

2. 原体の混在物および代謝物の毒性

(1) 原体中の混在物の毒性

(2) 代謝物の毒性

なす（資料 M-9）、キャベツ（資料 M-10、11）およびもも（資料 M-12、13）を用いた ^{14}C -トルフェンピラドの植物代謝試験の結果、主要な代謝物は「
」であった。また、日本土壤を用いた ^{14}C -トルフェンピラドの代謝試験（資料 M-14）の結果、主代謝物は「
」であった。これらの代謝物の毒性を検索するため、表 II に示す毒性試験を実施した。
なお、これらの代謝物はラットを用いた代謝試験においても検出された。

表 I . 毒性試験用原体 の分析結果

有効成分および混在物名 略 号	化学名および構造式	含有率 (%)
トルフェンピラド 4-クロ-3-エチル-1-メチル-N-[4-(p-トリルオキシ)ベンジル]ピラゾール-5-カルボキサミド		

表 II. 代謝物の毒性試験一覧

代謝物略名	化学名および構造式	実施毒性試験 (資料 No.)
PT-CA		<ul style="list-style-type: none"> ・ラットの急性経口毒性試験 (T-38, T-39) ・ラットの4週間経口(混餌)毒性試験 (T-40) ・細菌の復帰突然変異試験 (T-41) ・哺乳動物培養細胞の染色体異常試験 (T-42) ・ラットの骨髓小核試験 (T-43)
OH-PT		<ul style="list-style-type: none"> ・ラットの急性経口毒性試験 (T-44 T-45) ・ラットの4週間経口(混餌)毒性試験 (T-40) ・細菌の復帰突然変異試験 (T-46) ・哺乳動物培養細胞の染色体異常試験 (T-47) ・ラットの骨髓小核試験 (T-48)
T-CA		<ul style="list-style-type: none"> ・ラットの急性経口毒性試験 (T-49) ・細菌の復帰突然変異試験 (T-50)
T-AM		<ul style="list-style-type: none"> ・ラットの急性経口毒性試験 (T-51) ・細菌の復帰突然変異試験 (T-52)
CA-T-CA		<ul style="list-style-type: none"> ・ラットの急性経口毒性試験 (T-53) ・細菌の復帰突然変異試験 (T-54)
OH-T-CA		<ul style="list-style-type: none"> ・ラットの急性経口毒性試験 (T-55) ・細菌の復帰突然変異試験 (T-56)
OH-PAM		<ul style="list-style-type: none"> ・ラットの急性経口毒性試験 (T-57) ・細菌の復帰突然変異試験 (T-58)
PCA		<ul style="list-style-type: none"> ・ラットの急性経口毒性試験 (T-59) ・細菌の復帰突然変異試験 (T-60)

1) PT-CA の毒性

①PT-CA () のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 T-38)

試験機関 ボヅリサーチセンター [G.L.P. 対応]

報告書作成年 1999年

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時 7週齢 (体重 雄 182~200g、雌 145~169g)

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 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、投与前一晩絶食させた動物に強制経口投与した。なお、対照群の動物には投与溶媒のみを同様に投与した。

検査項目 : 中毒症状および生死を 14日間観察した。死亡動物および観察終了時の全生存動物について剖検を行った。また、体重を投与当日 (1日)、投与後 2、3、4、8、11 および 15 日に測定した。

試験結果 :

	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100	
LD ₅₀ 値 95%信頼限界 (mg/kg)	27.4 16.1~45.0	15.4 11.7~20.2
死亡開始時間 死亡終了時間	投与後 4 時間 投与後 3 日 ¹⁾	投与後 2 時間 投与後 2 日 ¹⁾
症状発現時間 症状消失時間	投与後 2 時間 投与後 3 日	投与後 2 時間 投与後 2 日
徵候のみられない 最高投与量 (mg/kg)	12.5	6.25

1) 最終の死亡個体を発見した日。

症状として、雌雄とも自発運動の低下、腹臥、呼吸数の減少、呼吸深大、呼吸困難、体温低下がみられた。

体重の減少または増加抑制が 12.5 mg/kg 群の雌では投与後 3 日まで、25 および 50 mg/kg 群の雄では投与後 4 日までにみられた。しかし、その後は順調な体重増加がみられた。

剖検の結果、死亡例では腸胃の暗赤色点がみられた。生存例では、主要な組織器官に特記すべき変化はみられなかった。

② PT-CA () のラットにおける急性経口毒性試験

(資料T-39)

試験機関 大塚化学

報告書作成年 2000年

試験目的 :

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時 7週齢 (体重 雄 189.3~213.5g、雌 134.3~158.7g)

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 被験物質をオリーブ油に懸濁し、投与前一晩絶食させた動物に強制経口投与した。
なお、対照群の動物にはオリーブ油のみを同様に投与した。

検査項目 : 中毒症状および生死を14日間観察した。死亡動物および観察終了時の全生存動物について剖検を行った。また、体重を投与当日(1日)、投与後2、3、4、6、8、11および15日に測定した。

試験結果 :

	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100	
LD ₅₀ 値 95%信頼限界 (mg/kg)	62 40~95	54 38~75
死亡開始時間 死亡終了時間	投与後 1 時間 投与後 3 日 ¹⁾	投与後 3 時間 投与後 3 日 ¹⁾
症状発現時間 症状消失時間		投与後 30 分 投与後 7 日
死亡例のみられなかった 最高投与量 (mg/kg)		25

1) 最終の死亡個体を発見した日。

症状として、雌雄とも自発運動の低下、眼瞼下垂および肛門周囲の汚れがみられた。また、少数例で腹臥、不整呼吸、歩行異常、削瘦および被毛の粗剛がみられた。

体重の減少または増加抑制が、雄の 50mg/kg 群では投与後 4 日まで、100mg/kg 群では投与後 6 日まで、雌の 25mg/kg 以上の群で投与後 4 日までみられたが、以降は順調な増加がみられた。その他の群では観察終了まで順調な増加がみられた。

剖検の結果、死亡例および生存例とともに主要な組織器官に特記すべき変化はみられなかった。

③ トルフェンピラド、PT-CA () および OH-PT () のラットにおける 4 週間混餌投与による毒性試験

(資料 T-40)

試験機関 ボゾリサーチセンター [GLP対応]

報告書作成年 2001年

試験目的 :

被験物質 :

試験動物 : Fischer 系ラット、1群雌雄各 5匹、

投与開始時 6 週齢 (体重 雄 115~130 g、雌 93~103g)

	投与量 (ppm)	動物数 (匹/投与量/性)	投与開始日～屠殺解剖日
共通対照群	0	5	2000年9月12日
PT-CA 投与群	3, 10, 30, 100	5	～同年10月10日
OH-PT 投与群	3, 10, 30, 100	5	(4 週間投与)
トルフェンピラド投与群	10, 30, 100	5	

投与方法 : 各被験物質を飼料中に混入し、上記に表示した投与量で 4 週間にわたって連続的に自由摂取させた。被験物質を混入した飼料は約 1 週間に 1 回調製した。

さらに、被験物質を混入しない飼料を与えた共通対照群を設けた。

投与量の設定根拠 :

検査項目および結果 :

一般状態および死亡 : 一般状態および死亡を毎日観察した。

いずれの被験物質投与群においても死亡は観察されず、また、被験物質による一般状態の変化もみられなかった。

体重： 投与期間を通じてすべての動物の体重を週1回測定した。

投与期間終了時点における各群の累積体重増加量を次表に示す。

性別	雄					雌				
	0 ⁽¹⁾	3	10	30	100	0 ⁽¹⁾	3	10	30	100
PT-CA	94	95	96	97	87	40	38	40	37	31b
OH-PT		95	101	103	90		41	40	41	39
トルフェンピラド		- ⁽²⁾	93	90	74b		- ⁽²⁾	40	39	34a

表中の数値単位：g

1) 共通対照群、2) - : 投与群の設定なし

a: p<0.05, b: p<0.01 (多重比較検定)

共通対照群に比べ、PT-CA の 100ppm 群の雌およびトルフェンピラドの 100ppm 群の雌雄において体重および体重増加量の低値がみられ、各被験物質による変化と考えられた。それ以外には、各被験物質による変化はみられなかった。

摂餌量および摂餌効率：投与期間を通じてすべての動物の摂餌量を週1回測定し、摂餌効率（体重増加量÷摂餌量×100）も算出した。

投与4週時の摂餌量を次表に示す。

性別	雄					雌				
	0 ⁽¹⁾	3	10	30	100	0 ⁽¹⁾	3	10	30	100
PT-CA	16	16	15	15	14	10	10	11	11	10
OH-PT		16	16	16	15		11	10	11	10
トルフェンピラド		- ⁽²⁾	16	16	14b		- ⁽²⁾	10	11	9a

表中の数値単位：g/匹/day

1) 共通対照群、2) - : 投与群の設定なし

a: p<0.05, b: p<0.01 (多重比較検定)

共通対照群に比べ、PT-CA の 100ppm 群の雌で投与期間の大半にわたり低値がみられた。トルフェンピラドの 100ppm 群の雌雄で摂餌量の低値がみられた。これらの変化は各被験物質による変化と考えられた。それ以外の低値は一過性の変化または用量との関連がない変化であり、各被験物質による変化とは考えられなかった。摂餌効率については、PT-CA の 100ppm 群の雌で投与期間の大半にわたり軽度な低値がみられ、被験物質による変化と考えられた。それ以外は一過性で一貫性に乏しい変化であり、各被験物質によるものとは考えられなかった。

被験物質摂取量：摂餌量および投与濃度から算出した投与期間中の1日あたりの平均被験物質摂取量を次表に示す。

性別	雄				雌			
	3	10	30	100	3	10	30	100
PT-CA	0.3	0.8	2.5	8.1	0.3	0.9	2.7	8.5
OH-PT	0.2	0.9	2.5	8.4	0.3	0.9	2.7	8.8
トルフェンピラド	- ⁽¹⁾	0.9	2.5	8.0	- ⁽¹⁾	0.9	2.6	8.2

表中の数値単位：mg/kg/day

1) - : 投与群の設定なし

血液学的検査：4週間の投与終了後、全動物を対象として一晩絶食させた動物の腹大動脈から血液を採取し、以下の項目を測定した。

赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積（MCV、計算値）、平均赤血球血色素量（MCH、計算値）、平均赤血球血色素濃度（MCHC、計算値）、網赤血球率、血小板数、白血球数、白血球百分率、プロトロンビン時間（PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）

共通対照群に比べ、統計学的有意差のみられた項目を次表に示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		3	10	30	100	3	10	30	100
PT-CA	血小板数	102	104	107	109 ^a	99	95	98	96
	APTT	101	93	91	87 ^a	102	98	99	100
OH-PT	血小板数	103	102	107	104	100	99	99	101
	APTT	101	97	94	97	99	96	98	101
トルフェ ンピラド	血小板数	- ^b	99	102	104	- ^b	102	100	102
	APTT	- ^b	99	103	99	- ^b	97	100	101

a: p<0.05, b: p<0.01 (多重比較検定)

1) - : 投与群の設定なし

表中の数値は、共通対照群値を100とした時の値。

共通対照群に比べ、PT-CA の 100ppm 群の雄で血小板数の高値および APTT の低値がみられたが、きわめてわずかな変化であり、血栓形成などはみられないことから、毒性学的意義はないと考えられた。その他、各被験物質に起因する変化はみられなかった。

血液生化学的検査：血液学的検査と同時期に採取した血液から得られた血清または血漿(*)を用いて以下の項目を検査した。

GOT(*), GPT(*), γ GT(*), ALP, 総コレステロール、トリグリセライド、総ビリルビン、グルコース、尿素窒素、クレアチニン、総蛋白、A/G 比、蛋白質分画、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン

共通対照群に比べ、統計学的有意差のみられた項目を次表（次頁）に示す。

(血液生化学的検査の結果表)

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		3	10	30	100	3	10	30	100
PT-CA	GOT	98	96	107	111	96	98	96	98
	GPT	100	97	92	89	90	93	97	80a
	ALP	95	99	94	81b	95	97	87a	87a
	総ビリルビン	89	89	78a	78a	100	100	100	86
	グルコース	101	97	98	98	105	109a	100	103
	総蛋白	100	98	98	98	100	102	102	100
	蛋白分画： βグロブリン	98	98	98	107	98	105a	102	98
OH-PT	GOT	67a	82	87	91	95	98	102	105
	GPT	97	95	92	89	90	93	103	97
	ALP	98	98	100	90a	92	97	94	93
	総ビリルビン	89	89	89	89	100	100	100	100
	グルコース	101	98	101	99	105	101	105	99
	総蛋白	100	98	100	100	102	102	98	102
	蛋白分画： βグロブリン	102	99	99	99	102	103	101	101
トル フェン ピラ ド	GOT	- ¹⁾	89	96	120	- ¹⁾	96	100	95
	GPT	-	97	95	95	-	100	97	83b
	ALP	-	98	88b	85b	-	98	94	84b
	総ビリルビン	-	89	89	78a	-	100	100	100
	グルコース	-	101	98	95	-	104	103	107
	総蛋白	-	98	97	95a	-	98	102	100
	蛋白分画： βグロブリン	-	100	100	99	-	101	100	99

1) - : 投与群の設定なし

a: p<0.05, b: p<0.01 (多重比較検定)

表中の数値は、共通対照群値を100とした時の値。

被験物質による影響として、総蛋白の低値がトルフェンピラドの100ppm群の雄でみられた。

GPTおよびALPの低値が、PT-CA、OH-PT、トルフェンピラド投与群にみられたが、それらの変化の程度はわずかであること、また、通常毒性学的に問題となる高値とは逆の変化であることから、毒性学的意義はないと考えられた。総ビリルビンの低値が、PT-CAおよびトルフェンピラド投与群でみられたが、軽度な変化であり、貧血や尿中ビリルビンあるいはウロビリノーゲンに変化が観察されないことから、毒性学的意義はないと考えられた。その他、3または10ppmに変化がみられたが、いずれの変化も用量との関連性がない変化であった。

尿検査：投与4週時に全動物を対象として、採取した尿を用いて以下の項目を測定した。

色調、pH、蛋白、ケトン体、グルコース、潜血、ビリルビン、ウロビリノーゲン、沈渣

共通対照群に比べ、PT-CAの10、30および100ppm投与群の雌で尿蛋白陽性例の減少がみられたが、血清総蛋白には変化がなく、腎臓の病理組織学的検査にも異常所見がないこと、さらに、通常毒性学的に問題となる増加とは逆の変動であることから、毒性学的意義はないと考えられた。また、尿蛋白陽性例の減少は

OH-PT の 10 および 30ppm 群の雌にもみられたが、同 100ppm 群で同様の変化はみられなかった。

眼科学的検査：投与開始前および投与 4 週時に全動物を対象として、眼外観、前眼部、中間透光体および眼底を検査した。

いずれの被験物質においても、投与に関連する変化はみられなかった。

器官重量：投与期間終了後の全動物を対象として、以下の器官重量（絶対重量）を測定し、相対重量として対体重比も算出した。

脳、副腎、胸腺、脾臓、肺、肝臓、腎臓、精巣、卵巢

共通対照群に比べ、統計学的有意差のみられた項目を次表に示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		3	10	30	100	3	10	30	100
PT-CA	最終体重(絶食後)	102	102	101	98	98	99	98	94b
	脳 絶対重量	102	99	100	101	99	98	98	99
	対体重比	100	97	98	102	102	99	101	105a
	肺 絶対重量	99	100	103	95	97	95	97	95a
	対体重比	97	97	103	97	100	96	100	100
	肝臓 絶対重量	102	101	105	105	100	102	103a	106b
	対体重比	100	100	104	107	102	103	106b	112b
	腎臓 絶対重量	103	103	107	108	100	98	100	103
	対体重比	101	101	107a	109b	104	100	104	110b
	卵巢 絶対重量					97	94	93	91
	対体重比					100	94	96	96
OH-PT	最終体重(絶食後)	102	105	105	97	102	98	101	97
	脳 絶対重量	99	101	102	99	99	101	99	98
	対体重比	97	96	96	101	97	103	98	102
	肺 絶対重量	97	104	101	96	97	100	98	97
	対体重比	97	100	97	100	96	102	98	100
	肝臓 絶対重量	104	108	106	99	105a	101	101	101
	対体重比	102	104	101	101	103	103	100	104
トルフェンピラド	最終体重(絶食後)	-	100	99	90a	-	99	98	94b
	脳 絶対重量	-	100	100	99	-	99	100	98a
	対体重比	-	99	100	109a	-	100	102	105
	肺 絶対重量	-	100	97	95	-	97	100	93
	対体重比	-	100	97	105	-	98	102	100
	肝臓 絶対重量	-	102	106	100	-	100	104	110b
トリスルフェンピラド	最終体重(絶食後)	-	102	107b	111b	-	100	104	105a
	脳 絶対重量	-	99	105	99	-	99	102	101
	対体重比	-	99	105a	111b	-	101	105	109
	肺 絶対重量	-	100	97	95	-	90	96	87a
	対体重比	-	100	97	105	-	90	97	92

1) - : 投与群の設定なし、a: p<0.05, b: p<0.01 (多重比較検定)、表中の数値は、共通対照群値を 100 とした時の値。

被験物質による影響として、肝臓重量の高値が PT-CA の 30ppm 以上の群の雌、トルフェンピラドの 30ppm 以上の群の雌雄にみられた。また、腎臓重量の高値が PT-CA の 30ppm 以上の群の雄および 100ppm 群の雌、OH-PT の 100ppm 群の

雄にみられ、トルフェンピラドでは30ppm以上の群の雄でみられた。

その他、脳重量の変動がPT-CAの100ppm群の雌（相対重量の高値）、トルフェンピラドの100ppm群の雄（相対重量の高値）および100ppm群の雌（絶対重量の低値）でみられたが、剖検時体重の変動に起因する二次的変化と考えられた。また、トルフェンピラドの100ppm群でみられた卵巣絶対重量の低値についても、剖検時体重の変動に起因する二次的変化と考えられた。その他の変化は、投与量との関連性のない変化であった。

剖検：投与期間終了後、全動物を対象として剖検を行った。

種々の変化が観察されたが、いずれの変化も被験物質によるものとは考えられなかった。

病理組織学的検査：全動物を対象として、以下の全組織・器官を固定保存した。組織検査は共通対照群、PT-CA 100ppm 群、OH-PT 100ppm 群、トルフェンピラド 100ppm 群の全動物の全組織・器官について染色標本を作製し、鏡検した。さらに、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膀胱および前立腺については、PT-CA および OH-PT の 3、10、30ppm 群、トルフェンピラド 10、30ppm 群の全動物を同様に鏡検した。

脳、小脳、脊髄（頸部、胸部、腰部）、坐骨神経、眼球、視神経、ハーダー腺、外涙腺、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、副腎、胸腺、脾臓、リンパ節（下頸、腸間膜）、心臓、胸大動脈、気管、肺（気管支を含む）、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、唾液腺（頸下、舌下）、肝臓、脾臓、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、腟、乳腺、胸骨・大腿骨（骨髓を含む）、骨格筋（大腿部）、皮膚（鼠径部）、肉眼的異常部位

観察された変化の発生状況を表I（雄）およびII（雌）に示す。

各被験物質による変化として、び漫性肝細胞肥大がPT-CAの100ppm群の雌およびトルフェンピラドの100ppm群の雌でみられた。また、腎臓の尿細管上皮の硝子滴がトルフェンピラドの100ppm群の雄でみられ、脾臓の腺房細胞の肥大がトルフェンピラド同群の雌でみられた。脾臓の腺房細胞の肥大については、軽微な変化がPT-CA、OH-PT およびトルフェンピラド投与群の雌でみられたが、発現頻度と投与量との関連性はあきらかではなかった。しかし、より程度が明らかかな変化（軽度）がトルフェンピラド100ppm群の雌1例にみられ、被験物質による変化と考えられた。

その他、種々の変化が観察されたが、いずれの変化も共通対照群でも観察されるか、または、出現の程度と投与量との関連性に乏しく偶発性の変化と考えられた。

以上、各被験物質の影響と考えられる変化を次表にまとめて示す。

性別 投与量 (ppm)	雄				雌			
	3	10	30	100	3	10	30	100
PT-CA								体重増加抑制 肝重量の低値 肾重量の低値 肝重量の高値 肾重量の高値 肝細胞肥大
OH-PT								肾重量の高値
トルフェン ピラド				体重増加抑制 肝重量の低値 肾重量の低値 肝重量の高値 腎尿細管上皮の硝子漬				体重増加抑制 肝重量の低値 肝細胞肥大 肝・腎尿細管の肥大

■ : 被験物質による影響

本試験の結果から無毒性量について、PT-CA は雌雄とも 10ppm (雄: 0.8mg/kg/day、雌: 0.9mg/kg/day)、OH-PT は雄で 30ppm (2.5mg/kg/day)、雌で 100ppm (8.8mg/kg/day) であり、トルフェンピラドは雌雄とも 10ppm (雌雄: 0.9mg/kg/day) であった。結論として、PT-CA の反復経口投与毒性はトルフェンピラドとほぼ同程度であり、質的にも大差なかった。一方、OH-PT の毒性はトルフェンピラドに比べて弱かった。

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本農薬㈱にある。

表 1. 治療組織学的変化 <雄>

投与量 (ppm)	検査動物数	共通对照群			PT-CA			OH-PT			トルフルエンゼピラド			
		グレード	0	3	10	30	100	3	10	30	100	10	30	100
心臓	限局性線維化	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1	0	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肝臓	横隔膜結節	0	5	5	5	5	5	4	5	4	4	5	5	5
	P	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
	ケラバ-細胞の 赤血球食食	0	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5
腎臓	尿細管上皮 の精子滴	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
好塞性尿細管	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
前立腺	背側葉の細胞浸潤	0	4	5	3	3	3	5	4	5	4	3	5	2
	1	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	3
眼球	網膜の萎縮	0	5	-	-	-	5	-	-	4	-	-	-	5
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

グレード, 0 : 異常なし (所見なし), 1 : 軽微, 2 : 中程度, 3 : 有義差なし
(Mann-Whitney の U 検定で統計処理したが有意差なし)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本農薬㈱にある。

表 II. 病理組織学的変化 <雌>

投与量 (ppm)	検査動物数	共通对照群			PT-CA			OH-PT			ヒルフエンビラド		
		0	3	10	30	100	3	10	30	100	10	30	100
肝臓	機間膜結節	0	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	び漫性肝細胞肥大	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5
		1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0
脾臓	脾房細胞の肥大	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
胃	腺胃のびらん	0	5	4	4	2	3	5	4	4	4	2	0
		1	0	1	1	3	2	0	1	1	1	3	4
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
眼球	網膜の萎縮	0	4	-	-	5	-	-	5	-	-	5	0
		1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
前庭器(虹彩の角膜への着着)	0	5	-	-	5	-	-	4	-	-	-	4	0
		1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
視神経	萎縮	0	5	-	-	5	-	-	5	-	-	-	4
		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

グレード、0：異常なし(所見なし)、1：軽微、2：程度、3：中程度、P：所見あり、-：検査非実施

a: p<0.05, b: p<0.01 (Mann-Whitney の U 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日本農薬㈱にある。

④ PT-CA () の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料T-41)

試験機関 ボヅリサーセンター [GLP対応]

報告書作成年 1999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、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 μg/プレートの用量で抗菌性がみられた。したがって、本試験では5000 μg/プレートを最高用量とし、以下公比2で計8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)アクリアミド、アゾ化ナトリウム、2-メチル-6-クロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノヒドロキシ]アクリジン・2HCl、2-アミノントレンおよびベニゾン[a]ヒドリンでは、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、PT-CA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。

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。

表 I. 予備試験の結果

薬物	S9 mix の 有無	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}\text{-ト}$)	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	WP2uvuA ^r	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [−]	0	151	15	24	27	10
		0.305	146	17	25	23	12
		1.22	133	17	24	28	10
		4.88	141	15	19	23	10
		19.5	158	14	21	24	12
		78.1	150	14	24	24	10
		313	150	15	21	24	10
		1250	130	16	19	21	10
		5000	122*	9a*	12a*	7a*	3a*
対照(DMSO)	S9 mix [+]	0	137	16	27	39	11
		0.305	160	17	21	33	12
		1.22	146	16	27	42	11
		4.88	144	20	24	38	12
		19.5	158	20	27	44	13
		78.1	143	20	28	41	12
		313	140	18	24	35	13
		1250	131	16	24	35	12
		5000	148*	11*	14a*	9a*	2a*
陽性对照物質	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}\text{-ト}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/プレート	824	427	141	426	1967
	S9 mix を必要とするもの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}\text{-ト}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	892	229	471	225	89

表中の数値は、3プレートの平均値である。

表中の陽性对照物質の説明

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリル酸

NaN₃: 75% 化ナトリウム

ICR-191: 2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-エトキシエチル)-7-ミノ-7-ヒドロヘキサ]アクリジン・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラセン

BP: ベンゾ[a]ピレン

a: 抗菌性

*: 結晶の析出

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業株式会社にある。

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	
			TA100	TA1535	WP2 <i>nvrA</i> ⁺	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [−]	0	139	15	22	23	18
		39.1	152	15	25	25	16
		78.1	149	14	20	29	16
		156	149	12	31	26	17
		313	156	14	28	23	16
		625	142	14	23	25	17
		1250	127	19	23	28	14
		2500	103*	15*	21*	23*	10*
		5000	117*	6a*	17a*	9a*	8a*
被験物質	S9 mix [+]	0	148	15	28	43	18
		39.1	144	21	29	43	14
		78.1	148	19	24	52	17
		156	134	20	29	52	13
		313	127	16	26	57	17
		625	147	16	31	47	18
		1250	150	16	32	59	13
		2500	135*	8*	24*	39*	14*
		5000	120*	9*	16a*	10a*	12a*
陽性対照物質	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
陽性対照物質	S9 mix を必要とするもの	コロニー数/プレート	844	406	174	597	2269
		名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	976	224	438	233	92

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-ヒドロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN₃: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノ]ビペラジン・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラゼン

BP: ベンゾ[a]ヒレン

a: 抗菌性

*:結晶の析出

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。

⑤ PT-CA () の哺乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験
(資料T-42)

試験機関 ボゾリサーチセンター [GLP対応]
報告書作成年 2001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（CHL/IU 細胞）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。

(短時間処理法)：6時間処理 (S9mix 共存下) + 18時間回復
6時間処理 (S9mix 非共存下) + 18時間回復

(連続処理法)：24時間処理 (S9mix 非共存下)
48時間処理 (S9mix 非共存下)

予備試験として各被験物質処理条件における細胞増殖抑制試験を実施し、得られた50%細胞増殖抑制濃度を染色体検査のための最高用量とした。細胞増殖抑制試験の結果を表Iに示す。

[判定基準] 異常細胞の出現率(%)について以下の判定基準を設けた。

- ・5%未満 陰性 (-)
- ・5%以上 10%未満 疑陽性 (±)
- ・10%以上 陽性 (+)

試験結果：染色体検査の結果を表II-1~4に示す。

被験物質では短時間処理および連続処理のいずれの処理においても、染色体の数的異常細胞および構造異常細胞の出現頻度に増加はみられなかった。一方、陽性対照物質のシクロフォスファミドおよびマイトマイシンCでは、構造異常細胞の出現頻度にあきらかな増加がみられた。

以上の結果から、PT-CAは本試験条件下で染色体異常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業株式会社にある。

表 I. 細胞増殖抑制試験の結果表

処理法	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖 抑制率(%) ¹⁾	細胞状態 ²⁾	結晶析出 ³⁾
<短時間処理法> 6+18 時間 + S9mix	0 (無処理)	-	-	-
	0 (溶媒対照)	-	-	-
	39.1	12	-	-
	78.1	16	-	-
	156	16	-	-
	313	31	-	-
	625	39	-	-
	1250	73	+	+
	2500	47	+++	+
	5000	31	+++	+
50%細胞増殖抑制濃度 : 827 $\mu\text{g/mL}$				
<短時間処理法> 6+18 時間 - S9mix	0 (無処理)	-	-	-
	0 (溶媒対照)	-	-	-
	39.1	9	-	-
	78.1	9	-	-
	156	13	-	-
	313	17	-	-
	625	59	-	-
	1250	59	+	+
	2500	51	+++	+
	5000	34	+++	+
50%細胞増殖抑制濃度 : 558 $\mu\text{g/mL}$				
<連続処理法> 24 時間 - S9mix	0 (無処理)	-	-	-
	0 (溶媒対照)	-	-	-
	39.1	39	-	-
	78.1	54	-	-
	156	62	-	-
	313	70	+	-
	625	58	++	-
	1250	50	+++	+
	2500	70	+++	+
	5000	70	+++	+
50%細胞増殖抑制濃度 : 67.7 $\mu\text{g/mL}$				
<連続処理法> 48 時間 - S9mix	0 (無処理)	-	-	-
	0 (溶媒対照)	-	-	-
	39.1	40	-	-
	78.1	79	-	-
	156	79	-	-
	313	82	+	-
	625	74	++	-
	1250	64	+++	+
	2500	82	+++	+
	5000	87	+++	+
50%細胞増殖抑制濃度 : 49.1 $\mu\text{g/mL}$				

1) 抑制率(%) = $(1 - \frac{\text{被験物質の細胞数}}{\text{溶媒対照の細胞数}}) \times 100$

2) 細胞状態 - : 正常

+ : 少数の生存細胞で不連続性が観察される。

++ : 約半数の生存細胞で不連続性が観察される。

+++ : ほとんどの生存細胞で不連続性が観察される。

3) 結晶析出 - : なし、+ : あり

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. 染色体検査の結果表<短時間処理法、6時間 (+S9mix) +18時間>

	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞 数	数的異常		構造異常：異常細胞の出現率 (%)							
			倍数体の 出現率(%)	判定	g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	判定
無処置対照	0	200	0.0	/	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	/
溶媒対照	0	200	0.0	/	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	/
被験物質	78.1	200	0.0	陰性	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	156	200	0.0	陰性	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	陰性
	313	200	0.5	陰性	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	陰性
	625	200	0.0	陰性	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	1250	8	0.0	TOX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	TOX
陽性対照 CP	15	200	0.0	陰性	0.0	30.5	47.0	0.0	0.0	0.0	47.5	陽性

g: ギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換

other: 断片化など, TA: ギャップを含めない場合の総異常細胞出現率

TOX: 細胞毒性

CP: シクロフオスマニド

表Ⅱ-2. 染色体検査の結果表<短時間処理法、6時間 (-S9mix) +18時間>

	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞 数	数的異常		構造異常：異常細胞の出現率 (%)							
			倍数体の 出現率(%)	判定	g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	判定
無処置対照	0	200	0.0	/	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	/
溶媒対照	0	200	0.0	/	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	/
被験物質	78.1	200	0.5	陰性	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	156	200	0.0	陰性	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	313	200	0.0	陰性	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	625	192	0.5	TOX	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	TOX
	1250	24	0.0	TOX	0.0	33.3	25.0	0.0	0.0	0.0	37.5	TOX
陽性対照 MMC	0.05	200	0.0	陰性	0.0	19.5	33.5	0.0	0.0	0.0	36.5	陽性

g: ギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換

other: 断片化など, TA: ギャップを含めない場合の総異常細胞出現率

TOX: 細胞毒性

MMC: マイトマイシンC

備考: 1250 $\mu\text{g/mL}$ において、染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度に高値がみられた。しかし、この用量では細胞毒性が極めて強く観察されたこと、ならびに 625 $\mu\text{g/mL}$ においては同様の出現頻度の高値がみられなかったことから、1250 $\mu\text{g/mL}$ における染色体の構造異常の増加は被験物質の構造異常誘発性を示唆する変化とは考えられず、最終判定には含めなかった。

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本農薬㈱にある。

表 II-3. 染色体検査の結果表<連続処理法、24時間(-S9mix)>

	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞 数	数的異常		構造異常：異常細胞の出現率(%)							
			倍数体の 出現率(%)	判定	g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	判定
無処置対照	0	200	0.0		0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	
溶媒対照	0	200	0.0		0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	
被験物質	4.89	200	0.0	陰性	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	1.5	陰性
	9.78	200	0.0	陰性	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	19.6	200	0.0	陰性	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	39.1	200	0.0	陰性	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	陰性
	78.3	200	0.0	陰性	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	157	200	0.5	陰性	0.0	1.0	1.5	0.0	0.0	0.0	1.5	陰性
	313	200	0.0	陰性	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
陽性対照 MMC	0.05	200	0.0	陰性	0.0	27.0	44.0	0.0	0.0	0.0	45.0	陽性

g: ギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換

other: 断片化など, TA: ギャップを含めない場合の総異常細胞出現率

TOX: 細胞毒性

MMC: マイトマイシン C

表 II-4. 染色体検査の結果表<連続処理法、48時間(-S9mix)>

	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞 数	数的異常		構造異常：異常細胞の出現率(%)							
			倍数体の 出現率(%)	判定	g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	判定
無処置対照	0	200	0.0		0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	
溶媒対照	0	200	0.5		0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	
被験物質	4.89	200	0.0	陰性	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	9.78	200	0.0	陰性	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	19.6	200	0.0	陰性	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	39.1	200	0.5	陰性	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	陰性
	78.3	200	0.5	陰性	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	陰性
	157	200	0.5	陰性	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	313	57	0.0	TOX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	TOX
陽性対照 MMC	0.05	200	0.0	陰性	0.0	28.0	44.5	0.5	0.0	0.0	46.0	陽性

g: ギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換

other: 断片化など, TA: ギャップを含めない場合の総異常細胞出現率

TOX: 細胞毒性

MMC: マイトマイシン C

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。

⑥ PT-CA () のラットを用いた小核試験

(資料T-43)

試験機関 新日本科学 [GLP対応]

報告書作成年 2000年

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雄6匹(ただし、高用量群のみ10匹に投与)

投与開始時9週齢(体重 303~372g)

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、0(溶媒対照)、5、10、20mg/kgの用量で24時間間隔で2回強制経口投与した。

用量設定試験(2.5、5、10、20mg/kgの計4用量、24時間間隔で2回強制経口投与)の結果、10mg/kg以下の群では死亡が観察されなかった(0/3)。しかし、20mg/kg群では1回目投与後に3例中1例に死亡がみられた。したがって、小核試験の最高用量を20mg/kgとしたが、この用量では死亡が予測されたため、投与動物数を高用量群のみ10匹とした。

2回目の投与後24時間に動物を屠殺し、アクリジンオレンジ染色による骨髄塗抹標本を作製した。各動物2000個の幼若赤血球を観察し、被験物質投与群で小核を有する幼若赤血球の出現頻度が、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。

PT-CAの高用量群20mg/kgで10例中4例の死亡がみられた。それ以外に死亡例は観察されなかった。骨髄塗抹標本を観察した結果、PT-CAでは低用量の5mg/kg以上の投与群で対照群にくらべて幼若赤血球の出現頻度の低下(骨髄細胞の増殖抑制)がみられた。小核を有する幼若赤血球(MNIE)の出現頻度は、いずれのPT-CA投与群においても増加しなかった。一方、陽性対照物質のシクロフォスファミド投与群では有意なMNIEの出現頻度の増加がみられた。

以上の結果から、PT-CAはラット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と判断された。

結果表：

試験物質	投与量 × 投与回数	標本製 作時期	検査 動物 数	IE ¹⁾ 全赤血球数	IE (%) (平均±SD)	MNIE ²⁾ IE 数	MNIE (%) (平均±SD)	判定
溶媒対照 (0.5%CMC-Na)	0 mg/kg×2		6	1525 / 3000	50.83±3.24	11 / 12000	0.09±0.04	
被験物質 (PT-CA)	5 mg/kg×2	最終 投与 後24 時間	6	1353 / 3000	45.10±1.84*	13 / 12000	0.11±0.06	陰性
	10 mg/kg×2		6	1153 / 3000	38.43±2.41*	11 / 12000	0.09±0.04	陰性
	20 mg/kg×2		6	958 / 3000	31.93±3.23*	17 / 12000	0.14±0.07	陰性
	陽性対照 (シクロアスアミド)		6	1227 / 3000	40.90±2.41*	440 / 12000	3.67±0.30#	陽性

1) IE: 幼若赤血球

2) MNIE: 小核を有する幼若赤血球

*: p<0.05 (Student t 検定)

#: P<0.05 (Kastenbaum and Bowman の検定)

2) OH-PT の毒性

①OH-PT () のラットにおける急性経口毒性試験 (資料T-44)
試験機関 ボゾリサーチセンター [GLP対応]
報告書作成年 1999年

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時 7週齢 (体重 雄216~233g、雌143~165g)

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 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、投与前一晩
絶食させた動物に強制経口投与した。なお、対照群の動物には投与溶媒のみを同
様に投与した。

検査項目 : 中毒症状および生死を14日間観察した。死亡動物および観察終了時の全生存動
物について剖検を行った。また、体重を投与当日(1日)、投与後2、3、4、
8、11および15日に測定した。

試験結果 :

	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 10, 30, 100, 300, 1000	
LD ₅₀ 値 95%信頼限界 (mg/kg)	70.8 34.7~144.5	35.5 17.4~72.4
死亡開始時間 死亡終了時間	投与後15分 投与後6時間 ¹⁾	投与後5分以内 投与後6日 ¹⁾
症状発現時間 症状消失時間		投与後5分以内 投与後2日
徵候のみられない 最高投与量 (mg/kg)		10

1) 最終の死亡個体を発見した時間または日。

症状として、雌雄とも自発運動の低下、腹臥、呼吸数の減少、呼吸深大、呼吸困
難、下痢がみられた。また、強直性痙攣が1000 mg/kg群の雌の死亡例の一部で
みられた。

体重の増加抑制が300 mg/kg群の雌雄で投与後4日までみられたが、その後は順
調な増加がみられた。その他の投与群では、体重に影響はみられなかった。

剖検では、死亡例および生存例とも主要な組織器官に特記すべき変化はみられな
かった。

②OH-PT () のラットにおける急性経口毒性試験 (資料T-45)

試験機関 大塚化学

報告書作成年 2000年

試験目的 :

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時 7週齢 (体重 雄 180.3~208.7g、雌 133.0~158.0g)

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 被験物質をオリーブ油に懸濁し、投与前一晩絶食させた動物に強制経口投与した。
なお、対照群の動物にはオリーブ油のみを同様に投与した。

検査項目 : 中毒症状および生死を14日間観察した。死亡動物および観察終了時の全生存動物について剖検を行った。また、体重を投与当日 (1日)、投与後2、3、4、6、8、11および15日に測定した。

試験結果 :

	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 10, 30, 60, 100, 200	
LD ₅₀ 値 95%信頼限界 (mg/kg)	30~60 (算出不能)	
死亡開始時間 死亡終了時間	投与後 15分 投与後 2日 ¹⁾	投与後 30分 投与後 2日 ¹⁾
症状発現時間 症状消失時間	投与後 5分 投与後 3日	投与後 5分 投与後 2日
死亡例のみられなかった 最高投与量 (mg/kg)		30

1) 最終の死亡個体を発見した日。

症状として、雌雄とも自発運動の低下、腹臥、不整呼吸、眼瞼下垂および肛門周囲の汚れがみられた。また、少数例で横臥および歩行異常がみられた。

体重の増加抑制が雄の100mg/kg群では投与後2日、200mg/kg群では投与後3日までみられたが、その後は順調な増加がみられた。また、雌の60mg/kg群で投与後2日に増加抑制がみられたが、その後は順調な増加がみられた。その他の投与群では、体重に影響はみられなかった。

剖検では、死亡例および生存例とも主要な組織器官に特記すべき変化はみられなかった。

③OH-PT () の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料T-46)
試験機関 ボゾリサーチセンター [G L P 対応]
報告書作成年 1999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、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、菌株およびS9 mixの有無により異なった用量において抗菌性と結晶の析出がみられた。したがって、各菌株ごと予備試験で抗菌性がみられた最低濃度を本試験の最高用量として設定し、以下公比2で計8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、ジ化ナトリウム、2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロロチル)-アミノブロピルアミノ]アクリゾン・2HCl、2-アミノアントラセンおよびヘソツ [a]レジでは、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、OH-PT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 ($\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{L}\right)$	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> ⁻	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [−]	0	183	16	23	23	12
		0.305	197	11	21	31	8
		1.22	222	17	25	33	12
		4.88	221	14	23	34	16
		19.5	211	29	26	33	20
		78.1	216	14	26	28	16
		313	157a	11a*	26	27	2a*
		1250	152a*	8a*	14a*	17a*	1a*
		5000	150a*	7a*	16a*	17a*	1a*
対照(DMSO)	S9 mix [+]	0	193	17	22	40	13
		0.305	211	14	31	58	10
		1.22	208	21	29	61	14
		4.88	198	23	35	77	14
		19.5	191	24	28	64	14
		78.1	240	14	39	66	9
		313	255	19	35	61	5a*
		1250	202a*	11a*	22a*	56a*	5a*
		5000	170a*	7a*	20a*	39a*	0a*
陽性 対照 物質	S9 mix を 必要とし ないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{L}\right)$	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/プレート	818	396	152	414	2113
	S9 mix を 必要とする もの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{L}\right)$	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	908	225	502	215	89

表中の数値は、3 $\text{L}\cdot\text{L}$ の平均値である。

表中の陽性対照物質の説明

AF-2: 2-(2-ブリル)-3-(5-ニトロ-2-ブリル)アクリラミド

NaN₃: ナトリウム

ICR-191: 2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロロチル)-アミノブロビノラバノ]アクリシン・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラセン

BP: ベンゾ[a]ピレン

a: 抗菌性

*:結晶の析出

表II. 本試験の結果

葉物	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>	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [−]	0	144	11	25	23	11
		2.44	152	14	-	-	14
		4.88	153	14	-	-	12
		9.77	169	12	24	20	15
		19.5	167	11	22	25	18
		39.1	166	16	25	24	18
		78.1	162	15	24	22	16
		156	123a	9a	20	22	12a
		313	116a	9a*	20	26	6a*
		625	-	-	19a	15*	-
		1250	-	-	14a*	13*	-
		0	142	12	28	46	17
被験物質	S9 mix [+]	2.44	-	-	-	-	14
		4.88	-	-	-	-	16
		9.77	176	-	27	54	14
		19.5	178	-	25	53	16
		39.1	176	16	25	52	18
		78.1	188	17	29	58	11
		156	170	15	27	65	8a
		313	172	13	30	52	6a*
		625	120a	13	21a*	47*	-
		1250	114a*	18	23a*	50*	-
		2500	-	9a*	-	-	-
		5000	-	5a*	-	-	-
陽性 対照 物質	S9 mix を 必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/プレート	907	401	169	481	2133
	S9 mix を 必要とするもの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	816	222	475	227	80

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

NaN₃: ナトリウム化ナトリウム

ICR-191: 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノヒドロキシメチル]アクリル酸・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラゼン

BP: ベンゾン [a]ヒレン

a: 抗菌性

*: 結晶の析出

-: 非実施

④ OH-PT () の哺乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験

(資料T-47)

試験機関 ポゾリサーチセンター [GLP対応]

報告書作成年 2001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 (CHL/IU 細胞) 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。

(短時間処理法) : 6 時間処理 (S9mix 共存下) + 18 時間回復

6 時間処理 (S9mix 非共存下) + 18 時間回復

(連続処理法) : 24 時間処理 (S9mix 非共存下)

48 時間処理 (S9mix 非共存下)

予備試験として各被験物質処理条件における細胞増殖抑制試験を実施し、得られた 50% 細胞増殖抑制濃度を染色体検査のための最高用量とした。細胞増殖抑制試験の結果を表 I に示す。

[判定基準] 異常細胞の出現率 (%) について以下の判定基準を設けた。

- ・ 5%未満 陰性 (-)
- ・ 5%以上: 10%未満 疑陽性 (±)
- ・ 10%以上 陽性 (+)

試験結果 : 染色体検査の結果を表 II-1~4 に示す。

被験物質では短時間処理および連続処理のいずれの処理においても、染色体の数的異常細胞および構造異常細胞の出現頻度に増加はみられなかった。一方、陽性対照物質のシクロフオスマミドおよびマイトマイシン C では、構造異常細胞の出現頻度にあきらかな増加がみられた。

以上の結果から、OH-PT は本試験条件下で染色体異常を誘発しないと判断された。

表 I. 細胞増殖抑制試験の結果表

処理法	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖抑制率(%) ¹⁾	細胞状態 ²⁾	結晶析出 ³⁾
<短時間処理法> 6+18 時間 + S9mix	0 (無処理)	-	-	-
	0 (溶媒対照)	-	-	-
	39.1	4	-	-
	78.1	11	-	-
	156	54	+	-
	313	93	TOX	-
	625	93	TOX	-
	1250	93	TOX	+
	2500	93	TOX	+
	5000	82	TOX	+
50%細胞増殖抑制濃度 : 149 $\mu\text{g/mL}$				
<短時間処理法> 6+18 時間 - S9mix	0 (無処理)	-	-	-
	0 (溶媒対照)	-	-	-
	39.1	12	-	-
	78.1	16	-	-
	156	89	+	-
	313	93	TOX	-
	625	93	TOX	-
	1250	93	TOX	+
	2500	93	TOX	+
	5000	85	TOX	+
50%細胞増殖抑制濃度 : 114 $\mu\text{g/mL}$				
<連続処理法> 24 時間 - S9mix	0 (無処理)	-	-	-
	0 (溶媒対照)	-	-	-
	39.1	29	-	-
	78.1	54	+	-
	156	93	TOX	-
	313	93	TOX	-
	625	93	TOX	-
	1250	93	TOX	+
	2500	93	TOX	+
	5000	93	TOX	+
50%細胞増殖抑制濃度 : 71.9 $\mu\text{g/mL}$				
<連続処理法> 48 時間 - S9mix	0 (無処理)	-	-	-
	0 (溶媒対照)	-	-	-
	39.1	38	-	-
	78.1	67	+	-
	156	96	TOX	-
	313	96	TOX	-
	625	98	TOX	-
	1250	96	TOX	+
	2500	96	TOX	+
	5000	96	TOX	+
50%細胞増殖抑制濃度 : 55.2 $\mu\text{g/mL}$				

1) 抑制率(%) = (1 - 被験物質の細胞数 ÷ 溶媒対照の細胞数) × 100

2) 細胞状態 - : 正常

+ : 少数の生存細胞で不連続性が観察される。

TOX : ほとんどの細胞がプレート表面から剥離するか、死滅している。生存細胞はほとんど観察されない。

3) 結晶析出 - : なし、+ : あり

表II-1. 染色体検査の結果表<短時間処理法、6時間(+S9mix)+18時間>

	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞 数	数的異常		構造異常：異常細胞の出現率(%)							
			倍数体の 出現率(%)	判定	g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	判定
無処置対照	0	200	0.5	/	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	/
溶媒対照	0	200	0.5	/	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.5	/
被験物質	40.0	200	0.0	陰性	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	80.0	200	0.0	陰性	0.0	1.0	1.5	0.0	0.0	0.0	1.5	陰性
	120	200	0.0	陰性	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	160	200	0.5	陰性	0.0	1.0	1.5	0.0	0.0	0.0	1.5	陰性
	200	0	0.0	TOX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	TOX
陽性対照 CP	15	200	0.0	陰性	0.0	22.0	46.5	0.5	0.0	0.0	49.0	陽性

g: ギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換

other: 断片化など, TA: ギャップを含めない場合の総異常細胞出現率

TOX: 細胞毒性

CP: シクロフォスファミド

表II-2. 染色体検査の結果表<短時間処理法、6時間(-S9mix)+18時間>

	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞 数	数的異常		構造異常：異常細胞の出現率(%)							
			倍数体の 出現率(%)	判定	g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	判定
無処置対照	0	200	0.0	/	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	/
溶媒対照	0	200	0.0	/	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	/
被験物質	40.0	200	0.5	陰性	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	80.0	200	0.0	陰性	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	120	200	0.0	陰性	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	160	0	0.0	TOX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	TOX
	200	0	0.0	TOX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	TOX
陽性対照 MMC	0.05	200	0.0	陰性	0.0	16.5	32.0	0.0	0.0	0.0	33.5	陽性

g: ギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換

other: 断片化など, TA: ギャップを含めない場合の総異常細胞出現率

TOX: 細胞毒性

MMC: マイトマイシン C

表 II-3. 染色体検査の結果表<連続処理法、24時間(=S9mix)>

	用量 (μg/mL)	観察 細胞 数	数的異常		構造異常：異常細胞の出現率(%)							
			倍数体の 出現率(%)	判定	g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	判定
無処置対照	0	200	0.0		0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	
溶媒対照	0	200	0.0		0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	
被験物質	10.0	200	0.0	陰性	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	30.0	200	0.0	陰性	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	50.0	200	0.0	陰性	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	70.0	200	0.0	陰性	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	90.0	200	0.0	陰性	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	陰性
	110	0	0.0	TOX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	TOX
	130	0	0.0	TOX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	TOX
陽性対照 MMC	0.05	200	0.0	陰性	0.0	22.0	38.5	0.0	0.0	0.0	39.5	陽性

g: ギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換

other: 断片化など, TA: ギャップを含めない場合の総異常細胞出現率

TOX: 細胞毒性

MMC: マイトマイシンC

表 II-4. 染色体検査の結果表<連続処理法、48時間(=S9mix)>

	用量 (μg/mL)	観察 細胞 数	数的異常		構造異常：異常細胞の出現率(%)							
			倍数体の 出現率(%)	判定	g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	判定
無処置対照	0	200	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
溶媒対照	0	200	0.0		0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	
被験物質	10.0	200	0.0	陰性	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	陰性
	30.0	200	0.0	陰性	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	50.0	200	0.0	陰性	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	陰性
	70.0	200	0.0	陰性	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	陰性
	90.0	79	0.0	TOX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	TOX
	110	0	0.0	TOX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	TOX
	130	0	0.0	TOX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	TOX
陽性対照 MMC	0.05	200	0.0	陰性	0.0	29.0	46.5	0.0	0.0	0.0	47.0	陽性

g: ギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換

other: 断片化など, TA: ギャップを含めない場合の総異常細胞出現率

TOX: 細胞毒性

MMC: マイトマイシンC

⑤ OH-PT () のラットを用いた小核試験

(資料T-48)

試験機関 新日本科学 [GLP対応]

報告書作成年 2000年

被験物質：

試験動物：SD系ラット、1群雄6匹（ただし、高用量群のみ10匹に投与）

投与開始時9週齢（体重307～349g）

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、0(溶媒対照)、5、10、20mg/kgの用量で24時間間隔で2回強制経口投与した。

用量設定試験(7.5、15、30、60mg/kgの計4用量、24時間間隔で2回強制経口投与)の結果、15mg/kg以下の群では死亡が観察されなかった(0/3)。しかし、30mg/kg群では2回目投与後に3例中2例が、60mg/kg群では全例が死亡した(3/3)。したがって、小核試験の最高用量を20mg/kgとしたが、この用量では死亡が予測されたため、投与動物数を高用量群のみ10匹とした。

2回目の投与後24時間に動物を屠殺し、アクリジンオレンジ染色による骨髄塗抹標本を作製した。各動物2000個の幼若赤血球を観察し、被験物質投与群で小核を有する幼若赤血球の出現頻度が、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。

OH-PTの高用量群20mg/kgで10例中1例の死亡がみられた。それ以外に死亡例は観察されなかった。骨髄塗抹標本を観察した結果、OH-PTでは低用量の5mg/kg以上の投与群で対照群にくらべて幼若赤血球の出現頻度の低下(骨髄細胞の増殖抑制)がみられた。小核を有する幼若赤血球(MNIE)の出現頻度は、いずれのOH-PT投与群においても増加しなかった。一方、陽性対照物質のシクロフォスファミド投与群では有意なMNIEの出現頻度の増加がみられた。

以上の結果から、OH-PTはラット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：

試験物質	投与量 × 投与回数	標本製作時期	検査動物数	IE ¹⁾ 数 ／ 全赤血球数	IE (%) (平均±SD)	MNIE ²⁾ 数 ／ IE 数	MNIE (%) (平均±SD)	判定
溶媒対照 (0.5%CMC-Na)	0 mg/kg×2		6	1544 / 3000	51.47±3.22	12 / 12000	0.10±0.05	
被験物質 (OH-PT)	5 mg/kg×2	最終投与後24時間	6	1395 / 3000	46.50±2.62*	13 / 12000	0.11±0.05	
	10 mg/kg×2		6	1283 / 3000	42.77±3.34*	15 / 12000	0.13±0.05	陰性
	20 mg/kg×2		6	1204 / 3000	40.13±2.04*	19 / 12000	0.16±0.08	陰性
	陽性対照 (シクロヘキサン)		6	1185 / 3000	39.50±2.51*	447 / 12000	3.73±0.82#	陽性

1) IE: 幼若赤血球

2) MNIE: 小核を有する幼若赤血球

*: p<0.05 (Student t 検定)

#: p<0.05 (Kastenbaum and Bowman の検定)

3) T-CA の毒性

① T-CA () のラットにおける急性経口毒性試験 (資料T-49)

試験機関 ボゾリサーチセンター [GLP対応]

報告書作成年 1999年

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時 7週齢 (体重 雄199~217g、雌154~177g)

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 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、投与前一晩絶食させた動物に強制経口投与した。なお、対照群の動物には投与溶媒のみを同様に投与した。

検査項目 : 中毒症状および生死を14日間観察した。死亡動物および観察終了時の全生存動物について剖検を行った。また、体重を投与当日(1日)、投与後2、3、4、8、11および15日に測定した。

試験結果 :

	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 60, 200, 600, 2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	600~2000	>2000
死亡開始時間 死亡終了時間	投与後6時間 投与後5日 ¹⁾	(死亡なし)
症状発現時間 症状消失時間	投与後15分 投与後5日	投与後15分 投与後2日
徵候のみられない 最高投与量 (mg/kg)		200

1) 最終の死亡個体を発見した日。

症状として、雌雄とも自発運動の低下および呼吸数の減少がみられ、雄ではさらに振戦、腹臥、呼吸深大および粗毛がみられた。

体重の増加抑制または減少が2000 mg/kg群の雄で投与後4日までみられた。その他の雄の投与群および雌の全投与群には体重に関して影響はみられなかった。

剖検では、2000 mg/kg群の雄の死亡例において腺胃の暗赤色点および脾臓の小型化がみられた。また、生存例では2000 mg/kg群の雄1例に腎臓の腫大がみられた。

② T-CA () の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料T-50)
試験機関 ボゾリサーチセンター[G.L.P対応]
報告書作成年 1999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、TA1535、TA1537株)およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *invA+*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サルモネラ菌株では $1250\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、大腸菌株では $5000\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性がみられた。したがって、本試験ではサルモネラ菌株では $1250\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、大腸菌株では $5000\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量とし、以下公倍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、ジ化ナトリウム、2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロロチル)-アミノ]ビニルアミノ]アクリジン・2HCl、2-アミノアントラセンおよびビンゴ[a]ビレンでは、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、T-CA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 ($\mu\text{g}/\text{v}-\text{t}$)	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>uvor</i>	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [−]	0	133	14	28	24	12
		0.305	151	15	23	23	10
		1.22	145	13	26	25	15
		4.88	144	13	28	26	12
		19.5	136	13	24	22	14
		78.1	132	12	28	22	14
		313	127	13	28	21	11
		1250	13*	1*	24	5*	3*
		5000	0*	0*	18*	0*	0*
対照(DMSO)	S9 mix [+]	0	164	14	24	43	12
		0.305	147	12	28	43	13
		1.22	144	11	25	46	14
		4.88	150	16	29	41	13
		19.5	148	14	26	50	15
		78.1	150	13	28	44	15
		313	137	15	22	41	12
		1250	10*	0*	26	4*	2*
		5000	0*	0*	24*	0*	0*
陽性 対照 物質	S9 mix を 必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{v}-\text{t}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/ $\text{v}-\text{t}$	855	416	142	434	2346
	S9 mix を 必要とする もの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{v}-\text{t}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/ $\text{v}-\text{t}$	874	221	522	211	78

表中の数値は、3ア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-ヒドロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN₃: 75% 化ナトリウム

ICR-191: 2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノ-2-ヒドロエチルアミノ]アクリジン・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラセン

BP: ベンゾ' [a]ピレン

*:抗菌性

表II. 本試験の結果

農物	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 novA	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [-]	0	133	12	24	26	11
		39.1	139	11	-	25	11
		78.1	131	13	-	22	11
		156	135	12	25	20	10
		313	121	11	25	22	11
		625	80*	2*	24	11*	5*
		1250	0*	0*	25	0*	0*
		2500	-	-	20*	-	-
		5000	-	-	17*	-	-
被験物質	S9 mix [+]	0	163	13	30	39	12
		39.1	144	11	-	41	16
		78.1	151	12	-	51	15
		156	134	11	33	33	11
		313	133	10	32	33	12
		625	88*	4*	32	25	5*
		1250	0*	0*	30	0*	0*
		2500	-	-	25*	-	-
		5000	-	-	20*	-	-
陽性 対照 物質	S9 mix を 必要としな いもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/プレート	839	371	139	488	2094
	S9 mix を 必要とする もの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	852	210	487	199	79

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-ブリル)-3-(5-ニトロ-2-ブリル)アクリルアミド

NaN₃: 75% 化ナトリウム

ICR-191: 2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロロエチル)-7-メチルヒドロアミノ]アクリル酸 + 2HCl

2-AA: 2-アミノアンモニウム

BP: ベンゼン[a]フラン

*: 抗菌性。

-: 非実施。

4) T-AM の毒性

①T-AM () のラットにおける急性経口毒性試験

(資料T-51)

試験機関 ボヅリサー・チセンター [G L P対応]

報告書作成年 1999年

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時 7週齢 (体重 雄195~202g、雌157~174g)

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 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、投与前一晩
絶食させた動物に強制経口投与した。なお、対照群の動物には投与溶媒のみを同
様に投与した。

検査項目 : 中毒症状および生死を14日間観察した。観察終了時の全生存動物について剖検
を行った。また、体重を投与当日(1日)、投与後2、3、4、8、11および15
日に測定した。

試験結果 :

	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 2000	
L.D ₅₀ 値 (mg/kg)	>2000	
死亡開始時間 死亡終了時間		(死亡例なし)
症状発現時間 症状消失時間		(症状発現なし)
徵候のみられない 最高投与量 (mg/kg)	2000	

いずれの動物にも、被験物質の投与による症状の発現、体重への影響はみられなかつた。また、主要な組織器官に特記すべき変化はみられなかつた。

②T-AM () の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料T-5-2)
試験機関 ポゾリサーチセンター[G L P対応]
報告書作成年 1999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、TA1535、TA1537株)およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *rrnA*⁻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 μg/プレートの用量で抗歯性がみられた。したがって、本試験では5000 μg/プレートを最高用量とし、以下公比2で計8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と表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)アクリアミド、アゾ化ナトリウム、2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロエチル)-アミノブロモメチル]アクリジン・2HCl、2-アミノアントラセンおよびペソツ[a]ヒレンでは、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、T-AM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				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
対照(DMSO)	被験物質 [−]	0	148	12	23	24	10
		0.305	132	12	24	20	12
		1.22	137	12	24	23	10
		4.88	145	11	21	21	13
		19.5	157	11	20	24	11
		78.1	136	12	20	27	9
		313	142	10	17	24	9
		1250	118*	8*	15*	24*	8*
		5000	130*	11*	10a*	17a*	1a*
対照(DMSO)	被験物質 [+]	0	158	13	24	37	13
		0.305	174	19	23	50	11
		1.22	164	13	24	37	13
		4.88	152	15	22	45	14
		19.5	146	19	23	41	10
		78.1	149	16	25	42	12
		313	118	13	20	40	10
		1250	94*	12*	19*	33*	7*
		5000	90a*	10*	10a*	32a*	2a*
陽性対照物質	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/プレート	825	364	142	452	2082
陽性対照物質	S9 mix を必要とするもの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	978	221	478	202	80

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

NaN₃: 7ジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-7-(2-ヒドロキシエチル)]ジソ・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラゼン

BP: ベンゾ[a]ピレン

a: 抗菌性

*: 結晶の析出

表II. 本試験の結果

柴物	S9 mix の 有無	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	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>	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [−]	0	153	16	22	25	11
		39.1	171	14	26	29	14
		78.1	167	19	20	29	15
		156	166	13	20	28	14
		313	171	19	21	30	12
		625	155	14	11	30	12
		1250	148	15	13	27	9
		2500	129*	18*	12a*	24*	6a*
		5000	122*	18*	10a*	17a*	2a*
被験物質	S9 mix [+]	0	168	13	26	44	13
		39.1	150	16	25	51	16
		78.1	146	15	23	45	14
		156	150	16	27	48	16
		313	151	12	26	51	14
		625	112	13	19	47	10
		1250	106	14	22	38	9
		2500	96a*	16*	15*	34*	2a*
		5000	87a*	11*	13a*	31a*	2a*
陽性 対照 物質	S9 mix を 必要とし ないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/プレート	816	369	171	485	1899
	S9 mix を 必要とする もの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	897	189	523	211	77

表中の数値は、37°Cの平均値である。

表中の陽性対照物質の説明

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

NaN₃: 75% 化ナトリウム

ICR-191: 2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロエチル)-アミノ-4-ヒドロ]ブリゾン・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラゼン

BP: ベンゾ[a]ヒレン

a: 抗菌性

*:結晶の析出

5) CA-T-CA の毒性

① CA-T-CA () のラットにおける急性経口毒性試験 (資料 T-53)

試験機関 ボゾリサー・チセントー [G L P対応]

報告書作成年 1999年

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時 7週齢 (体重 雄 202~215 g、雌 150~162 g)

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 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、投与前一晩
絶食させた動物に強制経口投与した。なお、対照群の動物には投与溶媒のみを同
様に投与した。

検査項目 : 中毒症状および生死を 14日間観察した。観察終了時の全生存動物について剖検
を行った。また、体重を投与当日 (1日)、投与後 2、3、4、8、11 および 15
日に測定した。

試験結果 :

	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	>2000	
死亡開始時間 死亡終了時間		(死亡例なし)
症状発現時間 症状消失時間	投与後 2 時間 投与後 4 時間	投与後 4 時間 投与後 6 時間
死亡例のみられなかった 最高投与量 (mg/kg)		2000

症状として、雌雄とも下痢がみられた。

体重について被験物質の投与による影響はみられず、また、剖検の結果、主要な
組織器官に特記すべき変化もみられなかった。

② CA-T-CA () の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料T-54)
試験機関 ポゾリサー・センター [GLP対応]
報告書作成年 1999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、TA1535、TA1537株)およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *rrnA*⁻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とともにいずれの用量においても抗菌性および結晶の析出がみられなかった。したがって、本試験では5000 μg/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、ジ化ナトリウム、2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロエチル)-アミノブロビルアミノ]アクリジン・2HCl、2-アミノアントラセンおよびペソツ[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、CA-T-CA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				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA ^a	TA98	TA1537
被験物質 [−]	S9 mix [−]	0	151	10	21	22	11
		0.305	150	8	19	24	9
		1.22	149	13	19	19	8
		4.88	155	12	18	18	10
		19.5	141	11	19	22	8
		78.1	153	11	17	22	9
		313	155	11	15	22	11
		1250	154	13	20	22	10
		5000	153	11	19	24	11
被験物質 [+]	S9 mix [+]	0	159	14	22	35	13
		0.305	160	13	22	39	13
		1.22	155	13	22	41	14
		4.88	171	11	20	46	12
		19.5	154	12	22	43	14
		78.1	185	14	20	44	15
		313	197	14	20	38	13
		1250	183	15	21	41	14
		5000	184	12	20	45	13
陽性対照物質	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/プレート	856	360	154	456	1860
	S9 mix を必要とするもの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	965	205	497	214	81

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)アクリル酸

NaN₃: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メチキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノ]ロビンアミドアクリル酸・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラゼン

BP: ベンゾ[a]フルベン

表II. 本試験の結果

薬物	S9 mix の 有無	濃度 ($\mu\text{g}/\text{v}\cdot\text{l}\cdot\text{ト}$)	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>nvrA</i>	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [−]	0	167	12	23	22	11
		156	173	15	21	21	14
		313	185	13	20	21	13
		625	178	16	20	21	13
		1250	179	14	19	18	12
		2500	174	14	20	20	13
		5000	180	13	22	22	13
対照(DMSO)	S9 mix [+]	0	175	17	23	42	12
		156	186	16	19	43	14
		313	180	16	19	36	14
		625	199	18	21	37	11
		1250	178	14	23	46	15
		2500	174	20	21	38	15
		5000	176	18	20	48	12
陽性対照物質	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{v}\cdot\text{l}\cdot\text{ト}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/ $\text{v}\cdot\text{l}\cdot\text{ト}$	861	408	136	405	1996
陽性対照物質	S9 mix を必要とするもの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{v}\cdot\text{l}\cdot\text{ト}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/ $\text{v}\cdot\text{l}\cdot\text{ト}$	825	214	497	210	79

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*

NaN₃: 75% 化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロム-9-[3-(2-クロエチル)-7-(1'，2'，6'，7'，8'，9'-ヘキサメチル)アクリゲン]，2HCl

2-AA: 2-アミノアントラセン

BP: ヘンプ [a]ルーヴ

6) OH-T-CA の毒性

① OH-T-CA () のラットにおける急性経口毒性試験 (資料T-55)

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 1999年

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時 7週齢 (体重 雄182~236g、雌148~165g)

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 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、投与前一晩絶食させた動物に強制経口投与した。なお、対照群の動物には投与溶媒のみを同様に投与した。

検査項目 : 中毒症状および生死を14日間観察した。死亡動物および観察終了時の全生存動物について剖検を行った。また、体重を投与当日(1日)、投与後2、3、4、8、11および15日に測定した。

試験結果 :

	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0,1000,2000,3000,4000	0,1000,2000
LD ₅₀ 値	2024	>2000
95%信頼限界 (mg/kg)	1726~2373	
死亡開始時間	投与後6時間	(死亡例なし)
死亡終了時間	投与後7日 ¹⁾	
症状発現時間	投与後1時間	投与後2時間
症状消失時間	投与後8日	投与後2日
	死亡例のみられなかった 最高投与量 : 1000 mg/kg	微候のみられない 最高投与量 : 1000 mg/kg

1) 最終の死亡個体を発見した日。

症状として、雌雄とも自発運動の低下がみられた。その他、雄で呼吸数の減少、下痢および粗毛がみられた。

体重の減少または増加抑制が 1000 mg/kg 群の雄および 2000 mg/kg 群の雌雄では投与後2日、3000 mg/kg 群の雄では投与後4日までみられた。しかし、その後は順調な体重増加がみられた。4000 mg/kg 群の雄の体重は、全例死亡まで減少した。

剖検の結果、投与当日の死亡例では、腺胃の一部暗赤色化および小腸の暗赤色液貯留がみられた。投与後4日以降の死亡例では胸腺の暗赤色化および萎縮、脾臓の萎縮、副腎の腫大、腺胃の暗赤色点がみられた。生存例では、主要な組織器官に特記すべき変化はみられなかった。

② OH-T-CA () の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料T-56)
試験機関 ポゾリサーチセンター [G L P 対応]
報告書作成年 1999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、TA1535、TA1537株)およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *invA+*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 μg / プレートでサルモネラ菌株に抗菌性がみられた。したがって、本試験では 5000 μg / プレートを最高用量とし、以下公比2で計8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、ジ化ナトリウム、2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノ]ピロリジニアミドアクリジン・2HCl、2-アミノアントラセンおよびペソロ [a]ビレンでは、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、OH-T-CA 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				
			塩基対置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvura</i>	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [−]	0	141	12	25	24	10
		0.305	131	9	24	18	9
		1.22	144	7	27	15	8
		4.88	144	14	23	15	10
		19.5	138	9	21	15	7
		78.1	151	10	15	18	5
		313	139	9	17	17	9
		1250	127	9	17	16	8
		5000	12a*	1a*	16*	1a*	1a*
対照(DMSO)	S9 mix [+]	0	141	14	24	40	12
		0.305	161	10	21	38	13
		1.22	157	17	11	38	10
		4.88	160	12	14	32	9
		19.5	149	14	17	40	13
		78.1	162	9	16	41	8
		313	149	11	16	33	15
		1250	118	10	19	36	11
		5000	6a*	2a*	21*	9a*	1a*
陽性 対照 物質	S9 mix を 必要とし ないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/プレート	870	376	156	493	2024
	S9 mix を 必要とする もの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	822	208	473	219	79

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-ブリル)-3-(5-ニトロ-2-ブリル)アリルアミド

NaN₃: 7ジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノブロモメチル]フラン・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラセン

BP: ベンゾ[a]ピレン

a: 抗菌性

*:結晶の析出

表II. 本試験の結果

薬物	S9 mix の 有無	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{l}$)	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	WP2uvrA ⁻	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [−]	0	141	11	20	25	9
		39.1	157	12	22	24	11
		78.1	151	14	19	26	12
		156	171	14	19	26	9
		313	160	13	21	20	9
		625	149	12	21	18	9
		1250	157	13	24	19	8
		2500	132	6a	14	16	4
		5000	20a*	5a*	17*	5a*	0a*
		0	147	19	27	44	14
被験物質	S9 mix [+]	39.1	149	15	23	46	13
		78.1	151	18	22	42	13
		156	145	17	22	41	14
		313	145	16	23	41	15
		625	149	15	26	41	14
		1250	143	15	20	34	15
		2500	116	6a	21	37	9
		5000	11a*	4a*	19*	11a*	1a*
		0	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{l}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
陽性对照物質	S9 mix を 必要とする もの	コロニー数/プレート	879	370	149	408	2131
		名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{l}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	873	233	472	243	80

表中の値は、3プレートの平均値である。

表中の陽性对照物質の説明

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

NaN₃: 75% 化ナトリウム

ICR-191: 2-メキソ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノブロモメチル]フラン・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラゼン

BP: ベンゾ[a]ヒツジ

a: 抗菌性

*:結晶の析出

7) OH-PAM の毒性

① OH-PAM () のラットにおける急性経口毒性試験 (資料 T-57)

試験機関 ポゾリサーチセンター [GLP対応]

報告書作成年 1999年

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時 7週齢 (体重 雄188~209g、雌150~172g)

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 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、投与前一晩絶食させた動物に強制経口投与した。なお、対照群の動物には投与溶媒のみを同様に投与した。

検査項目 : 中毒症状および生死を14日間観察した。死亡動物および観察終了時の全生存動物について剖検を行った。また、体重を投与当日(1日)、投与後2、3、4、8、11および15日に測定した。

試験結果 :

	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 60, 200, 600, 2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg) 95%信頼限界	1095 (算定不能)	
死亡開始時間 死亡終了時間	投与後4時間 投与後2日 ¹⁾	
症状発現時間 症状消失時間	投与後15分 投与後2日	投与後1時間 投与後2日
微候のみられない 最高投与量 (mg/kg)	200	

1) 最終の死亡個体を発見した日。

症状として、雌雄とも自発運動の低下、呼吸数の減少、腹臥、呼吸深大、体温低下、流涙および流涎がみられ、雄では少数例で呼吸困難がみられた。

体重の増加抑制が、600 mg/kg 群の雄で投与後2日にみられた。その他の被験物質投与群では影響がみられなかった。

剖検では、2000 mg/kg 群の雄の死亡例で腺胃の暗赤色点がみられた。一方、生存例では主要な組織器官に特記すべき変化はみられなかった。

② OH-PAM () の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料T-58)
試験機関 ポゾリサーチセンター [G.L.P対応]
報告書作成年 1999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、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ブレインキュー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 の共存下および非共存下においていずれの用量においても抗菌性はみられなかった。したがって、本試験では 5000 μg/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、アシ化ナトリウム、2-メキシ-6-クロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl、2-アミノアントラセンおよびペソツ[a]ヒレンでは、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、OH-PAM 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 ($\mu\text{g}/\text{v}\cdot\text{l}$)	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	WP2uvra	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [−]	0	147	15	28	25	10
		0.305	155	17	27	27	11
		1.22	170	16	27	25	10
		4.88	167	15	28	28	10
		19.5	157	17	26	26	10
		78.1	191	18	25	27	10
		313	178	16	27	26	11
		1250	165	16	24	26	16
		5000	157	17	27	28	12
被験物質	S9 mix [+]	0	171	18	29	55	13
		0.305	191	20	30	51	16
		1.22	184	23	24	61	14
		4.88	183	18	30	52	13
		19.5	187	17	27	53	13
		78.1	179	18	29	50	13
		313	176	17	28	66	13
		1250	190	18	32	57	13
		5000	186	20	26	58	15
陽性対照物質	S9 mix を 必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{v}\cdot\text{l}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/プレート	879	404	145	443	2155
	S9 mix を 必要とする もの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{v}\cdot\text{l}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	821	203	492	228	82

表中の数値は、3ア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-ヒドロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN₃: ナトリウム

ICR-191: 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノ]ヒドロアミノ]アクリシン・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラセン

BP: ベンゾ[a]ヒレン

表Ⅱ. 本試験の結果

薬物	S9 mix の 有無	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	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 novA ⁻	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [-]	0	152	15	28	25	11
		156	155	15	29	28	10
		313	158	18	28	27	10
		625	166	17	23	28	9
		1250	159	19	27	27	9
		2500	169	18	26	26	9
		5000	164	17	26	27	11
対照(DMSO)	S9 mix [+]	0	186	19	32	47	16
		156	198	20	30	49	13
		313	180	18	30	56	13
		625	183	16	28	55	14
		1250	161	17	29	55	14
		2500	181	19	32	58	13
		5000	176	19	27	57	14
陽性対照物質	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
		コロニー数/プレート	878	405	141	468	2195
陽性対照物質	S9 mix を必要とするもの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
		コロニー数/プレート	804	189	460	242	77

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

NaN₃: 75% 化ナトリウム

ICR-191: 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-7-(2-ヒドロヒドロキシ)エチル]アクリゾン・2HCl

2-AA: 2-アミノアントラセン

BP: ベンゾ[a]アントラセン

8) PCA の毒性

① PCA () のラットにおける急性経口毒性試験 (資料T-59)

試験機関 ポゾリサーチセンター [GLP対応]

報告書作成年 1999年

被験物質 :

試験動物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹

投与時 7週齢 (体重 雄 202~216g、雌 155~172g)

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 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、投与前一晩絶食させた動物に強制経口投与した。なお、対照群の動物には投与溶媒のみを同様に投与した。

検査項目 : 中毒症状および生死を 14日間観察した。死亡動物および観察終了時の全生存動物について剖検を行った。また、体重を投与当日 (1日)、投与後 2、3、4、8、11 および 15 日に測定した。

試験結果 :

	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 1000, 2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)		>2000
死亡開始時間	投与後 6 時間 ¹⁾	
死亡終了時間		投与後 6 時間 ¹⁾
症状発現時間	投与後 2 時間	投与後 2 時間
症状消失時間	投与後 2 日	投与後 6 時間
徵候のみられない		
最高投与量 (mg/kg)		1000

1) 2000 mg/kg 群の雄 2 例および雌 1 例が投与後 6 時間に死亡。

症状として、雌雄とも自発運動の低下、呼吸数の減少および下痢がみられた。また、雌の死亡例の一部で腹臥がみられた。

体重の増加抑制が被験物質投与群で投与後 2 日にみられたが、その後は順調な増加がみられた。

死亡例および生存例とともに、主要な組織器官に特記すべき変化はみられなかった。

② PCA () の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料T-60)
試験機関 日本油料検定協会総合分析センター
報告書作成年 1988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、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。投与用量は、5000 μg/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、2プレート/用量とした。

試験結果 : 結果を次頁の表に示す。

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、アゾ化ナトリウム、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロゾアミノン、9-アミノアクリジン、2-アミノソトランおよびペソツ[a]ピレングでは、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、PCA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。

結果表：

薬物	S9 mix の有無	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	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	WP2uvrd	TA98	TA1537
対照(DMSO)	S9 mix [-]	0	166	27	20	30	6
		313	159	25	23	36	8
		625	138	25	18	39	8
		1250	153	23	18	25	5
		2500	137	19	20	31	11
		5000	138	21	18	30	9
対照(DMSO)	S9 mix [+]	0	147	25	26	61	12
		313	164	15	25	60	12
		625	163	21	23	57	14
		1250	149	17	21	66	17
		2500	139	19	23	61	14
		5000	139	16	26	52	13
陽性对照物質	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数/プレート	424	368	465	305	380
陽性对照物質	S9 mix を必要とするもの	名称	BP	2-AA	2-AA	BP	BP
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	5	2	20	5	5
		コロニー数/プレート	886	151	1313	582	249

表中の数値は、2プレートの平均値であり、原報に基き申請者が算出した。

表中の陽性对照物質の説明

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリル酸†

NaN₃: ナトリウム化ナトリウム

ENNG: N-(2-チル-N'-ニトロ-5-ニトロツキニジン

9-AA: 9-アミノアクリシン

2-AA: 2-アミノアントラセン

BP: ベンゾ[α]ヒドロ