—	↓96%
				下垂体		—	—	↓83%		—	—	↓88%
				胸腺		—	—	↓64%		—	—	↓55%
				心臓		—	—	↓93%		—	—	↓89%
				肝臓		—	—	—		—	↓89%	—
				脾臓		—	—	↓90%		—	—	↓89%
				卵巣		—	—	—		—	—	—
			相対	脳		—	↑105%	↑104%		—	—	—
				下垂体		—	—	↓89%		—	—	—
				胸腺		—	—	↓69%		—	—	↓58%
				心臓		—	—	—		—	—	↓94%
				肝臓		—	—	—		—	↓92%	—
剖検	雄	腎臓		検体投与に関連した影響なし								
		腎盂拡張						6	5	9	7	
	雌	検体投与に関連した影響なし				検体投与に関連した影響なし						

注) Dunnet の多重比較法、↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01

臓器重量の数値(%)は対照群に対する百分比

—: 変化が認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

世代					P				F ₁				
投与量 (ppm)					0	200	2000	20000	0	200	2000	20000	
親 動 物	病理組織	雄	腎臓	乳頭部の石灰化	いずれの観察臓器でも 検体投与に関連した影響なし				1/6*	4/5	8/9	5/7	
				乳頭部の繊維化					0/6	2/5	5/9	6/7	
				尿路上皮の剥離					1/6	3/5	4/9	6/7	
				尿路上皮の過形成					1/6	4/5	5/9	7/7	
		雌			検体投与に関連した影響なし				検体投与に関連した影響なし				
		交尾率(%)		雄	100	100	100	100	100	100	100	100	100
				雌	100	100	100	100	100	100	100	100	
		妊娠率(%)		雄	93.3	100	96.7	100	100	100	96.0	100	
	雌			90.0	100	96.7	100	96.0	88.0	96.0	88.0		
	妊娠期間(days)			22.5	22.4	22.4	22.3	22.5	22.2	22.6	22.2		
	出産率(%)			100	100	100	100	100	100	95.8	100		
	着床数		総数	409	458	423	435	362	333	349	323		
			平均	15.1	15.3	14.6	14.5	15.1	15.1	14.5	14.7		

注) Dunnet の多重比較法、↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01

※: 発現例数/検査例数

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

世代			F ₁				F ₂					
投与量 (ppm)			0	200	2000	20000	0	200	2000	20000		
児 動 物	生存児数	総数	368	417	382	402	337	318	309	300		
		平均	13.6	13.9	13.2	13.4	14.0	14.5	12.9	13.6		
	死亡児数	総数	4	6	9	6	5	4	15	4		
	出生率(%)	平均	89.9	91.1	90.4	92.5	93.1	95.6	85.3	93.1		
	性比(%) 雄/全児動物		51.7	52.5	53.3	47.2	55.2	50.9	↓46.3	53.4		
	生存児の 体重(g)	雄	6.69	6.60	6.73	6.44	6.55	6.31	6.51	6.23		
		雌	6.30	6.25	6.30	6.08	6.27	5.96	6.18	5.88		
	外表異常	発現児数	6	0	0	0	3	↓0	↓0	↓0		
		頻度(%)	1.7	0	0	0	1	0	0	0		
	生存率(%)	4日目	93.5	93.7	96.9	96.8	97.1	91.9	93.5	98.4		
		離乳時	99.1	100	99.1	93.8	97.4	98.9	95.1	99.4		
	哺育期間の 体重	雄	4日		—	—	↓89%		—	—	↓86%	
			4日		—	—	↓89%		—	—	↓86%	
			7日		—	—	↓86%		—	—	↓85%	
			14日		—	—	↓92%		—	—	↓82%	
			21日		—	—	↓87%		—	—	↓80%	
		雌	4日		—	—	↓89%		—	—	↓85%	
			4日		—	—	↓89%		—	—	↓87%	
			7日		—	—	↓87%		—	—	↓85%	
			14日		—	—	↓90%		—	—	↓83%	
			21日		—	—	↓86%		—	—	↓82%	
	生後分化		—	—	—	—	—	—	—	—		
	離乳時機能検査		—	—	—	—	—	—	—	—		
	臓器重量	雄	最終体重		—	—	↓86%		—	—	↓80%	
				絶対	胸腺		—	—	↓87%		—	↓89%
脾臓				—	—	↓74%		—	—	↓71%		
相対			脳		—	—	↑115%		—	—	↑121%	
			脾臓		—	—	↓86%		—	—	↓88%	
雌			最終体重		—	—	↓85%		—	—	↓82%	
			絶対	脳		—	—	—		—	—	↓96%
				胸腺		—	—	↓86%		—	—	↓80%
		脾臓		—	—	↓78%		—	—	↓76%		
		相対	脳		—	—	↑115%		—	—	↑115%	
			脾臓		—	—	—		—	—	↓92%	

注) Dunnet の多重比較法、↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01

哺育期間中の体重(%)・臓器重量の数値(%)は対照群に対する百分比

—: 変化が認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

ジノテフラン原体 (MTI-446) のラットを用いた繁殖試験追加試験

(資料 6-1-2)

試験機関： 実医研

報告書作成年： 2000 年

試験目的： 当追加試験は、先に行われた「ジノテフラン原体 (MTI-446) のラットを用いた繁殖試験」(資料 6-1-1)において認められた F_1 親世代の腎臓所見の検体投与との関連を明らかにすることおよび検体の新生児神経系および精巣機能への影響を詳細に観察することを目的として行った。(申請者注)

検体純度：

試験動物： CD (SD) IGS 系ラット (投与開始時雄 6 週齢、雌 5 週齢)

P 世代； 1 群雌雄各 10 匹

F_1 世代； 10 週解剖群及び交配試験群とも 1 群雌雄各 10 匹

試験期間： 1999 年 2 月 12 日～1999 年 10 月 21 日

投与期間： P 世代； 投与開始から F_1 児離乳時までの約 18 週間

F_1 世代 (10 週解剖群)； 投与開始から剖検までの 10 週間

F_1 世代 (交配試験群)； 離乳時から F_2 児離乳時までの約 18 週間

投与方法： 検体の 0、2000 及び 20000ppm を含有した飼料を自由摂取させた。

< 投与量の設定 >

試験方法及び試験項目： 概要を表にまとめた。

一般状態及び死亡率； 全動物について毎日 2 回観察した。

神経毒性学的検査； F_1 世代 (10 週解剖群) の 9 週間投与後、各群雌雄全例について、Irwin の多次元観察法を参考に行動的プロフィール、神経学的プロフィール、自律神経的プロフィールなどの一般症状、握力検査、落下試験及び聴覚試験を実施した。

体重； 雄は全投与期間を通じて週一回、雌では育成期間中は週 1 回、交尾後は妊娠 0、7、14 及び 21 日、分娩後 0、7、14 及び 21 日及び剖検日に測定した。

摂餌量； 育成期間中は雌雄とも週一回、さらに雌では妊娠 7、14 及び 21 日、分娩後 1、7、14 及び 21 日に測定した。

検体摂取量； 体重及び摂餌量から 1 日の検体摂取量を算出した。

性周期； 各世代のすべての雌動物について投与開始 8 週間後から 14 日間の性周期を休止期、発情前期、発情期、発情後期に区分し、発情期数をカウントした。

尿検査； 各世代の投与開始 9 週間後に各群雌雄全例の新鮮尿を用いて以下の尿検査を行った。また、17 時間蓄尿を用いて尿量、比重を測定した。

潜血、ケトン体、ブドウ糖、蛋白、pH、ウロビリノーゲン、ビリルビン、沈渣、色調

交尾及び妊娠の確認； 同群内の雌雄 1 対 1 で同居させ、朝、膣垢中に精子を認めた場合に交尾成立とし、その日を妊娠 0 日とした。

繁殖性に関する項目；

発情期数；交配期間中の性周期を観察、発情期数をカウント

雌雄の交尾率(%)；(交尾した動物数/交配に用いた動物数)×100

雌の妊娠率(%)；(妊娠した動物数/交尾雌動物数)×100

雄の妊娠率(%)；(妊娠させた動物数/交尾雄動物数)×100

出産率(%)；(生存児を出産した雌動物数/妊娠した雌動物数)×100

妊娠期間；交尾を認めた日から分娩までの日数

着床数；剖検時の子宮内の着床痕数

出生率(%)；(出産生存児数/着床数)×100

性比(%)；(雄の出産生存児数/全出産生存児数)×100

哺育中の児動物の観察；全児動物について以下の項目を検査した。なお、出生日を生後 0 日とした。

出生日観察；生存児数、死産児数、外表観察、生存児体重

4 日生存率(%)；[生後 4 日(調整前)の生存児数/出産生存児数×100]

離乳時の生存率(離乳率, %)；

[生後 21 日の生存児数/生後 4 日(調整後)の生存児数×100]

児体重；生後 4、7、14 及び 21 日に、母体ごとに、雌雄別に測定し平均値を算出

生後の発育分化；陰茎と包皮の分離は生後 28 日以降、膈開口は生後 35 日以降に観察

なお、出生率(%)、性比(%)、哺育中の生存率(%)については腹ごとに算出した数値の平均値を群別の数値とした。

剖検；P 世代及び F₁ 世代(交配試験群)の親動物は児動物の離乳後、F₁ 世代(10 週解剖群)では 10 週間投与後、屠殺剖検した。児動物については、死亡時及び選抜されなかった動物は生後 4 日または離乳時に屠殺剖検した。

血液生化学的検査；F₁ 世代(10 週解剖群)の解剖時、各群雌雄各 5 例について血中尿素窒素及びクレアチニンを測定した。

テストステロン測定；P 世代及び F₁ 世代(10 週解剖群)の解剖時、各群雄 5 例について血液中及び精巢中のテストステロン濃度を測定した。

精子検査；P 世代及び F₁ 世代(10 週解剖群)の解剖時、各群雄 5 例について精巢上体尾部から採取した精子について検査を行った。検査項目は精子数、精子運動性、精子の形態検査とした。

精巢毒性学的検査；P 世代及び F₁ 世代(10 週解剖群)の対照群及び 20000ppm 投与群の各群雄 5 例について、精細管を A 相(I～VI)、B 相(VII～VIII)、C 相(IX～XI)、D 相(XII～XVI)に分類し、細胞数(伸長精子を除く)をカウントした。

病理組織学的検査；P 世代の各群雌雄全例、F₁ 世代(10 週解剖群)の各群雌雄全例、F₁ 世代(交配試験群)の各群雌雄全例について腎臓、尿管、膀胱を検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

神経病理組織学的検査；F₁世代(10週解剖群)の対照群及び20000ppm投与群の雌雄各5例について、脳、脊髄(頸部及び腰部)、坐骨神経、脛骨神経、腓腹筋、眼球左右(視神経を含む)を光学顕微鏡で検査し、坐骨神経、脛骨神経の一部を電子顕微鏡で検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

試験方法の概要:

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
P	生育(10 週)	雄 6 週齢、雌 5 週齢より 投与開始	一般状態、生死の観察 1 日 2 回 体重、餌を週 1 回測定 性周期 尿検査(潜血、ケトン体、ブドウ糖、蛋白、pH、ウロビリノーゲン、ビリルビン、沈渣、尿量、比重、色調)
	交配(1 週)	雌雄 1 対 1 で 1 週間交配 交尾は膣垢中の精子の 存在で確認(妊娠 0 日)	性周期、交尾率、妊娠率 一般状態観察、生死の観察 1 日 2 回、体重測定
	妊娠(3 週)		一般状態観察、生死の観察 1 日 2 回 妊娠 0、7、14 及び 21 日に体重測定 妊娠 7、14 及び 21 日に餌測定
	出産		出産状況の確認 妊娠期間、出産率、生存児数、死産児数、外表異常、 性比、出生率及び生存児の個別体重測定
	哺育(3 週)	生後 4 日目に各同腹児を 8 匹に調整(可能な限り雄 4 匹、雌 4 匹)	親動物の一般状態観察、生死の観察 1 日 2 回 分娩後 0、7、14 及び 21 日に体重測定 分娩後 7、14 及び 21 日に餌測定
			児動物の生死の確認(4 日生存率、離乳時生存率) 生後 4、7、14 及び 21 日に体重測定
			親動物の剖検(F ₁ 離乳後実施) 着床痕数の計測 雄の血液中及び精巣中のテストステロン測定 精子検査(精子数、精子運動性、精子形態検査) 精巣毒性学的検査 病理組織学的検査(腎臓、尿管、膀胱)
F ₁	離乳 (生後 21 日)	次世代用に各群雌雄各 20 匹を各腹から 2~4 匹 を選抜、10 週剖検用及び 交配用に無作為に 10 匹 ずつ配分	途中死亡及び選抜されなかった新生児(生後 4 日、及 び離乳時)について剖検 発育分化の観察(陰茎と包皮の分離、膣開口)
	生育(10 週)		P 世代と同様な項目 10 週剖検群の動物 テストステロン測定、精子検査、精巣毒性学的検査、 剖検、病理組織学的検査を P 世代に準じて実施 神経毒性学的検査 血液生化学的検査(尿素窒素、クレアチニン) 神経病理組織学的検査(脳、脊髄〔頸部及び腰部〕、 坐骨神経、脛骨神経、腓腹筋、眼球左右〔視 神経を含む〕を光学顕微鏡で検査、坐骨神経、脛 骨神経の一部を電子顕微鏡で検査)
	交配(1 週)	(P 世代に準ずる)	(P 世代に準ずる)
	妊娠(3 週)		(P 世代に準ずる)
	出産		(P, F ₁ 世代に準ずる)
	哺育(3 週)	(P 世代に準ずる)	(P, F ₁ 世代に準ずる) 雄動物においてはテストステロン測定、精子検査、精巣毒 性学的検査を除く
	離乳	離乳時に全例屠殺	児動物においては発育分化の観察を除く
F ₂			

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

結 果:

検体摂取量; 各投与群の育成期間中の平均検体摂取量は以下の通りである。

投与量 (ppm)	世代	雄 (mg/kg/day)	雌 (mg/kg/day)
2000	P	147	180
	F ₁	198	211
20000	P	1390	1690
	F ₁	2040	2180

試験結果; 結果の概要を次頁以降の表に示した。また、投与群において検体投与によると考えられる所見は次の通りであった。

20000ppm 投与群

親動物

P 及び F₁ 親動物の雌雄で体重増加抑制または増加抑制傾向、摂餌量の減少が認められた。

妊娠中の P 及び F₁ 動物、哺育中の F₁ 動物で体重増加抑制及び摂餌量の減少、哺育中の P 動物で体重増加抑制が認められた。

腎毒性については、F₁ 親動物で BUN の高値 (16.7mg/dl) が認められたが、試験実施期間における背景データ範囲内 (15.13±1.59mg/dl) であったため、生理的変動の範囲内と判断した。尿検査、腎、尿管および膀胱の病理組織学的検査において検体投与に関連すると思われる所見は認められなかった。

児動物

F₁ 及び F₂ 動物とも哺育期間中の雌雄に体重増加抑制が認められた。

神経系に対する検査として、神経病理学的検査および神経行動プロファイル、神経機能発育について観察したが検体投与の影響は認められなかった。

2000ppm 投与群

F₁ 児動物の雌で哺育の 21 日に体重の増加抑制がみられたが、ごく軽度な変化であり、検体投与による変化ではないと判断した。その他にはいずれの検査においても検体投与によると考えられる変化は認められなかった。

以上の結果より、ラットに2世代に渡りジノテフラン (MTI-446) 原体を混餌投与した場合、20000ppm 投与群で親動物に体重増加抑制及び摂餌量の減少、児動物に体重増加抑制が認められた。繁殖能に関しては、何ら影響はみられず先に実施した試験とほぼ一致する結果が得られた。本試験で検討した精巣毒性を含む生殖毒性に関する検査、神経系に関する検査および腎毒性を含む泌尿器系に関する検査では、いずれも検体投与の影響は認められなかった。

したがって、最大無毒性量は2000ppm (P 世代: 雄 147mg/kg/day、雌 180mg/kg/day、F₁ 世代: 雄 198mg/kg/day、雌 211mg/kg/day) と考えられた。一方、親動物の繁殖能に対する最大無作用量は20000ppm (P 世代: 雄 1390mg/kg/day、雌 1690mg/kg/day、F₁ 世代: 雄 2040mg/kg/day、雌 2180mg/kg/day) と考えられた。

繁殖試験追加試験結果概要:

世代			親:P 児:F ₁			親:F ₁ 児:F ₂			
投与量(ppm)			0	2000	20000	0	2000	20000	
動物数 (交配群+10 週解剖群)		雄 雌	10 + 0 10 + 0	10 + 0 10 + 0	10 + 0 10 + 0	10 + 10 10 + 10	10 + 10 10 + 10	10 + 10 10 + 10	
親動物 / 10 週解剖群	一般状態 及び 死亡率	雄	—	—	—	—	—	—	
		雌	交配前	—	—	—	—	—	
			妊娠中	—	—	—	—	—	
			哺育中	—	—	血尿 1 例	—	事故死 1 例 軟便、肛門周囲の汚れ 1 例	
	神経毒性学的検査 ^{a)}						—	—	
	体重	雄		—	1-16 週 増加抑制傾向		4-6 週↓ 3,7-10 週↓	0~16 週↓	
		雌	交配前		—	1,2 週↓ 4-10 週↓		0 週↓	0-10 週↓
			妊娠中		—	0 日↓ 7-21 日↓		—	0 日↓ 7-21 日↓
			哺育中		—	0-14 日↓		—	0-21 日↓
	摂餌量	雄		—	1 週↓		4,6 週↓	1-7,9 週↓	
		雌	交配前		—	1-2 週↓		—	1-3 週↓
			妊娠中		—	7 日↓		—	14 日↓
			哺育中		—	—		—	21 日↓
	性周期 (発情期数)		3.8	3.7	3.7	3.6	3.6	3.7	
	尿検査	雄		—	—		潜血+++ 3/20	潜血+++ 1/20	
		雌		—	—		—	—	
	血液生化学的検査 ^{a)} (N=5)	雄					—	BUN↑	
		雌					—	—	
	テストステロン測定 ^{b)} (N=5)			—	—		—	—	
	精子検査 ^{b)} (N=5)			—	—		—	—	
	精巣毒性学的検査 ^{b)} (N=5)			—	—		—	—	
	肉眼的病理検査			—	—		—	—	
	病理組織学的検査			—	—		—	—	
	神経病理組織学的検査 ^{a)} (N=5)							—	

注) Dunnetの多重比較法、↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01

—: 変化が認められなかった、N: 検査例数

a): 10週解剖群で検査を実施、b): P親動物及び10週解剖群で検査を実施

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

世代			親:P 児:F ₁			親:F ₁ 児:F ₂			
投与量(ppm)			0	2000	20000	0	2000	20000	
親動物	発情期数		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	交尾率(%)	雄	90	80	100	100	100	100	
		雌	90	80	100	100	100	100	
	妊娠率(%)	雄	100	100	100	100	100	90	
		雌	100	100	100	100	100	90	
	出産率(%)		100	100	100	100	100	100	
	妊娠期間		22.2	22.3	22.5	22.5	22.6	22.4	
	着床数	総数	128	112	143	148	141	120	
平均		14.2	14.0	14.3	14.8	14.1	13.3		
児動物	出生率(%)		95.3	94.6	86.6	89.83	91.9	90.56	
	生存児数	総数	122	106	128	133	130	107	
		平均	13.6	13.3	12.8	13.3	13.0	11.9	
	死亡児数		1	1	3	1	1	4	
	性比(%) 雄/全児動物		50.2	47.6	52.7	50.9	53.7	53.0	
	生存児の体重(g)	雄	6.92	6.78	6.53	6.90	6.95	6.75	
		雌	6.49	6.40	6.06	6.63	6.62	6.26	
	外表異常	発現児数 頻度(%)	0	0	0	0	0	0	
	生存率	4日目	100.0	100.0	91.7	97.6	96.3	100.0	
		離乳時	100.0	95.3	87.5	100.0	100.0	98.6	
	哺育期間中の一般状態		—	—	—	—	—	—	
	哺育期間の 体重 (g)	雄	4日	10.69	10.52	9.37	11.31	11.11	10.64
			4日	10.80	10.59	9.48	11.59	11.18	10.86
			7日	17.78	16.98	15.06	18.25	18.14	16.75
			14日	37.10	34.81	↓32.46	35.14	36.21	32.54
			21日	61.68	55.80	↓50.89	56.63	58.59	↓56.45
雌		4日	10.14	9.93	8.95	10.81	10.47	9.87	
		4日	10.36	10.01	9.05	11.19	10.55	10.03	
		7日	17.15	16.34	14.12	17.74	17.33	15.60	
		14日	25.93	33.43	↓30.49	34.37	34.83	↓30.47	
		21日	59.58	↓53.21	↓47.94	55.99	56.45	↓47.56	
離乳までの剖検			—	—		—	—		
生殖器の発育分化	雄		—	—					
	雌		—	—					

注) Dunnet の多重比較法、↑↓: p<0.05、⇕↓: p<0.01

—: 変化が認められなかった

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

2) 催奇形性

ジノテフラン原体 (MTI-446) のラットを用いた催奇形性試験

(資料 6-2-1)

試験機関: 実医研

(GLP 対応)

報告書作成年: 1998 年

検体純度:

試験動物: CD (SD) IGS 系雌ラット (10~11 週齢)、体重 212.22~269.37g、1 群 24 匹

試験期間: 1997 年 11 月 3 日~11 月 29 日

投与期間: 器官形成期 (妊娠 6 日~15 日の 10 日間)

投与方法: 雌雄を 1:1 で昼夜同居させ、翌朝、膣垢中の精子の有無により交尾を確認し、その日を妊娠 0 日とした。検体を 0.5%CMC-Na 水溶液に懸濁し、0、100、300 及び 1000mg/kg/day を妊娠 6~15 日までの 10 日間毎日 1 回強制経口投与した。

投与量設定根拠;

試験項目:

母動物 ; 一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠 0 日、3 日及び 5 日より 20 日の毎日 1 回体重を測定した。摂餌量および飲水量を妊娠 1 日、3 日及び 6 日より 20 日の毎日測定した。妊娠 20 日に屠殺し、肉眼的病理検査を行うとともに卵巣と子宮を調べ、妊娠の有無、黄体数、着床数、胚及び胎児死亡数 (着床痕、胎盤遺残、早・後期吸収胚、浸軟胎児、死亡胎児に分類) および生存胎児数を調べた。

生存胎児 ; 全例に対し性別、体重及び外表異常の観察を行った。生存胎児を各 1 対 1 に骨格検査用と内臓検査用に配分した。内臓検査用胎児は Bouin 液に固定後、胸部は顕微解剖法、頭部・腹部は Wilson 法で精査した。骨格検査用胎児は 99%エタノールで固定後、骨格標本作製し、異常及び変異を検査した。また、母動物毎の平均化骨数も測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

試験結果:

投与群(mg/kg/day)			0	100	300	1000	
1 群当たり動物数			24	24	24	24	
親動物	一般状態		異常無し	異常無し	異常無し	1 例に自発運動低下	
	死亡数		0	0	0	0	
	体重変化			変化なし	変化なし	一過性の体重増加抑制	
	摂餌量			変化なし	変化なし	妊娠 7,8,10 日目に減少	
	飲水量			変化なし	変化なし	一過性の飲水量増加	
	肉眼的病理検査		異常無し	異常無し	異常無し	異常無し	
	妊娠数		22	22	20	20	
	着床所見	検査親動物数	22	22	20	20	
		黄体数	15.6	16.2	15.3	15.7	
		着床数	14.2	14.8	14.1	12.2	
生存胎児数		13.5	14.0	13.6	11.8		
着床前胚死亡率(%)		9.2	8.3	10.1	24.0		
	胎児死亡率(%)	5.1	5.1	3.4	3.6		
胎児動物	体重		雄	3.73	3.72	3.83	3.71
			雌	3.55	3.51	3.65	3.47
	性比(雄/生存胎児数)		52.1	55.9	48.5	43.0	
	外表異常	検査胎児数	298	309	272	236	
		奇形胎児数	0	0	0	0	
	骨格異常	検査胎児数	143	150	132	114	
		奇形胎児率(%)	0	0	0	0	
		変異胎児率(%)	18.4	7.6	10.5	12.1	
	内臓異常	検査胎児数	155	159	140	122	
		奇形胎児率(%)	5.0	3.5	8.4	5.1	
	奇形	内臓(%)	胸腺の頸部残留	3.1	3.5	2.7	4.6
			左臍帯動脈	1.3	0	0	0.6
			腎盂拡張	0	0	5.7	0
			尿管拡張	0	0	5.0	0
			小眼球症	0.6	0	0	0
			卵巣位置異常	0.8	0	0	0
			変異	骨格(%)	腰肋骨	1.2	0.0
	第 14 肋骨	13.6			7.6	9.1	11.5
	第 13 肋骨短小	3.6			0.0	0.8	0.0
	平均化骨数	尾椎椎体	2.7	2.61	2.82	2.69	
		尾椎椎弓	0.81	0.76	0.85	0.76	
		前肢指節	2.67	2.78	2.84	2.51	
		後肢指節	2.49	2.40	2.51	1.88	

検定法) Dunnett の一対比較検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

母動物；

1000mg/kg/day 群；

- 1) 一般症状変化として、妊娠 8 日から 10 日まで、自発運動の低下が 1 例に観察された。
- 2) 妊娠 6 日目を基準とした体重増加量において、妊娠 11 日に有意な増加抑制が観察された。
- 3) 摂餌量が、妊娠 7 日、8 および 10 日に有意に減少した。
- 4) 飲水量が、妊娠 11 日から 13 日に有意に増加した。

300、100mg/kg/day 群；

検体投与の影響は認められなかった。

児動物；

1000、300、100mg/kg/day 群；

検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果より、ジノテフラン原体をラットの胎児器官形成期に母動物に投与したときの最大無毒性量は、母動物に対して 300mg/kg/day、胎児に対して 1000mg/kg/day であった。また、最高投与量の 1000mg/kg/day でも胎児に対して催奇形性はないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

ジノテフラン原体 (MTI-446) のウサギを用いた催奇形性試験

(資料 6-2-2)

試験機関： 実医研

(GLP 対応)

報告書作成年： 1998 年

検体純度：

試験動物： ニュージーランド白色種雌ウサギ(5～6 ヶ月齢)、体重 2.7～3.6kg、1 群 22 匹

試験期間： 1998 年 1 月 29 日～1998 年 3 月 12 日

投与期間： 器官形成期(妊娠 6 日～18 日の 13 日間) 1998 年 2 月 1 日～2 月 13 日

投与方法： 交配は生産施設(有限会社市川屋)で実施し、妊娠 3 日までに搬入した。交配確認日の翌日を妊娠 0 日とした。検体を 0.5%CMC-Na 水溶液に懸濁し、0、52、125 及び 300mg/kg/day を妊娠 6～18 日までの 13 日間毎日 1 回強制経口投与した。

投与量設定根拠；

試験項目：

母動物； 一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠 6 日より 19 日の毎日、21、23、25、27 および 28 日に 1 回体重を測定した。摂餌量および飲水量を妊娠 6 日より 28 日まで毎日一日量を測定した。妊娠 28 日に屠殺し、肉眼的病理検査を行うとともに卵巣と子宮を調べ、妊娠の有無、黄体数、着床数、胚及び胎児死亡数(着床痕、胎盤遺残、早・後期吸収胚、浸軟胎児、死亡胎児に分類)および生存胎児数を調べた。また、剖検で異常のみられた 300 と 125mg/kg 投与群の胃及び肝臓について各 5 例、溶媒対照群は 3 例について病理組織学的検査を実施した。

生存胎児； 性別、体重及び外表異常の観察を行った。全例に対し、内臓検査と骨格検査を行った。各母動物の 1/2 の胎児について頭部を切断し、Bouin 液に固定後、胸部は顕微解剖法、頭部は Wilson 法で精査した。内臓摘出後、99%エタノールに固定、骨格標本を作成し、異常及び変異を検査した。また、母動物毎の平均化骨数も測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

試験結果:

投与群(mg/kg/day)			0	52	125	300	
1 群当たり動物数			21 ¹⁾	22	22	21 ¹⁾	
親動物	一般状態		異常無し	異常無し	異常無し	妊娠 6 日～13 日まで、自発運動低下、腹臥姿勢、浅速呼吸、鼻・耳介の潮紅、振戦。	
	死亡数		0	0	0	0	
	体重変化			変化なし	試験初期に体重増加抑制。		
	摂餌量			変化なし	変化なし	妊娠 8,9 および 12～16 日に摂餌量減少。	
	飲水量			変化なし	変化なし	妊娠 14～16 日に減少。	
	肉眼的病理検査		変化なし	変化なし	肝の褪色、胃粘膜の灰白色斑。腎の黄色斑と褪色。	肝褪色・肥大、胃粘膜に灰白色斑および肥厚。	
	病理組織学的検査		検体投与の影響なし				
	妊娠数		20	19	21	19	
	着床所見	検査親動物数		20	19	21	19
		黄体数		8.6	8.5	9.0	8.8
着床数		7.9	8.3	8.7	8.4		
生存胎児数		7.6	8.1	8.1	7.7		
着床前胚死亡率(%)		7.7	3.2	5.0	4.4		
胎児死亡率(%)		5.1	2.1	6.9	6.9		
胎児動物	体重		雄	42.67	40.62	39.74	40.35
			雌	42.11	39.94	38.67	39.85
	性比(雄/生存胎児数)		59.2	43.9	52.0	51.6	
	外表異常	検査胎児数	151	153	170	147	
		奇形胎児数	0	1	2	1	
	骨格異常	検査胎児数	151	153	170	147	
		奇形胎児率(%)	0.9	0	0.6	0	
		変異胎児率(%)	58.9	70.2	60.7	67.6	
	内臓異常	検査胎児数	151	153	170	147	
		奇形胎児率(%)	1.6	0.7	2.9	3.0	

検定法) Dunnett の一対比較検定

1): 対照群の1例に誤投与による死亡、300mg/kg 投与群の 1 例を不良動物として、それぞれ試験より除外した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

投与群(mg/kg/day)				0	52	125	300
胎児動物	奇形	外表	臍帯ヘルニア	0	1	0	0
			腹壁破裂	0	0	1	0
			口蓋裂	0	0	0	1
			水頭症	0	0	0	1
			内反足	0	0	1	0
			関節拘縮(前肢)	0	0	1	0
		骨格	胸骨骨核の分離	0.9	0	0	0
			尾椎椎体の屈曲	0	0	0.6	0
		内臓	水頭症	0	0	0	2.2
			側脳室拡張	0	0	0.7	0
			第三脳室拡張	0.6	0	0	0
			冠状動脈口過剰	1.0	0	0.5	0.8
			心室中隔欠損	0	0.7	0	0
			動脈管開存	0	0	0	0.8
			動脈幹遺残	0	0.7	0	0
			水腎症	0	0	1.8	0
			尿管拡張	0	0	1.8	0
	変異	骨格	腰肋骨	49.4	55.7	60.7	55.4
			腰椎の仙椎化	0	2.3	0.6	1.9
			第8腰椎	42.5	66.3	57.3	58.3
			胸骨非対称	0	0	0	0.6
	平均化骨数		尾椎椎体	16.08	16.03	15.97	16.09
			尾椎椎弓	8.06	8.05	7.96	7.96
			前肢指節	13.94	13.95	13.94	14.00
			後肢指節	11.95	11.95	11.97	12.00

検定法) Dunnett の一対比較検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

母動物；

300mg/kg/day 群；

- 1) 一般症状変化として、妊娠6日から自発運動の低下、腹臥姿勢、浅速呼吸、鼻および耳介の潮紅、振戦等が観察されたが、経時的に症状が軽減し、妊娠 14 日に症状が消失した。
- 2) 体重増加量において、妊娠8、9日および妊娠12～19日において有意な増加抑制が観察された。
- 3) 摂餌量が、妊娠8、9日および妊娠12～16日に有意に減少した。
- 4) 飲水量が、妊娠14～16日に有意に減少した。
- 5) 剖検において、不妊例も含め、肝臓の褪色が19例、肥大が1例、胃粘膜の灰白斑が21例、粘膜肥厚が2例に観察された。
- 6) 肝臓及び胃の病理学的検査において、肝においてごく軽度の単核細胞浸潤が観察されたが、対照群と同等の変化であった。また、胃には異常は観察されなかった。

125mg/kg/day 群；

- 1) 体重増加量において、妊娠8日に有意な増加抑制が観察された。
- 2) 剖検において、不妊例も含め、肝臓の褪色が8例、胃粘膜の灰白斑が15例、腎の黄白色斑が1例、褪色が1例に認められた。
- 3) 肝臓及び胃の病理学的検査において、肝においてごく軽度の単核細胞浸潤が観察されたが、対照群と同等の変化であった。また、胃には異常は観察されなかった。

52mg/kg/day 群；

検体投与の影響は認められなかった。

児動物；

300、125、52mg/kg/day 群；

検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果より、ジノテフランをウサギの胎児器官形成期に母動物に投与したときの最大無毒性量は、母動物に対して 52mg/kg/day、胎児に対して 300mg/kg/day であった。また、最高投与量の 300mg/kg/day でも胎児に対して催奇形性はないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

(9) 変異原性

1) 遺伝子突然変異原性

ジノテフラン原体 (MTI-446) の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 7-1-1)

試験機関: オリンパス光学工業株式会社

染色体研究センター (CRC)

(GLP 対応)

報告書作成年: 1996 年

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) 及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) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は DMSO に溶解した。濃度設定試験の結果、試験菌株に対して抗菌性が認められなかった 5000 μ g/プレート を最高用量とした。試験濃度は、S9 Mix の存在下及び非存在下とも 313～5000 μ g/プレートの範囲で 5 用量とした。なお、各濃度について 3 枚のプレートを用い、試験は 2 回行った。復帰変異コロニー数が陰性対照群の 2 倍以上になり、濃度依存性、かつ再現性が認められた場合に陽性と判定した。

試験結果: 結果を次表に示した。

2 回の試験において検体は S9 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 (5000 μ g/プレート) まで、いずれの菌株においても陰性対照に比べて復帰変異コロニー数の増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた AF-2、 NaN_3 、9-AA、及び 2-AA では、全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、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で、細菌に対して復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

1 回目試験

(表中の数値は3反復の平均値を示す)

薬 物	濃度 (μ g/プレート)	S9 Mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
対照(DMSO)		—	119	7	14	11	3
検体	1.2	—	138	4	17	9	4
	4.9	—	128	5	13	13	3
	20	—	129	9	17	10	4
	78	—	129	6	16	10	2
	313	—	134	7	13	8	4
	1250	—	122	6	15	5	4
	5000	—	124	6	17	9	3
対照(DMSO)		+	121	8	15	17	9
検体	1.2	+	106	10	18	22	9
	4.9	+	119	10	15	19	8
	20	+	121	10	14	17	8
	78	+	120	10	12	19	5
	313	+	116	7	18	13	7
	1250	+	118	10	13	14	6
	5000	+	112	10	11	14	8
陽性 対照	S9 Mix を 必要とし ないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		μ g/プレート	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		コロニー数/プレート	829	180	104	475	376
	S9 Mix を 必要とす るもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		μ g/プレート	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	1006	208	845	286	71

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

NaN₃: アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

2-AA: 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

2 回目試験

(表中の数値は3反復の平均値を示す)

薬 物	濃度 (μ g/プレート)	S9 Mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
対照(DMSO)		—	101	5	25	12	3
検体	313	—	111	7	26	12	3
	625	—	104	7	18	7	3
	1250	—	121	9	22	11	2
	2500	—	103	6	19	9	5
	5000	—	103	9	18	16	5
対照(DMSO)		+	104	9	24	18	12
検体	313	+	102	8	24	21	8
	625	+	107	10	25	16	8
	1250	+	111	9	27	26	10
	2500	+	112	7	28	25	13
	5000	+	106	7	25	19	13
陽性 対照	S9 Mix を 必要とし ないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		μ g/プレート	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		コロニー数/プレート	727	244	106	460	578
	S9 Mix を 必要とす るもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		μ g/プレート	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	665	210	799	209	81

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

NaN₃: アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

2-AA: 2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

2) 染色体異常誘発性

ジノテフラン原体 (MTI-446) の CHL/IU 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 7-2-1)

試験機関: オリンパス光学工業株式会社

染色体研究センター (CRC)

(GLP 対応)

報告書作成年: 1996 年

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター肺由来の継代培養した CHL/IU 細胞を用い、直接法及び代謝活性化法による染色体異常誘発性を検定した。検体は生理食塩水に溶解して用いた。用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果、最高濃度の $2000 \mu\text{g/ml}$ において 50% に至る細胞増殖抑制は観察されなかったので、本試験の濃度は直接法及び代謝活性化法とも 500、1000 及び $2000 \mu\text{g/ml}$ (10mM 相当) とした。各濃度あたり 3 枚のプレートを用い、2 枚のプレートについては染色体標本を作製し、残りの 1 枚については生存細胞数測定を行なった。観察は 1 濃度あたり 200 個 (プレートあたり 100 個) の分裂中期像について行ない、構造異常及び数的異常 (倍数体) の有無を記録した。結果の判定は、ギャップを含む構造異常細胞出現率あるいは倍数体細胞出現率が 5% 未満を陰性、5% 以上 10% 未満を疑陽性、10% 以上を陽性とした。

試験結果: 結果を次表に示した。

1) 直接法

24 及び 48 時間処理群ともに、 $500 \sim 2000 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で、構造異常細胞及び倍数体は誘発されなかった。なお、細胞生存率は 24 及び 48 時間処理群ともに、検体濃度に依存してやや低下した。一方、陽性対照物質 MMC は 24 及び 48 時間ともに、明らかに構造異常を誘発した。

2) 代謝活性化法

直接法と同様に $500 \sim 2000 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で、構造異常細胞及び倍数体は誘発されなかった。なお、細胞生存率は S9 Mix の存在の有無に関わらず、陰性対照と比較して大差なかった。一方、陽性対照物質 CP は、S9 Mix 存在下で、明らかに構造異常を誘発した。

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、CHL/IU 細胞に対し、染色体異常を誘発しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

試験結果表

1) 直接法 (24 及び 48 時間処理)

(異常細胞出現頻度は 2 反復の平均値を示す)

処理	処理 濃度 (μ g/ml)	処理 時間	細胞 生存率 (%)	倍数体		構造異常細胞の出現頻度(%)									判 定
				出現 頻度 (%)	判定	ギャップ	染色分体型		染色体型		その他	合計			
							切断	交換	切断	交換		-g	+g		
溶媒 (saline)	10(*1)	24	100	0.0	—	0.5	0.5	0.0	0.0	1.5	0.0	2.0	2.5	—	
検体	500	24	85	0.0	—	0.0	2.5	2.0	0.0	0.0	0.0	4.0	4.0	—	
	1000	24	84	0.5	—	0.5	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.5	—	
	2000	24	72	0.0	—	0.5	2.0	0.5	0.5	0.0	0.0	3.0	3.5	—	
陽性対照 (MMC)	0.03	24	70	0.5	—	2.0	42.5	38.5	1.0	0.5	0.0	64.0	65.5	+	
溶媒 (saline)	10(*1)	48	100	2.5	—	1.0	1.5	0.0	0.5	0.0	0.0	1.5	2.5	—	
検体	500	48	93	0.5	—	0.0	1.0	0.5	0.0	0.5	0.0	2.0	2.0	—	
	1000	48	95	0.5	—	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	2.0	—	
	2000	48	62	1.5	—	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	—	
陽性対照 (MMC)	0.03	48	74	0.5	—	2.0	36.0	66.5	0.0	0.5	0.0	74.5	76.0	+	

(*1): %(v/v)

MMC: マイトマイシン C

—g : ギャップを含まない構造異常細胞出現頻度

+g : ギャップを含む構造異常細胞出現頻度

判定欄:

+ ; 陽性、 ± ; 疑陽性、 — ; 陰性

細胞生存率は 24、48 時間それぞれの溶媒対照群の生存細胞数を 100 とした場合の値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

2)代謝活性化法(6 時間処理及び 18 時間回復)

(異常細胞出現頻度は 2 反復の平均値を示す)

処理	処理 濃度 (μ g/ml)	S9 Mix 有無	細胞 生存率 (%)	倍数体		構造異常細胞の出現頻度(%)								
				出現 頻度 (%)	判定	ギャップ	染色分体型		染色体型		その他	合計		判定
							切断	交換	切断	交換		-g	+g	
溶媒 (saline)	10(*1)	—	100	0.5	—	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	—
検体	500	—	103	1.0	—	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	—
	1000	—	104	0.0	—	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	—
	2000	—	106	1.0	—	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	—
陽性対照 (CP)	12.0	—	99	0.5	—	1.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5	1.5	—
溶媒 (saline)	10(*1)	+	100	1.0	—	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	—
検体	500	+	100	1.0	—	0.0	0.5	0.0	0.0	1.0	0.0	1.5	1.5	—
	1000	+	99	2.5	—	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	—
	2000	+	104	1.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	1.0	—
陽性対照 (CP)	12.0	+	86	1.0	—	0.0	15.5	43.5	0.0	0.5	0.0	51.0	51.0	+

(*1): %(v/v)

CP: シクロフォスファミド

—g : ギャップを含まない構造異常細胞出現頻度

+g : ギャップを含む構造異常細胞出現頻度

判定欄:

＋ ; 陽性、 ± ; 疑陽性、 — ; 陰性

細胞生存率は、-S9、+S9 それぞれの溶媒対照群の生存細胞数を 100 とした場合の値

3) DNA 損傷誘発性

ジノテフラン原体 (MTI-446) の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 7-3-1)

試験機関: ビー・エム・エル

(GLP 対応)

報告書作成年: 1996 年

検体純度:

試験方法: 枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換え修復能保持株 (H17、Rec+) 及び欠損株 (M45、Rec-) を用い、孢子法により代謝活性化及び非代謝活性化法によって DNA 損傷の誘発性を検定した。検体は DMSO に溶解して用いた。最大溶解濃度の 16000 μ g/ディスクを最高用量として行なった予備試験の結果、代謝活性化の有無にかかわらず試験菌株に対して生育阻止域を誘起しなかったため、本試験は、代謝活性化の存在下及び非存在下とも 1000~16000 μ g/ディスクの 5 用量について試験した。

試験結果: 結果を次表に示した。

検体は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの濃度においても、両菌株に生育阻止域を認めなかった。なお、検体は水に対する溶解性が比較的高いため、寒天培地へは充分拡散していると考えられ、試験菌との接触及び菌内への浸透も行われたと考えられる。

一方、陽性対照の MMC (S9 Mix 非存在下) 及び Trp-P-1 (S9 Mix 存在下) では両菌株間に明らかな生育阻止域の差が生じた。また、陰性対照のカナマイシン (S9 Mix 非存在下) 及びストレプトマイシン (S9 Mix 存在下) では両菌株に同程度の生育阻止帯が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において、枯草菌に対して DNA 損傷の誘発性を有しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

試験結果表

薬 物	濃 度 (μ g/ディスク)	S9 Mix の 有無	阻止域の差(mm)		差 (mm)
			M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)	0	—	0.0	0.0	0.0
検 体	1000	—	0.0	0.0	0.0
	2000	—	0.0	0.0	0.0
	4000	—	0.0	0.0	0.0
	8000	—	0.0	0.0	0.0
	16000	—	0.0	0.0	0.0
陰性対照 (KM)	10	—	10.5	8.8	1.7
陽性対照 (MMC)	0.01	—	7.2	0.0	7.2
溶媒対照 (DMSO)	0	+	0.0	0.0	0.0
検 体	1000	+	0.0	0.0	0.0
	2000	+	0.0	0.0	0.0
	4000	+	0.0	0.0	0.0
	8000	+	0.0	0.0	0.0
	16000	+	0.0	0.0	0.0
陰性対照 (SM)	100	+	4.0	2.9	1.1
陽性対照 (Trp-P-1)	3.0	+	6.0	0.0	6.0

注) KM: 硫酸カナマイシン

MMC: マイトマイシン C

SM: 硫酸ストレプトマイシン

Trp-P-1: 3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド[4,3-b]インドール アセテート

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

4) 小核試験

ジノテフラン原体 (MTI-446) のげっ歯類を用いた小核試験

(資料 7-4-1)

試験機関: (財) 食品農医薬品安全性評価センター

(GLP 対応)

報告書作成年: 1995 年

検体純度:

試験動物: BDF1 (C57BL/6×DBA/2) 系マウス、体重: 雄 24.8～27.1g、1 群雄 6 匹

試験方法: 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース・Na 水溶液 (0.5% CMC・Na) に懸濁し、270、540 及び 1080mg/kg を 2 日間連続強制経口投与した。なお、溶媒対照群には 0.5% CMC・Na を同様に投与し、陽性対照群にはマイトマイシン C の 2mg/kg を腹腔内に単回投与した。各最終投与から 24 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髓細胞を採取し、塗末標本を作製した。メタノールで固定後、ギムザ染色を行ない、染色塗末標本を作製した。各染色塗末標本について、顕微鏡下で 1000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計測した。また、骨髓に対する影響を調べるため、1000 個の赤血球を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を計測した。投与期間中及び標本作製時に毒性徴候を観察し、体重を測定した。

用量設定根拠:

結果: 骨髓標本の観察結果を次表に示した。

標本作製時においては、体重減少を含め毒性徴候を示す顕著な症状は認められなかった。

検体投与による小核を有する多染性赤血球の出現頻度は、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。また、骨髓細胞に対する影響の指標である、多染性赤血球の割合に明確な減少は観察されなかった。

一方、陽性対照である MMC 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。さらに、多染性赤血球の割合が減少し、骨髓細胞の分裂抑制作用が確認された。

以上の結果から、本試験条件下において、検体はマウス骨髓細胞に対し、小核赤血球を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

試験結果表

(表中の数値は 6 反復の平均値を示す)

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 (0.5%CMC・Na)		雄	6	0.18±0.15	51.6±3.7
	検 体	270		6	0.20±0.14	55.2±4.2
		540	雄	6	0.15±0.05	50.0±4.2
		1080		6	0.22±0.13	52.8±5.1
	陽性対照 (マイマイシン C)	2	雄	6	7.03±0.88**	29.8±4.7**

注) PCE: 多染性赤血球数、NCE: 正染性赤血球数、

MNPCE: 多染性赤血球 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

統計検定法:

MNPCE; Kastenbaum and Bowman の推計学的方法

PCE/(PCE+NCE); Dunnett の t-検定

** : $p < 0.01$

(10) 生体機能影響

ジノテフラン原体 (MTI-446) の薬理試験

(資料 8-1-1)

試験機関: 実医研

報告書作成年: 1999 年

検体純度:

1) マウスの一般症状及び行動に対する作用

試験動物: CD-1 (ICR) 系マウス、5 週齢、体重: 雄 22.8~29.0g、雌 17.9~22.0g、
1 群雌雄各 5 匹

試験方法: 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、550、850、1300、2000 及び 2600mg/kg を
20ml/kg の容量で強制経口投与し、投与前、投与後 30 分、1、2、4 及び 24 時間に
Irwin の多次元観察法の簡便法に基づき一般症状を観察した。

試験結果: 850mg/kg 以上の投与群で自発運動の低下及び群居性の低下を示す動物数が用
量相関的に増加し、1300mg/kg 以上の投与群ではさらに立毛、体温低下が観察さ
れ、2000mg/kg 以上では一部の動物に振戦、痙攣、皮膚蒼白、腹這い姿勢、外刺
激に対する反応の低下、発声及び眼瞼下垂が見られた。また、2600mg/kg 投与群
では投与 30 分後に雌雄それぞれ 4 例及び 3 例が死亡した。いずれの症状も 24 時
間後には回復した。550mg/kg 投与群では影響はみられなかった。

2) 中枢神経系に対する作用

① マウスにおける自発運動量

試験動物: CD-1 (ICR) 系マウス、5 週齢、体重: 雄 25.2~32.7g、1 群雄 10 匹

試験方法: 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、850、1300 及び 2000mg/kg を 20ml/kg の容量
で強制経口投与し、投与前、投与後 30 分、1、2 及び 4 時間に運動量測定装置を
用いて 10 分間の自発運動量を測定した。

試験結果: マウスの自発運動量に対し、1300mg/kg 以下の投与群では影響が認められず、
2000mg/kg 投与群で投与 30 分から 2 時間後にかけて有意な著しい自発運動量の
低下が認められた。

② マウスにおける Hexobarbital 睡眠増強作用

試験動物: CD-1 (ICR) 系マウス、5 週齢、体重: 雄 26.0~32.0g、1 群雄 10 匹

試験方法: 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、850、1300 及び 2000mg/kg を 20ml/kg の容量
で強制経口投与し、2 時間後に 80mg/kg の hexobarbital を腹腔内投与し、正向反射
消失から回復までの時間を睡眠時間として測定した。

試験結果: マウスの睡眠増強作用に対し、何ら作用を示さなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

③マウスにおける最大電撃痙攣に対する作用

試験動物： CD-1 (ICR) 系マウス、5 週齢、体重： 雄 25.3～33.5g、 1 群雄 10 匹

試験方法： 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、850、1300 及び 2000mg/kg を 20ml/kg の容量で強制経口投与し、2 時間後に最大電撃刺激を両側角膜に 0.3 秒間与え、強直性伸展痙攣の発現率及び持続時間ならびに死亡の発現率を測定した。

試験結果： 2000mg/kg 投与群で死亡例がやや増加したが、有意差は認められなかった。マウスの強直性伸展痙攣発現率及び持続時間においても有意差は認められなかった。

④マウスにおける鎮痛作用に対する作用

試験動物： CD-1 (ICR) 系マウス、5 週齢、体重： 雄 25.2～29.6g、 1 群雄 10 匹

試験方法： 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、550、850、1300 及び 2000mg/kg を 20ml/kg の容量で強制経口投与した。2 時間後に 0.1ml/10g の 0.6%酢酸水溶液を腹腔内投与し、20 分間の writhing 回数を測定した。

試験結果： マウス鎮痛作用に対する作用は、550mg/kg 投与群では影響が認められず、850mg/kg 以上の投与群において酢酸誘発 writhing 回数の用量相関性のある有意な減少が観察された。

⑤ラットにおける体温に対する作用

試験動物： CD (SD) IGS 系ラット、6 週齢、体重： 雄 179～229g、 1 群雄 5 匹

試験方法： 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、550、850、1300 及び 2000mg/kg を 20ml/kg の容量で強制経口投与し、投与前、投与後 30 分、1、2 及び 4 時間にサーミスターセンサーを用いて直腸温を測定した。

試験結果： ラットの体温に対する作用は、550mg/kg 投与群では影響が認められず、850mg/kg 以上の投与群で有意な体温低下が投与 30 分から 2 時間後に観察され、2000mg/kg 投与群では 4 時間後にも観察された。また、2000mg/kg 投与群では 2 例が死亡した。

⑥ウサギにおける脳波に対する作用

試験動物： 日本白色種ウサギ、体重： 雄 3.18～3.24kg、 1 群雄 3 匹

試験方法： 10mg/kg の gallamine triethiodide の静脈注射により非動化したウサギの頭部を東大脳研式脳定置固定装置に固定し、注射用蒸留水に懸濁した検体の 0、10、30 及び 100mg/kg を 10ml/kg の容量で漸増的に静脈注射し、運動領、知覚領及び視覚領の皮質脳波ならびに背側海馬、扁桃核及び中脳網様体の深部脳波を測定した。投与前、投与後 5、10、15 及び 30 分に脳波の周波数解析を行った。また、大腿動脈の平均血圧及び心拍数も同時に記録した。

試験結果： ウサギの脳波に対する作用は、30mg/kg 投与群の投与前及び投与 1 分後に知覚領の δ 波成分に有意な減少が認められたが、投与前からの変化であり検体の影響によるものではないと考えられた。その他の脳波に対する影響は認められなかった。

3) 骨格筋系に対する作用

① マウスにおける懸垂時間に対する作用

試験動物： CD-1 (ICR) 系マウス、5 週齢、体重： 雄 25.3～32.0g、 1 群雄 10 匹

試験方法： 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、850、1300 及び 2000mg/kg を 20ml/kg の容量で強制経口投与し、投与前、投与後 30 分、1、2 及び 4 時間に Courvoiser らの方法に従って懸垂時間を測定した。すなわち、床上 30cm の水平に張った針金に両前肢で懸垂させ、後肢を針金に掛けるまでの時間を測定した。

試験結果： マウスの懸垂時間に対し、何ら作用を示さなかった。

② ウサギにおける腓骨神経－前脛骨筋収縮に対する作用

試験動物： 日本白色種ウサギ、体重： 雄 2.30～2.40kg、 1 群雄 4 匹

試験方法： 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、10、30 及び 100mg/kg を 10ml/kg の容量で漸増的に静脈注射し、urethane 麻酔したウサギの腓骨神経(間接刺激)及び前脛骨筋(直接刺激)に電気刺激を交互に与え、前脛骨筋収縮に及ぼす影響を投与前、投与 5、10、15 及び 30 分後に測定した。

試験結果： ウサギの腓骨神経－前脛骨筋収縮に対し、何ら作用を示さなかった。

③ ラットの摘出横隔膜神経筋収縮に対する作用

試験動物： CD (SD) IGS 系ラット、6 週齢、体重： 雄 240～283g、 雄 4 匹

試験方法： 横隔膜神経を付帯した横隔膜をラットから摘出し、横隔膜及び横隔膜神経に電極を留置してマグヌス管内に静止張力 3g をかけて懸垂した。検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 及び 10^{-3} g/ml を 30℃ の Krebs-Henseleite 液を満たしたマグヌス管に順次適用し、横隔膜及び横隔膜神経に電気刺激を与えた場合の収縮に及ぼす影響を測定した。

試験結果： ラットの摘出横隔膜の筋収縮に対し、何ら作用を示さなかった。

4) 自律神経系に対する作用

① ラットにおける瞳孔径に対する作用

試験動物： CD (SD) IGS 系ラット、6 週齢、体重： 雄 183～215g、 1 群雄 5 匹

試験方法： 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、850、1300 及び 2000mg/kg を 20ml/kg の容量で強制経口投与し、投与前、投与後 30 分、1、2 及び 4 時間に 40W の蛍光灯から約 1.5m 離れたラットの左右の瞳孔径を測定した。

試験結果： ラットの瞳孔径に対して、850mg/kg では影響が認められず、1300mg/kg では投与 1 及び 2 時間後に、2000mg/kg では投与 30 分、1 および 2 時間後に有意な縮瞳が認められた。

②ラットの摘出輸精管収縮に対する作用

試験動物： CD(SD)IGS 系ラット、6 週齢、体重： 雄 206～245g、 雄 4 匹

試験方法： ラットから摘出した約 2 cm の輸精管標本に電極を通してマグヌス管内に 0.5g の負荷をかけて懸垂した。検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 及び 10^{-3} g/ml を 30℃ の Krebs-Henseleite 液を満たしたマグヌス管に累積的に適用し、経壁的に交感神経を電気刺激した場合の収縮に及ぼす影響を測定した。

試験結果： ラットの摘出輸精管収縮に対し、 10^{-6} 及び 10^{-5} g/ml では影響が認められず、 10^{-4} g/ml で増大傾向が観察され、 10^{-3} g/ml で有意な収縮増大が認められた。

5) イヌの呼吸・循環器系に対する作用

試験動物： ビーグル犬、12 ヶ月齢、体重： 雄 10.2～12.7kg、 1 群雄 3 匹

試験方法： 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、10、30 及び 100mg/kg を 10ml/kg の容量で漸増的に pentobarbital 麻酔下のビーグル犬に静脈内注射した。呼吸数は鼻孔型呼吸ピックアップを介して、血圧は左大腿動脈圧をカニユーレに接続した血圧トランスデューサを介して測定した。血流量は右大腿動脈のカニユーレに接続したプローブ及び電磁血流計を介して測定した。心電図は第Ⅱ誘導法で測定した。いずれも投与前、投与後 1、3、5、10、15 及び 30 分に測定した。

試験結果： イヌの呼吸数、血圧、血流量、心拍数及び心電図に対し、30mg/kg 以上の投与で血流量の増加傾向が観察され、100mg/kg の投与では脈圧の上昇傾向が観察されたが、有意な影響は観察されなかった。

6) 消化器系に対する作用

①マウスにおける炭末輸送能に対する作用

試験動物： CD-1(ICR)系マウス、5 週齢、体重： 雄 24.9～29.2g、 1 群雄 10 匹

試験方法： 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、850、1300 及び 2000mg/kg を 20ml/kg の容量で絶食させたマウスに強制経口投与した。投与 2 時間後に 10ml/kg の 5%炭末アラビアゴム懸濁液を経口投与し、30 分後に幽門から炭末先端までの長さを測定し、小腸全体の長さに対する比率を算出した。

試験結果： マウスの炭末輸送能に対し、何ら作用を示さなかった。

②モルモットの摘出回腸運動に対する作用

試験動物： ハートレー系モルモット、体重： 雄 312～358g、 雄 4 匹

試験方法： モルモットから摘出した 1.5cm の輪状回腸標本に 1g の負荷をかけて懸垂し、検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 及び 10^{-3} g/ml を 30℃ の Tyrode 液を満たしたマグヌス管に順次適用した。検体を 5 分間適用した後、 10^{-6} M 塩化アセチルコリン、 10^{-6} M 二塩化ヒスタミン及び 10^{-3} M 塩化バリウムを添加し、収縮反応への影響を測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

試験結果： モルモットの摘出回腸を用いたアセチルコリン及びバリウム収縮に対し、何ら作用を示さなかった。ヒスタミン収縮に対し、 10^{-3} g/ml の投与で有意な抑制が観察された。

7) ラットの腎機能に対する作用

試験動物： CD(SD)IGS 系ラット、6 週齢、体重：雄 181～225g、雌 139～168g、1 群雌雄各 5 匹

試験方法： 検体を注射用蒸留水に懸濁して絶食、絶水させたラットの雌に 0、360、550、850 及び 1300mg/kg、雄に 0、360、550、850、1300 及び 2000mg/kg を 20ml/kg の容量で強制経口投与した。投与直前にラットの膀胱を圧迫して排尿させ、30ml/kg の生理食塩液を経口負荷し、5 時間蓄尿を採取した。尿重量及び尿比重から尿量を算出し、尿中 Na^+ 、 K^+ 及び Cl^- 濃度及び pH を測定した。

試験結果： 850mg/kg 投与群の雄においてのみ尿量が有意に増加し、1300mg/kg 以上の投与群で雌雄とも尿電解質濃度も上昇傾向及び有意な上昇が観察された。また、pH では雌の 360 及び 850mg/kg 投与群で有意に上昇した。

8) ウサギの血液系に対する作用

試験動物： 日本白色種ウサギ、体重： 雄 2.00～2.76kg、 1 群雄 3 匹

試験方法： 検体を注射用蒸留水に懸濁して 0、10、30 及び 100mg/kg を 10ml/kg の容量で静脈内注射した。投与前、投与 5、10、30 及び 60 分後に耳介動脈より採血し、プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンビン時間(APTT)、白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)及びヘマトクリット値(Ht)を測定した。

試験結果： ウサギの血液凝固時間に対し、何ら影響を示さなかった。血液学的検査に対しては、投与 1 時間後の 100 mg/kg 投与群でヘマトクリット値の有意な低下が観察されたが、採血時の影響と考えられた。

9) 受容体結合に対する作用

試験方法： 検体の 10^{-4} M を用いて、中枢性及び末梢性の histamine H_1 受容体、 H_2 、 H_3 受容体、中枢性及び筋肉性 nicotine N 受容体、noradrenaline α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 受容体、GABA 受容体、imidazoline 受容体、muscarine M_1 、 M_2 、 M_3 受容体、opioid 受容体、serotonine 5-HT 受容体と其々のリガンドとの結合への影響を検討した。

試験結果： 末梢性の histamine H_1 受容体、中枢性及び筋肉性 nicotine N 受容体に対し、それぞれ 15、27 及び 16%の結合抑制を示し、histamine H_2 受容体の結合を 50%以上増強した。その他の受容体の結合に対しては、何ら作用を示さないか 10%以下の結合抑制であった。

以上の結果より、本検体は無麻酔動物及び麻酔動物の生体機能に対して、自発運動抑制、鎮痛作用及び体温低下など一部中枢神経抑制作用と縮瞳及び摘出平滑筋収縮の増大など自律神経系の興奮作用を示し、これにはニコチン性及びヒスタミン神経系の関与が示唆された。また、尿排泄促進作用を有する可能性も示唆された。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

	試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
一般症状	一般症状 [Irwin 法] (マウス)	経口(蒸留水)	0, 550, 850, 1300, 2000, 2600	♂:5 ♀:5	850 以上	550	850mg/kg 以上で自発運動の低下、群居性の低下、1300mg/kg 以上で立毛、体温低下、2000mg/kg 以上で振戦、痙攣、皮膚蒼白、腹這い姿勢、外刺激に対する反応の低下、発声、眼瞼下垂 2600mg/kg では♂: 3/5、♀: 4/5 例が死亡。
中枢神経系	自発運動量 (マウス)	経口(蒸留水)	0, 850, 1300, 2000	♂:10	2000	1300	2000mg/kg 群で顕著な自発運動量の低下
	Hexobarbital 睡眠増強作用 (マウス)	経口(蒸留水)	0, 850 1300, 2000	♂:10		2000	影響なし
	最大電撃痙攣 (マウス)	経口(蒸留水)	0, 850, 1300, 2000	♂:10		2000	2000mg/kg 群で死亡例の増加傾向がみられたが、有意な変化ではなかった。
	鎮痛作用 [酢酸 writhing 法] (マウス)	経口(蒸留水)	0, 550, 850, 1300, 2000	♂:10	850 以上	550	850mg/kg 以上で用量相関性に Writhing 回数が減少
	体温(ラット)	経口(蒸留水)	0, 550, 850, 1300, 2000	♂:5	850 以上	550	850mg/kg 以上で体温の低下 2000mg/kg では 2/4 例死亡
	脳波 (ウサギ)	静注(蒸留水)	0, 10, 30, 100	♂:3		100	検体による影響なし
骨格筋	懸垂時間 [Courvoisier 法] (マウス)	経口(蒸留水)	0, 850, 1300, 2000	♂:10		2000	影響なし
	腓骨神経— 前脛骨筋収縮 [麻醉下] (ウサギ)	静注(蒸留水)	0, 10, 30, 100	♂:4		100	影響なし
	摘出横隔膜 神経筋収縮 [マグヌス管] (ラット)	<i>in vitro</i> (Krebs-Hensel eite 液)	0, 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻³ g/ml	♂:4		10 ⁻³ g/ml	影響なし
自律神経系	瞳孔径(ラット)	経口 (蒸留水)	0, 850, 1300, 2000	♂:5	1300 以上	850	1300mg/kg 以上で縮瞳
	摘出輸精管収縮 [マグヌス管] (ラット)	<i>in vitro</i> (Krebs-Hensel eite 液)	0, 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻³ g/ml	♂:4	10 ⁻³ g/ml	10 ⁻⁴ g/ml	10 ⁻³ g/ml で電気刺激による筋収縮を増大
呼吸・循環器	呼吸数・血圧、 血流量、心拍数、 心電図 [麻醉下](イヌ)	静注(蒸留水)	0, 10, 30, 100	♂:3		100	影響なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三井化学株式会社にある。

試験項目 (試験動物)		投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数/群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
消化器系	炭末輸送能 (マウス)	経口 (蒸留水)	0, 850, 1300, 2000	♂:10		2000	影響なし
	摘出回腸 [マグヌス管] (モルモット)	<i>in vitro</i> (Tyrode 液)	0, 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻³ g/ml	♂:4	10 ⁻³ g/ml	10 ⁻⁴ g/ml	10 ⁻³ g/ml でヒスタミン収縮を抑制 アセチルコリン、バリウム収縮に 対しては影響なし
腎機能	腎機能 (ラット)	経口 (蒸留水)	♂♀:0, 360, 550, 850, 1300 ♂:2000	♂:5 ♀:5	♂:850 以上 ♀:1300 以上	♂:550 ♀:850	1300mg/kg 以上で尿電解質濃 度の上昇 ♂の 850mg/kg で尿量の増加、 1300 mg/kg 以上で増加傾向
血液系	PT, APTT, WBC, RBC, Ht, Hb (ウサギ)	静注 (蒸留水)	0, 10, 30, 100	♂:3		100	影響なし
受容体	受容体結合試験 (マウス、ラット、 モルモット)	<i>in vitro</i>	10 ⁻⁴ M	供試受容体(由来動物)		結合能(%)	末梢性ヒスタミン H ₁ 受容体及 び中枢性、筋肉性ニコチン N 受容体との結合を抑制、ヒスタ ミン H ₂ 受容体との結合を増大
				noradrenaline α ₁ (ラット)		93.9	
				noradrenaline α ₂ (ラット)		93.8	
				noradrenaline β ₁ (ラット)		97.7	
				noradrenaline β ₂ (モルモット)		101.3	
				GABA (ラット)		106.9	
				中枢性 histamine H ₁ (モルモット)		91.9	
				末梢性 histamine H ₁ (モルモット)		84.8	
				histamine H ₂ (モルモット)		162.5	
				histamine H ₃ (ラット)		93.1	
				中枢性 imidazoline I ₂ (ラット)		103.4	
				muscarine M (ラット)		100.1	
				muscarine M ₁ (ラット)		95.0	
				muscarine M ₂ (ラット)		100.2	
				muscarine M ₃ (ラット)		104.3	
				中枢性 nicotine N (ラット)		72.9	
				筋肉性 nicotine N (マウス)		83.8	
				opioid (ラット)		105.3	
				serotonine 5-HT (ラット)		93.2	