

1 2. 繁殖毒性及び催奇形性

(1) 繁殖性に及ぼす影響

(資料 22)

ラットを用いた 2 世代繁殖毒性試験

試験機関 ㈱三菱化学安全科学研究所〔GLP 対応〕

報告書作成年 1999 年

検体の純度： %

試験動物 : SD 系ラット (Crj:CD(SD)IGS, SPF), 投与開始時 8 週齢

1 群雌雄各 30 匹 (F₀ 世代), 雌雄各 24 匹 (F₁ 世代)

投与期間 : P 世代; 投与開始から雄は交配前 14 週間及び剖検日までの計 17 週間, 雌は交配前 14 週間及び F₁ 動物の離乳までの計 21 週間.

F₁ 世代; 離乳時から雄は交配前 14 週間及び剖検日までの計 17 週間, 雌は交配前 14 週間及び F₂ 動物の離乳までの計 21 週間.

(1997 年 6 月 18 日~1998 年 4 月 13 日)

投与方法 : 検体を 400, 2000, 10000 ppm 含有した飼料を自由に摂食させた.

投与量設定根拠; 同研究所において F344/DuCrj ラットを用い, 0, 1000, 3000 及び 10000 ppm の投与量で 13 週間亜急性経口毒性試験 (資料 15) を実施した. その結果, 10000 ppm 投与群で雌雄の体重増加抑制ないしは抑制傾向, 雌の摂餌量の減少傾向が認められた. この結果を参考に F₁ 及び F₂ 世代を考慮し, SD 系ラットを用いる本試験の投与量を, 0, 400, 2000 及び 10000 ppm とした.

方法及び試験項目: 概要を次頁の表にまとめた.

一般状態及び死亡率; 全動物の全投与期間に一般状態及び生死を毎日観察した.

交配及び妊娠の確認; 交配は雌雄 1 対 1 で同居させ, 翌日膣栓あるいは精子の有無により交尾を確認した. 妊娠の確認は出産及び着床の有無により行った. なお, 交尾が成立した日を妊娠 0 日とした.

繁殖性に関する指標; 交配, 妊娠, 出産及び離乳までの観察に基づき, 次の指標を算出した.

交尾所要日数: 交配開始から交尾成立までに要した日数

交尾が成立するまでに逸した発情期の回数

$$\text{交尾率(\%)} = \frac{\text{交尾動物数}}{\text{同居動物数}} \times 100$$

$$\text{受胎率(\%)} = \frac{\text{妊娠動物数}}{\text{交尾動物数}} \times 100$$

妊娠期間: 妊娠 0 日から分娩日までの期間

$$\text{出産率(\%)} = \frac{\text{生存児出産雌数}}{\text{妊娠雌数}} \times 100$$

$$\text{出生率(\%)} = \frac{\text{出生生存児数}}{\text{着床数}} \times 100$$

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ゼオン株式会社にある。

$$\text{出産時生存率(\%)} = \frac{\text{出産生存児数}}{\text{出産児数}} \times 100$$

$$4 \text{ 日生存率(\%)} = \frac{\text{生後 4 日の生存児数}}{\text{出産生存児数}} \times 100$$

$$\text{離乳率(\%)} = \frac{\text{離乳時の生存児数}}{\text{児数調整後の児数}} \times 100$$

病理学的検査；全動物について剖検を実施した。以下に示す器官・組織を摘出し，対照群及び 10000 ppm 投与群の P 及び F₁ 世代の親動物について病理標本を作製し，鏡検した。また，400 及び 2000 ppm 投与群については P 世代の雌，F₁ 世代の雌雄について，精巣，前立腺，子宮及び膣の組織検査も行った。

下垂体，精巣，精巣上部，精のう，前立腺，卵巣，子宮，膣，
肉眼的異常部位

世代	期間 (週間)	作業手順	試験項目
P	生育 (14 週)	雌雄 1 対 1 で交配. 交尾は膣栓あるいは膣垢標本中の精子で確認 (妊娠 0 日)	体重及び摂餌量を週 1 回測定.
	交配 (1 週)		交尾状況の観察. 交配終了後雄全例を剖検し, 対照群と 10000 ppm 投与群について病理組織学的検査.
	妊娠 (3 週)		妊娠 0, 7, 14 及び 20 日に体重と摂餌量を測定.
	出産	-----	出産状況の観察. 新生児数, 死産児数, 外表異常, 性別
F ₁	哺育 (3 週)	出産後 4 日目に各同腹児数を雄 4 匹, 雌 4 匹に調整 (不可能な場合, 雌雄計 8 匹, 8 匹に満たない場合, そのまま飼育)	母動物は哺育 0, 4, 7, 14 及び 21 日に体重, 摂餌量測定. 同腹生存児は生後 0, 4, 7, 14 及び 21 に体重測定. なお, 途中死亡の出生児は外表異常を検査した後, 剖検.
	離乳	-----	母動物全例を剖検し, 対照群と 10000 ppm 投与群について病理組織学的検査. また, 継代用以外の児動物を剖検.
	生育 (14 週)	(P 世代に準ずる)	(P 世代に準ずる)
	交配 (1 週)		
	妊娠 (3 週)		
	出産		
	哺育 (3 週)	(P 世代に準ずる)	(P 世代に準ずる)
離乳	-----	(F ₁ 世代に準ずる)	(F ₁ 世代に準ずる)
F ₂			F ₁ 母動物全例を剖検し, 対照群と 10000 ppm 投与群について病理組織学的検査. F ₂ 児動物全例を剖検.

結 果：概要を次頁の表に示す。

10000 ppm 投与群の P 及び F₁ 世代の雌雄ともに、体重増加抑制及び摂餌量減少が妊娠・哺育期間を含むほぼ全試験期間を通じて認められた。病理組織検査では、発育抑制に起因したと考えられる萎縮性の変化が、P 世代で子宮及び膈、F₁ 世代で子宮、膈及び精巣に認められた。なお、死亡動物が F₀ 世代および F₁ 世代でみられたが、分娩時にしばしば認められる播種性血管内凝固症候群 (DIC) あるいは自然発生性の変化などが原因で、被験物質に起因した死亡は認められなかった。繁殖能への影響として、10000 ppm 投与群の F₁ 世代において出産生存児数の減少が認められた。

2000 ppm 投与群では、F₁ 世代の雄で離乳後の体重と摂餌量の推移に統計学的に有意な変化が認められた。しかし、雌では同様な変化はなく、離乳後、間もない発育の著しい時期のみにみられ、その後は対照群と同様の推移を示した。試験期間全般を通してみると、一過性の変化であると判断され、2000 ppm 投与群での変化は毒性学的に意義のないものと考えられる。その他、P 及び F₁ 世代の一般状態、交尾能、受胎能、分娩・哺育状態及び剖検では、検体投与に起因する変化は認められなかった。

10000 ppm 投与群の F₁ 及び F₂ 児動物ともに体重増加抑制が認められた。なお、F₂ 児動物の出産時の性比に 400 ppm 投与群で差がみられたが、10000 ppm 投与群で変化がないことから、検体投与と関連のない偶発的な変化と考えられる。その他、F₁ 及び F₂ 児動物とも生存率、一般状態及び剖検では検体投与に起因する変化は認められなかった。

以上、2 世代にわたって本剤を飼料中に混入して投与した場合、10000 ppm 投与群で親動物に体重増加抑制、摂餌量減少が認められた。また、児動物では低体重を示し生後の発育抑制が認められた。繁殖能に対しては 10000 ppm 投与群の F₁ 世代で出産児数の減少が認められた。400 及び 2000 ppm 投与群では親動物及び児動物とも検体投与による影響は認められなかった。

したがって、本剤のラットに対する繁殖試験の無毒性量は親動物及び児動物に対し 2000 ppm (P: 雄 94.37 mg/kg/日, 雌 103.59 mg/kg/日, F₁: 雄 138.7 mg/kg/日, 雌 153.0 mg/kg/日) と判断される。

試験結果：

世 代		親：P 児：F ₁				親：F ₁ 児：F ₂			
投与群(ppm)		0(対照)	400	2000	10000	0(対照)	400	2000	10000
動物数	雄	30	30	30	30	24	24	24	24
	雌	30	30	30	30	24	24	24	24
一般状態									
死亡数	雄		1 ²⁾						
	雌	1 ¹⁾	1 ³⁾						1 ³⁾
体 重					増加抑制↓ (雌雄)			28-56日↓ (雄)	増加抑制↓ (雌雄)
摂餌量					減少↓ (雌雄)			35-42日↓ (雄)	減少↓ (雌雄)
摂餌効率									
検体摂取量(mg/kg)	雄；交配前期間		18.77	94.37	478.5		24.74	138.7	714.3
	雌；交配前期間		21.06	103.59	514.7		27.84	153.0	765.8
	妊娠期間		21.50	104.77	545.3		21.17	102.79	541.3
	哺育期間		52.77	283.4	1332.9		61.11	259.7	1344.2
交尾所要日数		2.3	2.2	2.2	2.0	2.4	2.7	2.3	2.9
逸した発情回数		0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
交尾率(%)		100 (30/30)	100 (30/30)	96.7 (29/30)	96.7 (29/30)	95.8 (23/24)	95.8 (23/24)	100 (24/24)	95.8 (23/24)
受胎率(%)		96.7 (29/30)	96.7 (29/30)	100 (29/29)	86.2 (25/29)	100 (23/23)	87.0 (20/23)	95.8 (23/24)	87.0 (20/23)
妊娠期間(日)		22.3	22.3	22.2	22.0	22.3	22.3	22.1	22.0
着床数		14.2	13.7	13.5	14.0	14.3	14.1	13.9	13.4
分娩異常			1 ⁵⁾						
哺育異常(全児死)		1 ⁶⁾				1 ⁶⁾			
出生率(%)		85.87	88.82	81.68	85.88	88.80	87.65	91.90	84.83
出産率(%)		100 (28/28)	96.4 (27/28)	92.9 (26/28)	100 (25/25)	95.7 (22/23)	100 (20/20)	100 (23/23)	100 (19/19)
剖 検									
病理組織学的検査									
子宮・膣の萎縮					5/30 ⁶⁾				8/24 ⁶⁾
精巣の萎縮									4/24 ⁷⁾

空欄は異常なし

多重比較検定 ↑↓：P<0.05, ↓↑：P<0.01

- 1) 腎芽腫による死亡(哺育7日) 2) 慢性心不全による死亡(投与開始後105日)
 3) DIC(播種性血管内凝固症候群)による死亡(妊娠23日) 4) 全出生児死亡(哺育0及び1日)
 5) 分娩完了せず 6) 内膜上皮, 内膜間質, 子宮腺及び平滑筋層の萎縮, 粘膜上皮層の非薄化
 7) び慢性の精細管萎縮

世 代		親：P 児：F ₁				親：F ₁ 児：F ₂			
投与群 (ppm)		0(対照)	400	2000	10000	0(対照)	400	2000	10000
母動物数		28	27	26	25	23 ¹¹⁾	20	23	19
児 動 物	出産児数	12.6	12.8	12.7	12.4	13.7	12.7	12.8	11.5
	出産生存児数	12.2	12.6	12.5	12.1	13.4	12.4	12.8	11.4 ↓
	性比 (雄/雌) ⁸⁾	0.92 (169/184)	0.93 (167/179)	1.01 (165/164)	1.04 (157/151)	1.12 (166/148)	0.72** (106/147)	0.86 (136/159)	1.00 (109/109)
	出生時生存率 (%)	95.40	98.71	98.12	98.09	93.68	97.72	99.67	99.04
	4日生存率 (%)	92.83	97.12	99.44	99.16	96.89	98.25	98.85	98.43
	離乳率 (%)	99.36	99.54	100.0	100.0	100.0	100.0	98.37	100.0
	生存児体重 (g)								
	0日 雄	7.0	6.9	6.9	6.4 ↓	6.7	6.7	6.6	6.5
	雌	6.6	6.5	6.6	6.0 ↓	6.3	6.4	6.3	6.2
	4日 雄	11.1	10.7	10.9	9.4 ↓	10.5	10.9	10.7	10.2
雌	10.4	10.4	10.5	8.9 ↓	9.8	10.5	10.4	9.7	
21日 雄	61.0	60.6	60.0	47.0 ↓	60.5	61.7	59.5	49.3 ↓	
雌	57.6	57.7	57.8	44.5 ↓	56.7	58.6	57.1	45.6 ↓	
外表異常/一般状態			不正咬合 口唇裂 無眼球症 (雄1例) ⁹⁾						自発運動低下 (雌2例) ¹⁰⁾
剖 検									

空欄は異常なし

多重比較検定 ↓↑ : P<0.01, Fisherの直接確率法 **: P<0.01

8) 出産時の性比 9) 自然発生性の変化と判断した。

10) 同腹の他の児動物には異常はみられず、2例のみの発現であることから偶発的な変化と判断した。

11) 全出生児死亡が認められた母動物数を含む(哺育0日)。

(2) 催奇形性

(資料 23)

1) ラットにおける催奇形性試験

試験機関 : 株式会社 実医研[G L P 対応]

報告書作成年 : 1997

検体の純度 : %

試験動物 : SD系ラット、1群24匹(交尾動物)

妊娠0日において11~12週齢

試験期間 : 妊娠期間

方法 : 検体を0.2% Tween80添加0.2%トランスコーム水溶液に乳濁し、30、120及び500mg/kgの投与レベルで妊娠6日~15日の10日間、毎日1回強制経口投与した。対照群には0.2% Tween80添加0.2%トランスコーム水溶液のみを同様に投与した。

なお、交配は雌雄1対1で昼夜同居させることにより行い、臍垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。

投与量設定根拠 ; 0(対照)、100、300及び1000mg/kgの投与量で妊娠ラットを用いて予備試験を実施した。その結果1000mg/kgの投与群で体重及び摂餌量の減少、300mg/kgの投与群で摂餌量の減少が見られた。したがって、母動物に毒性が確実に現れると考えられる500mg/kgを高用量とし、以下に公比4で120及び30mg/kgを設定した。

試験項目 :

親動物 ; 一般状態及び生死を毎日観察し、体重を妊娠0、3、6~20日(毎日)に測定し、投与開始日の体重をもとに体重増加量を算出した。また、摂餌量を妊娠3日及び6~20日に測定した。

妊娠20日に帝王切開し、剖検の後、黄体数及び着床数を調べ、着床前胚死亡率を算出した。

生存胎児 ; 性別、体重及び外表異常を検査した。各腹の半数の胎児について骨格標本を作製し、骨格異常の有無及び骨化進行度を検査した。残り半数の胎児については、ブアン液で固定後内臓検査を行った。

結果：

投与群(mg/kg/日)		0(溶媒)	30	120	500
妊娠動物数		21	20	22	20
親動物	一般状態	—	—	—	—
	死亡数	0	0	0	0
	流産数	0	0	0	0
	体重変化	—	—	一過性増加抑制	一過性増加減少
	摂餌量	—	—	—	減少
	黄体数	17.2	16.8	16.8	17.0
	着床数	15.0	14.7	15.6	16.3
	着床前胚死亡率	13.7	11.4	6.2	4.0
剖検所見		—	—	—	—
胎児	着床後胚死亡率	4.5	3.7	3.3	4.5
	生存胎児数	14.2	14.1	15.1	15.6
	性比(雄/雌)	0.88	1.20	0.95	1.07
	生存胎児体重(g)				
	雄	3.82	3.95	3.82	3.78
	雌	3.68	3.75	3.60	3.57
	外表奇形(%)	0	0	0	0
	内臓奇形(%)	0	0	0	0
	内臓変異(%)	1.8	3.6	6.4	9.8
	胸腺 頸部残留	1.8	2.9	4.6	7.4
	腎盂拡張	0	0.7	1.1	1.4
	尿管拡張	0	0.7	1.1	0.7
	脊椎 左 臍帯動脈	0	0	0.6	1
	骨格奇形(%)	0	0	0.5	0
	胸骨裂	0	0	0.5	0
	骨格変異(%)	11.4	6.4	18.4	28.6
	頸肋骨	0.7	0.8	0.6	0.6
	14本肋骨(%)	9.5	4.9	16.7	↑28.0
	第13肋骨短小	1.3	0.6	1.2	0
	腰椎5個	0	0	0.7	0
腰椎7個	1.6	0	0.5	3.2	
骨化進行		—	—	—	—

分散分析又は Kruskal-Wallis 検定後 Dunnet 検定 ↑、↓ : P<0.05

— : 変化なし

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ゼオン株式会社にある。

親動物では 120mg/kg 投与群で一過性の体重増加抑制が、500mg/kg 投与群で一過性の体重減少及び摂餌量の減少が見られた。これらの変化はその後回復した。胎児では 500mg/kg 投与群で骨格変異の一つである 14 本肋骨の発生頻度が有意に増加し、検体投与に起因した変化と思われた。しかし、14 本肋骨は自然発生性に見られる骨格変異であり、またその発生頻度には実験間で著しい変動のあることが知られていることから、偶発的である可能性も考えられる。なお、外表、骨格及び内臓検査では検体投与に起因した異常は見られなかった。

以上の結果から、本検体を妊娠ラットに投与したときの母体に対する無毒性量は 30mg/kg/日、胎児に対する無毒性量は 120mg/kg/日であると判断した。また、最高投与量の 500mg/kg/日においても胎児に対して催奇形性を及ぼさないものと判断される。

2) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 24)

試験機関 : 株式会社 実医研[G L P 対応]
報告書作成年 : 1 9 9 7

検体の純度 : %

試験動物 : New Zealand White 系妊娠ウサギ、1 群 15~17 匹 (交尾確認動物)
妊娠 0 日 (交尾確認の翌日) において 5~6 カ月齢 (体重 2.61~3.68kg)

試験期間 : 妊娠期間 28 日間 (1996 年 11 月 12 日~12 月 26 日)

方 法 : 検体を 0.2% Tween80 添加 0.2%トランソゴム水溶液に乳濁し、20、80、
300mg/kg の投与で、妊娠 6 日~18 日の 13 日間、毎日 1 回強制経口投
与した。対照群には 0.2% Tween80 添加 0.2%トランソゴム水溶液のみ
を投与した。

投与量設定根拠 ; 妊娠動物を用いた催奇形性予備試験 (用量 : 100、300、1000mg/kg、
1 群 6 匹) の結果に基づき設定した。すなわち、1000mg/kg 投与では、投与
期間終了までに全例が死亡または流産した。300mg/kg 投与では体重減少
及び摂餌量の減少傾向が見られたが、胚・胎児に影響は見られなかった。
この結果から母動物に毒性徴候が現れると考えられる 300mg/kg の高用量
とし、以下に公比 4 で 80 及び 20mg/kg の 3 用量を設定した。

試験項目 :

親動物 ; 一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠 0、4、6~19、21、23、25、27、
及び 28 日に体重を、妊娠 5~28 日の毎日摂餌量を測定した。妊娠 28 日
に帝王切開し、黄体数、着床数、生存胎児数及び死亡胚数を検査した。ま
た、検査結果に基づき着床前胚死亡率、着床後胚死亡率及び総合胚死亡率
を算出した。

生存胎児 ; 性別、体重及び外表異常の観察を行った。全群の全生存胎児について内
臓検査を行った後、骨格標本作製し、骨格異常の有無及び骨化進行度を
検査した。

結果：

投与群(mg/kg/日)		0(溶媒)	20	80	300
妊娠動物数		15	17	15	17
親動物	一般状態	—	—	—	摂水の減少
	死亡数	0	0	0	0
	流産数	0	0	0	1/17例
	体重変化	—	—	—	減少(14~19日)
	摂餌量	—	—	—	減少(14~16日) ↓
	黄体数	7.5	8.2	8.0	8.0
	着床数	6.9	7.1	7.5	7.1
	生存胎児数	6.5	6.7	6.9	5.8
	着床前胚死亡率	9.4	13.7	6.4	12.8
	着床後胚死亡率	5.4	6.7	6.8	13.4
	剖検所見	—	—	—	—
胎児	性比(雄/雌)	1.04	0.95	1.05	1.26
	生存胎児体重 雄	41.8	41.6	41.0	40.7
	(g) 雌	41.2	41.6	39.0	41.0
	外表奇形(%)	3.1	2.4	0	1.9
	半陰陽	0.8	0	0	0
	臍帯ヘルニア	2.2	0	0	0.8
	水頭症	0	1.2	0	1.1
	前肢拘縮	0	2.4	0	0
	内反足	0	1.2	0	0
	内臓異常(%)	0.8	2.4	0	1.2
	水頭症	0	2.4	0	1.2
	半陰陽	0.8	0	0	0
	内臓変異				
	側脳室拡張	0	2.2	0	0
	骨格奇形(%)				
	前頭骨 減形成	0	0	0	1.0
		0	0	0	1.0
	骨格変異(%)				
	13本肋骨	68.5	60.8	65.6	50.7
	胸骨核過剰	53.5	45.9	50.4	47.5
	腰椎の仙椎化	0	1.3	0	0
	胸骨核分離	0	0	0.7	0
	胸骨核非対称	0	2.2	1.9	0
	腰椎8個	0	0	0	0.8
		63.7	51.9	57.5	45.5
	骨化進行	—	—	—	—

分散分析又は Kruskal-Wallis 検定後 Dunnett 検定

↑ ↓ : P < 0.01

— : 変化なし

親動物の 300mg/kg 群において、妊娠 14～19 日に体重増加量の減少、妊娠 14～16 日に摂餌量及び摂水の減少が見られ、1 例に流産が認められた。流産例については摂餌量の減少が著しく、衰弱に伴う続発的な流産と考えられた。なお、300mg/kg 群で着床後胚死亡率の増加傾向及び生存胎児数の減少傾向が見られたが、水様性下痢が発生し胚／胎児が全て死亡した 1 例を除くと対照群との差はないことから、偶発的なものと判断した。黄体数、着床数、着床前胚死亡率及び剖検では検体に起因した異常は見られなかった。

胎児検査では性比、生存胎児体重、外表異常、内臓異常、骨格異常及び骨格変異の発現率及び骨化進行度に検体に起因した異常は見られなかった。

以上の結果から、本検体をウサギに投与した時の親動物における無毒性量は 80mg/kg/日、胎児における無毒性量は 300mg/kg/日であった。また、最高投与量の 300mg/kg/日においても胎児に対して催奇形性を及ぼさないものと判断される。

1 3. 変異原性

(資料 25)

1) 細菌を用いる復帰変異原性

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

検体の純度： %

方法： *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素 (S9 mix) の非共存下及び共存下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検索した。
溶媒には DMSO を用いた。予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 µg/プレート の濃度で実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix 非共存下ではすべての菌株の 78.1 µg/プレート 以上で、共存下では TA100, TA1535 の 313 µg/プレート 以上、WP2uvrA, TA98, TA1537 の 1250 µg/プレート 以上でそれぞれ抗菌性が認められた。この結果をもとに本試験では、各菌株の最高濃度を、S9 mix 非共存下の TA100, TA1535, TA1537 は 78.1 µg/プレート、WP2uvrA, TA98 は 156 µg/プレート、共存下の TA100, TA1535 は 625 µg/プレート、WP2uvrA, TA98 は 2500 µg/プレート、TA1537 は 1250 µg/プレート とし、以下公比 2 で 5 または 6 濃度を設定した。

結果： 結果を次表に示した。

2 回の本試験ともに、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix 非共存下では TA100, WP2uvrA, TA98, TA1537 の 78.1 µg/プレート 以上、TA1535 の 39.1 µg/プレート 以上で、共存下では TA100, TA1535 の 313 µg/プレート 以上、WP2uvrA, TA98, TA1537 の 625 µg/プレート 以上で抗菌性が見られた。

一方、陽性対照として用いた AF-2、NaN₃、9-AA、ENNG 及び 2-AA ではすべての菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断した。

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本ゼオン株式会社にある。

結 果：

一回目試験結果(表中の数値は3プレートの平均値)

薬 物	濃 度 (μ g/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異数 (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)		—	109	12	18	25	8	
検 体	2.44	—	128	9	23	23	6	
	4.88	—	113	11	18	23	5	
	9.77	—	132	12	19	23	7	
	19.5	—	136	9	16	25	6	
	39.1	—	120	9	18	25	6	
	78.1	—	0*	0*	18*	13*	0*	
	156	—			18*	14*		
対照 (DMSO)		+	133	9	27	32	12	
検 体	9.77	+	133	10				
	19.5	+	123	9				
	39.1	+	142	10	23	32	10	
	78.1	+	121	10	28	31	10	
	156	+	121	9	21	32	9	
	313	+	99*	10	21	24	10	
	625	+	88*	0*	20*	15*	0*	
	1250	+			20*	19*	0*	
2500	+			17*	16*			
陽 性 対 照	AF-2	0.01	—	640				
		0.1	—				553	
	NaN3	0.5	—		456			
	ENNG	2	—			477		
	9-AA	80	—					357
	2-AA	1	+	933				
		2	+		287			
		10	+			1598		
		0.5	+				301	
		2	+					127

*：抗菌性あり

AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN3：アゾ化ナトリウム

ENNG：N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソクアニジン

9-AA：9-アミノアクリジン

2-AA：2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本ゼオン株式会社にある。

二回目試験結果(表中の数値は3プレートの平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9Mix の有無	復帰変異数 (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)		—	118	16	33	18	10
検体	2.44	—	116	9	39	21	9
	4.88	—	112	13	34	20	10
	9.77	—	117	8	38	21	14
	19.5	—	107	9	35	24	14
	39.1	—	101	8	34	24	10
	78.1	—	0*	0*	31*	13*	0*
	156	—			18*	13*	
対照 (DMSO)		+	135	13	45	21	12
検体	9.77	+	112	9			
	19.5	+	117	10			
	39.1	+	115	11	39	23	15
	78.1	+	111	10	43	23	16
	156	+	110	11	41	23	13
	313	+	89	6*	42	20	14
	625	+	88	0*	30*	21*	0*
	1250	+			25*	18*	0*
	2500	+			22*	19*	
陽 性 対 照	AF-2	0.01	—	690			
		0.1	—			674	
	NaN3	0.5	—		429		
	ENNG	2	—			558	
	9-AA	80	—				350
	2-AA	1	+	932			
		2	+		300		
		10	+			1537	
		0.5	+				322
		2	+				

* : 抗菌性あり

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

NaN3 : アジ化ナトリウム

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

2) 染色体異常誘発性

(資料 26)

チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を用いた in vitro 哺乳動物細胞
遺伝学的試験

試験機関 三菱化学安全科学研究所[G L P 対応]

報告書作成年 1996

検体の純度： %

方 法： チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、代謝活性化法
及び非代謝活性化法によって染色体異常誘発性を検討した。溶媒として
アセトンを用いた。細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制濃度は
非代謝活性化法の 24 及び 48 時間処理で 64 及び 54 μ g/ml、代謝活性化法
の S9Mix 共存下及び非共存下で 4776 及び 81 μ g/ml であった。この結果
より、非代謝活性化法及び代謝活性化法の S9Mix 非共存下では 80, 40,
20, 10 μ g/ml の 4 濃度、S9Mix 共存下では 5000, 2500, 1250 μ g/ml の 3 濃度
で染色体異常試験を行った。

本試験では、各濃度について 2 枚のシャーレを用い、1 枚のシャーレに
つき 100 個の分裂中期像を観察した。染色体の異常をギャップ、染色分
体型切断、染色分体型交換、染色体型切断、染色体型交換、断片化及び
数的異常（核内倍加細胞を含む倍数体細胞）に分類した。

構造異常を 1 個以上持つ細胞を染色体異常細胞とし、ギャップのみの異
常を持つ細胞を除いた場合（- gap）と含めた場合（+ gap）で集計し、
+ gap の構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度がいずれも 5 %未満
を陰性、いずれかが 5 %以上 10 %未満を疑陽性、10 %以上を陽性と判
定した。

なお、陽性対照としてマイトマイシン C (MMC)、ベンゾ[a]ピレン (BP)
を用いた。

結 果：非代謝活性化法の 48 時間処理の 80 μ g/ml の標本で 50 個以上の分裂中
期細胞が得られなかったため、この処理群は観察対象から除外した。
いずれの処理条件においても、検体による染色体構造異常及び数的異常
細胞の出現頻度は 5 %未満であった。

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ゼオン株式会社にある。

一方、陽性対照として用いた MMC 及び BP では染色体異常構造細胞の著しい増加が観察された。

以上の結果より、本検体のチャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU に対する染色体異常誘発性は陰性と判断した。

結果：
(非代謝活性化法による)

薬物	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/mL)	倍数体の出現頻度 (%)	染色体構造異常細胞の出現頻度 (%)										
				ギヤップ	染色分体型		染色体型		断片化		合計			
					切断	交換	切断	交換	-g	+g				
無処理	24	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	48	0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	
	24	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
溶媒 (アeton)	48	0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	
	24	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	
		20	0.0	0.0	0.5	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.5	
40		0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5		
80		0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5		
検体	48	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5		
		20	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.5		
		40	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		80	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0		
細胞毒性														
陽性対照 (MMC)	24	0.03	0.0	0.0	11.5	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.5	18.5	
	48	0.03	1.0	1.5	11.5	17.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	28.0	28.5	

1 検体あたり 2 枚のシャーレを作成し、シャーレ 1 枚につき分裂中期細胞 100 個を観察した

MMC: マイトマイシン C

判定基準: 陰性; +g の構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度がいずれも 5% 未満

擬陽性; +g の構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度が 5% 以上 10% 未満

陽性; +g の構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度が 10% 以上

(代謝活性化法による)

薬物	S9 Mix の有無 (μg/mL)	倍数体の 出現頻度 (%)	ギヤップ g	染色体構造異常細胞の出現頻度 (%)						合計	
				染色分体型		染色体型		断片化		-g	+g
				切斷	交換	切斷	交換	切斷	交換		
溶媒 (アセトン)	-	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0
	+	0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.5
		10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
		20	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5
検体		40	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.5
		80	0.5	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	0.5
		1250*	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	0.5
		2500*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
陽性対照 (BP)		5000*	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0
	-	20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	+	20	0.0	0.0	9.5	59.0	0.0	0.0	0.0	60.0	60.0

1 検体あたり 2 枚のシャーレを作成し、シャーレ 1 枚につき分裂中期細胞 100 個を観察した。

BP : ベンゾ [a] ピレン

判定基準 : 陰性 ; + g の構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度がいずれも 5 % 未満

擬陽性 ; + g の構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度が 5 % 以上 10 % 未満

陽性 ; + g の構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度が 10 % 以上

S9 の用量 (5 %)、被検物質処理時間 (6 h)、被検物質処理後の細胞回復時間 (18) 時間

* : 処理開始時に油滴状物質の分離が認められた。

3) DNA損傷性

(資料 27)

細菌を用いたDNA修復試験

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

検体の純度： %

方 法：枯草菌 Bacillus subtilis の組み換え修復機能保持株 (H17) と欠損株 (M45) を用い、代謝活性化及び非代謝活性化法によってDNAの損傷性を検定した。検体の最高濃度を検体原液の濃度である 848mg/ml とし、以下、DMSO で希釈して、265 ~ 16960 μ g/ディスクの範囲で7濃度 (公比2) を設定した。H17 株にわずかな生育阻止帯を示す濃度において H17 株及び M45 株の生育阻止帯の直径の差が 5mm 以上の場合を陽性と判断した。
なお、陽性対照として Mitomycin C (MC) 及び 2-Aminoanthracene (2-AA) を、陰性対照として Kanamycin (KM) を用いた。

結 果：各濃度につき2回実施した結果の平均を次表に示す。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	非代謝活性化法			代謝活性化法		
		阻止帯直径(mm)			阻止帯直径(mm)		
		M-45	H17	差	M-45	H-17	差
溶媒対照 (DMSO)		0	0	0	0	0	0
PDJ	265	0	0	0	0	0	0
	530	0	0	0	0	0	0
	1060	0	0	0	0	0	0
	2120	0	0	0	0	0	0
	4240	0	0	0	0	0	2
	8480	0	0	0	2.5	0	2.5
	16960	0	0	0	3	2	1
陰性対照 KM	2	15.0	15.0	0	11.0	9.5	1.5
陽性対照 MMC	0.02	22.0	4.0	18.0			
2-AA	10				8.0	0	8.0

代謝活性化法による場合の M45 株で 4240 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ 以上に生育阻止帯が認められたが、両菌株間の生育阻止帯の差は 5mm 未満であり、陰性であった。陰性対照 (KM) では、両菌株に生育阻止帯が生じたが、長さには差は見られなかった。陽性対照 (MMC、2-AA) では、生育阻止帯の差は、5mm 以上であった。溶媒対照 (DMSO) では、両菌株に生育阻止帯は認められなかった。

以上の結果から、細菌を用いる DNA 修復試験において PDJ の DNA 損傷性は陰性と結論した。

4) ラットを用いた小核試験

試験機関：㈱三菱化学安全科学研究所〔GLP 対応〕
報告書作成年：2002年

検体純度： %

供試動物：SD系[Crj:CD(SD)IGS,SPF]ラット（7週齢、体重259～280g）
一群雄5匹

試験方法：被験物質に媒体（1%Tween80-トラガントゴム）を加え、ボルテックスミキサーおよび超音波処理により投与液を調製した。500、1000、2000mg/kgの用量で被験物質を24時間間隔で2回強制経口投与した。媒体のみを投与する陰性対照群および小核を誘発するCP（シクロホスファミド）10mg/kgを投与する陽性対照群を設定し、CPは単回腹腔内投与した。

体重を、各投与日の投与開始直前および標本作製前に測定した。

陰性対照群、被験物質群については1回目投与1時間後、2回目投与前、投与後および標本作製前に一般状態を観察した。陽性対照群については、投与1時間後および標本作製前に一般状態を観察した。

標本の作製は、ラットを安楽死させた後、大腿骨を摘出し骨髓細胞を洗出し、得た細胞浮遊液を処理して骨髓細胞懸濁液として保存した。観察骨髓細胞懸濁液をアクリジン・オレンジ染色し、骨髓細胞をスライドガラスに伸展した。

個体毎に全赤血球（多染性赤血球および正染性赤血球）1000個に対する多染性赤血球の割合を調べると共に、多染性赤血球2000個中の小核をもつ細胞数を数えた（2領域、合計2000個）。

用量設定根拠：PDJのラット急性毒性試験の結果（LD₅₀値5000mg/kg以上）をもとに500、1000および2000mg/kgの用量を設定した。

結果：骨髓標本の観察結果を表に示した。

2000mg/kg群で1回目投与後から体重の減少が見られた。

2000mg/kg群において、2回目投与前と標本作製前に尿量の増加と飲水量の増加が見られた。

小核をもつ多染性赤血球（MNPCE）の出現頻度は、いずれの被験物質群でも明らかな増加、減少は見られず、陰性対照群と比較して有意な差はなかった。

多染性赤血球（PCE）の出現頻度は、陰性対照群と比較して2000mg/kg群で有意な増加（ $p < 0.05$ ）が見られ、陽性対照群では有意な減少が見られた（ $p < 0.05$ ）。

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ゼオン株式会社にある。

陰性対照群の MNPCE 出現頻度が、当研究所における背景データの変動範囲内の値〔2000年4月19日～2001年11月13日、 $0.21 \pm 0.31\%$ （平均 $\pm 3SD$ 、 $n=93$ ）〕であり、陽性対照群の MNPCE 出現頻度が著しく増加した。したがって本試験は適切に行われたと考えられる。

観察結果

薬物	投与量(mg/kg) ×回数	性	観察 動物数	MNPCE (平均値 $\pm SD$)	PCE/(PCE+NCE) % (平均値 $\pm SD$)
陰性対照 (1%Tween80 -トランスゴム)	0×2	雄	5	0.09 \pm 0.07	52.0 \pm 2.6
被験物質 (PDJ)	500×2	雄	5	0.10 \pm 0.04	54.0 \pm 3.2
	1000×2	雄	5	0.12 \pm 0.06	52.8 \pm 2.6
	2000×2	雄	5	0.10 \pm 0.05	56.8 \pm 2.1 #
陽性対照 (CP)	10×1	雄	5	1.73 \pm 0.14 *	43.0 \pm 6.6 #

MNPCE 出現頻度 … Kastenbaum & Bowman 法、* $p < 0.01$

PCE 出現頻度 … Student の t-検定、# $p < 0.05$

PCE：多染性赤血球数、 NCE：正染性赤血球数、

MNPCE：小核をもつ多染性赤血球、 CP：シクロホスファミド

結論：以上の結果、本試験条件下における PDJ の小核誘発性は陰性と結論した。

1.4. 生体の機能に及ぼす影響

薬理試験

(資料 29)

試験機関 (株)三菱化学安全科学研究所
報告書作成年 1996

検体の純度 : %

1) 中枢神経系に対する作用

①マウスにおける一般症状

供試動物: ICR系マウス、4週齢、体重 雄 22.7～26.8g、1群雄 3匹

方法: 検体を1% Tween 80 添加1%トラガントゴムに乳化させ、溶媒対照(0)、500、1500 および 5000mg/kg を経口投与し、Irwin の多次元観察法に準じて観察した。

結果: 500mg/kg 投与群では一般症状に異常は認められなかった。1500mg/kg 以上の投与群で反応性および自発運動の低下、腹這いおよび眼瞼裂の狭小が、5000mg/kg 投与群ではこれらに加えて受動性の増大、宙返り反射、四肢緊張、握力の低下、立毛、体温低下が見られた。

②マウスのヘキソバルビタール睡眠時間に対する作用

供試動物: ICR系マウス、4週齢、体重 雄 23.9～29.6g、1群雄 8匹

方法: 検体を上記と同様にして乳化させ、0、500、1500、5000mg/kg を経口投与し、4時間後にヘキソバルビタール 80mg/kg を腹腔内に投与し、睡眠時間を測定した。

結果: 1500mg/kg 投与群までは、睡眠時間に対する影響は見られなかった。5000mg/kg 投与群では統計学的有意差はなかったが、睡眠時間延長傾向(対照群の1.41倍)が見られた。

投与量(mg/kg)	対照	500	1500	5000
ヘキソバルビタール 睡眠時間 (min)	29.6	28.6	34.1	41.6
% of control		97	115	141

③マウスにおける痙攣誘発作用(電撃痙攣に対する作用)

供試動物: ICR系マウス、4週齢、体重 雄 25.0～30.2g、1群雄 10匹

方法: 検体を上記と同様にして乳化させ、0、500、1500、5000mg/kg を経口投与し、4時間後に電撃痙攣装置を用いて、正常動物の痙攣誘発閾値よりやや低い電気刺激を角膜に与え、強直性屈曲、強直性伸展および間代性の各痙攣および昏睡の有無を観察した。陽性対照群には電気刺激の15分前にペンチレンテトラゾール 40mg/kg を皮下投与した。

結果: 5000mg/kg まで痙攣誘発作用は見られなかった。一方、陽性対照群では強直性屈曲、強直性伸展および間代性の各痙攣および昏睡が発現し、有意な痙攣誘発作用が見られた。

④ラットにおける正常体温に対する作用

供試動物：Wistar系ラット、4週齢、体重 雄 96～111g、1群雄6匹

方 法：検体を上記と同様にして乳化させ、0、500、1500、5000mg/kg を経口投与した。投与前、投与後0.5、1、2、4および6時間にデジタル電子体温計を用いて直腸温を測定した。

結 果：1500mg/kg までの投与群では体温に対する影響は見られなかった。5000mg/kg 投与群では投与後0.5および1時間に有意な体温低下が見られ、6時間でも低下傾向が見られた。このためこの投与群のみ投与後24時間にも体温を測定したが、ほぼ回復していた。

投与量 (mg/kg)	対照	500	1500	5000
体温 (°C) 投与前	38.4	38.4	38.3	38.3
0.5 時間	38.3	38.2	38.3	↓ 37.7
1 時間	38.3	38.1	38.1	↓ 37.5
2 時間	38.2	38.0	38.1	37.7
4 時間	37.9	37.9	37.9	37.7
6 時間	37.9	38.0	37.8	37.5
24 時間	38.2	38.1	38.2	37.8

Dunnet の多重比較検定

↓ : P < 0.05

2) 循環器系に対する作用

①ラットにおける血圧および心拍数に対する作用

供試動物：Wistar系ラット、7週齢、体重 雄 268～329g、1群雄6匹

方 法：検体を上記と同様にして乳化させ、0、500、1500、5000mg/kg を経口投与し、投与前、投与後1、2、4および6時間にラット尾動脈圧測定装置を用い無麻酔下で収縮期血圧および心拍数を測定した。

結 果：いずれの投与群においても、収縮期血圧および心拍数に対する作用は認められなかった。

3) 自律神経に対する作用

①ラットにおける瞳孔径に対する作用

供試動物：Wistar系ラット、5週齢、体重 雄 164～186g、1群雄6匹

方 法：検体を0、500、1500、5000mg/kg の用量で経口投与し、投与前、投与後0.5、1、2、4および6時間に実体顕微鏡を用いて瞳孔径を測定した。

結 果：いずれの投与群においても瞳孔径に対する作用は見られなかった。

4) 消化器系に対する作用

①マウスの腸管輸送能に対する作用

供試動物：ICR系マウス、4週齢、体重 雄 20.1～25.7g、1群雄8匹

方法：検体を0、500、1500、5000mg/kgの用量で一晩絶食させたマウスに経口投与し、投与後4時間に5%アラビアゴム溶液に懸濁させた5%炭末液を一匹あたり0.2ml経口投与した。30分後に頸椎脱臼により致死させ、十二指腸起始部から炭末到達先端までの距離を測り、全小腸の長さに対する炭末移動距離の比率を測定した。

結果：1500mg/kg以下の投与群では腸管輸送能に対する作用は見られなかった。5000mg/kg投与群では有意な腸管輸送能の昂進が見られた。

投与量 (mg/kg)	対照	500	1500	5000
炭末移動距離比+	62.2	61.9	73.2	↑ 76.8
% of control		100	118	123

Dunnetの多重比較検定 ↑ : P < 0.05

+炭末移動距離比 = 小腸移動距離 / 全小腸の長さ

5) 骨格筋に対する作用

①マウスにおける懸垂動作試験

供試動物：ICR系マウス、4週齢、体重 雄 22.5～27.6g、1群雄8匹

方法：水平に張り渡した太さ1mmの針金に前肢をかけて懸垂させ、5秒以内に後肢を針金に懸けられるマウスを選び試験に供した。検体を0、500、1500、5000mg/kgの用量でマウスに経口投与し、投与後0.5、1、2、4および6時間に判定を行い、10秒以内に後肢を針金に懸けられない場合を筋弛緩反応陽性とした。

結果：1500mg/kg以下の投与群では筋弛緩作用は見られなかった。5000mg/kg投与群では有意差はなかったが、数例に筋弛緩反応が見られた。

投与量 (mg/kg)	対照	500	1500	5000
筋弛緩例数 0.5時間	0/8	0/8	0/8	0/8
1時間	0/8	0/8	0/8	1/8
2時間	0/8	0/8	0/8	2/8
4時間	0/8	0/8	0/8	2/8
6時間	0/8	0/8	0/8	0/8

6) 血液に対する作用

①ラットにおける血液凝固に対する作用

供試動物：Wistar系ラット、5週齢、体重 雄 159～199g、1群雄6匹

方 法：検体を0、500、1500、5000mg/kgの用量で経口投与し、投与後4時間にペントバルビタール麻酔下で後大静脈から採血し、血液凝固自動測定装置を用いて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：いずれの投与群においても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に対する影響は見られなかった。

②ラットにおける溶血作用

供試動物：Wistar系ラット、5週齢、体重 雄 159～199g、1群雄6匹

方 法：検体を0、500、1500、5000mg/kgの用量で経口投与し、投与後4時間にペントバルビタール麻酔下で後大静脈から採血しヘパリン加血漿を得、分光光度計を用いて540nmでの吸光度を測定した。

結 果：いずれの投与群においてもラット血液に対する溶血作用は見られなかった。

考察及び結論：本試験において、中枢神経系、睡眠時間、骨格筋、消化器系及び体温への作用が見られた。すなわち、いずれも軽度な作用ではあるが、マウスの一般状態観察における種々の全身性症状の発現に加えて、ヘキソバルビタール睡眠時間延長傾向、筋弛緩作用と消化管の炭末輸送の昂進及びラットでの体温低下作用が観察された。一方、マウスでの電撃痙攣誘発、ラットにおける血圧、心拍数、瞳孔径、血液凝固及び溶血性に対する作用は見られず、循環器系、自律神経系及び血液に対する作用はないものと判断した。マウスの一般症状観察では、1500mg/kg投与で反応性及び自発運動の低下、腹這い及び眼瞼裂の狭小が、5000mg/kgではこれらに加えて受動性の増大、宙返り反射、四肢緊張及び握力の低下、立毛、体温低下が見られ、ヘキソバルビタール睡眠時間延長及びラットでの体温低下作用も見られた。なおマウスでの電撃痙攣誘発作用は見られなかった。これらのことから検体は中枢神経系の抑制作用を有するものと思われる。

マウスの懸垂動作試験において5000mg/kg投与で筋弛緩が見られ、一般状態観察でも握力及び四肢緊張度の低下が見られていることから、検体は筋弛緩作用を有すると考えられるが、上記のように中枢抑制作用も有していることから、この筋弛緩は末梢性のものではなく中枢抑制による骨格筋緊張の低下が原因と考えられる。

マウスの腸管輸送能試験において5000mg/kg投与で昂進が見られたが、自律神経系への影響を反映する瞳孔径への作用が見られていないことから、この昂進は腸管に対する直接的な作用である可能性が高い。

なお、上記に見られた作用はいずれも軽度であった。

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ゼオン株式会社にある。

以上の結果から、検体の投与による生体機能に及ぼす影響として、1500mg/kg では中枢神経抑制作用が、5000mg/kg ではこれに加えて睡眠延長傾向、筋弛緩、体温低下及び腸管運動の昂進作用がいずれも軽度に見られた。なお、循環器系、自律神経系及び血液に対する作用は見られなかった。

別紙：PDJ 一般薬理 総括表

別紙 PDJ 一般薬理 総括表

試験の種類		供試生物	一群当たり供試数	投与方法	投与量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	概要
中枢神経	一般状態 Irwin	マウス	♂3	経口	0, 500, 1500, 5000,	500	1500	>1500で反応性/自発運動低下、腹這い/眼瞼裂狭小、5000で受動性増大、宙返り反射/四肢緊張/握力低下、立毛、体温低下
	睡眠時間	マウス	♂8	経口	0, 500, 1500, 5000,	1500	5000	5000で延長
	痙攣誘発作用	マウス	♂10	経口	0, 500, 1500, 5000,	5000	—	作用なし
	正常体温	ラット	♂6	経口	0, 500, 1500, 5000,	1500	5000	5000で低下
循環器	血圧・心拍数	マウス	♂6	経口	0, 500, 1500, 5000,	5000	—	作用なし
消化器	腸管輸送	マウス	♂8	経口	0, 500, 1500, 5000,	1500	5000	5000で鼻進
自律神経	瞳孔径	ラット	♂6	経口	0, 500, 1500, 5000,	5000	—	作用なし
骨格筋	懸垂動作	マウス	♂8	経口	0, 500, 1500, 5000,	1500	5000	5000で数例に筋弛緩
血液	血液凝固 PT,APTT	ラット	♂6	経口	0, 500, 1500, 5000,	5000	—	作用なし
	溶血	ラット	♂6	経口	0, 500, 1500, 5000,	5000	—	作用なし

原体混在物及び代謝物

(資料 30)

原体混在物のラットを用いる急性経口毒性試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所

GLP対応

報告書作成年：1999年

.....

検体の純度：%

試験動物：Crj:CD(SD)IGS ラット(SPF)、5週齢、
体重：雄 127g~130g、雌 113g~118g、1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察(1999年6月29日~1999年7月13日)

方法：投与経路は経口、投与回数は1回とした。投与は強制経口投与とし、約18時間絶食させたラットに胃ゾンデを用いて行った。飼料は投与後約3時間まで与えなかった。投与量は10mL/kgとし、投与直前の体重に基づいて算出した。投与液の調製は投与日に行った。被験物質に1%Tween80添加1%トラガントゴム溶液を加え、ポリトロンを用いて設定濃度となるように調製した。

[用量設定理由]

予備試験を5000mg/kg(雌雄各3匹)で行った結果、死亡例は認められなかったことから、5000mg/kgの1用量を設定した。

試験項目：一般状態及び生死を14日間観察した。体重は投与直前、第4、8および15日に測定した。全動物を観察終了後(第15日)にチオペンタール・ナトリウムの腹腔内投与により麻酔し、放血致死させた後剖検した。

結果：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	雌雄 5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄 > 5000
死亡開始時間及び終了時間	なし
症状発現時間及び消失時間	なし
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌雄 5000

死亡例はみられず、一般状態、体重推移および剖検にも異常は認められなかった。従って、の最小致死量は雌雄ともに5000mg/kg以上であった。

動植物代謝物 DJA のラットを用いる急性経口毒性試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所
GLP対応
報告書作成年：1999年

DJA……ジヒドロジャスモニクアシド

検体の純度： %

試験動物：Crj:CD(SD)IGS ラット(SPF)、5週齢、
体重：雄 124g~138g、雌 110g~126g、1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察(1999年6月29日~1999年7月13日)

方法：投与経路は経口、投与回数は1回とした。投与は強制経口投与とし、約17~18時間絶食させたラットに胃ゾンデを用いて行った。飼料は投与後約3時間まで与えなかった。
投与液量は10mL/kgとし、投与直前の体重に基づいて算出した。投与液の調製は投与日に行った。被験物質に1%Tween80添加1%トラガントゴム溶液を加え、ポリトロンを用いて設定濃度となるように調製した。

[用量設定理由]

予備試験を5000mg/kg(雌雄各3匹)で行った結果、死亡例は認められなかったことから、5000mg/kgの1用量を設定し本試験を実施したが、投与当日に雌1例、投与後14日に雄1例が死亡したことから、追加試験として雌雄の3500および7000mg/kgの2用量を追加した。

試験項目：一般状態及び生死を14日間観察した。体重は投与直前、第4、8および15日に測定した。全生存動物を観察終了後(第15日)にチオペンタール・ナトリウムの腹腔内投与により麻酔し、放血致死させた後剖検した。

結果：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	雌雄 3500、5000、7000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄 > 5000
死亡開始時間及び終了時間	投与後2時間から開始 投与後14日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後30分から発現 投与後14日以降に消失
死亡例の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雌雄 3500

投与日に5000mg/kg群の雌1例と、7000mg/kg群の雄4例、第2日に7000mg/kg群の雌2例、第14日に5000mg/kg群の雄1例が死亡した。

投与日に死亡した7000mg/kg群の雄では、自発運動の減少、異常歩行、呼吸不整、呼吸緩徐および横臥が認められ、剖検では、腺胃部の点状出血あるいは粘膜面の出血が認められた。第2日に死亡した7000mg/kg群の雌では、投与日の一般状態と剖検に異常は認められなかった。第14日に死亡した5000mg/kg群の雄1例では、第9~13日に呼吸緩徐、腹部膨満および呼吸困難(開口呼吸)が認められ、剖検では、胃から結腸にかけて大量のガスの充満が認められた。

生存例では7000mg/kg群の雌雄各1例に自発運動の減少あるいは呼吸不整が投与後4時間から第3日に認められた。また、5000mg/kg群の雄1例にラッセル音が第9日以降に、呼吸困難(開口呼吸)が第14日以降に認められ、剖検で胃から直腸にかけてガスの充満が認められた。体重では途中死亡例および一般状態でラッセル音および呼吸困難がみられた5000mg/kg群の雄各1例を除いて、雌雄ともに異常は認められなかった。

以上の結果から、DJAをラットに1回経口投与した時の半数致死量(LD₅₀値)は、雌雄ともに5000mg/kg以上であった。

原体混在物 の細菌を用いる復帰変異試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所

GLP対応

報告書作成年：1999年

.....

検体の純度： %

方法： *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、ラット肝由来 S9 から調製した S9 mix の非共存下および共存下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検索した。

溶媒には DMSO を用いた。用量設定試験を 5000、1250、313、78.1、19.5、4.88、1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の濃度で実施した結果、S9 mix 非共存下および共存下のすべての菌株で菌の生育阻害が認められた。また、S9 mix 非共存下の TA100、TA1535、TA1537 では著しい菌の生育阻害が認められ、正しい評価のできる用量が 4 用量以上得られなかった。WP2uvrA、TA98 では S9 mix の有無によらず、陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。これらの結果をもとに本試験では以下の用量を設定した。なお、TA100、TA1535、TA1537 は用量設定試験において正しい評価が出来なかったため、本試験を 2 回実施した。

菌株名	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	
	S9 mix 非共存下	S9 mix 共存下
TA100、TA1535	78.1、39.1、19.5、9.77、4.88、2.44	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77
WP2uvrA	625、313、156、78.1、39.1、19.5、9.77	1250、625、313、156、78.1、39.1
TA98	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77
TA1537、	156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88、2.44	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77

結果：結果を次表に示した。

本試験の結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。さらに、TA100、TA1535、TA1537 について本試験 2 を実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix 非共存下では TA100、TA1535、TA1537 の 78.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、WP2uvrA、TA98 の 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で、共存下では TA100、TA98 の 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA1535、TA1537 の 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、WP2uvrA の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上でそれぞれ菌の生育阻害が認められた。

また、S9 mix の非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数が、各菌株の陰性（溶媒）対照の復帰変異コロニー数と比較して明らかに 2 倍を超えて増加した。以上の結果から、 の細菌を用いる復帰変異試験において変異原性を有さない（陰性）と結論した。

結 果 :

用 量 設 定 試 験 結 果

代謝活性化系の有無	被験物質用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陽性対照	121	8	30	24	6	
	1.22	126	7	27	30	7	
	4.88	138	11	22	25	10	
	19.5	142	10	22	23	9	
	78.1	* 101	* 7	26	25	* 4	
	313	* 0	* 0	* 19	* 11	* 0	
	1250	* 0	* 0	* 16	* 14	* 0	
	5000	* 0	* 0	* 9	* 15	* 0	
S9 mix (+)	陽性対照	144	10	23	38	10	
	1.22	141	12	27	26	14	
	4.88	128	12	29	30	12	
	19.5	150	9	24	36	13	
	78.1	139	12	23	26	15	
	313	* 88	* 0	33	* 18	* 10	
	1250	* 82	* 0	* 19	* 11	* 0	
	5000	* 83	* 0	* 18	* 15	* 0	
陽性 対照	S9 mix (-)	名 称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数 プレート	559	415	822	414	634
	S9 mix (+)	名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数 プレート	1557	209	1758	583	224

(表中の数値は2プレートの平均値)

* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃ : アジ化ナトリウム

ENNG : N-エチル-N'-ニトロソグアニジン、9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩、2-AA : 2-アミノアントレン

結 果 :

本 試 験 1 結 果

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg /プレート)	復帰変位数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陽性対照	106	14	37	23	10	
	2.44	131	15	/	/	6	
	4.88	117	16	/	/	8	
	9.77	122	12	31	27	7	
	19.5	129	13	33	24	5	
	39.1	113	14	35	25	7	
	78.1	* 102	* 6	31	22	* 6	
	156	/	/	* 21	* 16	* 0	
	313	/	/	* 16	* 13	/	
	625	/	/	* 19	/	/	
S9 mix (+)	陽性対照	126	15	35	34	13	
	9.77	128	19	/	34	10	
	19.5	133	18	/	36	11	
	39.1	116	16	35	34	16	
	78.1	127	16	34	36	10	
	156	111	* 10	33	33	* 13	
	313	* 80	* 4	28	* 18	* 7	
	625	/	/	* 23	/	/	
	1250	/	/	* 14	/	/	
陽性対照	S9 mix (-)	名 称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
		用 量 (μg /プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数 プレート	535	368	541	459	430
	S9 mix (+)	名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用 量 (μg /プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数 プレート	1024	226	1303	561	219

(表中の数値は2プレートの平均値)

* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2 : 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド、NaN₃ : アジ化ナトリウム

ENNG : N-エチル-N'-ニトロソグアニジン、9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩、2-AA : 2-アミノアントラセン

結 果 :

本 試 験 2 結 果

代謝活性化系の有無		被験物質用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変位数 (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		TA1537
S9 mix (-)	陽性対照		106	12		7
	2.44		120	11		9
	4.88		107	10		7
	9.77		122	9		10
	19.5		110	9		6
	39.1		111	11		7
	78.1		* 92	* 7		* 10
	156					* 0
S9 mix (+)	陽性対照		131	11		15
	9.77		121	10		12
	19.5		122	11		14
	39.1		119	10		13
	78.1		130	9		14
	156		109	* 9		* 9
	313		* 85	* 0		* 6
陽性対照	S9 mix (-)	名 称	AF-2	NaN_3		9-AA
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5		80
		コロニー数 プレート	433	413		408
	S9 mix (+)	名 称	2-AA	2-AA		2-AA
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2		2
		コロニー数 プレート	1406	222		243

(表中の数値は2プレートの平均値)

* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2 : 2-(2-フル)-3-(5-ニトロ-2-フル)アクリルアミド、 NaN_3 : アジ化ナトリウム

ENNG : N-エチル-N'-ニトロソグアニジン、9-AA : 9-アミノアグニジン塩酸塩、2-AA : 2-アミノアントラセン

動植物代謝物 DJA の細菌を用いる復帰変異試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所

GLP対応

報告書作成年：1999年

DJA……ジヒドロジャスモニクアシド

検体の純度： %

方法：*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、ラット肝由来 S9 から調製した S9 mix の非共存下および共存下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検索した。

溶媒には DMSO を用いた。用量設定試験を 5000、1250、313、78.1、19.5、4.88、1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の濃度で実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix 非共存下では TA100 の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で、共存下では TA100、TA1535 の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で菌の生育阻害が認められた。この結果をもとに本試験では以下の用量を設定した。

菌株名	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	
	S9 mix 非共存下	S9 mix 共存下
TA100	5000、2500、1250、625、313、156、78.1	5000、2500、1250、625、313、156、78.1
TA1535	5000、2500、1250、625、313	5000、2500、1250、625、313、156、78.1
TA98、TA1537、WP2uvrA	5000、2500、1250、625、313	5000、2500、1250、625、313

結果：結果を次表に示した。

本試験の結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix 非共存下では TA100 の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で、共存下では TA100、TA1535 の 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ でそれぞれ菌の生育阻害が認められた。

また、S9 mix の非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数が、各菌株の陰性（溶媒）対照の復帰変異コロニー数と比較して明らかに 2 倍を超えて増加した。以上の結果から、DJA の細菌を用いる復帰変異試験において変異原性を有さない（陰性）と結論した。

結 果 :

用 量 設 定 試 験 結 果

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg /プレート)	復帰変異数 (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	
S9 mix (-)	陽性対照	115	8	26	20	9	
	1.22	106	8	22	22	9	
	4.88	101	7	23	20	8	
	19.5	100	9	24	22	11	
	78.1	105	7	21	27	10	
	313	107	10	25	29	7	
	1250	102	9	31	22	9	
	5000	* 95	8	24	26	8	
S9 mix (+)	陽性対照	118	12	35	34	12	
	1.22	116	8	26	32	14	
	4.88	124	10	34	33	12	
	19.5	115	9	36	36	13	
	78.1	128	12	30	34	12	
	313	125	9	24	29	12	
	1250	100	9	30	32	11	
	5000	* 98	* 6	30	31	14	
陽性対照	S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
		用量 (μg /プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数 プレート	351	425	835	472	683
	S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (μg /プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数 プレート	1420	225	1241	488	207

(表中の数値は2プレートの平均値)

* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2 : 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド、NaN₃ : ナジ化ナトリウム

ENNG : N-エチル-N'-ニトロソアジピン、9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩、2-AA : 2-アミノアトレン

結 果 :

本 試 験 結 果

代謝活性化系の有無	被験物質用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陽性対照	111	13	40	30	10	
	78.1	104	/	/	/	/	
	156	108	/	/	/	/	
	313	102	16	34	22	8	
	625	103	16	36	29	11	
	1250	106	12	37	26	8	
	2500	101	13	34	26	7	
	5000	* 91	15	42	30	7	
S9 mix (+)	陽性対照	113	16	38	36	14	
	78.1	115	16	/	/	/	
	156	116	19	/	/	/	
	313	115	12	51	27	12	
	625	112	19	34	33	12	
	1250	110	15	39	29	11	
	2500	* 92	* 8	39	29	11	
	5000	* 88	* 5	34	29	11	
陽性対照	S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数 プレート	404	339	864	498	442
	S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数 プレート	984	178	1288	414	234

(表中の数値は2プレートの平均値)

* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2 : 2-(2-フル)-3-(5-ニトロ-2-フル)アクリルアミド、NaN₃ : アジ化ナトリウム

ENNG : N-エチル-N'-ニトログアニジン、9-AA : 9-アミアクリジン塩酸塩、2-AA : 2-アミアントレン

製剤

(資料 5)

PDJ 液剤のラットを用いる急性経口毒性試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：5%液剤 (PDJ 含有率 %)

供試動物：Crj：CD(SD)IGS ラット(SPF)、5 週齢、
体重：雄 138g～148g、雌 113g～124g、一群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間観察 (2000 年 1 月 12 日～1 月 26 日)

方法：被験物質に 1%Tween80 添加 1%トリス・EDTA 溶液を加え、ポリトロンを用いて攪拌後、懸濁調製して、経口投与した。投与は約 18 時間絶食させたラットに胃ゾンデを用いて行った。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。試験終了時の全動物について安楽死後、剖検した。

結果：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄 >5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	症状なし
死亡例の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雌雄 5000

投与の結果、死亡例はみられず、一般状態、体重推移及び剖検所見にも投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。雄 1 例で認められた片側性腎盂拡張は、本系統でしばしば認められる所見であることから、自然発生病変と判断した。

従って、本試験条件下における PDJ 液剤の最小致死量は雌雄ともに 5000mg/kg より大であった。

PDJ 液剤のマウスを用いる急性経口毒性試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所

[GLP対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：5%液剤 (PDJ 含有率 %)

供試動物 : Crj : CD-1(ICR)マウス(SPF)、5 週齢、
体重：雄 28.0g~30.5g、雌 21.8g~23.6g、一群雌雄各 5 匹

観察期間 : 14 日間観察 (2000 年 1 月 12 日~1 月 26 日)

方 法 : 被験物質に 1%Tween80 添加 1%トリアソルコム溶液を加え、ポリトロンを用いて攪拌後、懸濁調製して、経口投与した。投与は約 4 時間絶食させたマウスに胃ゾンデを用いて行った。

観察・検査項目 : 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。試験終了時の全動物について安楽死後、剖検した。

結 果 :

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄 >5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	症状なし
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌雄 5000

投与の結果、死亡例はみられず、一般状態、体重推移及び剖検所見にも投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。雄の 1 例に腎臓の小型化が認められたが、片側性であり、被験物質投与に起因する変化とは考え難く、自然発生の変化と判断した。

従って、本試験条件下における PDJ 液剤の最小致死量は雌雄ともに 5000mg/kg より大であった。

PDJ 液剤のラットを用いる急性経皮毒性試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所

[GLP対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：5%液剤 (PDJ 含有率 %)

供試動物：Crj：CD(SD)IGS ラット(SPF)、雄 7週齢、雌 10週齢、
体重：雄 241g～257g、雌 218g～236g、一群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察 (2000年1月12日～1月26日)

方 法：躯幹背部被毛の4×5cm以上を刈毛した。被験物質は4×5cmのガーゼ上に均一に塗布した。それを刈毛した背部皮膚に適用し、24時間閉塞塗布した。適用期間終了後、水道水を用いて残存した被験物質を除去した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。試験終了時の全動物について安楽死後、剖検した。

結 果：

投与方法	経皮
投与量(mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄 >2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	症状なし
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌雄 2000

投与の結果、死亡例はみられず、一般状態、体重推移及び剖検所見にも投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。投与第2日に雄3例、雌4例でみられた体重減少は、閉塞塗布によるストレスが原因と思われる。

従って、本試験条件下におけるPDJ液剤の最小致死量は雌雄ともに2000mg/kgより大であった。

PDJ 液剤のラットを用いた全身吸入暴露による急性毒性試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：5%液剤 (PDJ 含有率 %))

供試動物：Crj：CD(SD)IGS ラット(SPF)、5週齢、

体重：雄 172g~182g、雌 137g~144g、一群雌雄各5匹

観察期間：15日間観察 (2000年3月31日~4月14日)

方法：試料を二流体ネブライザーでミスト化し、4時間全身暴露させた。

設定濃度：ミスト発生可能な5mg/Lとした。

実際濃度：5.0mg/L

チャンバー内のミストをガラス繊維フィルターで捕集し、乾燥後の蒸発残分の重量からチャンバー内の被験物質濃度を測定した。

暴露条件：

設定濃度(mg/L)	5
実際濃度(mg/L)	5.0
粒子径分布(μm)	重量% (累計)
8.23	0
5.21	5.6 (99.1)
3.42	13.8 (93.5)
2.11	22.3 (79.7)
1.55	19.9 (57.4)
1.05	25.9 (37.5)
0.48	11.6 (11.6)
質量基準空気動学的中央径(μm)	1.96±1.83
呼吸可能な粒子(<4 μm)の割合(%)	88.1
チャンバー容積(L)	120
チャンバー内通気量(L/分)	30
暴露条件	ミスト 4時間 全身暴露

観察・検査項目：暴露終了直後及び終了後14日間、中毒症状及び生死を観察した。

試験終了時の全動物について安楽死後、剖検した。

結 果 :

投与方法	吸入
暴露濃度(mg/L)	5.0mg/L
LC ₅₀ (mg/L)	雌雄 >5.0
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	暴露終了直後から発現 暴露後 2 時間に消失
死亡例の認められなかった 最高暴露濃度(mg/L)	5.0

投与の結果、雌雄ともに死亡例は認められなかった。暴露終了直後に雌雄全例で流涎、鼻汁および自発運動の低下が認められた。流涎および鼻汁は暴露後 1 時間、自発運動の低下は同じく 2 時間に消失した。その後は第 15 日の観察終了時まで変化は認められなかった。体重は観察期間を通して増加の推移を示し、観察終了後の解剖でも変化は認められなかった。

これらの結果から、PDJ 液剤は本試験条件ではラットに対し一過性の毒性症状を発現させるものの、その回復性は良好であると考えられる。本試験条件下における PDJ 液剤のラットに対する最小致死濃度は、5.0mg/L 以上であると結論した。

PDJ 液剤のウサギを用いた眼一次刺激性試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：5%液剤 (PDJ 含有率 %))

供試動物：日本白色種(Kbl:JW、SPF)雌性ウサギ、11週齢、
体重：2.3kg～2.7kg、9匹

観察期間：7日間観察 (2000年1月17日～1月24日)

方法：右眼に被験物質 0.1mL を点眼し、上下まぶたを約 1 秒間閉じ合わせた。非洗眼群はそのままとし、24 時間後に精製水を用いて洗眼を行った。洗眼群は、投与 2 分後から精製水を用いて約 60 秒間洗眼を行った。非洗眼群および洗眼群ともに、左眼は無処置対照とした。

観察項目：投与後 1、24、48、72 時間および 4、7 日に眼刺激性の反応を観察した。
角膜の混濁程度、虹彩の損傷程度、結膜の発赤および浮腫の程度を農薬ガイドラインに記載された基準に従って採点した。
角膜の混濁範囲および分泌物については、Draize の基準に従って採点した。
Kay&Calandra の方法に従い、眼刺激性の程度を分類した。
投与日から観察終了までの間、一般状態を毎日観察し、体重は投与直前および観察終了時に測定した。

結果：眼所見は以下の表のとおりである。

項目			* 最高 評点	投与後時間					
				1hr	24hrs	48hrs	72hrs	4days	7days
非洗眼群 (6匹平均)	角膜	混濁	4	2.0	2.0	2.0	1.5	1.5	0
		範囲	4	4.0	4.0	3.83	2.83	2.5	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0
		浮腫	4	2.5	1.0	1.0	0.67	0	0
		分泌物	3	2.5	2.67	0.17	0	0	0
	Draize 評点		110	52.0	49.3	42.7	25.8	22.0	0
洗眼群 (3匹平均)	角膜	混濁	4	1.67	1.67	1.33	1.0	0	0
		範囲	4	4.0	4.0	3.0	1.67	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0
		浮腫	4	2.0	1.0	0.33	0	0	0
		分泌物	3	0.67	1.67	0	0	0	0
	Draize 評点		110	40.7	40.7	22.7	10.3	2.0	0

*：判定基準の最高評点

投与の結果、非洗眼群では投与後 1 時間に評価点 2 の角膜の混濁（範囲：4）、評価点 1 の結膜の発赤、評価点 2 または 3 の結膜の浮腫および分泌物が全例に認められた。これらの症状は漸次軽減し、投与後 7 日に全例で消失した。

洗眼群では投与後 24 時間までに評価 1 または 2 の角膜の混濁（範囲：4）、評価点 1 の結膜の発赤、評価点 2 の結膜の浮腫、評価点 1 または 3 の分泌物が全例に認められた。これらの症状は漸次軽減し、投与後 7 日に全例で消失した。また、非洗眼群の症状と比べて洗眼群では一部の症状で消失時期が早いことから、洗眼の効果が認められた。

Draize 法により重みづけした非洗眼群の平均評点の最大値は 52.0 であり、この値から Kay& Calandra の方法に従い刺激性の程度を分類すると「強い刺激」であった。

一般状態、体重の推移は、いずれの動物にも異常は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下で PDJ 液剤はウサギの眼に対して可逆性の強い刺激性を示すものと結論した。

PDJ 液剤のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所
[GLP対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：5%液剤 (PDJ含有率 %)

供試動物：日本白色種(Kbl: JW,SPF)雌性ウサギ、11週齢、
体重：2.4kg~2.6kg、6匹

観察期間：4日間観察 (2000年1月18日~1月21日)

方法：刈毛したウサギの躯幹背部の皮膚に、被験物質 0.5mL を塗布したガーゼパッチ (約 6cm²) を貼布した (半閉塞貼布)。暴露時間は4時間とし、皮膚に残存している被験物質は微温湯で洗い流した。

試験項目：パッチ除去後1、24、48および72時間に投与部位の皮膚反応を観察した。
農薬ガイドラインに記載された基準に従って、紅斑および痂皮の形成、浮腫の程度を採点した。
パッチ除去後1、24、48時間の紅斑および浮腫の評価点を全動物について加算し、48時間までの観察回数18 (6匹×3回) で除して Primary Cutaneous Irritation Index (P.C.I.) を求めた。この値を用いて、Association Francaise de Normalisation (AFNOR) で提唱された基準に従い、皮膚刺激性の程度を分類した。
行った。
投与日から観察終了までの間、一般状態を毎日観察し、体重は投与直前および観察終了時に測定した。

結果：観察結果は以下の表のとおりである。

項目	* 最高 評点	投与後時間			
		1 hr	24hrs	48hrs	72hrs
紅斑・痂皮	4	0.5	0.17	0.0	0.0
浮腫	4	0.0	0.0	0.0	0.0
合計	8	0.5	0.17	0.0	0.0

注) 表の点数は6匹の平均値である。

*は判定基準の最高評点

パッチ除去後1時間に評価点1の紅斑が3例に認められたが、パッチ除去後24時間に2例で消失し、残る1例も48時間に消失した。その他、残りの3例では皮膚反応は認められなかった。P.C.I.は0.2で、この値から皮膚刺激性の程度を分類すると、「刺激なし」であった。一般状態および体重の推移は、いずれの動物にも異常は認められなかった。これらの結果から、本試験条件下でPDJ液剤はウサギの皮膚に対して刺激性を示さないものと結論した。

PDJ 液剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

試験機関：株式会社三菱化学安全科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：5%液剤 (PDJ 含有率 %)

試験動物：Hartley 系 (Std:Hartley、クリーン)モルモット雌、6 週齢、
体重：356g~387g

被験物質投与群	1 群 10 匹
被験物質対照群	1 群 10 匹
DNCB 投与群	1 群 5 匹
DNCB 対照群	1 群 5 匹

試験期間：30 日間観察 (2000 年 1 月 12 日~2 月 11 日)

試験方法：[Buehler 法]

投与量設定根拠

予備試験において、被験物質の原液、50、25 および 10vol%溶液をそれぞれ 0.4mL ずつ 3 匹のモルモットの皮膚に 6 時間閉塞貼布した結果、原液、50 および 25vol%溶液を投与した部位には軽度の紅斑が認められ、10vol%溶液を投与した部位には皮膚反応は認められなかった。よって、本試験に用いる被験物質の濃度は、皮膚一次刺激性を示さない 10vol%とした。注射用水で用時希釈した。

陽性対照物質には DNCB 用い、確実に感作性を示す濃度である 0.1w/v%とした。アセトンに用時溶解した。

感作

投与前日に動物の左側腹部約 6×6cm の範囲を剃毛し、翌日、下記に示した投与試料 0.4mL を 2×2cm のフランネルパッチに塗布し、6 時間の閉塞貼布を行った。以上の処置を一週間間隔で 3 回行った。

被験物質投与群	被験物質
被験物質対照群	注射用水
DNCB 投与群	DNCB
DNCB 対照群	アセトン

惹起

惹起処置の前日に、感作時と同じ方法で右側腹部約 6×6cm を剃毛した。最終感作処置後 14 日に、下記に示した投与試料を 0.4mL 塗布したパッチを、6 時間閉塞貼布した。

被験物質投与群	被験物質
被験物質対照群	被験物質
DNCB 投与群	DNCB
DNCB 対照群	DNCB