

(9) 変異原性

1) 遺伝子突然変異原性

①細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 T-26)

試験機関 Covance Laboratories (英国) [G L P 対応]

報告書作成年 1997年

被験物質:

試験方法: ヒスチジン要求性サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium*(TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 株)およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*株)を用いた。ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の共存下および非共存下において実験1ではプレート法、実験2ではプレインキュベーション法を用いて被験物質の変異原性を検索した。被験物質はDMSOに溶解した。予備試験 (0、8、40、200、1000 および 5000  $\mu$ g/プレート;  $\pm$ S9 mix) の結果、いずれの用量においても抗菌性がみられなかった。したがって、本試験の実験1では 5000  $\mu$ g/プレートを最高用量とし、以下公比5で計5用量を設定し、また、実験1の 5000 および 1000  $\mu$ g/プレートで被験物質の沈殿がみられたので、実験2では 1000  $\mu$ g/プレートを最高用量とし、以下公比2で計5用量を設定した。各実験は、3プレート/用量とした。

[判定基準] 以下の3条件を満たせば、陽性と判定された。

- ・陰性対照群の値に比べて、Dunnnett 検定で有意 ( $p \leq 0.01$ ) な復帰変異コロニー数の増加がみられ、また、用量相関性 (直線回帰分析) があること。
- ・上記の反応に再現性があること。
- ・陰性対照群の値に比べて、2倍以上の復帰変異コロニー数の増加があること。

試験結果: 結果を次頁以降の表1および2に示す。

実験1および2において、被験物質は S9 mix の共存下および非共存下においていずれの用量または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、陽性対照物質として用いた 2-ニトロフルoren、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、グルタリルアルデヒド および 4-ニトロキノリン-1-オキサイドではすべての指標菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加がみられた。実験2において 2-アミアントラセンでは、S9 mix 共存下において TA102 株に復帰変異コロニー数の増加がみられなかった。しかし、その他の 2-アミアントラセン処理においては、S9 mix 共存下および非共存下においていずれの指標菌株でも明らかな復帰変異コロニーの増加がみられた。

以上の結果から、原体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異を誘発しないと判断された。

表 1 : 実験 1

薬 物	S9 mix の 有 無	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型				フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> <sup>-</sup>	TA102	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [-]	0	125.4	22.6	33.4	350.2	19.8	17.6
被験物質		8	131.7	23.7	27.0	295.0 L	21.7	13.3
		40	119.0	21.3	30.0	296.3	23.0	17.0
		200	112.3	27.3	36.0	318.3	21.7	16.7
		1000	121.3 P	17.3 P	27.7 P	333.3 P	15.3 P	20.0 P
		5000	122.0 P	16.7 P	30.7 P	417.3 P	13.3 P	13.7 P
対照(DMSO)	S9 mix [+]	0	141.8	29.0	37.4	359.0	30.4	18.6
被験物質		8	143.7	21.7	44.3	416.3	24.3	20.7
		40	143.0	22.3	43.7	423.7	28.7	23.0
		200	149.0	26.0	47.3	389.3	33.0	23.3
		1000	137.3 P	19.3 P	38.3 P	400.0 P	23.5 CP	20.0 P
		5000	129.7 P	18.7 P	29.0 P	414.7 P	15.0 P	21.7 P
陽性 対照 物質	S9 mix を 必要としな いもの	名称	NaN <sub>3</sub>	NaN <sub>3</sub>	NQO	GLU	2NF	AAC
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	2	2	2	25	5	50
		コロニー数/プレート	621.7	516.0	1432.3	519.7	680.7	527.0
	S9 mix を 必要とする もの	名称	AAN	AAN	AAN	AAN	AAN	AAN
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5	5	5	5	5	5
		コロニー数/プレート	2126.0	216.0	85.0	586.7	1911.0	428.7

表中の数値は、対照では5プレート、被験物質および陽性対照物質では3プレートの平均値である。

表中の陽性対照物質の説明：NaN<sub>3</sub>：7% 化ナトリウム、NQO：4-ニトロキノリン-1-オキシド、GLU：グルカザルデヒド、

2NF：2-ニトロフルオレン、AAC：9-7メチルアントラセン

L：1プレート紛失（破損または技術的ミス）

C：1プレートが汚染

P：被験物質の沈殿

表 2 : 実験 2

薬 物	S9 mix の 有 無	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	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 <i>uvrA</i> <sup>-</sup>	TA102	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [-]	0	104.0	18.6	16.8	312.8	23.2	8.2
被験物質		62.5	103.7	15.0	15.0	329.3	22.3	7.0
		125	101.3	14.0	18.3	254.7	22.7	7.3
		250	102.3	15.0	18.0	302.7	27.0	5.3
		500	103.3	18.0	16.7	289.3	23.0	8.0
		1000	102.0	13.7	17.3	245.3	22.7	8.3
対照(DMSO)	S9 mix [+]	0	135.4	17.0	17.2	297.6	32.8	7.8
被験物質		62.5	138.3	20.3	17.7	220.0	34.0	9.3
		125	145.7	14.0	26.3	213.3	32.7	7.7
		250	146.0	15.7	21.0	206.7	36.0	9.0
		500	141.7	21.3	15.3	180.0	30.7	6.7
		1000	131.3	15.0	20.0	153.3	32.7	13.3
陽性 対 照 物 質	S9 mix を 必要としな いもの	名称	NaN <sub>3</sub>	NaN <sub>3</sub>	NQO	GLU	2NF	AAC
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	2	2	2	25	5	50
		コロニー数/プレート	764.0	382.7	897.3	627.7	721.7	609.3
	S9 mix を 必要とする もの	名称	AAN	AAN	AAN	AAN	AAN	AAN
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5	5	5	5	5	5
		コロニー数/プレート	1561.0	110.0	56.3	202.0 <sup>1)</sup>	1559.0	118.7

表中の数值は、対照では5プレート、被験物質および陽性対照物質では3プレートの平均値である。

表中の陽性対照物質の説明：NaN<sub>3</sub>：7% 化学物質、NQO：4-ニトソリン 1-ナトリウム、GLU：グルタリルヒド、

2NF：2-ニトロフルオレン、AAC：9-アミノカリン、AAN：2-アミノイソクサントリン

1) S9 mix 共存下の AAN 処理では、復帰変異コロニー数の増加がみられなかった。しかし、S9 mix 非共存下の GLU 処理では、復帰変異コロニー数の増加がみられ、S9 mix 共存下の溶媒対照の復帰変異コロニー数も正常であった。また、その他の AAN 処理では復帰変異コロニー数の増加がみられた。したがって、TA102 株の被験物質処理で得られたデータは有効であると考えられた。

\*申請者注：申請者は、実験2の S9 mix 共存下における TA102 株で得られた陰性対照群、被験物質群および陽性対照群のすべてのデータは無効であるとする。S9 mix 共存下における TA102 株の結果に関して再現性が確認されないことになるが、その他の標準的な菌株のデータが陰性を示していることから、結論として被験物質の復帰突然変異誘発性は、陰性とする。

② 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料T-27)

試験機関 ポゾリサーチセンター [G.I.P対応]

報告書作成年 2000年

試験目的：前回の試験（資料T-26）において、実験2のS9 mix 共存下におけるTA102株で得られた結果の妥当性に問題があった。申請者は、前回の試験結果を総合的に評価し、被験物質の復帰突然変異誘発性を陰性と考えたが、念のため、TA102株を含む同様の試験を再実施し、被験物質の変異原性の有無を確認した。

被験物質：原体、純度99.33%

試験方法：ヒスチジン要求性サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium*(TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537株)およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*株)を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の共存下および非共存下でプレインキュベーション法を用いて被験物質の変異原性を検索した。被験物質はDMSOに溶解した。予備試験（次頁の表Iを参照）の結果、S9 mix の共存および非共存下において5000  $\mu$ g/プレートの用量でも抗菌性がみられなかった。したがって、本試験では5000  $\mu$ g/プレートを最高用量とし、以下公比2で計6用量を設定した。各実験は、3プレート/用量とした。

試験結果：予備試験および本試験の結果を次頁以降の表IとIIに示す。

被験物質では、S9 mix の共存下および非共存下においていずれの用量、また、いずれの菌株においても陰性対照の2倍をこえる復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。

一方、陽性対照物質として用いた2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド<sup>\*</sup>、7ジ<sup>o</sup>化ナトリウム、2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン<sup>o</sup>・2HCl、マイマイシンC、2-アミノアントラセンおよびベンゾ[a]ピレンでは、すべての指標菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加がみられた。

以上の結果から、原体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰突然変異を誘発しないと判断された。

表 I. 予備試験の結果

薬 物	S9 mix の 有 無	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		架橋型/酸化型
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> <sup>+</sup>	TA98	TA1537	TA102
対照(DMSO)		0	99	13	30	24	13	285
被験物質	S9 mix [-]	0.305	99	16	35	24	14	314
		1.22	104	16	33	27	14	325
		4.88	98	10	29	27	15	307
		19.5	94P	14P	29P	29P	14P	327P
		78.1	91P	19P	32P	26P	18P	289P
		313	91P	15P	27P	28P	14P	292P
		1250	90P	13P	28P	23P	17P	298P
		5000	85P	13P	21P	20P	12P	277P
対照(DMSO)		0	101	14	36	31	14	401
被験物質	S9 mix [+]	0.305	104	14	33	33	13	401
		1.22	102	17	29	30	10	426
		4.88	106	14	32	34	13	360
		19.5	105P	15P	34P	36P	12P	395P
		78.1	108P	16P	38P	29P	16P	393P
		313	105P	18P	31P	26P	10P	402P
		1250	97P	15P	38P	24P	12P	390P
		5000	93P	14P	31P	25P	13P	424P
陽性 対照 物質	S9 mix を 必要としな いもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	ICR-191	MMC
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00	0.01
		コロニー数/プレート	979	230	134	352	1812	2017
	S9 mix を 必要とする もの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP	2-AA
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00	10.0
		コロニー数/プレート	963	218	365	251	79	3127

表中の数値は、3プレートの平均値である。

表中の陽性対照物質の説明

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

NaN<sub>3</sub>: ナトリウムアジド

ICR-191: 2-メチル-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]ピリミジン・2HCl

MMC: マイトマイシン C

2-AA: 2-アミノアントラセン

BP: ベンゾ[a]ピレン

P: 結晶の析出

表Ⅱ. 本試験の結果

薬物	S9 mix の有無	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	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		架橋型/酸化型
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	TA102
対照(DMSO)	被験物質	0	113	11	26	21	11	348
S9 mix [-]		156	107P	14P	24P	24P	11P	373P
		313	110P	14P	27P	25P	14P	359P
		625	109P	14P	23P	23P	16P	373P
		1250	117P	16P	26P	20P	18P	371P
		2500	116P	15P	26P	21P	17P	361P
		5000	109P	15P	26P	25P	15P	362P
対照(DMSO)	被験物質	0	126	12	29	26	12	408
S9 mix [+]		156	120P	16P	27P	25P	14P	433P
		313	127P	17P	26P	24P	14P	432P
		625	123P	12P	25P	26P	16P	444P
		1250	120P	16P	28P	23P	14P	434P
		2500	124P	16P	23P	28P	16P	433P
		5000	113P	15P	27P	28P	18P	434P
陽性 対照 物質	S9 mixを 必要としな いもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	ICR-191	MMC
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00	0.01
		コロニー数/プレート	846	340	185	500	2006	2050
	S9 mixを 必要とする もの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP	2-AA
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00	10.0
		コロニー数/プレート	825	158	354	243	87	3126

表中の数値は、3プレートの平均値である。

表中の陽性対照物質の説明

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

NaN<sub>3</sub>: ナトリウムアジド

ICR-191: 2-メチル-6-クロロ-9-[3-(2-クロロフェル)-7-メチルピリミジン]アクリン・2HCl

MMC: マイトマイシン C

2-AA: 2-アミノアントラセン

BP: ベンゾ[*a*]ピレン

P: 結晶の析出

## 2) 染色体異常誘発性

### ①哺乳動物培養細胞を用いた染色体異常試験

(資料 T-28)

試験機関 Covance Laboratories (英国) [G L P 対応]

報告書作成年 1997年

被験物質:

試験方法: チャイニーズハムスターの肺組織由来の培養細胞株 (CHIL細胞) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の共存下および非共存下で被験物質の染色体異常誘発性を検索した。以下の条件で被験物質処理を行った後、染色体標本を作製し、染色体検査を実施した。なお、被験物質の溶媒として DMSO を用いた。

(実験 1): 24 時間処理 (S9mix 非共存下)

6 時間処理 (S9mix 共存下) + 18 時間回復

(実験 2): 24 時間処理 (S9mix 非共存下)

6 時間処理 (S9mix 共存下) + 18 時間回復

48 時間処理 (S9mix 非共存下)

6 時間処理 (S9mix 非共存下) + 18 時間回復

各処理条件における細胞増殖率および染色体検査のために選択した用量について表 I に示す。染色体検査のための用量として、溶媒対照に比較して 50~75% の細胞増殖抑制がみられた用量を最高用量として選択した。

[判定基準] 次の 3 条件を満たした場合に、陽性と判定した。

- ・被験物質処理群の 1 用量以上でギャップを含まない構造異常の出現頻度が、陰性対照群に比べて統計学的 (Fisher の直接確率法) に有意 ( $p \leq 0.05$ ) に増加すること。
- ・その増加が正常範囲を超えること。
- ・その増加に再現性があること。

試験結果: 染色体検査の結果を表 II-1~6 に示す。

いずれの被験物質の処理においても溶媒対照に比べて統計学的に有意な染色体構造異常細胞の増加はみられなかった。

染色体の数的異常については、被験物質 24 および 48 時間処理 (S9mix 非共存下) で統計学的に有意な増加 (特に倍数体) がみられ、これらの高値は背景データ<sup>#)</sup> の範囲を上回っていた。

一方、陽性対照物質として用いたメチルメタンсульホネートおよびシクロフオスファミドでは、統計学的に有意な染色体構造異常細胞数の増加がみられた。

以上の結果から、原体は本試験条件下で染色体の数的異常を増加させたが、構造異常は誘発しないと判断された。

---

#): 数的異常の背景データ -S9 2.1% 範囲 0~6%

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本農薬㈱にある。

表 I : 細胞毒性

実験 1			
薬物	用量 ( $\mu$ g/mL)	24時間処理	6時間処理
		-S9 mix	+S9 mix
細胞増殖率 (%) a			
溶媒対照 (DMSO)	0	100	100
無処理対照	0	214	111
被験物質	4.943 7.062 10.09 14.41 20.59 29.41 42.02 60.03 85.75 122.5 175 250	67 67 51 49 40 52 31 41 43 46 49 36	77 78 78 65 71 69 52 30 33 23 14 14
染色体検査のための 用量	10.09, 14.41, 20.59 $\mu$ g/mL	20.59 $\mu$ g/mL で細胞増殖は 6.0%抑制。	85.75 $\mu$ g/mL で細胞増殖は 6.7%抑制。

  

実験 2					
薬物	用量 ( $\mu$ g/mL)	24時間処理	6時間処理	48時間処理	6時間処理
		-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	-S9 mix
細胞増殖率 (%) a					
溶媒対照 (DMSO)	0	100	100	100	100
無処理対照	0	82	113	142	74
被験物質	8.59 10.74 13.42 16.78 20.97 26.21 32.77 40.96 51.2 64 80 100	41 37 32 31 27 25 24 19 12 NT NT NT	NT NT NT NT NT NT 79 64 68 54 35 17	14 13 12 12 10 10 10 10 7 NT NT NT	NT NT NT NT 48 50 49 36 24 19 20 16
染色体検査のための 用量	8.59, 10.74, 13.42 $\mu$ g/mL	13.42 $\mu$ g/mL で細胞増殖は 68%抑制。	80 $\mu$ g/mL で細胞増殖は 6.5%抑制。	8.59 $\mu$ g/mL で細胞増殖は 86%抑制。	32.77 $\mu$ g/mL で細胞増殖は 51%抑制。

a 細胞増殖率 (%) : 溶媒対照の増殖細胞数を100とした場合の各被験物質処理群の値である。申請者が原報に基づき算出した。

NT : 非発症



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本農薬㈱にある。

表II-1 : 染色体の観察結果<実験1 : 24時間処理 (S9 mix 非共存下) >

薬物	用量 ( $\mu$ g/ml)	数的異常の出現数と頻度(%)					構造異常の出現数と頻度(%)							判定		
		観察細胞数	II	E	P	合計 (%)	観察細胞数	ギョップ	染色分体型		染色体型		その他		合計 <sup>a</sup>	
									交換	切断	交換	切断			ギョップを含む	ギョップを含まず
溶媒対照 (DMSO)	0	201	1	0	0	1 (0.5)	200	1	3	0	3	0	0	6	5 (2.5)	
無処理対照	0	200	0	0	0	0 (0)	200	2	1	0	3	0	0	5	3 (1.5)	
被験物質	10.09	218	0	2	16	18*** (8.3)	200	1	3	1	2	3	0	10	9 (4.5)	陰性
	14.41	201	0	0	1	1 (0.5)	200	0	1	0	1	0	0	2	2 (0.1)	陰性
	20.59	201	0	0	1	1 (0.5)	200	2	2	1	1	1	0	7	5 (2.5)	陰性
陽性対照物質 MMS	25	101	1	0	0	1 (0.5)	100	1	8	0	44	49	2	61	61*** (61.0)	陽性

H : hyperdiploid (高二倍体)

E : endoreduplicated (核内倍化)

P : polyploid (倍数体)

a : 1ヶの細胞に複数の異常がみられる場合も、1ヶとカウントした。

MMS : メチルメタンсульフォネート

\*\*\* :  $p < 0.001$  (Fisherの直接確率法)

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本農薬㈱にある。

表II-2：染色体の観察結果<実験1：6時間処理 (S9 mix 共存下) +18時間回復>

薬物	用量 ( $\mu$ g/mL)	数的異常の出現数と頻度(%)				構造異常の出現数と頻度(%)						判定				
		観 察 細 胞 数	H	E	P	合計 (%)	観 察 細 胞 数	ギ ャ ッ プ	染 色 分 体 型	染 色 体 型	そ の 他		ギ ャ ッ プ を 含 む	ギ ャ ッ プ を 含 ま ず		
溶媒対照 (DMSO)	0	200	0	0	0	0 (0)	200	2	3	0	8	1	0	11	10 (5.0)	/
	0	201	0	0	1	1 (0)	200	1	4	0	7	1	0	10	10 (5.0)	/
被験物質	42.02	200	0	0	0	0 (0)	200	0	3	0	6	0	0	9	9 (4.5)	陰性
	60.03	200	0	0	0	0 (0)	200	2	1	0	7	1	0	10	9 (4.5)	陰性
	85.75	201	0	0	1	1 (0.5)	200	0	0	0	3	0	0	3	3 (1.5)	陰性
陽性対照物質 CPA	25	100	0	0	1	1 (1.0)	99	1	13	0	44	33	58	92	92*** (92.9)	陽性

H: hyperdiploid (高二倍体)

E: endoreduplicated (核内倍化)

P: polyploid (倍數体)

a: 1ヶの細胞に複数の異常がみられる場合も、1ヶとカウントした。

CPA: シクロフォスファミド

\*\*\*:  $p < 0.001$  (Fisherの直接確率法)

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本農薬㈱にある。

表II-3 : 染色体の観察結果<実験2 : 24時間処理 (S9 mix 非共存下) >

薬物	用量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	数的異常の出現数と頻度(%)					構造異常の出現数と頻度(%)							判定		
		H 観察細胞数	E	P	合計 (%)	判定	ギョップ	染色分体型		染色体型		その他	合計 <sup>a</sup>			
								交換	切断	交換	切断		ギョップを含む		ギョップを含まず	
溶媒対照 (DMSO)	0	202	1	0	1	2 (1.0)				1	1	0	0	5	4 (2.0)	
無処理対照	0	201	0	0	1	1 (0.5)				1	2	0	0	6	5 (2.5)	
被験物質	8.59	305	2	10	93	105*** (34.4)				0	2	0	0	1	1 (0.5)	陽性
	10.74	270	0	9	61	70*** (25.9)				1	0	2	0	3	2 (1.0)	陰性
	13.42	227	0	7	20	27*** (11.9)				1	3	1	2	8	7 (3.5)	陰性
陽性対照物質 MMS	12.5	100	0	0	0	0 (0)				7	0	0	9	22	17*** (17.0)	陽性

H : hyperdiploid (高二倍体)

E : endoreduplicated (核内倍化)

P : polyploid (倍数体)

a : 1ヶの細胞に複数の異常がみられる場合も、1ヶとカウントした。

MMS : メチルメタンсульフォネート

\*\*\* :  $p < 0.001$  (Fisherの直接確率法)

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本農薬㈱にある。

表II-4：染色体の観察結果<実験2：6時間処理(S9 mix 共存下) +18時間回復>

薬物	用量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	数的異常の出現数と頻度(%)				構造異常の出現数と頻度(%)							判定			
		観 察 細 胞 数	H	E	P	合計 (%)	判定	ギョップ 観察 細胞 数	染色体型 切 断	染色体型 交 換	染色体型 交 換	染色体型 切 断		染色体型 交 換	その他	ギョップ を含む
溶媒対照 (DMSO)	0	201	0	0	1	1 (0.5)	/	200	2	0	3	6	0	0	11 (5.5)	/
無処理対照	0	202	0	0	2	2 (1.0)	/	200	2	1	4	0	0	0	8 (3.5)	/
被験物質	51.2	201	0	0	1	1 (0.5)	陰性	200	3	0	5	1	0	0	9 (3.5)	陰性
	64	201	0	0	1	1 (0.5)	陰性	200	3	0	0	0	0	0	3 (0.5)	陰性
	80	205	0	0	5	5 (2.4)	陰性	200	0	1	1	1	0	0	2 (1.0)	陰性
陽性対照物質 CPA	2.5	101	1	0	0	1 (1.0)	陰性	100	8	0	49	54	40	89 (89.0)	陽性	

H: hyperdiploid (高三倍体)

E: endoreduplicated (核内倍化)

P: polyploid (倍數体)

a: 1ヶの細胞に複数の異常がみられる場合も、1ヶとカウントした。

CPA: シクロホスファミド

\*\*\*:  $p < 0.001$  (Fisherの直接確率法)

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本農薬㈱にある。

表II-5：染色体の観察結果<実験2：48時間処理 (S9 mix 非共存下) >

薬物	用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	数的異常の出現数と頻度(%)					構造異常の出現数と頻度(%)					判定				
		H	E	P	合計 (%)	判定	観察細胞数	ギョーブ	染色体分型	染色体分型	染色体分型		その他	合計 <sup>a</sup>	判定	
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	3	3 (1.5)	/	203	3	0	2	0	1	0	5	3 (1.5)	/
無処理対照	0	0	0	0	0 (0)	/	209	0	1	1	1	0	0	6	3 (1.5)	/
被験物質	8.59	15	2	1065	1082*** (81.2)	陽性	1332	1	2	1	3	2	0	8	7 (3.5)	陰性

H: hyperdiploid (高二倍体)

E: endoreduplicated (核内倍化)

P: polyploid (倍数体)

a: 1ヶの細胞に複数の異常がみられる場合も、1ヶとカウントした。

\*\*\*:  $p < 0.001$  (Fisherの直接確率法)

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本農薬㈱にある。

表II-6：染色体の観察結果<実験2：6時間処理(S9 mix 非共存下) + 18時間回復>

薬物	用量 ( $\mu$ g/mL)	数的異常の出現数と頻度(%)				構造異常の出現数と頻度(%)							判定			
		H	E	P	合計 (%)	観察細胞数	ギャップ	染色分体型		染色体型		その他		ギャップを含む	ギャップを含まず	
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	2	2 (1.0)	200	8	5	0	6	0	0	0	14	10 (5.0)	/
無処理対照	0	0	0	0	0 (0)	200	6	2	1	2	1	0	0	10	5 (2.5)	/
被験物質	32.77	0	0	2	2 (1.0)	200	0	1	0	1	1	0	0	3	3 (1.5)	陰性

H: hyperdiploid (高二倍体)

E: endoreduplicated (核内倍化)

P: polyploid (倍数体)

a: 1ヶの細胞に複数の異常がみられる場合も、1ヶとカウントした。

\*\*\*:  $p < 0.001$  (Fisherの直接確率法)

② マウスを用いた小核試験

(資料T-29)

試験機関 大塚化学

報告書作成年 1997年

被験物質：

試験動物：d d Y系マウス、1群雌雄各6匹

投与開始時8週齢(体重 雄34.2~38.7g、雌27.5~29.7g)

試験方法：被験物質をオリーブ油に懸濁し、雄では0(溶媒対照)、3、6、12、24 mg/kg、雌では0、1.8、3.5、7、14 mg/kgの用量で24時間間隔で2回腹腔内投与した。用量設定試験(雌雄とも公比2で8~2000 mg/kgの計9用量、2回腹腔内投与)の結果、雄では32 mg/kg群で全例(3/3)、16 mg/kg群で1/3例の死亡がみられ、8 mg/kg群では死亡はなかった。雌では16 mg/kg群で全例(3/3)の死亡がみられ、8 mg/kg群では死亡はなかった。したがって、小核試験では高用量(最大耐量)を雄で24 mg/kg、雌で14 mg/kgとする上記の用量を設定した。2回目の投与後24および48時間に動物を屠殺し、アリジン・オレンジ染色による骨髓塗抹標本を作製した。各動物1000個の多染性赤血球(PCE)を観察し、被験物質投与群で小核を有する多染性赤血球(MNPCE)の出現頻度が、溶媒対照群の値に比べて統計学的に有意な増加を示した場合に陽性と判定した。

試験結果：結果を次頁の表に示す。

雌雄いずれの被験物質投与群においても小核を有する多染性赤血球(MNPCE)の出現頻度について、統計学的に有意な増加はみられなかった。一方、陽性対照物質のマイトマイシンC投与群では、MNPCEが顕著に増加した。

なお、投与後24時間の雄24 mg/kg群および投与後48時間の雌14 mg/kg群において全赤血球に対する多染性赤血球比の有意な減少がみられた。また、これらの高用量群では、自発運動の減少、腹臥および体重減少がみられ、雄の24 mg/kg群では死亡もみられた。

以上の結果から、原体はマウスを用いた小核試験において小核を誘発せず、*in vivo*染色体異常誘発能を有しないものと判断された。

結果表：

性別	標本作製時間	試験物質	用量 × 投与回数	PCE(%) <sup>1)</sup>	MNPCE(%) <sup>2)</sup>	判定
雄	最終投与後 24 時間	溶媒対照(オリーブ油)	—	60.5±5.2 <sup>3)</sup>	0.667±0.816	
		被験物質	3 mg/kg×2	58.6±7.4	0.167±0.408	陰性
			6 mg/kg×2	54.8±5.8	0.667±0.516	陰性
			12 mg/kg×2	51.4±6.8	0.833±0.000	陰性
			24 mg/kg×2	36.3±7.7 <sup>**</sup>	1.667±0.408	陰性
	陽性対照(マイマイシ C)	1.0 mg/kg×1	54.7±7.8	33.667±4.561 <sup>##</sup>	陽性	
	最終投与後 48 時間	溶媒対照(オリーブ油)	—	58.5±6.6	0.333±0.816	
		被験物質	3 mg/kg×2	62.7±9.7	1.000±0.516	陰性
			6 mg/kg×2	63.8±8.3	0.167±0.516	陰性
			12 mg/kg×2	53.8±11.2	0.833±0.516	陰性
24 mg/kg×2			— <sup>4)</sup>	— <sup>4)</sup>		
雌	最終投与後 24 時間	溶媒対照(オリーブ油)	—	60.6±5.2	0.500±0.816	
		被験物質	1.8 mg/kg×2	60.3±7.4	0.500±0.408	陰性
			3.5 mg/kg×2	63.8±5.8	0.333±0.516	陰性
			7 mg/kg×2	59.3±6.8	0.667±0.000	陰性
			14 mg/kg×2	51.5±7.7	0.333±0.408	陰性
	陽性対照(マイマイシ C)	1.0 mg/kg×1	62.3±7.8	36.833±4.561 <sup>##</sup>	陽性	
	最終投与後 48 時間	溶媒対照(オリーブ油)	—	62.8±6.6	0.500±0.816	
		被験物質	1.8 mg/kg×2	63.9±9.7	0.333±0.516	陰性
			3.5 mg/kg×2	68.0±8.3	1.167±0.516	陰性
			7 mg/kg×2	61.4±11.2	0.167±0.516	陰性
14 mg/kg×2			45.8±9.5 <sup>**</sup>	0.333±0.548	陰性	

1) PCE (%) : 全赤血球に対する多染性赤血球の出現率 (%)

2) MNPCE (%) : 多染性赤血球 1000 個中の小核を有する細胞数

3) 数値は、平均値±標準偏差 (N=6) を示す。

4) — : 6 例中 4 例が死亡し、有効なデータが得られなかった。

\*\* : p<0.01 (Dunnnett の多重比較検定)

## : p<0.01 (Kastenbaum and Bowman の検定)



### 3) DNA損傷誘発性

#### ①細菌を用いたDNA修復試験

(資料T-30)

試験機関 三菱化学安全科学研究所 [GLP対応]

報告書作成年 1996年

被験物質:

試験方法: 枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換修復能保持株 (H17、rec+) および欠損株 (M45、rec-) を用い、胞子法により代謝活性化 (S9 mix) の共存下および非共存下で DNA 損傷の誘発性を検索した。被験物質はDMSOに溶解した。予備試験 (0、313、625、1250、2500、5000、10000、20000  $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ ;  $\pm$ S9 mix) の結果、いずれの用量においても両菌株の生育阻止帯の差はみられなかった。したがって、本試験では 20000  $\mu\text{g}/\text{ディスク}$  を最高用量として、以下公比2で計5用量を設定した。なお、1濃度あたり2枚のペーパーディスクを用いた。

試験結果: 結果を次頁の表に示す。

本試験において、S9 mix の共存下および非共存下のいずれの条件においても、また、いずれの菌株においても生育阻止帯はみられず、両菌株間の生育阻止帯の差はみられなかった。

一方、陰性対照として用いたカナマイシンでは両菌株に生育阻止帯はみられたが、両菌株間でその長さに差はみられなかった。また、陽性対照のマイトマイシンC および2-アミノアントラセンでは、両菌株の生育阻止帯直径の差は5mm以上であった。

以上の結果から、原体は代謝活性化を含む本試験条件下でDNAの損傷を誘発しないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

結果表：

薬物	S9 mix の有無	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	阻止帯の直径 <sup>1)</sup> (mm)		差 <sup>2)</sup> (mm)	
			M45	H17		
溶媒対照(DMSO)	—	0	0	0	0	
被験物質	—	1250	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0	
		2500	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0	
		5000	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0	
		10000	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0	
		20000	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0	
溶媒対照(DMSO)	+	0	0	0	0	
被験物質	+	1250	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0	
		2500	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0	
		5000	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0	
		10000	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0	
		20000	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0	
陰性対照	カマイソツ	—	2	1.4	1.4	0
		+	2	9	9	0
陽性対照	マイトシンC	—	0.02	2.4	3	2.1
	2-7-ジメチルシロリン	+	10	1.0	0	1.0

表中の数値は2つのディスクの平均値。

1)：生育阻止帯の直径からディスクの直径8mmを差し引いた値。

2)：生育阻止帯の長さの平均値の差 (M45の生育阻止帯直径 - H17の生育阻止帯直径)。

C：ディスク上に析出物あり。

## (10) 生体機能影響

### 1) 生体の機能に及ぼす影響に関する試験

(資料T-31)

試験機関 三菱化学安全科学研究所

報告書作成年 1999年

被験物質：

#### ① 中枢神経系に対する作用

##### 一般状態観察

動物：Wistar系雄ラット、5週齢（体重142～155g）、1群3匹

方法：被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、10、50および200mg/kgの投与量で動物に強制経口投与した（投与日を投与後0日とする）。投与後1、3および6時間、以後1日1回7日後まで、Irwinの多次元観察法に準じて観察した。

結果：10および50mg/kg群では、一般状態に影響はみられず、死亡もなかった。200mg/kg群では1例で投与後1時間に意識の低下、運動性の低下、運動協調性の低下、筋緊張度の低下、反射の低下、散瞳、立毛、体温の低下、呼吸抑制が観察され、観察終了後に死亡した。生存した2例にも意識の低下、運動性の低下、振戦、運動協調性の低下、立毛、体温の低下および呼吸抑制が観察された。これらの症状は投与後3時間にもみられ、投与後6時間には1例でさらに症状が悪化し、投与後1日に死亡した。他の1例では投与後6時間には回復し、投与後4日まで症状が観察されなかったが、投与後5日で異常歩行、体温の低下、削瘦がみられ、投与後7日にはそれらの症状が悪化し、最終観察終了後に死亡した。

##### 睡眠時間に対する作用

動物：ICR系雄マウス、5週齢（体重27.1～32.9g）、1群8匹

方法：被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、10、50および150mg/kgの投与量で動物に強制経口投与した。経口投与2時間後にヘキソバルビタール80mg/kgを腹腔内投与し、正向反射消失から回復までの時間を測定し、睡眠時間を調べた。

結果：10mg/kg群では、作用はみられなかった。50mg/kg以上の群では睡眠時間の有意な延長がみられた。なお、150mg/kg群ではヘキソバルビタール投与後に2例死亡した。

##### 自発運動量に対する作用

動物：ICR系雄マウス、5週齢（体重27.9～34.8g）、1群18匹

方法：被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、10、50および150mg/kgの投与量で動物に強制経口投与した。その後、自発運動量測定装置を用いて6時間後まで30分毎の運動量を測定した。

結果：10mg/kg群では、作用はみられなかった。50mg/kg群では投与後0.5時間で有意な低下がみられた。また、150mg/kg群では投与後1時間まで有意な低下がみられ、以降6時間まで運動量はほとんど0を示した。

なお、測定終了後に 50mg/kg 群では 4 例、150mg/kg 群では 17 例が死亡した。

#### 鎮痛作用

動物：Wistar 系雄ラット、5 週齢（体重 140～169 g）、1 群 6 匹

方法：被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルロース-Na 水溶液に懸濁し、0、10、50 および 150mg/kg の投与量で動物に強制経口投与した。投与前および投与後 2 時間に Randall-Selitto 法に準じて圧刺激鎮痛効果測定装置により疼痛閾値を測定した。

結果：10 および 50mg/kg 群では、作用はみられなかった。150mg/kg 群では疼痛閾値の上昇がみられたが、投与後 2 時間までに 3 例が死亡しており、この鎮痛作用の上昇が被験物質の直接作用か、全身状態の悪化に伴う変化なのか明らかではなかった。

#### 正常体温に対する作用

動物：Wistar 系雄ラット、5 週齢（体重 146～175 g）、1 群 6 匹

方法：被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルロース-Na 水溶液に懸濁し、0、10、50 および 150mg/kg の投与量で動物に強制経口投与した。投与前および投与後 0.5、1、3 および 6 時間に直腸温を測定した。

結果：10mg/kg 群では、作用はみられなかった。50mg/kg 群では、投与後 0.5 時間から低下傾向を示し、6 時間には有意な低下がみられた。また、150mg/kg 群では投与後 3 時間まで有意な低下がみられた。

なお、150mg/kg 群では 3 例が死亡した。

#### 自発脳波に対する作用

動物：Wistar 系雄ラット、12～15 週齢（体重 370～469 g）、1 群 3 匹

方法：動物に麻酔下で前頭葉にネジ電極を置き、海馬に双極電極を刺入し、各電極を頭蓋骨上に固定した。被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルロース-Na 水溶液に懸濁し、0、10、50 および 150mg/kg の投与量で動物に強制経口投与した。脳波は投与前、投与後 1、3 および 6 時間に測定した。

結果：いずれの被験物質投与群においても自発脳波に対する作用はみられなかった。

なお、150mg/kg 群では測定終了後に 1 例が死亡した。

#### 血漿コリンエステラーゼに対する作用

動物：Wistar 系雄ラット、7 週齢（体重 267～314 g）、1 群 6 匹

方法：被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルロース-Na 水溶液に懸濁し、0、10、50 および 150mg/kg の投与量で動物に強制経口投与した。投与後 2 時間に動物の後大静脈から採血した。その血漿を用いてコリンエステラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ活性をチオコリンエステルを基質とした DTNB 法で測定した。

結果：いずれの被験物質投与群においても作用はみられなかった。

② 呼吸・循環器系に対する作用

呼吸、血圧、心拍数および心電図に対する作用

動物：日本白色種雄ウサギ、11～14週齢（体重2.2～2.8kg）、1群4匹

方法：動物はウレタン麻酔下で気管および大腿動脈内にカニューレを挿入し、それぞれ呼吸流量計および圧トランスデューサーに接続し、呼吸運動および血圧、心拍数を測定した。心電図は、心電図計を用い、四肢第II誘導の波形を測定した。被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、2、10および50mg/kgの投与量で十二指腸内に挿入したカテーテルにより投与した。投与前および投与後0.5、1、2および4時間にウレタン麻酔下で呼吸、血圧、心拍数および心電図を測定した。

結果：いずれの被験物質投与群においても呼吸数、呼吸換気量、血圧、心拍数および心電図波形に対する作用はみられなかった。

③ 自律神経系に対する作用

瞳孔径に対する作用

動物：Wistar雄ラット、6週齢（体重171～199g）、1群6匹

方法：被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、10、50および150mg/kgの投与量で動物に強制経口投与した。投与前および投与後0.5、1、3および6時間に瞳孔径を実体顕微鏡を用いて測定した。

結果：10mg/kg群では瞳孔径に作用はみられなかった。50mg/kg群では有意な高値（散瞳）が投与後1および3時間でみられた。また、150mg/kg群では投与後0.5時間に有意な高値がみられ、以降も対照群に比べて高値傾向を示した。

なお、150mg/kg群では4例が死亡した。

④ 消化器系に対する作用

腸管輸送能に対する作用

動物：ICR雄マウス、5週齢（体重28.3～33.8g）、1群8匹

方法：被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、10、50および150mg/kgの投与量で一晩絶食した動物に強制経口投与した。投与後2時間に炭末懸濁液を経口投与し、その30分後に動物を屠殺し、十二指腸起始部から炭末到達先端までの長さを測定し、小腸全長に対する炭末最先進部の移行率を求めた。

結果：10mg/kg群では腸管輸送能に作用はみられなかった。50および150mg/kg群では動物が全例死亡し、腸管輸送能を測定できなかった。

⑤ 骨格筋に対する作用

懸垂動作試験

動物：ICR雄マウス、5週齢（体重28.7～34.3g）、1群8匹

方法：被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、10、50および150mg/kgの投与量で動物に強制経口投与した。その後、水平に張り渡した針金に動物の前肢をかけさせ、10秒以内に後肢を針金にかけ

られない場合を陽性とし、懸垂動作への作用を検討した。検査は、投与後1、3および6時間に行った。

結果：10mg/kg 群では懸垂動作に作用はみられなかった。50mg/kg 群では、いずれの検査時間でも陽性発現率に有意差はみられなかったが、投与後3時間で2例、6時間で1例の陽性例がみられた。150mg/kg 群では投与後1時間で4例、3時間で2例、6時間で2例の陽性例がみられ、陽性発現率に有意差がみられた。

なお、50mg/kg 群で1例、150mg/kg 群で6例が死亡した。

#### ⑥ 腎機能に対する作用

尿量および尿中電解質に及ぼす作用

動物：Wistar 雄ラット、7週齢（体重141～172g）、1群6匹

方法：被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、10、50および150mg/kgの投与量で一晩絶食させた動物に強制経口投与した。その直後、生理食塩水を経口投与し、個別採尿ケージで被験物質の投与後6時間まで採尿し、1時間毎の尿量を測定した。また、6時間分の蓄尿を用いてNa、KおよびClイオン、pH、浸透圧を測定した。

結果：尿量について、10mg/kg 群では作用がみられなかったが、50mg/kg 群では投与後1および3時間に有意な低下がみられた。しかし、150mg/kg 群では有意な変化はみられなかった。

電解質について、Naイオンには有意ではないものの150mg/kg 群で対照群の5.4倍の排泄量がみられた。Kイオンでは50mg/kg 群で有意な増加がみられたが、150mg/kg 群では影響がなかった。Clイオンでは、10mg/kg 群で有意な低下が、150mg/kg 群で増加傾向がみられた。

浸透圧は、50および150mg/kg 群で有意な高値を示した。

pHは、影響がみられなかった。

なお、150mg/kg 群で1例が死亡した。

PSP排泄能に対する作用

動物：Wistar 雄ラット、6週齢（体重202～231g）、1群6匹

方法：被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、10、50および150mg/kgの投与量で動物に強制経口投与した。その2時間後にフェールスルホンブライン（PSP）を静脈内投与し、30分後に後大静脈より採血した。得られた血液から血漿を分離し、分光光度計を用いてその吸光度を測定した。

結果：いずれの被験物質投与群でもPSP排泄能に対する作用はみられなかった。

<腎機能への作用に関するまとめ>

尿電解質の有意な変化が各被験物質投与群でみられたが、各群で変化のみられる電解質は異なっており、また、被験物質の投与量に相関した変化ではなかった。したがって、これらの変化は被験物質に起因するものではないと考えられた。また、尿浸透圧が50mg/kg以上の群で増加を示したが、この増加は尿電解質の濃度に依存した変化で

あり正常な反応と考えられ、尿濃縮能には影響がないと考えられた。また、尿量、pH、PSP 排泄能にも作用がみられなかったことから、被験物質は腎機能に対して作用しないと考えられた。

#### ⑦ 血液に対する作用

##### 血液凝固に対する作用

動物：Wistar 雄ラット、7 週齢（体重 249～283g）、1 群 6 匹

方法：被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルロース-Na 水溶液に懸濁し、0、10、50 および 150mg/kg の投与量で動物に強制経口投与した。その 2 時間後、後大静脈より採血し、得られた血液からクエン酸血漿を調製し、プロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した。

結果：10mg/kg 群では血液凝固作用について作用はみられなかった。50mg/kg 以上の群で PT の延長がみられたが、この延長は対照群と比較して 1 秒以内と短いことから明らかな作用とは考えられなかった。

なお、150mg/kg 群で 1 例が死亡した。

##### 溶血作用

動物：Wistar 雄ラット、7 週齢（体重 251～283g）、1 群 6 匹

方法：被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルロース-Na 水溶液に懸濁し、0、10、50 および 150mg/kg の投与量で動物に強制経口投与した。その 2 時間後、後大静脈より採血し、得られた血液から血漿を分離し、分光光度計を用いてその吸光度 (540nm) を測定した。

結果：いずれの被験物質投与群においても溶血作用はみられなかった。

なお、150mg/kg 群で 5 例が死亡した。

#### ⑧ 肝機能に対する作用

##### ICG 代謝能に対する作用

動物：Wistar 雄ラット、7 週齢（体重 245～287g）、1 群 6 匹

方法：被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルロース-Na 水溶液に懸濁し、0、10、50 および 150mg/kg の投与量で動物に強制経口投与した。その 2 時間後にインドシアニングリーン (ICG) を尾静脈投与し、15 分後、後大静脈より採血した。得られた血液から血漿を分離し、血漿中 ICG 濃度を分光光度計で測定し、血中停滞率 (ICG 代謝能) を求めた。

結果：いずれの被験物質投与群においても ICG 代謝能に作用はみられなかった。

2) 雄ラットにおける腸管輸送能試験

(資料T-32)

試験機関 大塚化学

報告書作成年 1999年

背景:

被験物質:

動物: Wistar系雄ラット、5週齢(体重102.8~132.7g)、1群10匹

方法: 被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、0、10、50および150mg/kgの投与量で一晩絶食した動物に単回強制経口投与した。投与後2時間に炭末懸濁液を経口投与し、その30分後に動物を屠殺し、十二指腸起始部から炭末到達先端までの長さを測定し、小腸全長に対する炭末最先進部の移行率を求めた。なお、硫酸アトロピンを経口投与(100 mg/kg)する陽性対照群も設けた。

結果: 溶媒対照群にくらべ、いずれの被験物質投与群においても統計学的に有意な炭末移行率の差はみられなかった。一方、陽性対照群では炭末移行率の有意な低下がみられた。



3) 動物細胞ミトコンドリア系を用いた *in vitro* 呼吸阻害

(資料T-33)

試験機関 三菱化学

報告書作成年 2001年

背景:

検討① ラット肝ミトコンドリア系(電子伝達系)を用いた呼吸阻害の検討

被験物質: トルフェンピラド、

肝ミトコンドリアの調製: Wistar系雄ラットから肝臓を摘出し、テフロンホモジナイザーで磨り潰した後、遠心分離し、ミトコンドリアショ糖浮遊液を調製した。

呼吸阻害測定法: 基質を添加し、溶存酸素計を用いてミトコンドリア浮遊液中の酸素消失を測定した。基質として次の2種を用いた。

- ・リンゴ酸(2.5mM)・グルタミン酸(2.5mM)・マロン酸(5mM)の混合液
- ・コハク酸(6mM)

被験物質の添加の有無による酸素消失の阻害(呼吸阻害)を測定し、阻害度(%)を算出した。なお、この実験系の信頼性は、既知のミトコンドリア呼吸阻害物質(オリゴマイシン、アンチマイシンA、ロテノン)で確認した。

結果: リンゴ酸(2.5mM)・グルタミン酸(2.5mM)・マロン酸(5mM)の混合液を基質とした場合の被験物質の阻害度を次表に示す。

被験物質濃度 ( $\mu$ g/mL)	0.16	0.04	0.01	0.004	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
阻害度(%)	100	94.2	64.3	22.6	0.0078

(参考) ロテノン 0.003 $\mu$ g/mL: 阻害度 20.0%、0.006 $\mu$ g/mL: 阻害度 84.2%

被験物質トルフェンピラドは、ロテノンと同程度の強い呼吸阻害を示した。一方、コハク酸を基質とした場合、被験物質がかなり高濃度(3840 $\mu$ g/mL)でのみ阻害を示した。また、被験物質による呼吸阻害は脱共役剤であるジニトロフェノールの添加により回復した。

結論として、トルフェンピラドはラット肝ミトコンドリア系の呼吸を強く阻害し、その主な作用点はComplex Iと推定された。

検討② ウシ心筋ミトコンドリア Complex I呼吸阻害の検討

被験物質：トルフェンピラド、

PT-CA、

心筋ミトコンドリアの調製：ウシ心臓を摘出し、ミキサーで粉碎後、遠心分離した。沈殿物を超音波処理し、再遠心分離して亜ミトコンドリア粒子を調製した。

呼吸阻害測定法：呼吸阻害は、NADH-Q酸化還元活性を指標とする Complex I に特化した影響を検討した。基質としてアルキル鎖 10 の人工キノンを用い、NADH の酸化による 340nm での吸光度の減少を分光光度計で測定した。亜ミトコンドリア粒子を含む反応溶液中に被験物質を添加し、その後人工キノンおよび NADH を添加した。

結果：トルフェンピラドおよび PT-CA の結果を次表に示す。

トルフェンピラド 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.146	0.036	0.021	0.015	0.007	0.004	0.002	0	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
阻害度(%)	100	93	87	78	59	52	27	0	0.003 (8.5nM)

PT-CA 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	22.4*	9.52	4.14	2.24	1.24	0	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
阻害度(%)	90	78	46	32	16	0	5.80 (14 $\mu\text{M}$ )

\*溶解限界、(参考) ピエリシジン A の IC<sub>50</sub> : 3.1nM

被験物質トルフェンピラドは、既知の阻害剤であるピエリシジン A よりやや弱いものの、ミトコンドリアの電子伝達系 Complex I を強く阻害した。一方、PT-CA の阻害は極めて弱かった。

以上の検討①および②から、トルフェンピラドは動物細胞由来のミトコンドリア電子伝達系の呼吸を強く阻害した。その作用点は Complex I と考えられた。一方、代謝物 PT-CA の同作用は弱かった。

4) ラットの肝ミトコンドリア系を用いた呼吸阻害

(資料T - 34)

- *in vivo* 下における定性的検討

試験機関 三菱化学

報告書作成年 2001年

背景および目的: トルフェンピラドの残留農薬安全性評価委員会から出された要望事項に対処するため、本試験を実施した。

検討① トルフェンピラドのラットを用いた単回経口投与後の肝臓および全血中の親化合物濃度の測定 (投与後短時間の測定)

被験物質: トルフェンピラド、

動物: Fischer 系雄ラット、5週齢 (体重 79~86g)、1群3匹/投与後時点

方法: <被験物質投与・試料採取>

被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルロース-Na 水溶液に懸濁し、160mg/kg の投与量で一晩絶食した動物に単回強制経口投与した。投与後 5、15、30 分に肝臓および血液 (全血) を採取し、分析に用いた。なお、投与前に無処置の 3 匹から同様に肝臓および血液を採取した。

投与量および試料採取時間の根拠

<親化合物の分析>

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本農薬㈱にある。

結 果：次表に肝臓中および全血中のトルフェンピラド濃度を示す。

試料	トルフェンピラド濃度、 $\mu\text{g/g}$ または $\mu\text{g/mL}$			
	無処置群	160mg/kg 投与群		
		投与後 5 分	投与後 15 分	投与後 30 分
肝臓	0.02	0.29	0.64	0.80
全血	0.005	0.008	0.012	0.030

検出限界：肝臓  $0.01 \mu\text{g/g}$ 、全血  $0.004 \mu\text{g/mL}$

肝臓および全血とも、投与後 5 分から親化合物が検出され、投与後 30 分では最高値を示した。親化合物は *in vitro* ラット肝ミトコンドリア系で呼吸阻害作用 ( $\text{IC}_{50}=0.0078 \mu\text{g/mL}$ ) を示すことがわかっている (資料 T-33)。本検討から判明した肝臓および全血中の濃度は、それ自体が各種の組織・器官のミトコンドリア内濃度を示すものではないが、ミトコンドリア呼吸阻害をひきおこすのに十分なトルフェンピラドがミトコンドリア内に存在すると推察される。

以上のことから、本検討の条件下において、ラット *in vivo* においてもミトコンドリア呼吸阻害作用が発現すると推察された。

検討② トルフェンピラド投与ラットの肝臓ミトコンドリア呼吸系に対する作用 (*ex vivo* および *in vitro* 下での検討)

被験物質：トルフェンピラド、

動物：SD系雄ラット、5週齢 (体重 140~150g)、4匹 (投与群 2匹、無処置群 2匹)

方法：<被験物質投与・肝ミトコンドリアの調製>

被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルロース-Na 水溶液に懸濁し、160mg/kg の投与量で動物に単回強制経口投与した。投与後 30 分に肝臓を採取した。被験物質の投与量および肝臓の採取時間は、上記の検討①に基づいた。なお、何も投与しなかった無処置群の 2 匹から同様に肝臓を摘出した。

摘出した肝臓は氷冷単離液 (ショ糖緩衝液) 中で細切後、テフロンホモジナイザーで磨砕し、冷却下で遠心分離し、ミトコンドリアのショ糖浮遊液を調製した。

<呼吸阻害測定法>

基質を添加し、溶存酸素計を用いてミトコンドリア浮遊液を含む反応系の酸素消費速度を測定した。はじめに、 $\beta\text{-OH-butyrate}$  を基質とし、ADP 添加 (state 3 開始) から ADP が消費されて抑制的な基質呼吸 (state 4) が始まるまでの酸素消費 (即ち、NADH oxidase 由来の酸素消費。以下、NADH-state 3 と記載) を測定した。引き続き、Succinate を基質とし、ADP を加えて state 3 開始から state 4 開始までの酸素消費 (即ち、Succinate oxidase 由来の酸素消費。以下、Succinate-state 3 と記載) を測定した。なお、調製ミトコンドリア浮遊液のタンパク量を定量し、反応系におけるタンパク濃度を一定にして実験した。調製されたミトコンドリア

の呼吸活性は動物個体ごとにわずかに異なることから、評価は、酸素消費の絶対値ではなく、NADH-state 3 と Succinate-state 3 の比率の変化でおこなった。トルフェンピラドは、*in vitro* 動物細胞ミトコンドリア系で Complex I を特異的に阻害すると考えられることから（資料 T-33）、本検討条件下において、Complex I 阻害がみられるとすれば、比率 [NADH-state 3 / Succinate-state 3] は低下すると考えられる。

なお、トルフェンピラド投与群および無処置群ともに用いたミトコンドリアは呼吸調節能（RCR）が 3.5 前後のものであり、状態が安定した良好なものであると考えられた。

結 果：

		NADH-state 3 / Succinate-state 3		阻害度(%) #
		個別値	平均値	平均値
無処置群	Rat 1	0.41	0.42	-
	Rat 2	0.42		
トルフェンピラド投与群 (160mg/kg, p.o.)	Rat 3	0.28	0.27	41.7
	Rat 4	0.26		

#：阻害度(%)は肝ミトコンドリアと  $\beta$ -OH-butyrate を添加した後、ADP を添加する前の自発性呼吸状態を呼吸阻害度の理論値「100%」として補正、算定した。

トルフェンピラドを投与したラットでは、比率 [NADH-state 3 / Succinate-state 3] は 0.27 であり、無処置群 0.42 に対して明らかに減少していた。無処置群との比較から、阻害度は 41.7%であった。

以上のことから、本検討の条件下において、ラット *in vivo* においてミトコンドリア呼吸阻害作用が発現していることが示唆された。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

検査項目 (試験動物)		投与経路 (溶媒: 0.5% カルボキシメチルセ ルロース-Na 水溶 液)	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	
資料 T 31	中枢 神経 系	単回経口 投与	一般状態 (ラット)	0 10 50 200	♂3	200	50	症状: 意識の低下、運動性の低下、 運動協調性の低下等 (中枢神経の抑制) 死亡: ≤50 mg/kg 0/3 200mg/kg 3/3
			Irwin 法による 多次元行動観察					
			睡眠時間- (マウス)	0 10 50 150	♂8	≥50	10	睡眠時間の延長作用あり 死亡: 150mg/kg 2/8
			ヘキサメトール睡眠					
			自発運動量 (マウス)	0 10 50 150	♂18	≥50	10	自発運動量の低下あり 死亡: 50 mg/kg 4/18 150mg/kg 17/18
			自発運動量測定 装置による計測					
			鎮痛作用 (ラット) Randall-Selitto 法	0 10 50 150	♂6	150	50	鎮痛作用閾値の上昇あり 死亡: 150mg/kg 3/6
			正常体温 (ラット)	0 10 50 150	♂6	≥50	10	体温低下あり 死亡: 150mg/kg 3/6
直腸温								
自発脳波 (ラット)	0 10 50 150	♂3	(作用 なし)	150	自発脳波への作用なし 死亡: 150mg/kg 1/3			
コリンエステラーゼへの 作用 (ラット)	0 10 50 150	♂6	(作用 なし)	150	血漿コリンエステラーゼ (AchE, ChE) への作 用なし			
呼吸・循環器系	単回十二指 腸内投与	0 2 10 50	♂4	(作用 なし)	50	呼吸数、呼吸換気量、血圧、心拍 数および心電図波形への作用なし		
呼吸、血圧、心拍数 および心電図 (ウサギ) 麻酔下で測定								
自律神経系	単回経口 投与	0 10 50 150	♂6	≥50	10	散瞳作用あり 死亡: 150mg/kg 4/6		
瞳孔径 (ラット)								
消化器系		0 10 50 150	♂8	(作用 なし)	10 (50mg/ kg 以上 の群では 全例死亡 のため検 査できな かった。)	腸管輸送能への作用なし 死亡: ≥50mg/kg 8/8		
腸管輸送能 (マウス) 炭末輸送能								
資料 T 32	消化器系		0 10 50 150	♂10	(作用 なし)	150	腸管輸送能への作用なし	
	腸管輸送能 (ラット) 炭末輸送能							

(次頁に続く)

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表（続き）

検査項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒: 0.5% 加水キシリトール Na-Na 水溶液)	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	
資料 T 31	骨格筋への作用  懸垂動作 (マウス)	0	2/8	≥ 50	10	筋弛緩作用あり	
		10					
		50					
		150					
	腎機能への作用 尿量および尿中 電解質 (ラット)	単回経口 投与	0	2/6	(作用 なし)	150	尿量、尿中電解質、尿 pH、浸透 圧には影響なし
			10				
			50				
			150				
	P S P 排泄能 (ラット)	単回経口 投与	0	2/6	(作用 なし)	150	P S P 排泄能への作用なし
			10				
			50				
			150				
血液への作用 血液凝固 (ラット)	単回経口 投与	0	2/6	(作用 なし)	150	血液凝固能(PT、APTT)への作用 なし	
		10					
		50					
		150					
血液への作用 溶血 (ラット)	単回経口 投与	0	2/6	(作用 なし)	150	溶血作用なし	
		10					
		50					
		150					
肝機能への作用 I C G 代謝能 (ラット)	単回経口 投与	0	2/6	(作用 なし)	150	I C G 代謝能への作用なし	
		10					
		50					
		150					
資料 T 33	動物細胞ミトコンドリア電子伝達系の呼吸阻害 ( <i>in vitro</i> ) ①ラット肝ミトコンドリア呼吸阻害 ②ラット心筋ミトコンドリア呼吸阻害	濃度 (μg/mL) ①トルフェンピラド: 0.004, 0.01, 0.04, 0.16 ②トルフェンピラド: 0.002, 0.004, 0.007, 0.015, 0.021, 0.036, 0.146 PT-CA : 1.24, 2.24, 4.14, 9.52, 22.4	50%阻害濃度 (IC <sub>50</sub> , μg/mL) ①トルフェンピラド: 0.0078 ②トルフェンピラド: 0.003 PT-CA : 5.80				
資料 T 34	経口投与ラットを用いたミトコンドリア電子伝達系における <i>in vivo</i> 呼吸阻害検討 ①経口投与ラットの肝・血液の親化合物 TK ②経口投与ラットから調製した肝ミトコンドリア呼吸阻害検討	①②ともトルフェンピラドを 160mg/kg の投与量で単回強制経口投与。	<i>in vivo</i> 呼吸阻害作用が示唆された。				

＜申請者のまとめ・考察＞

トルフェンピラド原体は単回大量投与時に意識低下、運動性低下、運動協調性低下などの中枢神経の抑制症状、睡眠時間の延長、自発運動量の低下、鎮痛閾値の上昇、体温低下、散瞳作用および筋弛緩作用がラットまたはマウスで認められた。これらの作用は致死用量である 50mg/kg またはそれ以上の用量で発現したが、非致死量である 10mg/kg ではみられなかった。したがって、これらの作用は投与動物の顕著な全身状態の悪化に伴う非特異的な作用であると考えられる。

トルフェンピラド原体は呼吸循環器系、血液凝固系、コリンエステラーゼ活性、肝機能および腎機能には影響を及ぼさず、溶血作用もないことが明らかとなった。

消化管に対する作用については、ラットの炭末輸送能試験で作用なしとの結果が得られた。しかし、<sup>14</sup>C-トルフェンピラドを致死用量 (160、320 mg/kg) でラットに単回経口投与した試験 (資料 M-8) において、投与後 7 日においても高い残留放射能が胃内容物でみられたことから、致死量投与時には胃運動が抑制されると考えられる。

トルフェンピラドは、*in vitro* 系においてミトコンドリア電子伝達系の呼吸を阻害し、同阻害作用は *in vivo* 系においても発現することが示唆された。

(11) 解毒および治療

1) 解毒試験 - 拮抗薬による解毒

(資料T-35)

試験機関 三菱化学安全科学研究所

報告書作成年 1999年

被験物質:

試験動物: Wistar系雄ラット、1群雄10匹、5週齢(体重147.3~161.3g)

試験期間: 14日間観察

試験方法: 被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース-Na水溶液に懸濁し、200mg/kgの投与量で動物に単回強制経口投与した。その0.5時間後、3種類の中樞神経興奮薬(カフェイン、30mg/kg皮下投与; 塩酸メチルフェニデート、10mg/kg皮下投与; ペモリン、50mg/kg皮下投与)を投与した。

被験物質の投与量、薬物の選定と薬量の理由:

検査項目: 被験物質投与後1、3および6時間、以後1日1回14日間まで、死亡の有無を観察した。また、体重および摂餌量を投与当日(0日、体重のみ)、投与後3、7、10および14日に測定した。

試験結果:

死亡率(%)

	投与後時間																
	投与当日(時)			投与翌日以降(日)													
	1	3	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
被験物質単独	0	0	0	10	10	10	30	30	40	60	100	100	100	100	100	100	100
被験物質 + カフェイン	20	70*	70*	70*	70*	70*	80	80	80	80	80	80	80	90	90	90	90
被験物質 + 塩酸メチルフェニデート	20	30	30	80*	90*	90*	90*	90*	90	100	100	100	100	100	100	100	100
被験物質 + ペモリン	10	30	30	50	60	60	70	70	80	80	80	80	80	80	80	80	80

投与量: 被験物質(メチルフェニデート原体) 200mg/kg p.o., カフェイン 30mg/kg s.c., 塩酸メチルフェニデート 10mg/kg s.c., ペモリン 50mg/kg s.c.

\*:  $p < 0.05$  ( $\chi^2$ 検定, 被験物質単独群と比較)

被験物質単独投与群では、投与後8日までに全例が死亡した。

一方、被験物質投与後0.5時間に解毒薬としてカフェイン、塩酸メチルフェニデートまたはペモリンを投与したいずれの処置群においても、死亡率または死亡時間の改善はみられず、死亡時期を早める結果となった。



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本農薬㈱にある。

体重および摂餌量

		投与前	投与後日数			
			3	7	10	14
被験物質単独	平均体重(g)	153.3	129.2	105.6	-	-
	平均摂餌量(g/day/animal)	-	3.4	2.3	-	-
被験物質 + カフェイン	平均体重(g)	153.5	120.2	105.9	104.3	148.2
	平均摂餌量(g/day/animal)	-	4.9	6	6.95	17.8
被験物質 + 塩酸メチルフェニデート	平均体重(g)	153.5	133.6	-	-	-
	平均摂餌量(g/day/animal)	-	2.5	1.5	-	-
被験物質 + ペモリン	平均体重(g)	154.4	124.0	108.7	104.7	152.6
	平均摂餌量(g/day/animal)	-	0.8	4.6	5.3	18.3

投与量：被験物質（トルフェンピラド原体）200mg/kg p.o., カフェイン 30mg/kg s.c.,  
塩酸メチルフェニデート 10mg/kg s.c., ペモリン 50mg/kg s.c.

被験物質単独投与群では、全例とも死亡するまで体重および摂餌量とも減少した。一方、解毒薬の処置群において、カフェインおよびペモリン処置群の生存例では投与後 14 日に体重および摂餌量が増加に転じた。しかし、おおむね被験物質投与による体重または摂餌量の減少に対して、用いた解毒薬による改善効果はみられなかった。

以上の結果から、解毒薬 カフェイン、塩酸メチルフェニデートおよびペモリンは、トルフェンピラド原体による急性毒性に対して解毒効果を示さず、急性毒性を増強させると判断された。

2) 解毒試験 - 吸着剤および緩下剤による解毒

(資料 T-36)

試験機関 大塚化学

報告書作成年 2000年

被験物質:

試験動物: SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時6週齢(体重 雄 133.4~154.8 g、雌 106.5~133.8 g)

試験期間: 7日間観察

試験方法: 被験物質を 0.5%カルボキシメチルセルローズ-Na 水溶液に懸濁し、250 または 500mg/kg の投与量で動物に単回強制経口投与した。その15分後に活性炭素・ソルビトール、あるいは活性炭・硫酸マグネシウムを単回経口投与した。さらに、被験物質を 250mg/kg の用量で同様に投与し、60分後に活性炭・硫酸マグネシウムを単回経口投与する群も設けた。なお、被験物質のみを投与した群(無処置群)も比較のため設けた。

トルフェンピラト <sup>®</sup> 投与量 (mg/kg)	吸着剤・緩下剤		供試動物数
	処置内容	処置時間	
250	無処置		雌雄各5匹
	活性炭(1500mg/kg,po)+ソルビトール(2500mg/kg,po)	15分後	雌雄各5匹
	活性炭(1500mg/kg,po)+硫酸マグネシウム(400mg/kg,po)	15分後	雌雄各5匹
		60分後	雌雄各5匹
500	無処置		雌雄各5匹
	活性炭(1500mg/kg,po)+ソルビトール(2500mg/kg,po)	15分後	雌雄各5匹
	活性炭(1500mg/kg,po)+硫酸マグネシウム(400mg/kg,po)	15分後	雌雄各5匹

検査項目: 被験物質投与後5、15、30分、1、3、6時間、以後1日1回7日間にわたって死亡の有無および一般状態を観察した。また、体重を被験物質の投与直前(0日)、それ以降は1日1回測定した。

試験結果:

死 亡:

トルフェンピラト <sup>®</sup> 投与量 (mg/kg)	吸着剤・緩下剤		性 別	死亡数							累積死亡数	
	処置内容	処置時間		投与後時間(日)								
				0	1	2	3	4	5	6		7
250	無処置		雌	1	0	0	0	1	2	0	0	4/5
	活性炭+ソルビトール	15分後		0	0	0	0	0	0	0	0	0/5**
	活性炭+硫酸マグネシウム	15分後		0	0	0	0	0	0	0	0	0/5**
		60分後		0	1	0	0	0	0	0	0	1/5
500	無処置			2	0	2	0	1	-	-	-	5/5
	活性炭+ソルビトール	15分後		0	0	0	0	0	0	1	4	5/5
	活性炭+硫酸マグネシウム	15分後		0	1	0	1	0	0	3	-	5/5
250	無処置			雌	1	3	0	0	0	0	1	-
	活性炭+ソルビトール	15分後	0		0	0	0	0	0	1	0	1/5**
	活性炭+硫酸マグネシウム	15分後	0		0	0	0	0	0	0	1	1/5**
		60分後	1		1	0	0	0	0	1	0	3/5
500	無処置		4		1	-	-	-	-	-	-	5/5
	活性炭+ソルビトール	15分後	0		0	1	0	1	1	0	0	3/5
	活性炭+硫酸マグネシウム	15分後	0		1	3	0	0	0	1	-	5/5

-: 全例死亡のため、観察せず。

\*\* : p<0.01 (χ<sup>2</sup>検定, 無処置群との比較)

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本農薬㈱にある。

無処置群では、いずれの投与量においてもほぼ全例が死亡した。

一方、被験物質（250mg/kg）投与15分後に活性炭とソルビトールまたは硫酸マグネシウムを投与した群では、有意に死亡数が減少した。また、被験物質（250mg/kg）投与60分後に活性炭と硫酸マグネシウムを投与した群でも、死亡数の減少傾向がみられた。

しかし、被験物質の投与量を500mg/kgに上げると、いずれの処置群でも死亡数は無処置群と同程度であった。

一般症状：無処置群では、自発運動の低下、肛門周囲の汚れ、歩行異常、眼瞼下垂、被毛の粗剛および削瘦が観察された。被験物質（250mg/kg）投与15分後に活性炭とソルビトールを投与した雄の群では、無処置群と比べ一般症状の軽減がみられたが、その他の処置群では軽減化はみられなかった。

体 重：

トルフェンチラド <sup>®</sup> 投与量 (mg/kg)	吸着剤・緩下剤		性 別	平均体重 (g)								
				投与後時間 (日)								
	処置内容	処置時間		0	1	2	3	4	5	6	7	
250	無処置		雄	142.4 (5) <sup>#1</sup>	139.0 (4)	131.2 (4)	122.3 (4)	116.9 (3)	129.3 (1)	122.6 (1)	113.7 (1)	
	活性炭 +ソルビトール	15分後		145.1 (5)	146.3 (5)	140.6 (5)	135.6 (5)	144.8 (5)	161.6 (5)	174.0 (5)	183.7 (5)	
	活性炭 +硫酸マグネシウム	15分後		146.3 (5)	150.1 (5)	145.5 (5)	144.7 (5)	147.1 (5)	161.4 (5)	171.1 (5)	176.4 (5)	
		60分後		146.3 (5)	147.7 (4)	142.9 (4)	144.9 (4)	144.2 (4)	156.6 (4)	161.7 (4)	182.7 (4)	
500	無処置			雌	143.5 (5)	134.0 (3)	128.4 (1)	115.3 (1)	-	-	-	-
	活性炭 +ソルビトール	15分後			141.5 (5)	139.6 (5)	134.9 (5)	126.7 (5)	121.7 (5)	113.5 (5)	111.7 (4)	-
	活性炭 +硫酸マグネシウム	15分後			146.4 (5)	141.5 (4)	132.8 (4)	119.8 (3)	111.3 (3)	105.4 (3)	-	-
250	無処置				雄	124.4 (5)	111.1 (1)	105.8 (1)	98.2 (1)	90.7 (1)	84.5 (1)	-
	活性炭 +ソルビトール	15分後	120.0 (5)			117.2 (5)	111.4 (5)	104.7 (5)	105.8 (5)	104.1 (5)	109.5 (4)	112.2 (4)
	活性炭 +硫酸マグネシウム	15分後	125.3 (5)			123.1 (5)	116.5 (5)	113.6 (5)	115.0 (5)	117.3 (5)	118.5 (5)	130.0 (4)
		60分後	125.5 (5)			124.4 (3)	118.5 (3)	112.6 (3)	106.2 (3)	103.4 (3)	107.1 (2)	117.0 (2)
500	無処置		雌			113.4 (5)	-	-	-	-	-	-
	活性炭 +ソルビトール	15分後		110.5 (5)		109.5 (5)	105.5 (4)	100.8 (4)	98.3 (3)	98.3 (3)	96.4 (2)	90.0 (2)
	活性炭 +硫酸マグネシウム	15分後		112.3 (5)		102.7 (4)	107.3 (1)	103.1 (1)	102.1 (1)	91.9 (1)	-	-

#1: ( )内の数値は測定動物数を示す。

-: 全例が死亡したためデータなし。

無処置群では、全例とも死亡するまで体重が継続的に減少した。

一方、被験物質を250mg/kg投与後に活性炭とソルビトールまたは硫酸マグネシウムで処置した群では、体重はいったん減少するものの、その後増加に転じた。

しかし、被験物質の投与量を500mg/kgに増加させると、活性炭とソルビトールまたは硫酸マグネシウムで処置しても体重は継続的に減少し、増加に転じること

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本農薬㈱にある。

はなかった。

以上の結果から、吸着剤（活性炭）および緩下剤（ソルビトールまたは硫酸マグネシウム）の投与はトルフェンピラド原体の急性経口毒性の解毒において有効であることが示唆された。

3) 解毒剤の検討

(資料 T-37)

試験機関 日本農薬

報告書作成年 2003年

背景および目的：使用時安全性委員会から出された要望事項に対応するため、本検討が実施された。

被験物質：

試験動物：SD系雄ラット、1群雄10匹、5週齢（体重94.6～119.8g）

試験期間：14日間観察

試験方法：被験物質をコーン油に懸濁し、50mg/kgの投与量で1晩絶食させた動物に単回強制経口投与した。その投与直後（午前中）に、解毒剤としてユビデカレノン（50または100mg/kg）、塩化カルニチン（500または1000mg/kg）、または塩化レボカルニチン（500または1000mg/kg）を単回強制経口投与した。また、同日午後、翌日午前と午後にも同様の解毒剤を同様に各1回投与した。

被験物質の投与量、解毒剤と投与量の設定理由：

検査項目：被験物質投与当日（0日）は、被験物質投与後1、3および6時間、以後投与後7日までは1日2回（午前、午後）、投与後8日～14日までは1日1回（午前）生死を含む一般状態を観察した。また、体重を投与当日（投与前）、投与後毎日（午前）測定した。

試験結果：

生存数

群名	用量 (mg/kg/回)	動物 数	投与後時間									
			投与当日(hr)			投与後1日		同2日		同3日		同14日
			1	3	6	午前	午後	午前	午後	午前	午後	(最終日)
被験物質単独	50	10	10	10	10	1	1	0	0	0	0	0
解毒剤処置	ユビデカレノン	50	10	10	10	4	1	0	0	0	0	0
		100	10	10	10	6	4	2	2	2	2	2
	塩化カルニチン	500	10	10	10	2	2	2	1	1	1	1
		1000	10	10	10	3	3	3	3	3	3	3
	塩化レボカルニチン	500	10	10	10	4	1	1	1	1	1	1
		1000	10	10	10	7	5	2	2	2	2	2

被験物質単独投与群では、投与後2日までに全例が死亡した。

一方、解毒剤投与群では、解毒薬の投与量に応じて死亡数が減少し、投与14日後の生存数ではユビデカレノンの50および100mg/kg投与群ではそれぞれ0、2匹、塩化カルニチンの500および1000mg/kg投与群ではそれぞれ1、3匹、塩化レボカルニチンの500および1000mg/kg投与群ではそれぞれ1、2匹であった。カプラン・マイヤー法による生存時間解析を行った結果、被験物質単独投与群に

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本農薬株式会社にある。

比べて塩化レボカルニチン 1000mg/kg 投与群において Log-Rank 検定で有意な ( $p < 0.05$ ) 生存時間の延長がみられたが、他の解毒剤処置群の生存時間に有意性はみられなかった。

一般症状：被験物質単独投与群では立毛、被毛汚染、衰弱、自発運動の低下ないし消失、体温低下、横臥、呼吸数低下、流涙などがみられた。解毒剤投与群においても同様な症状がみられた。

体重：

群名	用量 (mg/kg/回)	動物数	平均体重 (g)							
			0	1	2	3	4	7	14(日)	
被験物質単独	50	10	108.7	106.8	-	-	-	-	-	-
解毒剤処置	ユビデカレノン	50	109.1	100.5	-	-	-	-	-	-
		100	109.3	106.9	107.0	114.9	124.2	147.7	200.0	
	塩化カルニチン	500	109.5	104.8	98.3	91.2	96.1	122.5	168.5	
		1000	109.1	108.0	102.3	102.4	105.2	138.7	188.1	
	塩化レボカルニチン	500	109.5	105.7	116.1	127.0	136.9	157.5	203.6	
		1000	109.2	107.5	105.6	110.9	121.5	152.4	209.8	

-: 全例死亡のため、測定値なし。

被験物質単独投与群では投与後 1 日に体重低下がみられた。解毒剤投与群においても投与後 1～2 日に低下がみられたが、その後回復する傾向がみられた。

以上の結果から、ラットにおいて、解毒薬ユビデカレノン、塩化カルニチンおよび塩化レボカルニチンはトルフェンピラドの急性経口毒性を軽減することが示唆された。