

(8) 繁殖性に及ぼす影響

① ラットを用いた2世代繁殖試験

(資料 No.17)

試験機関 : WIL Research Laboratories, Inc. (GLP)

報告書作成年 : 1999年

検体純度 :

供試動物 : CrI : CD[®](SD)BR系ラット、試験開始時約6週齢、1群雌雄各30匹(F₀、F₁世代)
開始時体重範囲 : 雄 130-196g、雌 115-158g

試験期間 : F₀世代 ; 投与開始からF₁児離乳時までの18週間(交配まで70日間投与)
F₁世代 ; 離乳時からF₂児離乳時までの18週間(交配まで70日間投与)
(本試験 : 1996年12月19日-1997年9月16日)
(追加試験 : 1998年2月10日-1998年11月3日)

試験方法 : 検体を0、20、80および200 ppmの濃度で飼料に混入し、自由に摂食させた。飼料は、
毎週1回調製した。
また、F₁世代体重への影響を確認する為に、0、7.5、15、20 ppm群からなる追加試験を同様の方法で実施した。

投与量設定根拠 ;

症状および死亡率 ; 死亡および外観は1日2回観察し、詳細な症状観察は週1回実施した。

体重 ; F₀およびF₁親世代の雄については、試験期間中、週1回測定した。

F₀およびF₁親世代の雌については、生育および交配期間には週1回、交尾確認後は妊娠0、4、7、11、14、20日および哺育1、4、7、14、21日に測定した。

飼料摂取量 ; F₀およびF₁親世代の雌雄について、交配期間を除き週1回測定した。なお、妊娠、哺育中のF₀およびF₁親世代の雌については、体重測定と同様の間隔で測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

交配および交尾・妊娠の確認；雌雄1対1で最高10日間同居させ、膣栓あるいは膣垢中の精子の存在により交尾を確認した。10日間交尾が確認されなかった雌は、交尾能力が確認された同一試験群の雄と最高5日間同居させた。合計15日間交配しても交尾が確認されない雌はケージに収容した。交尾確認日を妊娠0日とした。

繁殖性に関する指標；各雌親動物毎に、交配、妊娠および出産の観察に基づき、次の指標を算出した。

$$\text{交尾率} = (\text{交尾動物数} / \text{交配動物数}) \times 100$$

$$\text{雄授胎率} = (\text{児が得られた雄動物数} / \text{交配雄動物数}) \times 100$$

$$\text{雌受胎率} = (\text{妊娠雌動物数} / \text{交配雌動物数}) \times 100$$

$$\text{出産率} = (\text{生存児を出産した雌動物数} / \text{妊娠雌動物数}) \times 100$$

分娩時観察；F₀およびF₁親世代の妊娠雌は自然分娩させ、分娩状況を1日2回観察した。分娩後、性別および外表異常の有無を検査し、死亡および生存児数を記録した。

また、個体毎に妊娠期間を算出した。

児動物の観察；F₁およびF₂児世代について、哺育期間中毎日生死および外観の観察を行った。

また、哺育1、4、7、14、21日に、体重測定および詳細な症状観察を実施した。

分娩時に引き続き、哺育4、7、14、21日には各動物の性別を検査した。

4日までに死亡した動物には内臓検査を施し、外表異常の認められる個体についてはさらに骨格検査も実施した。また、4日以降に死亡した動物には詳細な肉眼的病理検査を施した。

哺育4日に、1腹の児動物数が8匹(雌雄各4匹)となるように調整した。

以下の指標を算出した。

$$\text{生存同腹児数} = \text{哺育0日の総生存児数} / \text{哺育0日の生存児のある腹数}$$

$$0 \text{ あるいは } 4 \text{ 日生存率} = (0 \text{ あるいは } 4 \text{ 日生存児数} / \text{新生児数}) \times 100$$

$$N \text{ 期間生存率(調整後)} = (N \text{ 期間終了時の生存児数} / \text{開始時生存児数}) \times 100$$

さらに、選別したF₁動物については、性成熟を評価する為、包皮分離および膣開口日を、各々生後40日あるいは30日から生後53日まで記録した。

精子検査；F₀およびF₁親世代の雄については、安楽死の直後、全群を対象として精子の運動性、精子細胞数および精子産生率を調べ、対照群と高用量群を対象として精子形態を検査した。追加試験では実施しなかった。

肉眼的病理検査；F₀およびF₁親世代の全生存動物は、各々F₁およびF₂児世代の離乳後に屠殺し、詳細に検査した。また、F₁動物のうち親世代として選抜されなかった動物および離乳したF₂世代も同様に検査した。死亡動物についても検査を実施した。

臓器重量；F₀およびF₁親世代については、以下の臓器の重量を測定し、体重比(相対重量)を算出した。

副腎、脳、精巣上体、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、前立腺、精嚢および凝固腺、脾臓、精巣、胸腺、子宮

非選抜F₁および全F₂児動物については、脳、脾臓および胸腺重量を測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

病理組織学的検査；F₀およびF₁親世代の対照群および高用量群ならびに死亡動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、鏡検した。追加試験では実施しなかった。

副腎、脳、精巣上体、子宮頸、凝固腺、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、前立腺、精囊、脾臓、精巣、胸腺、子宮、膈、精管、肉眼的病変部

結果：結果の概要を表-2（本試験成績）および表-3（追加試験成績）に示す。

（親世代）F₀およびF₁親世代のいずれにおいても、死亡、症状、飼料摂取量、肉眼的病理検査所見、臓器重量および病理組織学的検査所見には、検体投与に起因すると考えられる影響は認められなかった。

生育期間中の体重増加量は、F₀世代の200 ppm群雌雄で有意に減少した。F₁動物では、80および200 ppm群の雌雄ならびに20ppm群の雌で有意に減少した。

20ppm群雌における変化を確認する為、0、7.5、15、20ppm群からなる繁殖試験を追加実施したところ、いずれの群においても体重増加に対する影響は認められなかった。臓器重量では、20ppm群F₀雌の胸腺の絶対および相対重量、ならびに7.5、15、および20ppm群 F₁雄の副腎の絶対重量が対照群と比較して有意に増加していたが、片性の1世代のみに認められ、用量に対応した反応が認められないこと等から検体投与による影響とは考えられなかった。その他の検査項目にも何ら検体投与による影響を示唆する変化は認められず、追加試験の無毒性量は20ppmと判断された(表-3)。

従って、本試験において20ppm群雌で生育期に認められた変化は、検体投与に起因する影響ではないと判断された。妊娠期の体重は、200ppm群のF₀動物で妊娠初期に、F₁動物で全妊娠期間に亘って対照群と比較して有意な低値を示したが、妊娠期間における体重増加量に全く影響は認められなかった。また、哺育期の体重も、200ppm群のF₀およびF₁動物で対照群と比較して有意に低下していたが、体重増加量に有意な変化は認められなかった。従って、これらの変化は、妊娠以前の体重増加抑制によるものと判断された。

飼料摂取量(g/kg/day)は、妊娠および哺育期に80あるいは200ppm群で有意に増加したが、g/animal/dayで算出した値に同様の変化が認められず、また対応する体重増加も認められなかったことから、主として体重低下に関連する変化であり、検体投与による影響とは考えられなかった。

臓器重量では、200ppm群F₀雌で脾臓重量が増加したが、軽度(9%)であり、同群雄およびF₁雌雄に変化が認められず、対応する病理学的変化も認められなかったことから、検体投与による影響とは考えられなかった。その他F₀およびF₁世代を通じて、種々の臓器で統計学的に有意な変化が認められたが、いずれも絶対あるいは相対重量いずれか一方のみの変化であったことから、主として低最終体重に関連する変化であり、検体投与による影響とは考えられなかった。

検体投与群における交尾率および受胎率は、各々92.9%以上および90%以上であり対照群と変わらず、妊娠および交尾前期間ならびに精子検査所見にも変化はなく、繁殖に対する影響はいずれの群および世代においても認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

(児世代) 児世代では、一腹の平均児数、出産児数、性比および生存率に変化はなく、胎児重量、症状、肉眼的病理検査所見、臓器重量および性成熟にも、検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果より、本剤のラットを用いた飼料混入投与による2世代繁殖試験における影響として、200および/あるいは80 ppm群の親世代において体重増加抑制が認められた(F_0 世代では200ppm投与群のみ)。20ppm投与群では、検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。繁殖および児動物に対しては、いずれの投与群においても何ら影響は認められなかった。

従って、本試験における無毒性量は、親動物の雌雄何れにおいても20ppm

(F_0 雄：1.5 mg/kg/day、 F_0 雌：1.7 mg/kg/day、 F_1 雄：1.7 mg/kg/day、 F_1 雌：1.9 mg/kg/day)であると判断した。また、繁殖および児動物については、最高投与量の200 ppm群でも影響は認められなかった。

表-1 試験項目概要 (本試験および追加試験)

世代	期間 (週間)	作業手順	試験項目
F ₀	生育 (10週)		症状、生死観察：毎日 体重、飼料摂取量測定：週1回
	交配 (2週)	雌雄1対1で交配 交尾は膈栓の存在で確認 (妊娠0日)	交配状況観察 体重測定：週1回
	妊娠 (3週)		体重、飼料摂取量測定： 妊娠0、4、7、11、14、20日
F ₁	F ₁ 出産		妊娠期間算出、出産状況の観察： 出産児数、生存児数、外表異常および同腹生存児体重測定
	F ₁ 哺育 (3週)	出産後4日目に同腹児数を8匹(雌雄各4)に調整	F ₀ 雌動物の体重、飼料摂取量測定： 哺育1、4、7、11、14、21日 F ₁ 動物の生死、外観観察：毎日 F ₁ 動物の症状(詳細)および体重測定： 哺育 1、4、7、14、21日 F ₁ 動物の性別確認： 哺育 4、7、14、21日 F ₁ 死亡動物の内臓および骨格検査
	F ₁ 離乳	継代用の雌雄各30匹を可能な限り各腹から選抜	継代用以外のF ₁ 動物の肉眼的病理検査、臓器重量測定 F ₀ 親動物の肉眼的病理検査、病理組織学的検査、精子検査
	生育 (14週)		F ₁ 動物の性成熟検査 (F ₀ に準ずる)
F ₂	交配 (2週)	(F ₀ に準ずる)	(F ₀ に準ずる)
	妊娠 (3週)		(F ₀ に準ずる)
	F ₂ 出産		(F ₀ /F ₁ に準ずる)
	F ₂ 哺育 (3週)	(F ₁ に準ずる)	(F ₀ /F ₁ に準ずる)

表-2 試験結果(本試験)

世代				親：F ₀ 児：F ₁				親：F ₁ 児：F ₂					
投与量 (ppm)				0	20	80	200	0	20	80	200		
供試動物数		雄		30	30	30	30	30	30	30	30		
		雌		30	30	30	30	30	30	30	30		
検体摂取量 (mg/kg/day)		雄		-	1.5	6.1	15.3	-	1.7	6.9	17.4		
		雌		-	1.7	6.9	17.2	-	1.9	7.8	19.4		
親動物	症状			検体投与に起因する所見なし				検体投与に起因する所見なし					
	死亡率(%)		雄	0	3.3	0	0	0	0	0	0		
			雌	0	0	0	0	0	0	0	3.3		
	体重増加量 (%)	生育*	雄		(102)	(97)	89↓		(98)	89↓	88↓		
			雌		(102)	(97)	84↓		91↓	92↓	84↓		
		妊娠哺育	雄		(98)	(101)	(102)		(101)	(106)	(100)		
			雌		(250)	(267)	(83)		(62)	(23)	(23)		
	飼料摂取量** (%)	生育*	雄		(99)	(100)	(101)		(99)	(101)	(102)		
			雌		(101)	(104)	(103)		(99)	(102)	(102)		
		妊娠哺育	雄		(101)	106↑	118↑		(99)	(104)	109↑		
			雌		(107)	(104)	112↑		(106)	110↑	113↑		
	臓器重量 (%)	雄	肝臓	絶対 相対							86↓	86↓	
			脳	絶対 相対				106↑		106↑		113↑	
		雌	腎臓	絶対 相対				108↑				109↑	
			肝臓	絶対 相対								88↓	
			脾臓	絶対 相対				109↑ 117↑				113↑	
			卵巢	絶対 相対				113↑				115↑	
			副腎	絶対 相対				112↑		114↑		118↑	
			下垂体	絶対 相対								87↓	
			肉眼的病理検査			検体投与に起因する所見なし				検体投与に起因する所見なし			
			病理組織学的検査			検体投与に起因する所見なし				検体投与に起因する所見なし			
	精子検査			検体投与に起因する所見なし				検体投与に起因する所見なし					
	妊娠期間			21.8	21.9	21.6	21.8	21.7	21.8	21.8	21.9		
	交尾率(%)	雄		100.0	96.6	100.0	96.7	93.3	96.7	92.9	96.6		
		雌		100.0	96.7	100.0	100.0	96.7	100.0	96.4	100.0		
	受胎率(%)	雄		90.0	93.1	93.3	96.7	86.7	93.3	92.9	93.1		
		雌		90.0	90.0	93.3	96.7	86.7	96.7	96.4	93.1		
	出産率(%)			100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		
	交尾前期間(日)			2.2	2.8	2.2	2.8	2.9	3.1	3.1	2.9		

統計学的検定法：カイ二乗検定、Dunnnett 検定、Mann-Whitney 検定 ↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01

* : 申請者が算出した。

** : g/kg/day で算出された値を用いた。

() : 参考値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

表-2 - 続き -

世代				親：F ₀ 児：F ₁				親：F ₁ 児：F ₂				
投与量 (ppm)				0	20	80	200	0	20	80	200	
児動物	生存率／ 腹 (%)	産児数		14.3	14.1	14.3	13.9	12.2	13.7	13.6	12.0	
		性比(雄)		55.0	50.1	48.3	49.8	52.4	44.9 ↓	55.6	49.6	
		0日		97.4	98.5	98.8	98.5	99.4	98.8	96.4	97.8	
		4日(間引き前)		95.1	96.0	96.4	97.8	94.3	97.1	95.3	95.9	
		47日		100.0	100.0	97.8 ↓	100.0	99.0	100.0	100.0	99.5	
		7-14日		100.0	98.1	99.1	99.1	100.0	100.0	100.0	100.0	
		14-21日		99.0	98.6	100.0	99.6	100.0	99.6	100.0	100.0	
		4-21日		99.0	97.2	96.9	98.7	99.0	99.6	100.0	99.5	
	体重 (g)	1日		6.7	6.9	6.4	6.8	6.5	6.6	6.6	7.0 ↑	
		4日 (間引き前)		9.7	9.9	8.7 ↓	9.6	9.5	9.5	9.6	10.0	
		4日 (間引き後)		9.7	9.9	8.7 ↓	9.6	9.6	9.5	9.5	9.9	
		7日		15.9	15.8	14.2 ↓	15.2	15.6	15.5	15.5	15.8	
		14日		29.7	30.7	29.3	30.4	31.8	31.9	32.3	31.5	
		21日		43.8	46.2	42.6	44.4	49.1	49.8	49.7	49.0	
	症状			検体投与に起因する所見なし				検体投与に起因する所見なし				
	臓器重量	雄	脾臓	絶対								
				相対						111 ↑		
		雌	脾臓	絶対		122 ↑				113 ↑		
				相対		115 ↑				112 ↑		
	肉眼的病理検査				検体投与に起因する所見なし				検体投与に起因する所見なし			
	性成熟				検体投与に起因する所見なし							

統計学的検定法：カイ二乗検定、Dunnett 検定、Mann-Whitney 検定

↑ ↓ : p<0.05、↑ ↓ : p<0.01

表-3 試験結果(追加試験)

世代				親：F ₀ 児：F ₁				親：F ₁ 児：F ₂				
投与量 (ppm)				0	7.5	15	20	0	7.5	15	20	
供試動物数		雄		30	30	30	30	30	30	30	30	
		雌		30	30	30	30	30	30	30	30	
検体摂取量 (mg/kg/day)		雄		-	0.6	1.1	1.5	-	0.6	1.1	1.5	
		雌		-	0.6	1.3	1.7	-	0.6	1.2	1.7	
親動物	症状			検体投与に起因する所見なし				検体投与に起因する所見なし				
	死亡率(%)		雄	0	3.3	0	0	0	3.3	0	3.3	
			雌	0	0	3.3	0	3.3	0	6.7		
	体重 増加量 (%)	生育 *	雄		(100)	(96)	(97)		(102)	(99)	(99)	
			雌		(101)	(101)	(97)		(98)	(97)	(100)	
		妊娠 哺育	雌		(97)	(103)	(103)		(93)	(99)	(100)	
			雌		(100)	(68)	(89)		(139)	(133)	(133)	
	飼料摂 取量 ** (%)	生育 *	雄		(102)	(100)	(103)		(103)	(101)	(103)	
			雌		(103)	(103)	(101)		(104)	(100)	(101)	
		妊娠 哺育	雌		(101)	(101)	(100)		(105)	(100)	(97)	
			雌		(98)	(100)	(99)		(99)	(102)	(97)	
	肉眼的病理検査			検体投与に起因する所見なし				検体投与に起因する所見なし				
	臓器重量	雄	肝臓	絶対								
				相対				107↑				
			腎臓	絶対			94↓					
				相対								
			精巣上 体尾(右)	絶対								
				相対				111↑				
			副腎	絶対						112↑	111↑	111↑
				相対								
		雌	腎臓	絶対						93↓		
				相対								
			胸腺	絶対				117↑				
				相対				118↑				
妊娠期間			22.3	22.2	22.1	22.0	21.9	22.1	22.0	21.7		
交尾率(%)		雄	96.6	96.7	100.0	96.7	86.2	93.3	90.0	89.3		
		雌	96.7	96.7	100.0	96.7	96.6	93.3	96.7	92.9		
授胎率(%)		雄	90.0	90.0	86.7	86.7	69.0	80.0	73.3	82.1		
受胎率(%)		雌	90.0	90.0	90.0	96.7	79.3	83.3	80.0	85.7		
出産率(%)			96.2	92.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.8		
交尾前期間(日)			2.3	2.3	2.6	2.0	3.6	2.6	3.7	3.2		

統計学的検定法：カイ二乗検定、Dunnett 検定、Mann-Whitney 検定 ↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01

* : 申請者が算出した。

** : g/kg/day で算出された値を用いた。

() : 参考値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

表-3 - 続き -

世代			親 : F ₀ 児 : F ₁				親 : F ₁ 児 : F ₂			
投与量 (ppm)			0	7.5	15	20	0	7.5	15	20
児動物	生存率 / 腹 (%)	産児数	14.5	14.2	14.6	14.6	13.8	13.3	14.8	15.0
		性比(雄)	54.0	48.8	44.0	49.4	49.4	47.9	48.7	48.8
		0日	99.3	97.1	98.2	100.0	99.5	98.5	98.2	98.2
		4日(調整前)	91.7	90.1	97.0	98.0	96.2	95.9	97.4	93.1
		47日	99.5	99.5	100.0	99.5	100.0	99.5	99.5	100.0
		7-14日	99.4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		14-21日	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		42日	99.0	99.5	100.0	99.5	100.0	99.5	99.5	100.0
	体重 (g)	1日	7.2	7.3	7.6	7.4	7.1	7.2	7.1	6.7
		4日(調整前)	10.6	10.5	11.4	10.9	10.5	10.6	10.4	9.7
		4日(調整後)	10.5	10.5	11.4	10.9	10.4	10.5	10.4	9.7
		7日	17.3	17.0	18.6	17.9	17.1	17.1	17.2	16.0
		14日	35.0	34.7	37.1	35.7	34.6	34.5	35.3	34.0
		21日	59.5	58.0	61.8	59.4	55.0	54.7	56.1	53.3
	症状		検体投与に起因する所見なし				検体投与に起因する所見なし			
	臓器重量:	絶対								
		胸腺(雌) 相対						90↓		
	肉眼的病理検査		検体投与に起因する所見なし				検体投与に起因する所見なし			
	性成熟		検体投与に起因する所見なし							

統計学的検定法 : カイ二乗検定、Dunnnett 検定、Mann-Whitney 検定 ↑ ↓ : p<0.01

② ラットにおける催奇形性試験

(資料 No. 18)

試験機関 : WIL Research Laboratories, Inc. (GLP 対応)

報告書作成年 : 1997 年

検体純度 :

供試動物 : CrI:CD® (SD) BR 系ラット、開始時約 13 週齢、1 群雌 25 匹
開始時体重範囲 ; 221-314g

試験期間 : 妊娠 20 日間 (1996 年 7 月 30 日 - 8 月 23 日)

試験方法 : 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)溶液に懸濁し、最新の体重を基準に 0、10、100 および 500 mg/kg の投与量で、妊娠雌動物に妊娠 6 日-15 日の 10 日間、毎日 1 回 16 ゲージのステンレススチール製カニューレを用いて強制経口投与した。交配成立の証拠が得られた日を妊娠 0 日とした。

投与量設定根拠 ;

試験項目 :

親動物 ; 死亡を 1 日 2 回、症状を 1 日 1 回観察した。体重および飼料摂取量は、妊娠 0、6-16、20 日に個別別に測定した。妊娠 20 日に帝王切開し、黄体数、総着床数、吸収胚および胎児数および子宮内位置を調べた。平均子宮重量および子宮重量を除いた平均補正体重を算出した。

妊娠子宮検査により得られたデータは、1)腹毎の実数平均値を基準として群平均を算出する方法および 2)腹毎の比率を基準として群平均を算出する方法の 2 通りの方法で処理した。以下の指標を求めた。

$$\text{着床率} = (\text{着床数} / \text{妊娠黄体数}) \times 100$$

$$\text{総吸収胚率} = (\text{早期および後期吸収胚数} / \text{着床数}) \times 100$$

$$\text{着床後死亡胚率} = (\text{死亡胚} \cdot \text{死亡胎児数} / \text{着床数}) \times 100$$

胎 児 ; 生存胎児の性別を観察し、個別別体重を測定した後、外表異常の有無を検査した。外表検査の後、Stuckhardt と Poppe の未固定内臓観察法の変法により内臓検査を、さらにその後 Dawson 法に準じて骨格検査を実施し、奇形および変異の有無を調べた。胎児検査により得られたデータは、各群における所見が得られた胎児数および腹数で評価した他、腹を標本単位と考え腹毎の比率を算出し評価した。

結 果 : 試験成績概要を次頁の表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

親動物；いずれの群でも死亡は認められなかった。主な症状として、500 mg/kg 群で鼻周囲の赤色付着物、四肢の退色、糞量の減少および膈からの褐色流出物が観察された。100 mg/kg 群では主に鼻周囲に赤色汚れ・付着物が認められた。
投与期間中、100 および 500 mg/kg 群では、体重増加量および飼料摂取量の有意な減少が認められた。
剖検では、いずれの群にも検体投与に起因する所見は認められなかった。

着床後死亡胚の腹当たりの平均数は、対照群の 0.4 に比較して 100 mg/kg 群で 1.0 と有意に高く、また比率（腹当たりの％）でも、対照群の 2.7%と比較して 100 および 500 mg/kg 群で各々 10.0 および 5.7%と有意に高かった。これに対応して、生存胎児の比率が 100 および 500 mg/kg 群で有意に低下した。
しかしながら、これらはいずれも背景データの範囲内の変動であり[着床後死亡胚の腹当たりの平均数：0.3-1.4、比率（腹当たりの％）：2.2-13.5%]、また、対照群の値 2.7%は背景データの範囲内であったものの下限に近く、3%を下回る値は全背景データの 3.5%に過ぎないことから、この異常に低い対照群の値が統計学的解析結果に影響したものと思われた。さらに、着床後胚死亡に投与量との対応は認められず、発生毒性の最も有用な指標であると考えられる胎児体重に影響が認められなかったことから、着床後胚死亡に認められた変化は検体投与の影響とは考えられなかった。

児動物；胎児重量および性比に検体投与の影響は認められなかった。

形態学的検査では、外表および内臓奇形が、0、10、100 および 500mg/kg 群で各々 0(0)、0(0)、1(1)および 3(1)匹の胎児(腹)に認められたが、背景データ内あるいはこれをわずかに上回る程度であり、奇形の実数および型を考慮しても検体投与による影響とは考えられず、いずれも自然発生的なものと考えられた。骨格奇形は認められなかった。

また、内臓および骨格変異(骨化変異を含む)が投与群で観察されたが、いずれも対照群でも認められており、発生頻度も低く、背景データ内であることから、検体投与による影響とは考えられなかった。外表変異は認められなかった。

以上の結果より、本剤のラットを用いた器官形成期強制経口投与試験における影響として、親動物では 100 mg/kg 群以上で症状ならびに体重増加量および飼料摂取量の減少が認められた。10 mg/kg 群の親動物および全投与群の児動物に、検体投与による影響は認められなかった。また、いずれの投与量においても催奇形性は認められなかった。
従って、本試験における無毒性量は親動物で 10 mg/kg、胎児で 500 mg/kg と判断され、最高投与量の 500 mg/kg 群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日産化学工業株式会社にある。

試験成績総括表

投与量 (mg/kg)		0	10	100	500	
1 群当たりの動物数		25	25	25	25	
親動物	死亡動物数		0	0	0	0
	非妊娠動物数		0	3	0	1
	妊娠動物数		25	22	25	24
	妊娠率 (%)		100	88	100	96
	妊娠 20 日生存数		25	22	25	24
	症状		—	—	体表(主に鼻周囲)の赤色汚 れ・付着物	鼻周囲の赤色付着物 四肢の退色 糞量の減少 膣からの褐色流出物
	体重増加量 (g)	(0-20 日)	139	140 [101]	107↓ [77]	98↓ [71]
		(6-16 日)	44	40 [91]	6↓ [13.6]	3↓ [6.8]
	飼料摂取量 (g/kg/day)	(0-20 日)	78	76 [97]	72↓ [92]	69↓ [88]
		(6-16 日)	77	74 [96]	56↓ [73]	52↓ [68]
	剖検所見		検体投与に起因する所見なし			
	着床所見 ・腹平均	黄体数	17.4	18.7	18.2	17.9
		着床数	15.4	16.7	15.2	15.2
		(%) *	88.5	89.3	83.5	84.9
		生存胎児数	15.0	16.0	14.1	14.3
		(%)	97.3	96.1	90.0↓	94.3 ↓
		着床前死亡胚数	2.0	2.0	3.0	2.8
(%)		11.6	10.6	17.3	14.2	
早期吸収胚数		0.4	0.7	1.0 ↑	0.8	
(%)		2.7	3.9	9.7↑	5.4 ↑	
後期吸収胚数		0.0	0.0	0.0	0.0	
(%)	0.0	0.0	0.0	0.2		
総吸収胚率(%)		2.7	3.9	9.7↑	5.7 ↑	
死亡胎児数		0.0	0.0	0.0	0.0	
(%)		0.0	0.0	0.3	0.0	
着床後死亡胚数		0.4	0.7	1.0 ↑	0.8	
(%)		2.7	3.9	10.0↑	5.7 ↑	

統計解析法：Dunnett 法、Mann-Whitney 法、Kruskal-Wallis 法

↑ ↓ : p < 0.05 ↑ ↓ : p < 0.01

[] 中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

* : 申請者が算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

試験成績総括表 ー 続きー

投与量 (mg/kg)		0	10	100	500
検査親動物数		25	22	25	24
胎児	平均生存胎児体重	3.5	3.5	3.6	3.5
	生存胎児の雄性比(%)	46.7	54.2	52.1	51.9
	外表検査胎児数 (腹)	374 (25)	352 (22)	353 (24)	344 (24)
	外表奇形	外表奇形胎児数 (腹)	0	0	1 (1)
		外表奇形/腹の出現率(%)	0	0	0.3
		内訳 臍ヘルニア	0	0	1 [0.3]
	内臓検査胎児数 (腹)		374 (25)	352 (22)	353 (24)
	内臓奇形	内臓奇形胎児数 (腹)	0	0	0
		内臓奇形/腹の出現率 (%)	0	0	0
		内訳 食道後大動脈弓	0	0	2 [0.9]
	内臓変異	内臓変異胎児数 (腹)	0	0	0
		内臓変異/腹の出現率(%)	0	0	0
		内訳 大血管変異	0	0	0
	骨格検査胎児数 (腹)		374 (25)	352 (22)	353 (24)
	骨格奇形	骨格奇形胎児数 (腹)	0	0	0
		骨格奇形/腹の出現率(%)	0	0	0
	骨格・骨化変異/腹の出現率(%)		29.4	23.9	31.7
	骨格変異	骨格変異胎児数 (腹)*	16 (8)	5 (5)	26 (9)
		内訳	第 7 頸肋	2 [0.5]	0
			完全第 14 肋骨	0	0
			痕跡的第 14 肋骨	14 [3.6]	3 [0.8]
			湾曲肋骨	0	2 [0.6]
			胸骨分節異常配列	0	0
				0	3 [1.2]
	骨化変異	骨化変異胎児数 (腹)*	102 (20)	76 (21)	97 (21)
		内訳	舌骨未骨化	3 [0.7]	3 [0.8]
			第 1 頸椎椎体骨化	84 [21.9]	51 [14.4]
			椎弓骨化不全	0	0
			恥骨未骨化	0	0
			第 13 肋骨骨化不全	2 [0.7]	1 [0.3]
			胸骨分節糸状付着物	1 [0.3]	0
			第 1-4 胸骨分節未骨化	0	2 [0.6]

統計解析法：Dunnett 法、Mann-Whitney 法、Kruskal-Wallis 法、Fisher 直接確率法

↑ ↓ : p<0.05 ⇕ : p<0.01

[]内の値は腹毎の比率の平均

*：申請者が集計した

③ ウサギにおける催奇形性試験

(資料 No.19)

試験機関 : WIL Research Laboratories, Inc. (GLP 対応)

報告書作成年 : 1997 年

検体純度 :

供試動物 : New Zealand White 系ウサギ、開始時約 30 週齢 1 群雌 20 匹
開始時体重範囲 3234-4508 g

試験期間 : 妊娠 29 日間 (1996 年 8 月 18 日-9 月 17 日)

試験方法 : 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)溶液に懸濁し、最新の体重を基準に 0、10、50 および 200 mg/kg の投与量で、人工授精した雌動物に妊娠 7 日-19 日の 13 日間、毎日 1 回 12 ゲージのステンレススチール製カニューレを用いて強制経口投与した。人工授精日を妊娠 0 日とした。

投与量設定根拠 ;

試験項目 :

親動物 : 症状および死亡を毎日 2 回観察した。体重は妊娠 0、7-20、24、29 日に、飼料摂取量は妊娠期間中毎日個体別に測定した。妊娠 29 日に帝王切開し、黄体数、総着床数、吸収胚および胎児数および子宮内位置を調べた。平均子宮重量および子宮重量を除いた平均補正体重を算出した。

妊娠子宮検査により得られたデータは、1)腹毎の実数平均値を基準として群平均を算出する方法および 2)腹毎の比率を基準として群平均を算出する方法の 2 通りの方法で処理した。以下の指標を求めた。

$$\text{着床率} = (\text{着床数} / \text{妊娠黄体数}) \times 100$$

$$\text{総吸収胚率} = (\text{早期および後期吸収胚数} / \text{着床数}) \times 100$$

$$\text{着床後死亡胚率} = (\text{死亡胚} \cdot \text{死亡胎児数} / \text{着床数}) \times 100$$

胎 児 : 生存胎児の性別を観察し、個体別体重を測定した後、外表異常の有無を検査した。外表検査の後、Stuckhardt と Poppe の未固定内臓観察法の変法により内臓検査を、さらにその後 Dawson 法に準じて骨格検査を実施し、奇形および変異の有無を調べた。胎児検査により得られたデータは、各群における所見が得られた胎児数および腹数で評価した他、腹を標本単位と考え腹毎の比率を算出し評価した。

結 果 : 試験成績概要を次頁の表に示す。

親動物 ; 対照群、50 および 200 mg/kg 群で各 1 例流産が認められたが、検体投与の影響とは考えられなかった。

症状、体重、飼料摂取量、妊娠子宮重量および肉眼的病理検査所見に検体投与による影響は認められなかった。

200 mg/kg 群で着床後死亡胚数および率が、統計学的に有意ではないが対照群の 0.4 (4.8%)と比較して 0.6 (12.9%)とやや高値を示した。しかしながらこの変動は、同群の 1 匹(動物番号 21250)で認められた全胚吸収(早期吸収)によるものであり、また同群の平均着床後死亡胚数および率は、背景データ^{註15}の範囲内であったことから、検体投与の影響とは考えられなかった。

児動物 ; 胎児重量および性比に検体投与の影響は認められなかった。

形態学的検査では、対照群、10、50 および 200 mg/kg 群でそれぞれ 3(3)、2(2)、2(2) および 2(2)の胎児(腹)に外表、内臓あるいは骨格奇形が認められた。これらの奇形は自然発生奇形と考えられた。

外表変異は認められず、内臓変異は対照群を含めて散見されたがその発現頻度に検体投与の影響は認められなかった。骨格検査において、10 mg/kg 群で胸骨分節異常配列の出現腹数が、また 10 および 200 mg/kg 群で胸骨分節異常配列の出現頻度(腹当たりの%)が有意に減少した。しかしながら本減少が胎児の発生に対する検体の悪影響を示すものとは考えられず、投与群間で用量との対応も認められないことから、検体投与の影響とは考えられなかった。その他、種々の変異が観察されたが、いずれも発生頻度が低く、対照群と同等かつ背景データの範囲内であり、用量との対応も認められないことから、検体投与の影響とは考えられなかった。

以上の結果より、本剤のウサギを用いた器官形成期強制経口投与試験において、検体投与の影響は親動物および児動物ともに認められなかった。

従って、本試験における無毒性量を親動物および胎児ともに 200 mg/kg と判断した。また、最高投与量の 200mg/kg 群でも催奇形性は認められなかった。

註15: 平均着床後死亡胚数/率の 88 試験における背景データ範囲は、各々 0.1-1.9 匹および 0.6-26.1%。

試験成績総括表

投与量 (mg/kg)			0	10	50	200
1 群当たりの動物数			20	20	20	20
親動物	死亡動物数		0	0	0	0
	非妊娠動物数		2	0	4	2
	妊娠動物数		18	20	16	18
	妊娠率 (%)		90	100	80	90
	流産動物数		1	0	1	1
	妊娠 29 日生存数		17	20	15	17
	症状		検体投与に起因する症状なし			
	体重増加量 (g)	(0-29 日)	496	604 [122]	631 [127]	583 [118]
		(7-20 日)	168	187 [111]	234 [139]	144 [86]
	平均飼料摂取量 (g/kg/day)	(0-29 日)	37	39 [105]	40 [108]	39 [105]
		(7-20 日)	42	43 [102]	44 [105]	40 [95]
	剖検所見		検体投与に起因する所見なし			
	着床所見 ・ 腹平均	黄体数	9.7	9.5	10.5	9.1
		着床数	7.0	7.0	6.7	6.3
		(%)*	72.2	73.7	63.8	69.2
		生存胎児数	6.6	6.8	6.3	5.7
(%)		95.2	97.4	94.9	87.1	
着床前死亡胚数		2.7	2.5	3.8	2.8	
(%)		25.8	24.8	34.7	30.7	
早期吸収胚数		0.2	0.1	0.3	0.5	
(%)		3.3	1.6	4.4	12.4	
後期吸収胚数		0.1	0.2	0.1	0.1	
(%)		1.5	1.1	0.7	0.6	
総吸収胚率(%)	4.8	2.6	5.1	12.9		
死亡胎児数	0.0	0.0	0.0	0.0		
(%)	0.0	0.0	0.0	0.0		
着床後死亡胚数	0.4	0.3	0.3	0.6		
(%)	4.8	2.6	5.1	12.9		

統計解析法：Dunnett 法、Mann-Whitney 法、Kruskal-Wallis 法、Fisher 直接確率法

[]中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

*：申請者が算出した。

試験成績総括表 ー 続き ー

投与量(mg/kg)			0	10	50	200		
1 群当たりの検査親動物数			17	20	15	17		
胎児	平均生存胎児体重		44.0	45.9	46.7	47.3		
	生存胎児の雄性比 (%)		51.1	53.1	48.2	60.0		
	外表検査胎児数 (腹)		113 (17)	135 (20)	95 (15)	97 (15)		
	外表奇形	外表奇形胎児数 (腹)	0	0	1 (1)	0		
		外表奇形/腹の出現率 (%)	0	0	0.7	0		
		内訳 短尾	0	0	1 [0.7]	0		
	内臓検査胎児数 (腹)		113 (17)	135 (20)	95 (15)	97 (15)		
	内臓奇形	内臓奇形胎児数 (腹)	1 (1)	0	0	0		
		内臓奇形/腹の出現率 (%)	0.8	0	0	0		
		内訳	肺葉欠損	1 [0.8]	0	0	0	
			食道後大動脈弓	1 [0.8]	0	0	0	
	内臓変異	内臓変異胎児数 (腹) *		19 (10)	11 (7)	18 (11)	12 (9)	
		内臓変異/腹の出現率 (%)		19.4	7.3	19.2	12.2	
		内訳	副脾	16 [16.4]	6 [3.9]	13 [14.5]	7 [7.5]	
			尿管大静脈後方偏位	3 [2.9]	3 [2.1]	1 [0.7]	1 [0.7]	
			大血管変異	0	0	0	1 [1.1]	
			胆嚢欠損/小型化	1 [0.7]	1 [0.6]	4 [4.0]	3 [2.8]	
			虹彩周囲の出血	0	1 [0.7]	0	0	
	骨格検査胎児数 (腹)		113 (17)	135 (20)	95 (15)	97 (15)		
	骨格奇形	骨格奇形胎児数 (腹)		3 (3)	2 (2)	1 (1)	2 (2)	
		骨格奇形/腹の出現率 (%)		2.6	1.3	0.8	1.9	
		内 訳	椎骨異常(肋骨異常併発も含む)	3 [2.6]	2 [1.3]	1 [0.8]	1 [1.0]	
			肋骨異常	0	0	0	1 [1.0]	
			肋骨球状肥大	0	0	1 [0.8]	0	
	骨格変異	骨格・骨化変異/腹の出現率(%)		69.0	68.6	75.4	73.8	
		骨格変異胎児数 (腹) *		74 (16)	95 (19)	68 (15)	67 (15)	
		内 訳	舌骨弓湾曲	2 [2.8]	10 [7.6]	3 [3.7]	8 [7.4]	
			仙椎前椎骨数 27	26 [22.2]	18 [12.3]	24 [28.6]	23 [22.5]	
			完全 13 肋骨	51 [41.3]	61 [44.0]	49 [53.7]	50 [56.4]	
			痕跡状第 13 肋骨	19 [20.4]	27 [17.7]	14 [16.2]	10 [9.6]	
			痕跡状第 14 肋骨	1 [0.6]	0	0	0	
			胸骨分節異常配列 (腹)	5 [5.0] (4)	0 [0.0 ↓] (0 ↓)	4 [3.1] (3)	0 [0.0 ↓] (0)	
		骨化変異	骨化変異胎児数 (腹) *		2 (2)	8 (6)	8 (3)	3 (2)
			内 訳	胸骨分節糸状付着物	2 [1.7]	1 [1.0]	1 [1.0]	0
	第 1 胸骨分節前方の過剰骨化部			0	1 [0.6]	1 [0.7]	0	
	第 5/6 胸骨分節未骨化			2 [2.2]	7 [4.9]	7 [11.1]	3 [3.0]	

統計解析法: Dunnett 法、Mann-Whitney 法、Kruskal-Wallis 法、Fisher 直接確率法

↑ ↓: p<0.05

[]中の値は腹毎の比率の平均

*: 申請者が算出した

(9) 変異原性

①細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 No.20)

試験機関 : Microbiological Associates, Inc. (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*)TA1535 株、TA1537 株、TA98 株、TA100 株およびトリプトファン要求性の大腸菌(*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用い、代謝活性化系(S-9Mix)の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて復帰変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、10-5000 μ g/plate の 7 用量について 2 回試験を実施した。各濃度につき 3 枚のプレートを用いた。結果の判定は、対照と比べ TA98, TA100 および WP2uvrA 株では 2 倍以上、TA1535 および TA1537 株では 3 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が 1 菌以上および 2 用量以上で認められ、かつ、量-反応の関係が認められた場合を陽性とした。

陽性対照として 2-ニトロフルオレン(2NF)、アジ化ナトリウム(SA)、9-アミノアクリジン(9AA)、メチルメタンスルフォネート(MMS)および 2-アミノアントラセン(2AA)を用いた。

用量設定根拠;

結 果 : 結果を表 1 および表 2 に示した。

2 回の試験のいずれにおいても、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下において検体は、代謝活性化の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

表 1 : 1 回目試験

薬 物	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩 基 対 置 換 型			フレームシフト型	
			TA 100	TA 1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA 98	TA 1537
溶媒対照 (DMSO)		-	121	6	16	14	6
検 体	10	-	112	6	11	13	6
	33	-	120	9	11	14	5
	100	-	127	5	17	14	3
	333	-	126	7	15	11	4
	1000	-	132	10	9	17	4
	3333	-	127	7	8	10	6
	5000	-	132	5	7	7	8
溶媒対照 (DMSO)			137	16	13	19	4
検 体	10	+	159	13	14	20	8
	33	+	149	14	16	18	9
	100	+	154	13	13	19	7
	333	+	155	14	13	17	8
	1000	+	211	14	9	14	10
	3333	+	211	13	11	14	10
	5000	+	213	13	7	10	5
陽 性 対 照	SA	1	-	508	446		
	2NF	1	-			117	
	9AA	75	-				394
	MMS	1000	-		204		
	2AA	1	+	2369	119	2329	455
		10	+		242		

表中の復帰変異コロニー数は 3 枚のプレートの平均値

SA : アジ化ナトリウム 2NF : 2-ニトロフルオレン 9AA : 9-アミノアカリジン

MMS:メチルメタンスルフォネート 2AA : 2-アミノアントラセン

表 2 : 2 回目試験

薬 物	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate				
			塩 基 対 置 換 型			フレームシフト型	
			TA 100	TA 1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA 98	TA 1537
溶媒対照 (DMSO)		-	102	7	10	26	4
検 体	10	-	124	6	10	28	4
	33	-	120	8	6	24	5
	100	-	135	6	8	28	4
	333	-	114	7	9	25	4
	1000	-	135	9	10	31	4
	3333	-	181	6	10	27	5
	5000	-	193	9	12	28	10
溶媒対照 (DMSO)		+	124	11	10	25	4
検 体	10	+	140	9	8	31	6
	33	+	137	8	12	26	4
	100	+	143	7	9	26	6
	333	+	129	6	10	21	5
	1000	+	166	9	13	28	6
	3333	+	118	7	7	30	7
	5000	+	159	9	8	27	9
陽 性 対 照	SA	-	641	474			
	2NF	-				177	
	9AA	-					55
	MMS	-			210		
	2AA	+	1855	178		1661	249
		+			284		

表中の復帰変異コロニー数は 3 枚のプレートの平均値

SA : アジ化ナトリウム 2NF : 2-ニトロフルオレン 9AA : 9-アミノアクリジン

MMS:メチルタンスルフォネート 2AA : 2-アミノアントラセン

② マウス L5178Y 細胞を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 No.21)

試験機関 : Microbiological Associates, Inc. (GLP 対応)

報告書作成年 : 1996 年

検体純度 :

試験方法 : マウスリンパ腫由来の L5178Y 細胞を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下および非存在下で、トリフルオロチミジン(TFT)抵抗性細胞の出現頻度を測定し、検体の遺伝子突然変異誘発性を調べた。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて溶解し、S-9Mix の存在下で 25-1000 μ g/ml、非存在下で 5-50 μ g/ml の濃度で細胞の培地中に処理し、処理後 TFT 抵抗性の細胞の出現頻度を測定した。

独立した 2 回の試験を行った。結果の判定は突然変異頻度の上昇に用量依存性があり、10 % 以上の細胞増殖率を有する 1 濃度以上で 10^6 生存細胞あたり溶媒対照より 100 個以上多くの変異コロニーが出現した場合を陽性 (55 個以上の場合は疑陽性) とした。

用量設定根拠 ;

結 果 : 結果を次表に示した。

S-9Mix の存在下および非存在下のいずれの検体処理群においても、 10^6 生存細胞あたり溶媒対照より 55 個以上多く変異コロニーが出現することはなかった。

一方、陽性対照群として用いたメチルメタンスルフォネート(MMS)は S-9Mix 非存在下で、7,12-ジメチルベンツアントラセン(DMBA)は S-9Mix 存在下で、 10^6 生存細胞あたりの変異コロニーの数が溶媒対照より 100 個以上多く、陽性と判定された。

以上の結果より、本試験条件下において検体は、遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断される。

<マウスリンフォーマ試験結果>

薬 物	濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	S-9 Mix の有無	第 1 回目試験			第 2 回目試験		
			細胞増殖率 (%) <平均*>	変異数 / 10^6cells <平均*>	判 定	細胞増殖率 (%) <平均*>	変異数 / 10^6cells <平均*>	判 定
溶媒対照 (DMSO)	-	-	100	23 27 <25>		100	30 30 <30>	
検 体	15	-	38 43 <41>	22 20 <21>	-	55 54 <55>	33 28 <31>	-
	20	-	27 32 <30>	31 27 <29>	-	40 37 <39>	22 23 <23>	-
	25	-	24 20 <22>	36 38 <37>	-	31 36 <34>	22 33 <28>	-
	30	-	20 22 <21>	37 22 <30>	-	27 12 <20>	34 26 <30>	-
	40	-	12 12 <12>	38 42 <40>	-	16 14 <15>	37 30 <34>	-
	50	-	TOX	TOX		TOX	TOX	
陽性対照 (MMS)	10 20	- -	52 17	128 198	+ +	45 15	225 350	+ +
溶媒対照 (DMSO)	-	+	100	82 88 <85>		100	85 104 <94>	
検 体	25	+	136 121 <129>	39 43 <41>	-	ND	ND	
	50	+	#	#		ND	ND	
	100	+	29 25 <27>	27 43 <35>	-	46 49 <48>	21 28 <25>	-
	150	+	21 22 <22>	27 33 <30>	-	# 36 <36>	# 24 <24>	-
	200	+	ND	ND		35 41 <38>	23 20 <22>	-
	250	+	11 10 <11>	38 46 <42>	-	31 28 <30>	22 26 <24>	-
	350	+	TOX	TOX		13 15 <14>	25 28 <27>	-
	500	+	ND	ND		TOX	TOX	
陽性対照 (DMBA)	2.5 4.0	+ +	40 7	303 505	+ +	44 22	314 331	+ +

TOX : 強毒性のためコロニー不形成。

MMS : メチルメンスルホネート

ND : データ記載なし

DMBA : 7,12-ジメチルベンゾアントラセン

: 紛失

* : 溶媒対照群以外は申請者が算出

③ ハムスターの卵巢由来培養細胞株(CHO)を用いた
*in vitro*染色体異常試験

(資料 No.22)

試験機関 : Microbiological Associates, Inc. (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・ハムスター卵巢細胞(CHO)を用い、代謝活性化系(S-9Mix)存在下および非存在下において、*in vitro*における染色体異常誘発性を調べた。

1 回目本試験では、代謝活性化系の存在下では 20、40、79、157、313、625、1250 μ g/ml、非存在下では 12、24、47、94、188、375 μ g/ml の用量で検体を 6 時間処理し、処理開始後 20 時間に標本作製した。第 2 回本試験では、代謝活性化系の存在下では 20、40、79、119、157、236 μ g/ml の用量で検体を 6 時間処理し、処理開始 20 または 44 時間後に標本作製した。一方、代謝活性化系の非存在下では 12、24、36、47、71、94 μ g/ml の用量で検体を 20 または 44 時間連続処理し、その後標本作成した。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、各処理毎(濃度、検体処理時間および標本作成時間)に、2 個ずつのフラスコを調製した。また、無処理、溶媒対照、陽性対照についても各 2 個ずつのフラスコを調製した。各フラスコの細胞数を計測し、溶媒対照群に対する細胞増殖抑制率を求めた。常法により染色体標本作製し、観察可能な群について各フラスコ当たり 100 個(各処理毎に合計 200 個)の有糸分裂中期の細胞の染色体を観察した。

結果の判定は、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な異常の増加が 1 群以上に認められ、かつ用量相関性が認められた場合を陽性と判定した。

陽性対照として代謝活性化系存在下ではシクロフォスファミド(CP)を、非存在下ではマイトマイシン C (MMC) を用いた。

用量設定根拠 ;

結 果 : 結果を表 1 および 2 に示した。

1 回日本試験では、代謝活性化系の存在下において、いずれの用量においても細胞増殖抑制率が 50%を超えることはなかった。染色体分析を実施した最高用量群である 157 μ g/ml では、有糸分裂指数が溶媒対照群に比較し 69%低下した。

代謝活性化非存在下において、染色体分析を実施した最高用量である 94 μ g/ml で細胞増殖抑制率が 55%であり、分裂指数が 86%低下した。

第 2 回本試験では、代謝活性化系存在下において、20 時間後に作製した標本では、細胞増殖抑制率は最高用量の 236 μ g/ml でも溶媒対照に比較し 50%を超えることはなかったが、有糸分裂指数は 56%低下しており、この用量で十分な細胞毒性があったことを示していた。44 時間後に作成した標本では、最高用量 236 μ g/ml で細胞増殖抑制率が 54%であり、有糸分裂指数は 52%低下した。

代謝活性化非存在下において、染色体分析を実施した最高用量である 36 μ g/ml で、細胞増殖抑制率は 54% (20 時間処理) および 74%(44 時間処理)であり、有糸分裂指数は 76% (20 時間処理) および 63%(44 時間処理)低下した。

いずれの用量群でも染色体構造異常あるいは数的異常の統計学的に有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質については、いずれの処理群においても染色体構造異常細胞頻度の有意な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において検体は、代謝活性化の有無にかかわらず染色体異常誘発性を有しないものと判断される。

表 1：第 1 回本試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S-9 Mix の有無	処理時間 ¹⁾		観察 細胞数	細胞増殖 抑制率 (%)	有糸分裂 指数 ²⁾ (%)	倍数体 細胞頻度 (%)	構造異常の種類 (/200 cells)						構造異常 細胞頻度 (%)
			検体 処理	標本 作製					染色分体型			染色体型			
									g	ctb	cte	csb	d	r	
無処理	—	+	6	20	200	—	5.9	N.D.	0	0	1	0	0	1	1.0
溶媒対照 (DMSO)	—				200	0	8.7 [-]	N.D.	0	3	0	2	0	0	1.0
検体	20				200	28	9.7 [111]	N.D.	1	1	0	0	0	3	2.0
	40				200	39	5.9 [69]	N.D.	0	2	0	0	1	0	1.5
	79				200	37	7.4 [85]	N.D.	0	5	0	0	0	0	2.5
	157				200	30	2.7 [31]	N.D.	0	1	0	0	0	0	0.5
	313				—	27	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
	625				—	23	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
	1250				—	19	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
陽性対照 (CP)	5				200	13	3.1 [36]	N.D.	0	20	17	4	0	0	13.5 $\uparrow$
無処理	—	—	6	20	200	—	10.5	N.D.	1	0	0	0	0	0	0.0
溶媒対照 (DMSO)	—				200	0	6.6 [-]	N.D.	1	0	0	0	0	0	0.0
検体	12				200	3	9.3 [141]	N.D.	1	1	0	0	0	0	0.5
	24				200	12	6.6 [100]	N.D.	2	1	0	0	1	0	1.0
	47				200	25	11.3 [171]	N.D.	2	2	0	0	0	1	1.0
	94				200	55	0.9 [14]	N.D.	0	3	0	0	0	0	1.5
	188				—	43	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
	375				—	41	N.D.	N.D.	N.D.						
陽性対照 (MMC)	0.08				200	20	7.2 [109]	N.D.	2	9	8	3	3	0	10.0 $\uparrow$

統計学的検定法：フィッシャーの直接確率検定 $\hat{p}$: $p < 0.01$

N.D.：実施せず

構造異常の種類： g; ギャップ ctb; 染色分体切断 cte; 染色分体交換
csb; 染色体切断 d; 2 動原体染色体 r; 環状染色体

陽性対照物質： CP: シクロフォスファミド MMC: マイトマイシン-C

1) 処理時間：検体処理時間および検体処理開始後標本作製までの時間

2) [] 内の数字は対照群に対する変動率 (%) を示す。

3) ギャップのみのものを除く。

表 2：第 2 回本試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S-9 Mix の有無	処理時間 ¹⁾		観察 細胞数	細胞増殖 抑制率 (%)	有糸分裂 指数 ²⁾ (%)	倍数体 細胞頻度 (%)	構造異常の種類 (/200 cells)						構造異常 細胞頻度 (%) ³⁾
			検体 処理	標本 作製					染色分体型			染色体型			
									g	ctb	cte	csb	d	r	
無処理	—	+	6	20	200	—	4.5	N.D.	1	1	0	0	0	0	0.5
溶媒対照 (DMSO)	—				200	0	4.3 [-]	N.D.	0	2	3	0	0	0	2.5
検体	20				—	29	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
	40				—	45	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
	79				200	26	3.2 [74]	N.D.	2	3	0	0	0	0	1.5
	119				200	30	2.5 [58]	N.D.	2	0	1	0	1	0	1.0
	157				200	21	2.8 [65]	N.D.	3	2	0	0	2	0	1.5
	236				200	19	1.9 [44]	N.D.	1	2	0	0	1	0	1.5
陽性対照 (CP)	10				200	8	0.9 [21]	N.D.	0	24	33	2	0	0	24.0 $\uparrow$
無処理	—		6	44	200	—	6.2	5.0	0	0	0	0	0	0	0.0
溶媒対照 (DMSO)	—				200	0	6.1 [-]	4.5.	0	0	0	0	0	0	0.0
検体	20				—	40	N.D	N.D	N.D.						N.D.
	40				—	44	N.D	N.D	N.D.						N.D.
	79				200	55	5.4 [89]	4.0	1	5	1	0	0	0	2.0
	119				200	60	4.7 [77]	2.5	2	3	1	0	1	0	2.0
	157				200	60	4.1 [67]	5.5	0	1	0	0	0	0	0.5
	236				200	54	2.9 [48]	4.0	0	3	3	0	0	0	2.0
陽性対照 (CP)	10				172	60	1.5 [25]	4.7	0	81	67	15	0	3	60.5 $\uparrow$
無処理	—	—	20	20	200	—	5.6	N.D.	2	4	1	3	2	0	2.5
溶媒対照 (DMSO)	—				200	0	8.4 [-]	N.D.	1	2	4	0	2	1	4.0
検体	12				200	26	7.9 [94]	N.D.	2	3	2	3	2	0	3.0
	24				200	41	2.4 [29]	N.D.	1	3	0	0	2	0	2.5
	36				200	54	2.0 [24]	N.D.	2	2	2	0	1	1	2.0
	47				—	64	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
	71				—	91	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
	94				—	83	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
陽性対照 (MMC)	0.08				200	24	1.9 [23]	N.D.	7	46	31	4	1	1	32.0 $\uparrow$
無処理	—		44	44	200	—	6.4	6.5	2	3	0	0	1	0	2.0
溶媒対照 (DMSO)	—				200	0	4.1 [-]	5.0	5	4	0	1	0	0	2.5
検体	12				200	14	4.2 [102]	5.0	6	10	0	4	1	1	5.5
	24				200	57	2.3 [56]	3.5	2	4	0	2	1	0	3.5
	36				200	74	1.5 [37]	4.5	17	9	0	1	0	1	5.0
	47				—	87	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
	71				—	100	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
	94				—	99	N.D.	N.D.	N.D.						N.D.
陽性対照 (MMC)	0.08				200	40	6.5 [159]	9.5	30	128	57	31	0	2	47.5 $\uparrow$

統計学的検定法：フィッシャーの直接確率検定 $\uparrow$: $p < 0.01$

N.D.：実施せず

構造異常の種類： g; ギャップ ctb; 染色分体切断 cte; 染色分体交換

csb; 染色体切断 d; 2 動原体染色体 r; 環状染色体

陽性対照物質： CP: シクロフォスファミド MMC: マイトマイシン-C

1) 処理時間：検体処理時間および検体処理開始後標本作製までの時間

2) [] 内の数字は対照群に対する変動率 (%) を示す。

3) ギャップのみのものを除く。

④ マウスを用いた小核試験

(資料 No.23)

試験機関 : Microbiological Associates, Inc. (GLP 対応)

報告書作成年 : 1996 年

検体純度 :

供試動物 : ICR 系マウス、1 群雌雄各 5 匹、投与開始時 6-8 週齢、

開始時体重範囲 (群分け時) : 雄 27.6-33.5 g 雌 24.6-27.9 g

試験方法 : 骨髄中の小核を有する多染性赤血球数を指標として、小核誘発性を調べた。

検体をコーンオイルに懸濁し、雄では 96、192 および 384mg/kg、雌では 50、100 および 200 mg/kg の用量を単回腹腔内投与した。同様に溶媒対照としてコーンオイルを、陽性対照としてシクロフォスファミドの水溶液を単回腹腔内投与した。検体および溶媒対照群では、投与 24、48 および 72 時間後に各群 5 匹ずつを屠殺し、大腿骨を摘出して牛胎児血清を用いて骨髄を洗い出し、骨髄塗抹標本作製した。なお陽性対照群は投与 24 時間後のみ標本作製した。

塗抹標本は、メタノール固定後メイ-グリュンワルド-ギムザ染色を施し、顕微鏡下で、1 動物当たり 1000 個の多染性赤血球について小核の有無を検査した。また全赤血球中の多染性赤血球の割合についても調べた。

結果の判定は、小核を有する多染性赤血球数の増加に用量相関性が認められ、いずれか 1 群以上で統計学的有意差が認められる場合を陽性とした。

投与量設定根拠 ;

結 果 : 結果を次表に示した。

いずれの検体投与群においても、溶媒対照に比べ小核を有する多染性赤血球数の増加は認められなかった。また、多染性赤血球数に変化は認められなかった。

一方、陽性対照群では、溶媒対照群に比較して、小核を有する多染性赤血球数の有意な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において、本検体は骨髄細胞に対する小核誘発性を有しないものと判断される。

注16 : 雄マウスについては、別途実施した小核試験 (TA482.122037) のデータを用いた。この試験は代謝物の小核試験と同時に実施されており、データは資料 No. 32 に収載されている。

小核試験結果

性	薬 物	投与量 (mg/kg)	時間 (hr)	動物数	多染性赤血球中の 小核出現頻度 (%)	多染性赤血球 出現頻度 (%)
雄	対照 (コーンオイル)	-	24	5	0.8	55
			48	5	0.6	45
			72	5	1.6	54
	検体	96	24	5	1.6	59
			48	5	0.6	44
			72	5	1.0	51
		192	24	5	1.2	55
			48	5	1.4	52
			72	5	0.2	55
		384	24	5	1.2	56
			48	5	1.0	48
			72	5	0.8	58
	陽性対照 (シクロオクサミド)	60	24	5	46.4 ↑	42
雌	対照 (コーンオイル)	-	24	5	1.8	55
			48	5	1.0	49
			72	5	1.8	54
	検体	50	24	5	1.2	56
			48	5	1.0	47
			72	5	1.4	54
		100	24	5	2.2	55
			48	5	1.2	50
			72	5	1.2	53
		200	24	5	1.4	54
			48	5	0.8	48
			72	5	0.6	56
	陽性対照 (シクロオクサミド)	60	24	5	30.6 ↑	43

Kastenbaum & Bowman's tables ↑ ↓ : p < 0.05

⑤ 細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 No.24)

試験機関 : (株) 実医研 (GLP 対応)

報告書作成年 : 1998 年

検体純度 :

試験方法 : 枯草菌(*Bacillus subtilis*) DNA 組み換え修復能機能保持株 (H17rec+)および欠損株 (M45rec-)を用い、代謝活性化系(S-9Mix)の存在および非存在下で、DNA 損傷の誘発性をストリーク法で調べた。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、用量は 1500、3000、6000、12000 および 24000 μ g/disk の 5 用量とし、各濃度につき 2 枚のプレートを用いた。陰性対照としてカナマイシンを、陽性対照としてマイトマイシン C を用いた。

結果の判定は、M45rec⁻と H17rec⁺の生育阻止帯の差が 3mm 以上認められた場合を陽性とした。

用量設定根拠 ;

結 果 : 結果を次表に示した。

代謝活性化の有無にかかわらず、検体のいずれの処理濃度でも用いた両菌株に全く生育阻止は認められなかった。

一方、陽性対照物質処理では両菌株間に著明な生育阻止の差が認められた。また、陰性対照物質処理では両菌株に同程度の生育阻止が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において検体は、代謝活性化の有無にかかわらず DNA 損傷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日産化学工業株式会社にある。

<DNA 修復試験結果>

薬 物	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	S-9 Mix の有無	生育阻止帯 (mm)		差 (mm)	判定
			M45rec ⁻	H17rec ⁺		
溶媒対照 (DMSO)		—	0	0	0	
検 体	1500	—	0	0	0	—
	3000	—	0	0	0	—
	6000	—	0	0	0	—
	12000	—	0	0	0	—
	24000	—	0	0	0	—
溶媒対照 (DMSO)		+	0	0	0	
検 体	1500	+	0	0	0	—
	3000	+	0	0	0	—
	6000	+	0	0	0	—
	12000	+	0	0	0	—
	24000	+	0	0	0	—
陰性対照 (カナマイシン)	80	—	15.0	14.5	0.5	—
		+	14.5	13.5	1.0	—
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.2	—	18.5	11.5	7.0	+
		+	17.5	8.5	9.0	+

表中の生育阻止帯の数値は 2 枚の disk の平均値

⑥ ラットを用いた *in vivo* 肝不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

(資料 No.25)

試験機関 : (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 (GLP 対応)
報告書作成年 : 1999 年

検体純度 :

供試動物 : S D系ラット、8 週齢、1 群雄 3 匹^{注17}

開始時体重範囲 (群分け時) : 282 - 331 g

試験方法 : 検体を 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム (C.M.C.) に懸濁し、500 および 2000mg/kg の 2 用量を単回強制経口投与し、投与 2 および 16 時間後に肝細胞を分離し、オートラジオグラフィ法を用い、肝細胞への DNA 損傷性を調べた。溶媒対照として 0.5% C.M.C.を、2 および 16 時間処理の陽性対照としてそれぞれ、N-ニトロソジメチルアミン (DMNA) および N-2-フルオレニルアセトアミド (2AAF) を投与した。

各投与後時間に動物はネンブタール深麻酔下でコラゲナーゼ肝灌流を行い、分離した肝細胞をチャンバースライドに播いた。細胞は ³H-チミジンを含む培地で 4 時間培養し、非放射能標識チミジンを含む培地でさらに 18 時間培養した。培養終了後カルノアで固定しスライド標本を作製した。標本は写真乳剤に浸漬し乾燥させ、次いで暗所で 10 日間露光後現像した。顕微鏡下約 1000 倍で、動物 1 匹につき計 100 個 (50 個/スライド) の細胞を観察し、測定した核内および細胞質内グレイン数からネットグレイン数 (核内グレイン数 - 細胞質内グレイン数) を求めた。各群の平均ネットグレイン数につき、各溶媒対照群と検体処理群間で t-検定を実施し、有意な増加が認められ、かつ用量相関性の認められた場合に肝細胞 DNA 損傷性を有すると判定した。

投与量設定根拠 :

結 果 : 結果を次表に示した。

いずれの処理時間の検体投与群においても、溶媒対照と比較して、平均ネットグレイン数の統計学的に有意な増加は認められなかった。

一方、各陽性対照群では有意な平均ネットグレイン数の増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において検体は、*in vivo* 肝細胞に対する DNA 損傷性を有しないものと判断される。

^{注17} : 1 群の投与動物数は、6~7 匹とし、標本は各群について合計 3 匹以上から作製したが、観察は各群 3 匹のみについて行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

In vivo 肝 UDS 試験結果

薬 物	投与量 (mg/kg)	処理時間 (hr)	ネットグレイン数／核 <平均値±SD>
対 照 (0.5%C.M.C)	—	2	-1.4 2.8 -3.4 <-0.67 ± 3.16>
		16	2.2 0.4 1.0 <1.20 ±0.92>
検 体	500	2	2.2 3.1 0.6 <1.97± 1.27>
		16	1.8 2.4 0.9 <1.70 ±0.75>
	2000	2	0.6 0.4 -5.5 <-1.50± 3.47>
		16	0.9 2.1 1.5 <1.50 ±0.60>
陽性対照 (DMNA)	10	2	42.7 34.3 55.4 <44.1± 10.6 [↑] >
陽性対照 (2AAF)	75	16	32.6 13.2 13.6 <19.8 ±11.1 [↑] >

C.M.C : カルボキシメチルセルロースナトリウム DMNA : N-ニトロジメチルアミン 2AAF: N-2-フルオレニルアセトアミド
Student's t-test ↑ : p < 0.05 [↑] : p < 0.01

(10) 生体機能に及ぼす影響

ピフェナゼートにおける薬理試験

(資料 No.26)

試験機関 : 残留農薬研究所 (GLP対応)

報告書作成年 : 1998年

コード番号 : D2341

検体純度 :

1 中枢神経系に対する作用

1.1 雌雄マウスの症状および体重

供試動物 : Crj:CD-1(ICR)マウス、6週齢、体重 雄30.0-35.9g 雌21.5-27.5g、1群雌雄各3匹

試験方法 : 検体を0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)水溶液に懸濁させ、0、320、800、2000、5000 mg/kgの用量で経口投与した。投与直前、投与後30分、1、3、6時間、1、3、7、14日に、Irwinの多元観察法に従い観察した。投与後8-13日はケージサイドからの観察を実施した。また、体重も測定した。

結果 : 5000 mg/kg群で、雌雄各1例に、極軽微な興奮性症状と抑制性症状を混在した非特異的症状が認められた。これらの症状は3-8日に発現し、雌は8日に死亡したが、雄では9日には消失した。その他の群では何ら異常は認められなかった。
体重は、800 mg/kg群以上の雌雄マウスで、投与1-7日にかけて軽度の減少が認められたが、14日には回復した。320 mg/kg群に影響は認められなかった。

1.2 雄ラットの症状および体重

供試動物 : Crj:CD(SD)IGSラット、雄、6週齢、体重214-248g、1群5匹

試験方法 : 検体を0.5%CMC水溶液に懸濁させ、0、800、2000、5000 mg/kgの用量で経口投与した。投与1日前、投与後30分、1、3、6時間、1、3、7日に症状を観察した。
また、体重も測定した。

結果 : 症状に、検体投与による影響は認められなかった。
体重は、2000および5000 mg/kg群で投与後1日に軽度に減少したが、投与後3日には回復した。800 mg/kg群に影響は認められなかった。

1.3 雄ラットの体温に対する作用

供試動物 : Crj:CD(SD)IGSラット、雄、6週齢、体重214-248g、1群5匹

試験方法 : 前述の症状観察に使用した動物で、同時に、サーミスタ型温度計で直腸温を測定した。

結果 : 検体投与による影響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日産化学工業株式会社にある。

1.4 雄マウスのヘキソバルピタール睡眠に対する作用

供試動物：Crj:CD-1(ICR)マウス、雄、6-7週齢、体重 28.8-38.0g、1群8匹

試験方法：検体を0.5%CMC水溶液に懸濁させ、0、3.28、8.19、20.5、51.2、128、320、800、2000、5000 mg/kgの用量で経口投与した。投与後1日にヘキソバルピタール100 mg/kgを皮下投与し、睡眠時間(正向反射消失から回復までの時間)を測定した。

結果：睡眠時間の短縮が20.5、51.2、128、320 mg/kg群に、睡眠時間の延長が2000、5000 mg/kg群に認められた。最大の変化は、それぞれ51.2および5000 mg/kg群で認められ、各々対照群の1/2および1.4倍であった。

3.28および8.19 mg/kg群ならびに800 mg/kg群では変化は認められなかった。

mg/kg	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
睡眠時間(%)	93	90	67	55 ↓	59 ↓	71	105	125	143 ↑

Dunnettの検定

↑↓：p<0.01

表中の数字は対照群に対する変動率(%)を示す。

2 呼吸、循環器系に対する作用

雄ラットの血圧、心拍数に対する作用

供試動物：Crj:CD(SD)IGSラット、雄、6週齢、体重226-262g、1群5匹

試験方法：検体を0.5%CMC水溶液に懸濁させ、0、800、2000、5000 mg/kgの用量で経口投与した。投与1日前、投与後1時間、1、3、7日に非観血式血圧測定装置を用い、尾部で安静時の血圧と心拍数を測定した。

結果：検体投与による影響は認められなかった。

3 自律神経系に対する作用

雄ラットの瞳孔径に対する作用

供試動物：Crj:CD(SD)IGSラット、雄、6週齢、体重214-248g、1群5匹

試験方法：前述の症状と体温を検査した動物で、それら検査の終了後、ルーペを用い瞳孔径を測定した。

結果：検体投与による影響は認められなかった。

4 消化器系に対する作用

雄マウスの小腸炭末輸送能に対する作用

供試動物：Crj:CD-1(ICR)マウス、雄、6週齢、体重 30.0-37.4g、1群8匹

試験方法：検体を0.5%CMC水溶液に懸濁させ、0、128、320、800、2000、5000 mg/kgの用量で経口投与した。投与後1日に10%の炭末アラビアゴム懸濁液を10 ml/kgの容量で経口投与し、投与後30分で小腸を摘出し、小腸全長に対する炭末の移動率を算出した。

結果：800 mg/kg以上の群で小腸炭末輸送能の抑制が認められ、5000 mg/kg群の輸送能は対照群の60%であった。その他の群に、影響は認められなかった。

mg/kg	128	320	800	2000	5000
移動率 %	91	86	73	71 ↓	59 ↓

Dunnettの検定 ↑↓ : $p < 0.05$ ↑↓ : $p < 0.01$
 表中の数字は対照群に対する変動率(%)を示す。

5 骨格筋に対する作用

雄ラットの握力に対する作用

供試動物：Crj:CD(SD)IGSラット、雄、6週齢、体重214-248g、1群5匹

試験方法：前述の症状、体温、瞳孔径を調べた動物で、それら検査の終了後、握力測定器を用いて、握力を測定した。

結果：検体投与による影響は認められなかった。

6 血液に対する作用

雌雄ラットの血液(溶血と凝固)に対する作用

供試動物：Crj:CD(SD)IGSラット、6週齢、体重 雄192-232g 雌148-178g、1群雌雄各5匹

試験方法：検体を0.5%CMC水溶液に懸濁させ、0、320、800、2000、5000 mg/kgの用量で経口投与した。投与後1日に採血し、Crippsの方法で血漿ヘモグロビン濃度を、全自動血液凝固測定装置でプロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

結果：溶血を示唆する血漿ヘモグロビン濃度の上昇は認められなかった。

凝固能に関しては、活性化部分トロンボプラスチン時間には変化がなく、プロトロンビン時間では極軽微な延長が雌の5000 mg/kg群で認められたのみであり、明確な変化は認められなかった。

	雌			
mg/kg	320	800	2000	5000
プロトロンビン時間 %	101	100	101	104 ↑

Dunnettの検定 ↑↓ : $p < 0.05$
 表中の数字は対照群に対する変動率(%)を示す。

以上の結果から、本剤の急性毒性は非常に弱く、本剤が散布作業に伴って摂取された場合や誤って摂取された場合に急性中毒が発現する可能性は低いと推測された。

[ピフェナゼートの生体の機能に及ぼす影響に関する試験] の総括表

試験項目	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 (匹/群)	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 [Irwin法] (マウス)	経口 (0.5%CMC)	0,320,800, 2000,5000	雌雄 3	5000	2000	興奮性症状と抑制性症状を混在した非特異的症状。 雌1例8日に死亡。
体重 (マウス)				800	320	軽度な減少、14日迄に回復。
一般状態 (ラット)		0,800,2000, 5000	雄 5	-	5000	影響なし
体重 (ラット)				2000	800	軽度な減少、3日迄に回復。
体温 (ラット)				-	5000	影響なし
ヘキソバルビタル睡眠 (マウス)		0,3.28,8.19, 20.5,51.2,128, 320,800,2000, 5000	雄 8	20.5-320, 2000-5000	8.19	中間量で短縮、 高用量で延長。
呼吸循環器系 血圧 (ラット)		0,800,2000, 5000	雄 5	-	5000	影響なし
心拍数 (ラット)				-	5000	影響なし
自律神経系 瞳孔径 (ラット)				-	5000	影響なし
消化器系 小腸炭末 輸送能 (マウス)		0,128,320, 800,2000, 5000	雄 8	800	320	炭末輸送能低下。
骨格筋 握力 (ラット)		0,800,2000, 5000	雄 5	-	5000	影響なし
血液 溶血 (ラット)		0,320,800, 2000,5000	雌雄 5	-	5000	影響なし
凝固 (ラット)				-	5000	明確な影響なし