

## 11. 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

### (1) ラットを用いた繁殖毒性試験 (3世代)

(毒性資料No. 原体-26)

試験機関:

報告書作成年: 1978年

検体の純度:

供試動物: CD系ラット、1群 雄10匹、雌20匹、投与開始時4週齢

投与期間: 1975年9月～1977年6月

投与方法: 検体をコーン油に溶解し、3、10及び30mg/kgの投与量(投与容量1mL/kg)で週5日強制経口投与した。対照にはコーン油のみを投与した。30mg/kg投与群は毒性が強くあらわれたため、試験開始5週間後に中止して廃棄し、新たに動物を追加して1mg/kg投与群を設けた。投与は投与開始から屠殺まで出産日とその翌日を除いて継続した。

用量設定根拠:

交配・調整・選抜及び観察・検査項目: 概要を次頁の表に示した。

一般状態及び死亡率: 毎日観察し、一般状態と死亡を記録した。

交配及び妊娠の確認: 交配は100日齢となった時点で同じ投与群の雌2匹と雄1匹を同居させ交尾の有無を確認した。妊娠が確認されるか各雌が最高3匹の雄と同居し終えるまで10日間隔で雄を交換した。

(交尾の確認法及び妊娠0日について報告書に記載なし。)

初回分娩の21日後に児を離乳させ10日間の回復期間の後、同じ手順で第2産児のための交配を行った。

児の観察及び調整・選抜: 出産時に全児の外表異常を検査し、同腹児毎に生存児及び死亡児数を記録した。哺乳期間中は生存数を記録し、離乳時にも外表異常を検査した。10匹以上の同腹児は哺育4日に10匹に調整した。第2産児から次世代親動物として離乳時に雄10匹、雌20匹を選抜した。

繁殖性に関する指標: 以下の繁殖能指標を算出した。

交尾率 = 交尾回数<sup>a)</sup> / 妊娠までに要した発情周期数 × 100

<sup>a)</sup> (発情周期 (5日間) につき交尾1回とした)

妊娠率 = 妊娠動物数 / 交尾回数 × 100

雄の授精率 = 妊娠させた雄の数 / 繁殖能力のある雌と交配した雄の数 × 100

受胎率 = 妊娠した雌の数 / 繁殖能力のある雄と交配した雌の数 × 100

出産率 = 分娩動物数 / 妊娠動物数 × 100

体重: 全動物について体重を交配前は毎日測定し、妊娠14日及び屠殺時にも測定した。児動物は離乳時に測定した。

肉眼的病理検査・臓器重量；死亡例について剖検を実施した。また生存動物については第2産児の離乳後、雌雄全例について剖検し、雄は各群全例、雌は各群10例について以下の臓器重量を測定し、対体重比も求めた。

肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、心臓、脳

児はF1親動物として使用しなかったF1b離乳児、全F2a離乳児、全F3b離乳児について剖検し、肉眼的に観察した。

F1a及びF3a離乳児について肉眼的観察は行わなかった。

病理組織学的検査；死亡例は可能な場合は主要な臓器について病理組織学的検査のために採取した。生存動物については全群の雌雄各5匹について病理組織学的に検査した。

児はF1親動物として使用しなかったF1b離乳児及び全F2a離乳児については肉眼的に所見を認めた場合に病理組織学的に検査した。また、F3b離乳児は全投与群の雌雄各10匹について検査した。

病理組織学的検査は以下の臓器について実施した。

心臓、気管、肺、肝臓、脾臓、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、脾臓、リンパ節（頸部及び腸間膜）、腎臓、膀胱、精巣、卵巣、前立腺、精嚢、子宮、下垂体、副腎、唾液腺、甲状腺（上皮小体含む）、骨格筋、胸骨及び大腿骨、坐骨神経、脳、脊髄

試験の概要：

世代	期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	生育（10週） （1mg/kg群は約9週） 交配（4週） 妊娠（3週） 出産-F1a  哺育（3週）  離乳-F1a	雌2に対し雄1で交配  出産日と翌日のみ投与休止  哺育4日に同腹児10匹に調整	一般症状、体重測定（毎日）測定  妊娠14日に体重測定 外表異常、生存性の観察 親の観察から交尾率、妊娠率、授精率、 受胎率、出産率算出  F1aの体重測定、外表異常を検査し屠殺
	回復（10日間） 交配（4週） 妊娠（3週） 出産-F1b 哺育（3週）  離乳-F1b	（F1aに準ずる） 哺育4日に同腹児10匹に調整 次世代親動物として 雄10匹、雌20匹を選抜  雌雄P動物を屠殺	（F1aに準ずる）  F1bの体重測定、外表異常を検査 親として選抜されなかった児を屠殺・剖 検、必要に応じて病理検査  P親動物雌雄各10例臓器重量測定、 各群雌雄各5匹については病理組織検査
F1	生育（10週） 28日齢より投与開始 交配（4週） 妊娠（3週） 出産-F2a 哺育（3週） 離乳-F2a	（以下P世代に準ずる）	（以下P世代に準ずる）  必要に応じて病理検査
	回復（10日間） F2bのための交配～哺育はF2aに準ずる 離乳-F2b	P世代に準じて次世代 親動物を選抜  雌雄F1動物を屠殺	親として選抜されなかった残りの児を 90日間検体を投与せずに飼育し、屠殺、 全例を剖検  （P世代に準ずる）
F2	F3aのための生育～哺育はF1に準ずる 離乳-F3a		（F1aに準ずる）
	回復（10日間） F3bのための交配～哺育はF1に準ずる 離乳-F3b		外表異常、生存性の観察、全例剖検し、 各群雌雄各10匹について病理検査

結果：結果の概要を表に示した。

親動物；

試験開始時に設けた30mg/kg投与群は雌雄で毒性が強く発現したため、試験開始5週で投与を中止した。

対照群を含めて10mg/kg以下の雌雄の全投与群で気管支肺炎あるいは肺炎によると考えられる死亡例を認めたが一般状態の変化や投与用量との関連もなく検体投与によるものとは思われなかった。体重変化においてはP動物雄の3及び10mg/kg群で統計学的有意差はなかったが対照群に比べて低い傾向が認められた。<sup>注)</sup>

F2母動物の1mg/kgおよび10mg/kg群で心臓重量の統計学的に有意な減少が認められたが、投与量との関連がなく、病理組織学的所見も伴わないことから投与に関連したものとは思われなかった。

交尾率、受精/受胎率などの各種繁殖指標の低下傾向が種々の時点で散見されたが、投与量と関連しない変化であった。

病理組織学的検査において全ての投与群雌雄で前胃粘膜の棘細胞症あるいは過角化症が認められ3mg/kg以上で統計学的有意差が認められた。

- 注) 申請者注：P雄動物の体重の低値傾向は変化に用量との関連が無く、対照に比してもわずかな変化であり統計学的有意差も認めないことから毒性学的に意義のあるものとは思われなかった。また、F2雌動物では3mg/kg群でF3a児妊娠時に有意な体重減少を認めているが、投与用量と関連がなく意義のある変化とは考えられなかった。

児動物；

平均産児数や生存あるいは死亡児数、哺育期間中の生存率等の各種指標に投与群間に差は認めなかった。各世代の離乳児生存率でやや低い数値が散見されたが、投与量と関連する低下は認めなかった。生存児数の減少が特にF1世代の対照群、3及び10mg/kg群児動物で認められたため、F2母動物とするためのF2b児を計画通り得ることができなかった。この生存児数の減少は、3mg/kg群で大きく、投与用量との関連性がないことから、本ラットの系統にみられる変動内のものと考えられた。(変動値は報告書に記載なし。)

各世代での離乳児体重が対照群に比して増減が認められたが投与量との関連は無かった。

外表検査で小型児を、また肉眼的あるいは病理組織学的検査で血腫、膿瘍、水腎症、腎炎、肺炎等が対照群を含めて散見されたが、各所見の発生頻度に投与に関連した傾向は認められなかった。

以上、親動物雌雄全ての投与群で投与量に関連した前胃の棘細胞症及び過角化症が有意に認められた。児動物では明らかな影響は認めなかった。

本試験においてラットの繁殖性への影響はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

申請者注：雌雄親動物では全投与群で胃に所見がみられていることから親動物に対する無毒性量は求められないと考えた。児動物では影響はみられず無毒性量は10mg/kg/日と考えられた。

繁殖性については最高投与用量でも影響は認められず本試験における繁殖性の無毒性量は10mg/kg/日と考えられた。

なお、本試験においては最低投与用量1mg/kg/日でも親動物の胃に所見を認めていることに対して、飲水投与により実施した慢性毒性/発がん性併合試験（毒性資料No. 原体-23）および2世代繁殖試験（毒性資料No. 原体-27）では、いずれの試験においても胃の所見は最高投与量である50ppm（2.88または3.99 mg/kg/日（雌雄平均））でも認められなかった。この差は強制経口投与の場合、MITCを一度に投与しているのに対し、飲水投与の場合はMITCを少量ずつ持続的に摂取させていることによって生じたものと考えられる。

表. 結果の概要 (親動物)

世代		親 : P 児 : F1a, F1b				親 : F1 児 : F2a, F2b				親 : F2 児 : F3a, F3b			
投与量 (mg/kg)		0	1	3	10	0	1	3	10	0	1	3	10
動物数	♂	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	♀	20	20	20	20	20	20	20	20	14	20	11	14
一般症状	♂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
死亡数	♂	2	1	3	3	2	2	2	5	7	3	3	6
	♀	0	4	3	1	3	7	7	4	2	3	4	2
体重変化 数値は対照群を100とした場合の値 ( )内の数値は参考値 (有意差なし)													
体重増加量 (交配前0週)	♂		*)	(94)	(92)		-	-	-		-	-	-
	♀		-	-	-		-	-	-		-	-	-
最終体重	♂		(92)	(88)	(90)		-	-	-		-	-	-
	♀		-	-	-		-	-	-		-	-	-
妊娠4日体重	♀		-	-	-		-	-	-		-	↓82 (F3a)	-
交尾率	a	45	68	38	44	17	42	9	22	18	32	8	32
	b	48	63	31	43	19	41	15	21	42	32	25	18
妊娠率	a	83	91	100	95	92	95	86	80	100	100	100	86
	b	82	90	78	94	78	100	100	100	100	93	100	100
雄の受精率	a	80	80	80	90	57	67	67	86	100	89	75	100
	b	78	100	63	89	63	88	33	60	100	67	100	80
受胎率	a	95	100	100	100	58	95	50	60	63	90	50	86
	b	95	100	78	90	64	93	80	73	89	82	67	64
出産率	a	100	100	95	100	100	100	100	100	89	100	100	92
	b	100	100	100	94	100	100	100	100	100	100	100	100
臓器重量													
心臓: ♀	実重量											↓ 84	
	対体重比											↓ 85	↓ 86
肉眼的剖検所見													
	♂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査所見数													
胃: 検査数	♂	5	5	5	5	8	8	8	5	3	6	6	4
	♀	5	5	5	5	10	9	10	10	8	8	7	8
前胃/棘細胞症;	♂	0	2	↑4	↑5	0	2	3	↑5	0	3	↑5	↑4
	♀	0	2	↑5	↑5	0	3	1	↑10	0	3	↑5	↑8
前胃/過角化症;	♂	0	0	1	↑5	0	1	↑5	↑5	0	0	3	↑4
	♀	0	2	3	↑5	0	1	↑6	↑10	0	0	↑5	↑8

↓ ; p<0.05、↓ ; p<0.01 (ScheffまたはTukeyの多重比較検定)

↑ ; p<0.05、↑ ; p<0.01 (病理検査 Fisher検定/申請者実施)

a : 第1産 b : 第2産 \*): 未実施 - : 所見なし / 異常なし

・交尾率 = 交尾回数(発情周期(5日間)につき交尾1回)/妊娠までに要した発情周期数×100

・妊娠率 = 妊娠動物数/交尾回数×100

・雄の受精率 = 妊娠させた雄の数/妊娠した雌と交配した雄の数×100

・受胎率 = 妊娠した雌の数/受精させた雄と交配した雌の数×100

・出産率 = 分娩動物数/妊娠動物数×100

表. 結果の概要 (児動物)

世 代		親 : P 児 : Fla				親 : P 児 : F1b				
投与量 (mg/kg)		0	1	3	10	0	1	3	10	
動物数	♂	10	10	10	10	9	10	8	9	
	♀	20	20	20	20	20	19	20	19	
出産母動物数		19	19	19	20	18	18	14	16	
児 動 物	平均産児数	10.9	13.3	12.5	11.0	11.3	14.2	12.4	10.2	
	平均生存児数	10.6	13.1	12.2	10.4	10.8	13.1	11.8	9.9	
	平均死亡児数	0.3	0.3	0.3	0.6	0.4	1.1	0.6	0.3	
	4日後生存率	97.5	98.0	99.6	94.7	92.3	93.6	97.0	98.1	
	12日後生存率	86.2	91.1	84.3	84.1	96.8	96.8	76.6	99.3	
	21日後生存率	77.2	81.1	56.2	75.0	87.2	87.9	62.0	96.3	
	21日後生存数	129	154	104	132	136	138	85	131	
	離乳児	♂	100	107	105	105	100	↓87	96	104
	平均体重 <sup>#</sup>	♀	100	105	105	105	100	↓85	100	102
	性比(21日目 雄/雌)		59/70	74/80	54/50	68/64	66/70	71/67	42/43	62/69
外表異常 (所見数)										
0日	検査児数	208	253	238	221	203	256	173	163	
	小型児					1				
21日(離乳児)	検査児数	129	154	104	132	136	138	85	131	
	小型児	5	1	1		3	4	1	1	
肉眼的剖検所見数 ( ) 内は腹数										
動 物	検査児数	-	-	-	-	86	104	54	94	
	腎臓: 腎盂拡張	-	-	-	-	3(2)	0	0	1(1)	
	嚢胞	-	-	-	-	0	0	0	1(1)	
	内耳: 感染症	-	-	-	-	0	0	1(1)	0	
	肺: 膿瘍	-	-	-	-	0	0	0	1(1)	
病理組織学的検査所見数										
動 物	検査児数	-	-	-	-	3	-	-	3	
	腎臓: 水腎症	-	-	-	-	2	-	-	2	
	急性腎盂腎炎	-	-	-	-	1	-	-	0	
	間質/限局性リンパ球浸潤	-	-	-	-	0	-	-	1	
	ネフローゼ	-	-	-	-	0	-	-	1	
	肺: 肺炎	-	-	-	-	0	-	-	1	
	気管支肺炎(多巣性)	-	-	-	-	0	-	-	1	
	膿瘍	-	-	-	-	0	-	-	1	
胸膜炎(限局性)	-	-	-	-	0	-	-	1		

↑ ↓ ; p<0.05、▲ ▼ ; p<0.01 (ScheffまたはTukeyの多重比較検定)

空欄: 所見なし

-: 未実施

<sup>#</sup>: 対照を100とした場合の値

表. 結果の概要 (児動物)

世 代		親 : F1		児 : F2a		親 : F1		児 : F2b		
投与量 (mg/kg)		0	1	3	10	0	1	3	10	
動物数	♂	10	10	10	10	8	9	9	5	
	♀	20	20	20	20	17	16	15	17	
出産母動物数		11	17	6	11	7	13	4	8	
児 動 物	平均産児数	10.1	10.8	12.3	9.5	9.1	12.1	12.0	11.4	
	平均生存児数	9.5	9.6	12.2	9.1	7.9	12.1	11.8	8.9	
	平均死亡児数	0.4	1.2	0.2	0.4	1.0	0.0	0.3	2.5	
	4日後生存率	93.3	86.5	98.6	92.0	76.4	92.4	91.5	81.7	
	12日後生存率	85.7	90.3	93.3	97.6	90.2	93.2	94.4	67.9	
	21日後生存率	63.1	80.6	78.3	81.7	65.9	67.5	61.1	58.5	
	21日後生存数	53	108	47	67	27	79	22	31	
	離乳児 平均体重 <sup>#</sup>	♂	100	↑123	114	▲137	100	↓80	85	85
		♀	100	▲127	118	↑124	100	89	104	96
	性比 (21日目 雄/雌)		27/26	45/63	20/27	35/32	12/15	39/40	11/11	17/14
	肉眼的的外表異常所見数									
	0日 検査児数		111	184	74	104	64	157	48	91
	重複異常		1 <sup>a)</sup>							
21日(離乳児) 検査児数		53	108	47	67	27	79	22	31	
小型児		2	1	1		1				
肉眼的剖検所見数 ( )内は腹数										
検査児数		53	108	47	67	-	-	-	-	
小型児		0	1(1)	0	0	-	-	-	-	
病理組織学的検査所見数										
検査児数		-	-	-	-	-	-	-	-	

↑ ↓ ; p<0.05、▲ ▼ ; p<0.01 (ScheffまたはTukeyの多重比較検定)

<sup>a)</sup>死亡児1例に無顎、耳の位置異常、無眼球

空欄 : 所見なし

- : 未実施

<sup>#</sup> : 対照を100とした場合の値



表. 結果の概要 (児動物)

世 代		親 : F2 児 : F3a				親 : F2 児 : F3b				
投与量 (mg/kg)		0	1	3	10	0	1	3	10	
動物数	♂	10	10	10	10	3	8	7	6	
	♀	14	20	11	14	13	19	9	13	
出産母動物数		8	17	4	11	8	14	2	7	
児 動 物	平均産児数	8.1	11.0	8.0	8.7	9.1	10.9	9.0	10.6	
	平均生存児数	7.8	10.4	6.3	8.1	8.6	9.7	9.0	10.1	
	平均死亡児数	0.3	0.3	0.5	0.4	0.5	1.1	0.0	0.3	
	4日後生存率	90.3	77.4	40.0	83.1	92.8	74.3	100.0	73.2	
	12日後生存率	85.5	87.9	70.0	85.5	84.1	73.3	44.4	81.6	
	21日後生存率	50.9	72.6	50.0	79.7	73.0	57.8	33.3	59.2	
	21日後生存数	28	90	5	55	46	52	6	29	
	離乳児	♂	100	100	145	95	100	↓74	79	93
	平均体重*	♀	100	92	↑138	95	100	82	82	95
	性比 (21日目 雄/雌)		13/15	44/46	1/4	24/31	21/25	22/30	1/5	9/20
	肉眼的的外表異常 (所見数)									
	0日	検査児数	65	187	32	96	73	152	18	74
		小型児						2		1
	血腫								3 <sup>b)</sup>	
	臍帯ヘルニア					1 <sup>c)</sup>				
21日 (離乳児)	検査児数	28	90	5	55	46	52	6	29	
	小型児					1				
肉眼的剖検所見数 ( ) 内は腹数										
	検査児数	-	-	-	-	45	45	6	27	
	子宮 : 膿瘍	-	-	-	-	0	1(1)	0	0	
主な病理組織学的検査所見数										
	♂	-	-	-	-					
	♀	-	-	-	-					

↑ ↓ ; p<0.05、↑↓ ; p<0.01 (ScheffまたはTukeyの多重比較検定)

空欄 : 所見なし

- : 未実施

<sup>b)</sup> 1日に観察

<sup>c)</sup> 4日に観察

\* : 対照を100とした場合の値

(2) ラットを用いた繁殖毒性試験 (2世代)

(毒性資料No. 原体-27)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 1987年

検体の純度:

供試動物: SD (Cr1:CD) 系ラット、1群雌雄各30匹、投与開始時5週齢

投与期間: P世代 ; 投与開始からF1児離乳までの19週間

F1世代 ; 離乳後からF2児離乳までの20週間、F2世代 ; 離乳直後屠殺  
(1985年4月25日~1986年2月13日)

投与方法: 検体を飲料水に加えて0、2、10及び50ppmの濃度の飲水として自由摂取させた。検体の調製は濃度1000ppmの調製用原液を毎週1回調製し、これに飲料水を加えて各濃度の飲水投与試料を週3回調製した。飲水中の検体の安定性を毎週分析して確認した。

用量設定根拠;

交配・選抜及び観察・検査項目: 概要を表に示した。

一般状態及び死亡率; 全動物の全検査期間に一般状態及び生死を毎日観察した。

体重; 全動物について毎週1回測定した。また妊娠動物は妊娠1、6、12、15及び20日、哺育1、7、14及び21日に測定した。

児動物は生後1、4、7、14及び21日に測定した

飲水量; 交配前及び哺育期間における飲水量をケージ毎に毎日測定した。また、雌は哺育期間中についても測定した。

交配及び妊娠の確認; 交配は雌雄1対1で20日間同居させ、交配が最初の14日間 (P世代) 又は17日間 (F1世代) に認められなかった時は雄を交換した。交配は膺スメア標本に精子を認めることで確認し、精子が認められた日を妊娠0日とした。

妊娠の確認は出産をもって行った。

F1世代の選抜; F1児の離乳時、親動物から児を雌雄各1匹選抜して各群雌雄各25匹をF1世代として選抜した。

繁殖性に関する指標; 交配、妊娠、出産、哺育時の観察に基づき、次の指標を算

出した。

- ・ 交配率 = [交配雌数 / 受精に必要な発情回数 (5日=1回発情)] × 100
- ・ 受胎率 = (妊娠雌数 / 交配に用いた雌数) × 100
- ・ 妊娠率 = (妊娠雌数 / 交配雌数) × 100
- ・ 出産率 = (生存児を出産した雌数 / 妊娠雌数) × 100
- ・ 4日生存率 = (4日生存児数 / 1日生存児数) × 100
- ・ 7日生存率 = (7日生存児数 / 4日生存児数) × 100
- ・ 14日生存率 = (14日生存児数 / 7日生存児数) × 100
- ・ 21日生存率(a) = (21日生存児数 / 14日生存児数) × 100
- ・ 21日生存率(b) = (21日生存児数 / 1日生存児数) × 100
- ・ 離乳前死亡率 = [(出産児数 - 21日生存児数) / 出産児数] × 100
- ・ 性比 1 : 雌数 / 雄数

生存・死亡児及び性別；出産時の生存及び死亡児数と性別、生後1、4、7、14及び21日の生存児数と性別を検査した。

発育指標；全児について耳介開展、切歯萌出及び眼瞼開裂時期を検査した。

機能検査；対照群及び50ppm群のF1及びF2児について、次の検査を行った。

生後1日 - 尾部圧迫、正向反射

生後17日 - 自由落下反射

生後21日 - 筋力、瞳孔反射、視覚性起き直り反応、聴覚性驚愕反応

肉眼的病理検査；生存動物及び屠殺動物を含め、全例のP親動物、F1児、F1親動物、F2児について、屠殺時の外表及び主要臓器の異常について検査した。

雌は子宮の内容を検査し、卵巣の黄体数を数えた。交配後、妊娠25日までに出産しなかった雌は屠殺・剖検し、子宮の着床の有無を硫化アンモニウム溶液で検査した。

臓器重量；P及びF1親動物は各群雌雄各10匹、出産または妊娠しなかった全ての親動物について、また、児 (F1、F2) は各群とも10腹 (但し、F2児の2ppm群は8腹) から雌雄各1例の児を選抜し、以下の臓器を採取して重量を測定し、対体重比も求めた。

副腎、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、前立腺・精嚢、下垂体、精巣、精巣上体、子宮・膣

病理組織学的検査；対照群及び50ppm群雌雄各10匹の親動物 (P、F1) から採取した以下の臓器、また未妊娠動物から採取した生殖器官について、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、病理組織学的に検査した。

副腎、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、前立腺・精嚢、下垂体、精巣、精巣上体、子宮・膣、肉眼的異常部位

試験の概要：

世代	期間 (週間)	交配・調整・選抜	観察検査項目
P	生育 (10週) 交配 (3週) 妊娠 (3週) 出産 (F1) 哺育 (3週)	雌雄1対1で交配、交配は精子で確認 (妊娠0日)	体重、摂餌量、飲水量を毎週測定  妊娠0、6、12、15及び20日に体重測定  出産状況の観察：出産児数、性別、外表異常、生存児体重測定  哺育1、7、14及び21日母体重測定 哺育1-7、8-14、15-21日の飲水量を測定 児の発育指標 (耳介開展、切歯萌出及び眼瞼開裂時期) 検査 生後1、17及び21日児に機能検査 生後7、14及び21日に生存児数、体重測定
F1	離乳  生育 (11週) 交配 (3週) 妊娠 (3週) 出産 (F2) 哺育 (3週)	継代用の雌雄を各群25腹から各1例ずつ体重の中央値に近いものから選抜、他は屠殺 親動物は離乳後屠殺  (P世代に準ずる)  (P世代に準ずる)	全例の外表・内臓異常検査； 剖検：親の全例、児は10腹から雌雄各1例 臓器重量：親は雌雄各10例及び不妊の雌全例、児は10腹から雌雄各1例 病理組織学的検査：対照群、50ppm群親の雌雄各10例、不妊の全例  (P世代に準ずる)  (P世代に準ずる) (P世代に準ずる)
F2	離乳	離乳後全動物を屠殺	全例の外表・内臓異常検査 剖検：親の全例、児は10腹から雌雄各1例 (2ppm群は8腹) 臓器重量：親は雌雄各10例 (但し、F1 2群は雄9例、1及び2群は雌11例) 及び不妊の全例、児は10腹から雌雄各1例 (2ppm群は 8腹) 病理組織学的検査：対照群、50ppm群親の雌雄各10例、不妊の全例

結果：結果を次の表に示した。

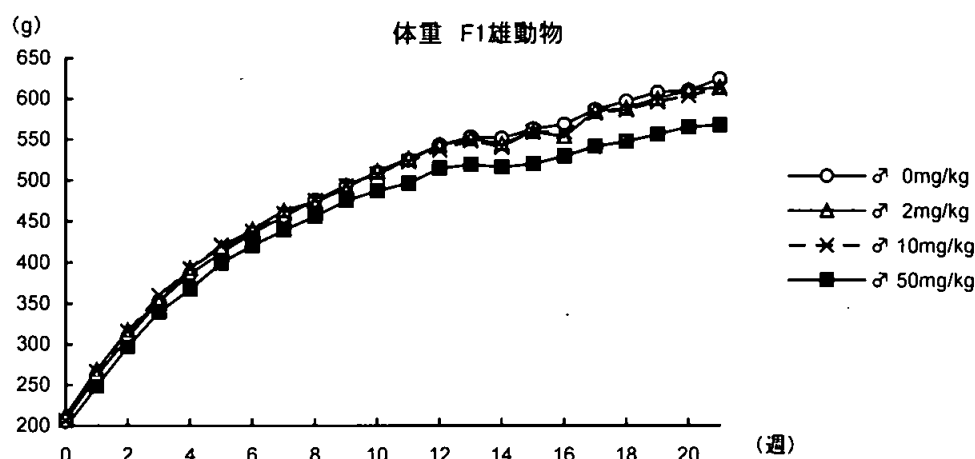
親動物；

P及びF1動物に投与に関連すると考えられる一般状態の変化は認めなかった。

体重変化においては体重増加量でP世代雄の50ppm群の8～11週の間で一時的な減少傾向（有意差なし）がみられたが一転して、10及び50ppm群の10～16週の間で対照群に比べ統計学的に有意な増加が認められた。P世代雌では10及び50ppm群で0～7週の間で対照群に比べ統計学的に有意な減少が認められた。しかし、P世代雌雄いずれもわずかな変化で増減が一貫しない変動が用量との関連が明らかでなく、投与に関連しないものと考えられた。

一方、F1世代では、50ppm群雄で対照群に比べ、14～21週の間で統計学的に有意な体重増加量の減少（対照100に対して71）が認められた。<sup>注1)</sup>

注1) 申請者注：雄のF1動物14～21週の間での体重増加量の減少が統計学的有意であり、以下に示したようにこの群では対照群との体重増加の差が徐々に拡大しており、毒性影響を示唆したものと考えられた。



交配前期間のP世代及びF1世代50ppm群雌雄、10ppm群ではP世代雄、F1世代雌で対照群に比べ有意に飲水量が減少し、また、雌の哺育期間でP世代では10及び50ppm、F1世代では50ppm群で飲水量が有意に減少した。<sup>注2)</sup>

注2) 申請者注：飲水量の減少が50ppmで対照群に比して有意であった。また、10ppmでもP世代雄の交配前期間、雌の哺育時、F1雌の交配前期間の減少が有意であったが、変化に2世代を通じての一貫性がなく、また、その減少の程度は50ppm群に比べて小さかった。これらの飲水量の減少は検体が有する西洋わさび様の刺激臭による忌避作用と考えられた。検体投与したいずれの群にも一般状態、肉眼的及び病理組織学的検査において毒性影響を示唆する明らかな影響がないことから忌避作用による飲水量減少には毒性学的意義はないものと考えられた。

摂餌量ではいずれの世代も雌雄共に対照群との差は認められなかった。

臓器重量ではP世代50ppm群雌に下垂体の実重量及び対体重比に有意な増加が認められたが、わずかな変化で関連した病理組織学的所見も伴わなかった。

F1世代では10ppm群雌の副腎実重量に有意な増加が認められたが、対体重比に

有意な差はなく用量との関連も認められず、投与と関連しないものと考えられた。肉眼的及び病理組織学的検査でも、投与に関連した変化は認めなかった。

繁殖性に関する指標では各世代で一定した変化は認められず、投与による影響は認められなかった。

#### 児動物；

F1において腹当り出産児数が10及び50ppm群で対照群に比べ若干少なかったが、統計学的に有意差は認めず、F2では同様な傾向はみられなかった。また、投与群において、F1及びF2児の離乳前死亡率が対照群に比してやや高かったが用量との関連がなく、また対照群の離乳前死亡率が通常より低かったこと、また、F2ではF1より低率であったことなどから、投与と関連しないものと考えられた。F1及びF2児の体重推移において統計学的有意な変化は認めなかった。

剖検において水頭症がF1児に10及び50ppm群で各2例、F2児2ppm群1例が認められたが、F2児の高用量群では認められていないこと、また試験施設において本系統のラットに自然発生することが知られていることから、偶発的なもので投与に関連はないものと考えられた。

耳介開展、切歯萌出及び眼瞼開裂、機能検査で各世代に一貫した変化は認められず、投与による影響はないものと考えられた。

以上の結果より、2世代にわたり本検体を飲水に混入して投与した場合、親動物では50ppm群F1雄で体重増加の減少が認められた。従って、本剤の無毒性量は雌雄共に10ppm (P：雄0.76mg/kg/日、雌1.01mg/kg/日、F1：雄0.71mg/kg/日、雌0.87mg/kg/日) <sup>注3)</sup> と判断される。

繁殖性については試験した最高用量50ppmでも影響はないものと考えられた。

<sup>注3)</sup> 申請者注：母動物及び児動物に投与と関連性のある毒性影響は認められていないことから、雌親動物の無毒性量は50ppm (P：4.76mg/kg/日、F1：4.22mg/kg/日) 児の無毒性量は50ppm (P：雄3.58mg/kg/日、雌4.76mg/kg/日、F1：雄3.40mg/kg/日、雌4.22mg/kg/日) と判断される。

表. 結果の概要 (親動物)

世 代		親 : P				親 : F1				親 : F1				児 : F2			
投与量 (mg/kg)		0		2		10		50		0		2		10		50	
動物数	♂	30		30		30		30		25		25		25		25	
	♀	30		30		30		30		25		25		25		25	
一般状態	♂♀	-		-		-		-		-		-		-		-	
死亡数	♂	0		0		0		0		0		0		0		0	
	♀	0		0		0		0		0		2 <sup>a)</sup>		0		0	
体重増加 *	♂ 8-11週			(101)		(94)		(80)									
	♂ 10-16週					↑ 126		↑ 141									
	♂ 14-21週															↓ 71	
	♀ 0-7週					↓ 91		↓ 93									
妊娠・哺育期間	♀	-		-		-		-		-		-		-		-	
摂餌量	♂	-		-		-		-		-		-		-		-	
	♀	-		-		-		-		-		-		-		-	
飲水量 *	♂ 1-3週					↓ 94		↓ 79								↓ 84	
	♂ 4-6週					↓ 91		↓ 79								↓ 81	
	♂ 7-10週							↓ 78								↓ 76	
	♀ 1-3週															↓ 77	
	♀ 4-6週							↓ 79				↓ 85				↓ 73	
	♀ 7-10週							↓ 77				↓ 86				↓ 70	
哺育期間	♀					↓ 89		↓ 80								↓ 74	
検体摂取量 (mg/kg/日)	♂	-		0.16		0.76		3.58		-		0.15		0.71		3.40	
	♀	-		0.21		1.01		4.76		-		0.19		0.87		4.22	
交配率		93.8		92.9		90.9		100.0		89.3		100.0		82.1		96.0	
受胎率		100.0		93.3		96.7		90.0		96.0		87.0		84.0		100.0	
妊娠率		100.0		100.0		96.7		90.0		96.0		95.2		87.5		100.0	
出産率		100.0		100.0		100.0		100.0		100.0		100.0		100.0		100.0	
妊娠期間 (日)		22.6		22.6		22.5		22.8		22.6		22.2		22.3		22.0	
臓器重量 *																	
下垂体 実重量	♀							↑ <sup>b)</sup>									
	♀							↑ <sup>c)</sup>									
副腎 実重量	♀											↑ 114					
肉眼的剖検	♂♀	-		-		-		-		-		-		-		-	
病理組織学的検査	♂♀	-		-		-		-		-		-		-		-	

↑ ↓ ; p<0.05、↑ ↓ ; p<0.01 (ANOVA, Kruskal-Wallis、t-検定またはWilcoxon検定)

<sup>a)</sup> 外傷のため屠殺

<sup>b)</sup> 下垂体 ; 実重量0.02g (対照群0.01g)

<sup>c)</sup> 下垂体 ; 対体重比0.01 (対照群0.00)

- : 所見なし/異常なし

\* 数値は対照を100とした場合の値

( )内の値は参考値 (有意差なし)

表. 結果の概要 (児動物)

世 代		親 : P 児 : F1				親 : F1 児 : F2				
投与量 (mg/kg)		0	2	10	50	0	2	10	50	
動物数	♂	30	30	30	30	25	25	25	25	
	♀	30	30	30	30	25	25	25	25	
児 動 物	平均産児数	14.6	14.7	13.8	13.7	11.0	11.4	12.3	11.0	
	平均生存児数	14.3	13.9	13.4	13.5	10.8	11.0	11.2	10.6	
	平均死亡児数	0.3	0.8	0.4	0.2	0.3	0.4	1.1	0.4	
	性比 (1:雌/雄)	1:0.94	1:1.16	1:0.95	1:1.17	1:1.00	1:1.15	1:1.11	1:0.89	
	4日後生存率	99.0	89.5	92.8	97.5	96.4	97.3	92.4	92.9	
	7日後生存率	100.0	99.7	98.6	99.2	97.9	98.6	99.5	99.6	
	14日後生存率	97.3	95.0	89.0	93.9	100.0	99.0	99.5	99.1	
	21日後生存率(a)	98.8	98.2	98.2	96.5	99.6	99.0	100.0	99.6	
	21日後生存率(b)	95.2	83.2	78.7	86.8	94.0	94.1	91.5	91.3	
	離乳前死亡率	6.6	21.0	23.5	14.4	8.3	9.3	16.7	11.8	
	離乳前平均死亡数	1.0	3.1	3.2	2.0	0.9	1.1	2.1	1.3	
	1日平均体重 (g)	♂	6.4	6.2	6.4	6.4	6.5	6.4	6.3	6.2
		♀	6.0	5.8	6.0	6.0	6.1	6.1	6.0	5.8
	21日平均体重 (g)	♂	38.5	41.3	41.8	39.7	42.2	41.3	41.7	40.3
		♀	36.9	40.0	39.2	38.6	40.9	40.2	40.9	38.1
	機能検査 (1, 17, 21日)	♂♀	-	---	---	-	-	---	---	-
耳介開展		-	-	-	-	-	-	-	-	
切歯萌出		-	-	-	-	-	-	-	-	
眼瞼開裂		-	-	-	-	-	-	-	-	
臓器重量		-	-	-	-	-	-	-	-	
肉眼的剖検 水頭症		-	-	2	2	-	1	-	-	

(ANOVA、Kruskal-Wallis、t-検定またはWilcoxon検定)

- : 投与に関連する所見/変化なし

--- : 未実施



(3) ラットを用いた催奇形性試験

(毒性資料No. 原体-28)

試験機関：

報告書作成年：1983年

検体の純度：

供試動物：：CD(SD)系(Cr1;BR)妊娠ラット(10~11週齢)1群雌24~28匹

投与期間：妊娠第6日から第15日までの10日間投与  
(試験実施 1982年4月29日~1982年6月30日)

投与方法：検体をコーン油に溶解し、1、5及び25mg/kgの投与量(投与容量10ml/kg)で毎日1回強制経口投与した。また、コーン油のみを投与した対照群を設けた。

用量設定根拠：

雄1匹に雌2匹を同居させ、膣スミア標本の精子の存在で交配を確認した。精子を確認した日を妊娠0日とした。

観察・検査項目：

親動物；行動の変化、一般状態を毎日観察し、体重及び摂餌量を妊娠0、3、6、9、12、15、18及び20日に測定した。妊娠第20日に屠殺後、帝王切開し、剖検して肉眼的観察、妊娠子宮重量、黄体数、着床数、生存胎児数及び死亡胎児数について検査した。

生存胎児；性別、体重、頭部/臀部長及び外表を検査し、各同腹児の2/3を剖検して内臓を検査、摘出してアリザリンレッドS染色骨格標本とし骨格検査に供した。残りの児はブアン固定液で固定後、カミソリで頭部切片を作製し、また他の部位は解剖して検査した。

試験結果：概要を表に示した。

投与に関連した一般状態の変化は認めなかった。

親動物での投与期間中(妊娠6~15日)の体重増加量が25mg/kg群で有意に低く、5mg/kgでもわずかながら低値(有意差なし)で投与の影響と考えられた。25mg/kg群では投与期間中の摂餌量が有意に減少し、投与終了後妊娠15~18日の摂餌量の減少程度はわずかとなったものの有意差を認めた。

申請者注：25mg/kg群の投与開始後、最初の期間摂餌量(妊娠6~9日)が対照に比して低かった(66%)が、妊娠9日の体重は投与開始時よりもわず

かに低かったものの (-1g(-0.4%))、対照に比して97%と同等で影響を伴わないものであり、投与開始初期では体重及び摂餌量ともに影響は認められなかったものと考えられる。

妊娠率、妊娠子宮重量、帝王切開時の観察に投与による影響は認めなかった。剖検では25mg/kg群で胃粘膜の肥厚/胃への内臓癒着を27例中24例に認め、5mg/kg群でも胃粘膜の肥厚が28例中1例に認められた。

児動物では25mg/kg群で対照群に比べ胎児体重及び頭部/臀部長が有意に小さくわずかに発育が遅滞した。

外表検査では投与に関連した異常は認めなかった。

内臓検査で25mg/kg群に両側性に腎尿管拡張症の頻度(11例, 3.3%)が対照群(2例, 0.7%)に比して高かったが、背景値の発生率(2.7~3.3%)の範囲内にあり、対照群での発生がやや低かったことから投与による影響とは思われなかった。

骨格検査では主に25mg/kg群で頭骨に軽度の化骨遅延頻度の増加を認め、胎児体重が低かったことと関連したものと考えられた。<sup>注)</sup>

注) 申請者注：申請者の実施した統計解析で5mg/kg群の頭頂間骨化骨遅延所見の頻度(28例, 14.3%)が有意となったが、背景値の発生率(6.2~12.0%)と比しても顕著な差はなく、他に有意差をもった頻度の増加所見もなく軽度な化骨遅延所見であるため毒性学的に意義のある頻度の増加とは思われなかった。

25mg/kg群は母動物の摂餌量、体重増加量が有意に減少し、胃粘膜の肥厚や胃への内臓癒着が認められた。また、5mg/kg群でも有意差のないわずかな体重増加量の減少がみられ、1例のみに胃粘膜の肥厚を認めた。

25mg/kg群母動物の顕著な体重増加量減少と摂餌量低下に伴う二次的な影響として胎児の発育遅滞があり、軽度の化骨遅延となって現れたが、母動物の体重や摂餌に顕著な影響がみられない用量では児への影響は認めなかった。

従って、本試験における無毒性量は母動物で1mg/kg、児動物に対しては5mg/kgと判断された。

催奇形性作用は認められなかった。

結果の概要：

投与群 (mg/kg/日)		0	1	5	25	
親動物	動物数	26	24	28	27	
	一般状態 <sup>a)</sup>	7	4	2	14	
	死亡数	0	0	0	0	
	妊娠数 (%)	23 (88.5)	21 (87.5)	23 (82.1)	24 (88.9)	
	体重増加量 <sup>#</sup>	妊娠 6-15日	-	-	(93)	↓67
		妊娠 0-20日 <sup>b)</sup>	-	-	(87)	↓77
	摂餌量 <sup>#</sup>	妊娠 6-9日	-	-	-	↓66
		妊娠 9-12日	-	-	-	↓84
		妊娠 12-15日	-	-	-	↓84
		妊娠 15-18日	-	-	-	↓92
	着床所見	妊娠 6-15日	-	-	-	(79)
		妊娠 0-20日	-	-	-	(90)
	着床所見	黄体数 (腹当り)	331 (14.4)	307 (14.6)	323 (14.0)	362 (15.1)
		着床数 (腹当り)	286 (12.4)	284 (13.5)	300 (13.0)	352 (14.7)
生存胎児数 (腹当り)		270 (11.7)	268 (12.8)	282 (12.3)	337 (14.0)	
着床前死亡率		13.6	7.5	7.1	2.8	
着床後死亡数 (早期)		14	14	17	13	
着床後死亡数 (後期)		2	2	1	2	
総着床後死亡数 (%)		16 (5.6)	16 (5.6)	18 (6.0)	15 (4.3)	
剖検	胃粘膜肥厚・癒着	0	0	1	24	
児動物	平均胎児体重 <sup>#</sup>	-	-	-	↓91	
	頭部/臀部長 <sup>#</sup>	-	-	-	↓97	
	性比 (雄:雌)	1:0.93	1:1.21	1:0.97	1:0.98	
	外表異常	検査数	270	268	282	337
		奇形[腹数]-皮下出血	4(1.5)	1(0.4)	5(1.8)	5(1.5)
	内臓異常	検査数	270	268	282	337
		変異[腹数]-水晶体混濁	117[17]	97[15]	85[18]	99[17]
		奇形[腹数]-水腎症	2 [2]	1 [1]		1 [1]
		両側性尿管拡張	2 [1]	6 [5]	4 [3]	↑11 [↑8]
		腎盂空洞化	10 [6]	1 [1]	1 [1]	13 [6]
		心室拡張	1 [1]			
		無眼球/小眼球		1 [1]		1 [1]
	骨格異常	検査数	187	185	196	232
		化骨遅延/未骨化[腹数]-				
頭頂骨化骨遅延		2[2]	1[1]	6 [4]	8 [3]	
頭頂間骨化骨遅延		13[6]	14[6]	↑28[11]	↑42[↑15]	
後頭骨化骨遅延		13[6]	2[2]	15 [9]	↑57[↑17]	
第1-4胸骨分節化骨遅延/未骨化		1[1]	4[4]	4 [3]	↑11 [5]	
中足骨化骨遅延			3[2]	1 [1]	↑7 [5]	
奇形[腹数]-短小肋骨				2 [1]		

↓ ; p<0.05、↓ ; p<0.01 (ANOVA, Kruskal-Wallis, t-検定またはWilcoxon検定)  
 ↑ ; p<0.05、↑ ; p<0.01 (Fisher検定/外表・内臓・骨格検査結果について申請者実施)  
<sup>#</sup>数値は対照を100とした場合の値 (摂餌量、体重及び頭部/臀部長、()内は参考値(有意差なし))  
<sup>a)</sup>被毛の汚れ (口周囲及び頭部など) <sup>b)</sup>妊娠子宮重量で補正した体重より求めた増加量  
 -: 著変なし

(4) ウサギを用いた催奇形性試験

(毒性資料No. 原体-29)

試験機関：

報告書作成年：1984年

検体の純度：

供試動物：ニュージーランドホワイト系妊娠ウサギ（交配時雌体重 3.2～4.4kg）  
1群雌16匹

投与期間：妊娠第7日から第19日まで13日間投与  
（1983年7月4日～1983年7月25日）

投与方法：検体をコーン油に溶解し、1、3及び5mg/kgの投与量（投与容量2ml/kg）  
で毎日1回強制経口投与した。また、コーン油のみを投与した対照群を設  
けた。

用量設定根拠：

雌雄1:1で自然交配させ、交尾した雌の排卵を確実にするため絨毛性ゴナ  
ドトロピンを耳介静脈から投与した。交配日を妊娠0日とした。

観察・検査項目：

親動物：行動の変化、死亡、一般状態を毎日観察し、体重及び摂餌量を妊娠0、  
7、10、13、16、19、24及び29日に測定した。妊娠第29日に屠殺後、帝王  
切開して剖検し、妊娠子宮重量、黄体数、着床数、生存胎児数及び死亡胎  
児数について検査した。

生存胎児：性別、体重、頭部/腎部長及び外表異常、内臓の異常を検査した。検  
査後、内臓を摘出して70%メチルアルコールに浸漬して固定後、冠状縫合  
にそって切断して脳の異常を検査した後、アリザリンレッドS染色標本と  
して骨格を検査した。

試験結果：概要を表に示した。

親動物ではウサギに一般的にみられる鼻汁あるいは肛門周囲の汚れが対  
照群を含めて各投与群で観察されたが、いずれの投与群にも統計学的有意  
差は認められなかった。

体重の変化ではいずれの期間も統計学的有意差は認めなかったが、5mg/  
kgで投与期間中（妊娠7～19日）の体重増加量が少なかった。妊娠子宮重  
量で補正した妊娠期間中の体重増加量は5mg/kg群で最も低かった。

摂餌量では投与期間中は5mg/kg群で対照群に比して少なかった（有意差な  
し）。投与終了後では摂餌量は増加した。

申請者注：5mg/kg群で初回測定（投与開始3日後）体重が投与開始時よりも  
わずかに低く（3.77kgから3.73kg（-1.1%）、同時期の摂餌量も軽度に低  
かった（対照の87%）が、体重は対照群と比した場合では、101%であり、  
投与開始3日後の体重及び摂餌量の僅かな変動は投与開始初期の毒性影  
響とは判断しなかった。

妊娠率、帝王切開時の観察に投与による影響は認めなかった。対照群で片側子宮角のみの着床・妊娠頻度(14例中3例)が高く、これにより対照群の着床前死亡率が高かった。

剖検では対照群を含めて全ての群で少数例に胃粘膜の発赤がみられたが、群間での差は認めなかった。

児動物では5mg/kg群で体重及び頭部/臀部長が対照群に比べ有意に小さかった。外表及び骨格検査では所見を散見したがその発現に用量との関連や一定の傾向もなく投与に関連したものとは思われなかった。

内臓検査では5mg/kg群で動脈管遺残がみられ、この所見を有した胎児は概して体重が低く成長の遅滞に関連したものと考えられた。また、全ての投与群で総頸動脈の位置異常がみられたが5mg/kg群での発生率(6例, 4.4%)がやや多かったが、対照群(2例, 2.5%)でも認められていることから投与と関連したものとは結論しなかった。

5mg/kg群では、母動物の摂餌量及び体重の減少を生じた。その結果、胎児発育がわずかに遅滞した二次的影響として軽度の内臓異常が対照群に比べわずかに多く認められたが、母動物への影響がみられない用量では児への影響は認めなかった。

従って、本試験における無毒性量は母動物及び児共に3mg/kgと判断された。

催奇形性作用は認められなかった。

結果の概要：

投与群 (mg/kg)		0	1	3	5	
親動物	動物数	16	16	16	16	
	一般状態 <sup>a)</sup>	2	2	5	5	
	死亡数	0	0	0	0	
	妊娠数 (%)	14 (87.5)	15 (93.8)	16 (100)	16 (100)	
	体重増加量 妊娠7-19 (増加率%) 妊娠0-29日 <sup>b)</sup>	7.1 4.8	5.7 3.9	5.6 5.6	4.2 3.3	
	摂餌量 <sup>c)</sup> 妊娠7-19 妊娠0-29日		101 108	100 105	85 103	
	着床所見	黄体数 (腹当り)	115 (8.2)	136 (9.1)	125 (8.3)	146 (9.1)
		着床数 (腹当り)	96 (6.9)	131 (8.7)	119 (7.9)	141 (8.8)
		生存胎児数 (腹当り)	79 (5.6)	124 (8.3)	106 (7.1)	136 (8.5)
		着床前死亡率	16.5	3.7	4.8	3.4
		着床後死亡数 (早期)	6	1	8	0
		着床後死亡数 (後期)	11	6	5	5
		総着床後死亡数 (%)	17 (17.7)	7 (5.3)	13 (10.9)	5 (3.5)
		剖検 胃粘膜発赤	2	4	3	3
児動物	平均胎児体重 <sup>d)</sup>				↓ 88	
	頭部/臀部長 <sup>d)</sup>				↓ 96	
	性比 (雄 : 雌)	1 : 0.72	1 : 0.80	1 : 1	1 : 0.94	
	外表異常 検査数	79	123	106	136	
	奇形[腹数]- 皮下出血 弯曲肢	1[1]	1[1]			
	内臓異常検査数	79	123	106	136	
	奇形[腹数]- 口蓋裂 内水頭症 総動脈幹遺残 水腎症	1[1] 1[1]		1[1] 2[2]	1[1]	
	肺動脈弁閉鎖-大動脈弓膨張 下行大動脈狭窄 外頸静脈うっ血 動脈管遺残 総頸動脈位置異常	2[2]	1[1]	3[2]	1[1] 1[1] 1[1] 5[4] 6[6]	
	骨格異常 検査数	79	123	106	136	
	化骨遅延[腹数] - 前頭骨 頭頂骨 奇形[腹数]- 拇指欠損/痕跡 重複奇形 <sup>e)</sup> 前頭骨癒合 左中手骨/指骨位置異常	15[6] 1[1]	↓ 11[7]	25[7] 3[2] 1[1] 1[1] 1[1]	25[7]	

↓ ; p<0.05、↓ ; p<0.01 (ANOVA, Kruskal-Wallis, t-検定またはWilcoxon検定)

↓ ; p<0.05 (Fisher検定/外表・内臓・骨格検査結果について申請者実施)

<sup>d)</sup> 数値は対照を100とした場合の値 (摂餌量、児体重及び頭部/臀部長)

<sup>a)</sup> 鼻汁/肛門周囲の汚れ <sup>b)</sup> 妊娠子宮重量で補正した体重より求めた増加量

<sup>c)</sup> 椎骨、胸骨分節及び肋骨 癒合/非対称

## 12. 変異原性

### (1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料No. 原体-30)

試験機関:

報告書作成年: 1978年

検体の純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (TA-1535、TA-1537、TA1538、TA-98、TA-100) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 (WP2<sub>hcr</sub>) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下でAmesらの方法で変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解し、0.5~1000  $\mu$ g/プレートの範囲の8濃度を2連で実施した。なお、検体の強い揮発性から軟寒天へ検体を混入させることが困難であったため、溶解した検体0.1mlを円形ろ紙にしみ込ませ、シャーレの蓋に置いてビニールで密封し、蓋を下側にして37°Cで揮発させて培養した。培養48時間で100  $\mu$ g/プレート以上の培養コロニーが小さかったため、培養72時間後にコロニー数を再計数した。

試験結果: 検体はS-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても、復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。

一方、陽性対照として用いたAF-2、 $\beta$ -プロピオラクトン、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-アミノアントラセン (S9+) では、著名な復帰変異コロニーの増加を誘起した。

以上の結果から、代謝活性化を含む本試験条件下で検体に復帰変異誘発性は認められなかった。

48時間培養：

(表中の数値は2反復の平均)

薬 剤	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			WP2 <sub>hcr</sub>	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
溶媒対照 (DMSO)			16	17	127	13	14	21	
検体	0.5	-	16	13	130	7	12	28	
	1		14	16	108	6	10	27	
	5		15	12	115	2	11	25	
	10		18	8	114	5	8	22	
	50		12	5	69	3	5	11	
	100		10	0	54	3	1	3	
	500		5	0	0	*1	*0	*0	
	1000		*	*	*0	*	*	*	
溶媒対照 (DMSO)			10	13	131	7	15	17	
検体	0.5	+	13	15	127	7	22	24	
	1		13	9	111	7	19	25	
	5		11	7	116	8	13	23	
	10		14	12	113	4	9	22	
	50		11	11	64	6	5	17	
	100		5	5	52	1	2	10	
	500		5	3	56	4	*1	6	
	1000		0	0	*0	*	*	*	
陽性対照	2-AA	10	-	17	18	170	15	23	36
		10	+	105	437	>3000	584	>3000	>3000
	AF-2	0.05	-			1217			
		0.1							263
		0.25		1202					
	$\beta$ -p	50			1576				
	9-AA	200					>10000		
	2-NF	50						>3000	

\*：生育阻止

AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

$\beta$ -p： $\beta$ -プロピオラクトン

9-AA：9-アミノアクリジン

2-NF：2-ニトロフルオレン

2AA：2-アミノアントラセン



72時間培養：

(表中の数値は2反復の平均)

薬 剤	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			WP2 $hcr$	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
溶媒対照 (DMSO)			21	23	135	15	20	24	
検体	0.5	-	22	21	142	8	17	31	
	1		21	24	123	9	14	31	
	5		22	19	136	7	15	30	
	10		24	16	132	6	13	27	
	50		18	6	81	5	10	15	
	100		16	3	81	4	4	6	
	500		14	10	71	*5	*1	*10	
	1000		*	*	*33	*	*	*	
溶媒対照 (DMSO)			19	19	143	15	27	28	
検体	0.5	+	17	19	135	16	31	33	
	1		17	11	124	14	24	33	
	5		16	9	125	12	20	32	
	10		18	14	122	7	14	34	
	50		13	14	74	9	8	25	
	100		10	6	61	5	5	12	
	500		12	5	127	9	*8	10	
	1000		8	7	*108	*	*	*	
陽性 対照	2-AA	10	-	21	27	177	15	33	42
		10	+	115	481	>3000	594	>3000	>3000
	AF-2	0.05	-			1235			
		0.1							264
		0.25		1236					
	$\beta$ -p	50			1602				
	9-AA	200					>10000		
	2-NF	50						>3000	

\*：生育阻止

AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

$\beta$ -p： $\beta$ -プロピオラクトン

9-AA：9-アミノアクリジン

2-NF：2-ニトロフルオレン

2AA：2-アミノアントラセン

(2) 細菌を用いたDNA修復試験

(毒性資料No. 原体-31)

試験機関：

報告書作成年：1978年

検体の純度：

試験方法：枯草菌の組換修復機構保持株(H-17)と欠損株(M-45)を用い、Rec-assay法でDNAの損傷の誘発性を検定した。

両菌株を出発点が接触しないように培地上にストリークし、DMSOに溶解した検体0.02mlを直径10mmのろ紙にしみ込ませ、ストリーク開始点にろ紙を置き、37℃で48時間培養し、阻止帯の長さを測定した。

濃度は20~2000  $\mu$ g/ディスクの範囲で6濃度とした。

試験結果：

薬物	濃度 ( $\mu$ g/ディスク)	阻止域(mm)		差(mm)
		M45	H17	
対照 (DMSO)		0	0	0
検体	20	0	0	0
	100	0	0	0
	200	0	0	0
	500	0	0	0
	1000	0	0	0
	2000	0	0	0
陰性対照 カナマイシン	10	6	4	2
陽性対照 マイトマイシンC	0.1	10	0	10

検体は両菌株に全く生育阻止を認めなかった。一方、陽性対照として用いたマイトマイシンCでは両菌株の間に著名な生育阻止の差が生じた。

以上の結果より、本試験条件下で検体にDNA損傷性は認められなかった。

(3) チャイニーズハムスターV79細胞を用いたHGPRT試験

(毒性資料No. 原体-32)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1984年

検体の純度：

試験方法：チャイニーズハムスター由来のV79細胞を用い、代謝活性化存在下(+S9mix)および非存在下(-S9mix)でヒポキサンチングアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子座(HGPRT)に対する変異原性を検定した。  
本試験の濃度は、濃度設定のために実施した細胞毒性試験を基に、最高濃度は細胞の生存率20~40%の範囲にあった濃度とし、代謝活性化非存在下で0.1、0.25、0.50及び1.00  $\mu\text{g/ml}$ 、存在下で0.25、0.50、1.00及び2.50  $\mu\text{g/ml}$ とした。培養細胞をコロニー形成率用にフラスコ中の5mlの培地に約400個、2反復で播種した。変異原性試験用にはフラスコ中30mlの培地に細胞 $1 \times 10^6$ 個を1反復で加えた。いずれのフラスコも24時間培養後、検体を4時間処理した。処理6日後、コロニー形成率フラスコのコロニーについて固定し、メチレンブルー染色した。変異原性試験用フラスコは処理3日後に継代し、処理7日後にチオグアニンを含む選択培地に5反復で継代(変異株の選抜用、細胞 $6 \times 10^5$ 個)した。また、2反復でコロニー形成率用に細胞約500個を継代した。処理7日後の継代からさらに7日後、各フラスコのコロニーについて固定・染色した。50個以上細胞のある染色コロニーについて顕微鏡下で観察した。試験は2回実施した。突然変異率が本試験における自然突然変異率の3倍以上あり、再現性がある場合、又は濃度依存性のある増加があり、再現性のある場合を陽性とした。陽性対照として代謝活性化非存在下でエチルメタンサルホネート(EMS)および存在下ではジメチルベンズアントラセン(DMBA)を用いた。

試験結果：結果を表に示した。

検体は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの濃度においても、陰性対照を越える再現性のある突然変異率の増加は認められなかった。

陽性対照として用いたEMS及びDMBAでは顕著な突然変異率の増加が認められた。

以上の結果から、チャイニーズハムスターV79細胞を用いたHGPRT試験における検体の変異原性は陰性であると判断される。

表1. コロニー形成率

試験	薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	S-9 mix	播種 <sup>a)</sup> 細胞数	コロニー数 <sup>b)</sup>			コロニー形成率 (%) <sup>c)</sup>	コロニー形成率 (相対%) <sup>d)</sup>	
					反復1	反復2	平均			
試験 1	陰性対照	0.00	-	487	456	423	439.5	90.2	100.0	
	溶媒対照	0.00		487	415	400	407.5	83.7	100.0	
	検体	0.10		487	429	385	407.0	83.6	99.9	
		0.25		487	425	365	395.0	81.1	96.9	
		0.50		487	240	247	243.5	50.0	59.8	
		1.00		487	122	96	109.0	22.4	26.7	
	陽性対照 (EMS)	1.00 (mg/ml)		487	321	248	284.5	58.4	64.7	
	陰性対照	0.00		+	487	417	402	409.5	84.1	100.0
	溶媒対照	0.00			487	350	338	344.0	70.6	100.0
	検体	0.25			487	317	320	318.5	65.4	92.9
		0.50			487	358	372	365.0	74.9	106.1
		1.00			487	219	228	223.5	45.9	65.0
		2.50			487	89	83	86.0	17.7	25.0
	陽性対照 (DMBA)	15.40			487	4	6	5.0	1.0	1.5

試験	薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	S-9 mix	播種 <sup>a)</sup> 細胞数	コロニー数 <sup>b)</sup>			コロニー形成率 (%) <sup>c)</sup>	コロニー形成率 (相対%) <sup>d)</sup>	
					反復1	反復2	平均			
試験 2	陰性対照	0.00	-	494	532	497	514.5	104.1	100.0	
	溶媒対照	0.00		494	455	361	408.0	82.6	100.0	
	検体	0.10		494	447	397	422.0	85.4	103.4	
		0.25		494	410	397	403.5	81.7	98.9	
		0.50		494	312	290	301.0	60.9	73.8	
		1.00		494	193	164	178.5	36.1	43.8	
	陽性対照 (EMS)	1.00 (mg/ml)		494	353	338	345.5	69.9	67.2	
	陰性対照	0.00		+	494	452	424	438.0	88.7	100.0
	溶媒対照	0.00			494	414	455	434.5	88.0	100.0
	検体	0.25			494	403	419	411.0	83.2	94.6
		0.50			494	417	398	407.5	82.5	93.8
		1.00			494	258	287	272.5	55.2	62.7
		2.50			494	162	165	163.5	33.1	37.6
	陽性対照 (DMBA)	15.40			494	36	42	39.0	7.9	9.0

<sup>a)</sup> 2フラスコの平均播種細胞数

<sup>b)</sup> 細胞が50個以上あるコロニー数

<sup>c)</sup> 平均コロニー数/播種細胞数 $\times$ 100

<sup>d)</sup> 平均コロニー数/溶媒対照群のコロニー数 $\times$ 100

EMS = エチルメタンサルホネート

DMBA = ジメチルベンズアントラセン (9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン)

表2 突然変異データ

試験	薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	S9- mix	播種 <sup>a)</sup> 細胞数	平均 <sup>b)</sup> コロニー数	生存 <sup>c)</sup> 係数	選択培地			変異コロニー数 <sup>d)</sup> (/ $10^6$ 細胞)	
							細胞数 ( $\times 10^6$ )		平均変異 コロニー数 <sup>e)</sup>		
							播種数 <sup>f)</sup>	生存数 <sup>g)</sup>			
1	陰性対照	0.00	-	474	417.0	0.88	43.4	38.2	6.0	15.7	
	溶媒対照	0.00		526	445.0	0.85	44.1	37.5	2.4	6.4	
	検体	0.10		490	438.0	0.89	46.8	41.7	4.4	10.6	
		0.25		452	425.5	0.94	48.6	45.7	6.0	13.1	
		0.50		509	476.5	0.94	58.8	55.3	5.8	10.5	
		1.00		505	460.5	0.91	46.5	42.3	6.2	14.7	
	陽性対照 (EMS)	1.00 (mg/ml)		505	416.5	0.82	42.7	35.0	184.8	527.9	
	陰性対照	0.00		+	470	445.0	0.95	33.6	31.9	2.4	7.5
	溶媒対照	0.00			456	475.5	1.04	49.2	51.2	3.8	7.4
	検体	0.25			498	479.5	0.96	44.9	43.1	2.8	6.5
0.50		539	550.0		1.02	45.0	45.9	2.8	6.1		
1.00		480	564.0		1.17	54.8	64.1	2.6	4.1		
2.50		456	434.5		0.95	45.3	43.0	2.4	5.6		
陽性対照 (DMBA)	15.40	522	423.5		0.81	35.0	28.3	75.2	265.6		

試験	薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	S9- mix	播種 <sup>a)</sup> 細胞数	平均 <sup>b)</sup> コロニー数	生存 <sup>c)</sup> 係数	選択培地			変異コロニー数 <sup>d)</sup> (/ $10^6$ 細胞)	
							細胞数 ( $\times 10^6$ )		平均変異 コロニー数 <sup>e)</sup>		
							播種数 <sup>f)</sup>	生存数 <sup>g)</sup>			
2	陰性対照	0.00	-	460	413.0	0.90	46.3	41.7	11.4	27.4	
	溶媒対照	0.00		505	499.5	0.99	39.5	39.1	7.8	20.0	
	検体	0.10		477	416.0	0.87	42.6	37.1	14.8	39.9	
		0.25		515	439.5	0.85	44.4	37.7	7.0	18.5	
		0.50		465	417.0	0.90	40.3	36.3	6.0	16.5	
		1.00		521	490.5	0.94	49.5	46.5	14.4	30.9	
	陽性対照 (EMS)	1.00 (mg/ml)		474	350.0	0.74	41.6	30.7	165.6	538.6	
	陰性対照	0.00		+	493	427.0	0.87	39.2	34.1	6.8	19.9
	溶媒対照	0.00			472	518.5	1.10	38.5	42.3	10.6	25.1
	検体	0.25			495	400.5	0.81	49.5	40.1	17.4	43.4
0.50		507	383.5		1.76	48.0	36.5	15.4	42.2		
1.00		471	399.5		0.85	50.1	42.6	5.8	13.6		
2.50		474	390.0		0.82	38.0	31.2	8.4	27.0		
陽性対照 (DMBA)	15.40	460	405.0		0.88	37.5	33.0	98.6	298.5		

- a) 2フラスコの平均播種細胞数  
 b) 細胞が50個以上あるコロニー数  
 c) 平均コロニー数/播種細胞数  
 d) 選択培地への播種細胞数  
 e) 播種数細胞数  $\times$  生存係数  
 f) 選択培地に細胞が50個以上ある変異コロニー数  
 g) 平均変異コロニー数  $\times 10^6$  / 生存細胞数

EMS = エチルメタンサルホネート

DMBA = ジメチルベンズアントラセン (9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン)

(4) チャイニーズハムスターV79細胞を用いた in vitro 染色体異常試験  
(毒性資料No. 原体-33)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1984年

検体の純度：

試験方法：チャイニーズハムスター由来のV79細胞を用い、代謝活性化存在下(+S9mix)

および非存在下(-S9mix)で染色体異常誘発性を検定した。

検体はDMSOに溶解して用いた。検体処理時間は4時間とし、処理開始6、12及び28時間後に標本を作製した。陰性及び陽性対照では処理12時間後に標本を作製した。1濃度あたり400個の分裂中期細胞についてテレビモニターを備えた顕微鏡で観察して異常を記録し、分裂指数も算出した。異常を有する細胞の出現頻度が対照群の背景データを越えているか、統計学的に有意差のある場合、又は濃度依存性のある増加がある場合を陽性とした。

試験は4反復で実施した。陽性対照として代謝活性化非存在下でエチルメタンスルホネート(EMS)および存在下ではシクロホスファミド(CPA)を用いた。

用量設定根拠：

試験結果：試験結果を表に示した。

細胞に対する検体の作用(細胞の生存率約35%)が認められた濃度1.0 $\mu$ g/ml(-S9mix)及び2.5 $\mu$ g/ml(+S9mix)では、処理開始28時間後の細胞に染色体の異常及び交換を誘発した。また、処理開始12時間後のS9-mix存在下では検体の濃度に関連してわずかながら切断を有する細胞数の増加や分裂指数の低下がみられた。

陽性対照として用いたEMS及びCPAでは顕著な染色体異常の増加が認められた。

以上の結果から、チャイニーズハムスターV79細胞を用いた in vitro 染色体異常試験において、検体の染色体異常誘発性が認められた。

表. 試験結果

薬物	濃度 (µg/ml)	処理時間	標本作製時間	観察細胞数	S-9 Mixの有無	染色体異常を有する細胞数										異常細胞発生率 (%)			分裂指数	評価	
						染色体型			染色体型			欠失	重複異常	交換	細粉化	ギャップを含む	ギャップを除去	交換			
						ギャンプ	切断	断片	ギャンプ	切断	断片										
溶媒対照 (DMSO)	0.0	4	6	400	-	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.25	0.50	0.00	6.2	-
検体	1.0					12	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.50	0.75	0.00		
溶媒対照 (DMSO)	0.0				+	14	6	0	0	0	0	0	0	0	0	5.00	1.50	0.00	4.8	-	
検体	2.5					7	12	0	0	0	0	0	0	0	0	4.50	3.00	0.00	2.1	-	
陰性対照 (無処理)	0.0	4	12	400	-	7	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2.75	1.00	0.00	5.5		
溶媒対照 (DMSO)	0.0					8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1.75	0.25	0.00	9.2	-	
検体	0.1					4	2	0	0	0	0	0	0	1	0	7.75	0.75	0.25	7.5	-	
	0.5					8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2.50	0.50	0.00	6.7	-	
	1.0					12	5	0	0	0	0	0	0	0	0	4.25	1.25	0.00	7.2	-	
陽性対照 (EMS)	3.72 (mg/ml)					25	15	0	1	1	0	0	0	5	0	10.0	5.00	1.25	2.4	+	
陰性対照 (無処理)	0.0				+	10	3	0	1	0	0	0	0	0	3.25	0.75	0.00	4.3			
溶媒対照 (DMSO)	0.0					10	2	3	2	0	0	0	0	0	3.75	0.75	0.00	4.2	-		
検体	0.25					10	6	0	1	0	0	0	0	0	3.75	1.50	0.00	6.2	-		
	0.75					9	6	0	0	0	0	0	0	0	3.75	1.50	0.00	5.2	-		
	2.50	14	8	0		0	0	0	0	0	1	5.00	2.00	0.25	3.2	-					
陽性対照 (CPA)	2.62	47	48	2		1	1	0	0	11	11	0	21.0	13.5	2.75	0.7	+				
溶媒対照 (DMSO)	0.0	4	28	400	-	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0.00	0.00	10.6	-		
検体	1.0					10	11	1	0	1	0	1	6	8	1	7.50	5.25	2.00	*	+	
溶媒対照 (DMSO)	0.0				+	6	5	0	0	0	0	0	0	1	2.75	1.50	0.25	12.4	-		
検体	2.5					14	11	0	0	0	0	1	9	0	6.50	4.00	2.25	*	+		

EMS : エチルメタンサルホネート

CPA : シクロホスファミド

\* 断片化により観察できなかった

(5) ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(毒性資料No. 原体-34)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1988年

検体の純度：

試験方法：ヒトリンパ球を用い、代謝活性化存在下 (+S9mix) および非存在下 (-S9mix) で染色体異常誘発性を検定した。

検体は培地に懸濁して用いた。処理時間は4時間とし、処理開始24及び48時間後に標本を作製して1濃度あたり200個の分裂中期細胞について顕微鏡で観察し、異常を有する細胞の出現頻度が陰性対照群に比べ統計学的に有意な増加を示す場合を陽性とした。試験は2反復で実施した。陽性対照として代謝活性化非存在下でエチルメタンスルホネート (EMS) および存在下ではシクロホスファミド (CPA) を用いた。

用量設定根拠；

試験結果：試験結果を表に示した。

代謝活性化の有無にかかわらず、4時間処理開始24及び48時間後の染色体異常出現率において、陰性対照群に比べ生物学的に意味のある増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いたEMS又はCPAでは顕著な染色体異常出現率の増加が認められた。

以上の結果から、ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験において、本試験条件下では代謝活性化の有無にかかわらず検体に染色体異常の誘発性は認められなかった。



表. 試験結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	処理時間	標本作製時間	観察細胞数	S-9 Mix の有無	染色体異常を有する細胞数								異常細胞発生率 (%)			評価							
						染色分体型				染色体型				重複異常	交換	細胞化		ギャップを含む	ギャップを除く	交換				
						ギャップ	切断	断片	欠失	ギャップ	切断	断片	欠失											
陰性対照 (培地)	0.0	4	24	200	-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0					
陽性対照 (EMS)	0.72 (mg/ml)					6	8	2	0	0	3	4	0	0	5	0	12.0	9.0	2.5	+				
検体	3.0					2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.0	0.0	-				
	5.0					2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2.0	1.0	0.0	-				
陰性対照 (培地)	0.0					+	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.0	1.0	0.0				
陽性対照 (CPA)	19.8						3	9	1	0	0	1	1	0	0	11	0	9.5	9.0	4.0	+			
検体	3.0				3		0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	3.0	1.0	0.5	-				
	5.0				1		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5	1.0	0.0	-				
陰性対照 (培地)	0.0				4		48	200	-	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1.5	1.0	0.0	
検体	3.0									0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5	1.5	0.0	-
	5.0					8				1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5.0	0.5	0.0	-	
陰性対照 (培地)	0.0					+			5	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	4.0	1.0	0.0		
検体	3.0	2	1	0					0	0	0	1	0	0	1	0	2.0	1.0	0.5	-				
	5.0	2	2	1					0	0	0	1	0	0	0	0	2.0	1.5	0.0	-				

EMS : エチルメタンサルホネート

CPA : シクロホスファミド

(6) チャイニーズハムスターV79細胞を用いたin vitro姉妹染色分体交換試験  
(毒性資料No. 原体-35)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1988年

検体の純度：

試験方法：チャイニーズハムスター由来のV79細胞を用い、代謝活性化存在下(+S9mix)および非存在下(-S9mix)で姉妹染色分体交換誘発性を検定した。

検体は培地に懸濁して用いた。培養細胞に各濃度の検体を4時間処理し、洗浄後、BrdU培地と交換した。処理開始28時間後、標本を作製して各培養あたり25個の分裂中期細胞を顕微鏡で観察して、姉妹染色分体交換の数を数えた。試験は各濃度の培養を2連とし2回試験実施した。姉妹染色分体交換細胞数に濃度依存性のある統計学的に有意な増加がある場合、又は検体処理群のうち少なくとも1濃度において再現性のある統計学的に有意な陽性反応がある場合を陽性とした。

陽性対照として代謝活性化非存在下でエチルメタンスルホネート(EMS)および存在下ではシクロホスファミド(CPA)を用いた。

用量設定根拠：代謝活性化非存在下で検体0.1~10.00 µg/ml、存在下で0.5~10.0

試験結果：結果を表3に示した。

姉妹染色分体交換細胞の出現数は、試験1において統計学的に有意差のあるわずかな増加がS9-mix非存在下の検体処理群に認められたが、試験2では認められず再現性はなかった。これらの出現数は陰性対照群での平均範囲内(4.1~4.7)に近似していた。

陽性対照のEMS又はCPAでは顕著で再現性のある増加が認められた。

以上の結果から、チャイニーズハムスターV79細胞を用いた姉妹染色分体交換試験において再現性のある統計学的有意な増加は認められず、検体の姉妹染色分体交換の誘発性は陰性であると判断される。

表1. 予備試験：コロニー形成能

試験 1;

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	S-9 mix	コロニー数			コロニー形成能比 (対陰性対照比) (%)
			反復 I	反復 II	平均	
陰性対照 (DMSO <sup>‡</sup> )	0.0	-	266	342	304.0	100.0
検体	0.5		287	326	306.5	100.8
	1.0		143	227	185.0	60.9
	2.0		0	0	0.0	0.0
	3.0		0	0	0.0	0.0
	4.0		0	0	0.0	0.0
	5.0		0	0	0.0	0.0
	6.0		0	0	0.0	0.0
	8.0		0	0	0.0	0.0
10.0	0		0	0.0	0.0	
陰性対照 (DMSO <sup>‡</sup> )	0.0	+	328	288	308.0	100.0
検体	0.5		323	300	311.5	101.1
	1.0		306	197	251.5	81.7
	2.0		26	37	31.5	10.2
	3.0		9	32	20.5	6.7
	4.0		0	0	0.0	0.0
	5.0		0	0	0.0	0.0
	6.0		0	0	0.0	0.0
	8.0		0	0	0.0	0.0
10.0	0		0	0.0	0.0	

試験;2

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	S-9 mix	コロニー数			コロニー形成能比 (対陰性対照比) (%)
			反復 I	反復 II	平均	
陰性対照 (DMSO <sup>‡</sup> )	0.0	-	322	306	314.0	100.8
検体	0.1		307	239	273.0	86.9
	0.2		291	281	286.0	91.1
	0.4		256	305	280.5	89.3
	0.6		289	287	288.0	91.7
	0.8		265	166	215.5	68.6
	1.0		164	210	187.0	59.6
陰性対照 (DMSO <sup>‡</sup> )	0.0	+	248	243	245.5	100.0
検体	0.5		25	48	36.5	14.9
	1.0		137	120	128.5	52.3
	1.5		41	42	41.5	16.9
	2.0		104	113	108.5	44.2
	2.5		1	1	1.0	0.4
	3.0		0	0	0.0	0.0

<sup>‡</sup> DMSOは予備試験でのみ溶媒として使用

表2. 細胞の複製 (分裂中期細胞数/有糸分裂細胞100個/1培養あたり)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/ml)	S-9 mix	試験 I				試験 II			
			反復 I	反復 II	平均	複製比 (%)	反復 I	反復 II	平均	複製比 (%)
陰性対照 (培地)	0.0	-	10.0	9.8	9.9	100.0	9.7	9.9	9.8	100.0
陽性対照 (EMS)	0.63 (mg/ml)		2.9	0.4	1.7	16.7	9.7	9.6	9.7	98.5
検体	0.1		9.9	10.0	10.0	100.5	9.8	10.0	9.9	101.0
	0.5		9.7	9.7	9.7	98.0	10.0	9.9	10.0	101.5
	1.0		9.5	9.8	9.7	97.5	10.0	9.6	9.8	100.0
	1.5		8.6	8.3	8.5	85.4	9.7	10.0	9.9	100.5
	2.0		7.4	9.4	8.4	84.8	9.5	9.8	9.7	98.5
	2.5		5.3	7.1	6.2	62.6	9.9	9.8	9.9	100.5
	3.0		7.0	7.7	7.4	74.2	9.0	9.1	9.1	92.3
3.5	6.8		4.3	5.6	56.1	7.9	7.9	7.9	80.6	
陰性対照 (培地)	0.0	+	10.0	9.1	9.6	100.0	9.1	9.4	9.3	100.0
陽性対照 (CPA)	1.4		9.5	9.5	9.5	99.5	9.8	9.3	9.6	103.2
検体	0.1		9.6	9.2	9.4	98.4	10.0	10.0	10.0	108.1
	1.0		9.5	9.6	9.6	100.0	9.5	10.0	9.8	105.4
	2.0		9.9	9.4	9.7	101.0	9.5	9.7	9.6	103.8
	2.5		9.8	9.5	9.7	101.0	9.9	9.8	9.9	106.5
	3.0		9.0	9.6	9.3	97.4	9.9	9.7	9.8	105.9
	3.5		9.3	8.9	9.1	95.3	8.8	9.8	9.3	100.5
	4.0		9.3	9.2	9.3	96.9	9.4	9.3	9.4	101.1
	5.0		6.2	6.2	6.2	64.9	7.7	8.7	8.2	88.6

EMS : エチルメタンサルホネート

CPA : シクロホスファミド

表3 姉妹染色分体交換数 (培養当り25個の分裂中期細胞を分析)

薬物	濃度 ( $\mu$ g/ml)	S-9 mix	試験1				試験2			
			反復 I	反復 II	平均	範囲	反復 I	反復 II	平均	範囲
陰性対照 (培地)	0.0	-	4.0	4.1	4.1	1-8	4.3	4.5	4.4	1-12
陽性対照 (EMS)	0.63 (mg/ml)		19.6	25.7	22.7	10-46	35.2	38.8	37.0	17-62
検体	0.1		5.5	5.3	↑5.4	2-10	3.3	3.2	3.3	1-8
	2.0	4.9	5.5	↑5.2	2-9	3.1	4.4	3.8	1-12	
	3.5	5.4	4.9	↑5.2	2-11	3.9	5.6	4.8	1-10	
陰性対照 (培地)	0.0	+	5.2	3.9	4.6	1-11	4.2	5.1	4.7	1-8
陽性対照 (CPA)	1.4		23.0	25.6	24.3	9-44	45.0	49.9	47.5	25-71
検体	0.1		3.9	4.3	4.1	0-14	3.6	3.8	3.7	1-9
	2.5	5.8	5.0	5.4	1-11	4.8	6.2	5.5	1-10	
	5.0	4.5	6.0	5.3	0-12	3.5	4.7	4.1	0-9	

↑ : P<0.01 (Mann-Whitney検定)

EMS : エチルメタンスルホネート

CPA : シクロホスファミド

(7) ラットの初代肝細胞を用いた不定期DNA合成試験

(毒性資料No. 原体-36)

試験機関：

報告書作成年：1985年

検体の純度：

試験方法：F344雄ラット（体重150～300g）から得た初代培養肝細胞を用いた。

検体はDMSOで溶解して原液とし、DMSOで順次希釈して調製した。検体は濃度0.253、0.505、1.01、2.53、5.05、10.1、15.2及び30.3 $\mu$ g/mlの8濃度で処理した。試験は5反復で実施し、2反復は細胞毒性測定に用いた。

細胞を2.5時間培養して培養皿中のカバーガラス上に単層培養細胞として付着させ、93.4%の生存率を示す単層細胞に検体及び<sup>3</sup>H-チミジンを含む培地で18時間処理した。溶媒対照にはDMSOのみを、陽性対照には2-アセチルアミノフルオレン（2-AAF）を処理した。<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みにより生じた細胞核上の銀粒子数をオートラジオグラフ法によって測定して評価した。試験した濃度で次の条件に該当する場合、陽性とした。

- (1) 核当り平均正味の核上の銀粒子数の増加が、陰性対照値を差引き後、少なくとも6個以上あること。
- (2) 正味の核上の銀粒子数を6個以上もつ細胞核の増加が、陰性対照値を差引き後、分析細胞総数の少なくとも10%であること。
- (3) 正味の核上の銀粒子数を20個以上もつ細胞核が分析細胞総数の2%以上であること。

結果：結果を表に示した。

検体は濃度30.3 $\mu$ g/mlで細胞に対し極めて毒性が強く致死量であった。15.2～0.253 $\mu$ g/mlで細胞の生存率は39.7～101.0%であり、細胞核上の銀粒子数に有意差は認められなかった。

検体は、本試験に用いた判定基準のいずれにも該当せず、ラット初代肝細胞を用いた不定期DNA合成試験において、陰性であると判断される。

表. 試験結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	UDS銀粒子数 <sup>a)</sup>	銀粒子を持つ細胞核の% <sup>a)</sup>		細胞生存率 <sup>b)</sup>
			6個以上	20個以上	
溶媒対照 (DMSO)	1%	0.72	0.7	0.0	100.0
陽性対照 (2-AAF)	0.1	7.06	48.7	4.7	109.5
検体	0.253	1.32	1.3	0.0	(未測定)
	0.505	1.42	1.3	0.0	101.0
	1.01	1.66	2.7	0.0	97.1
	2.53	1.43	4.0	0.0	88.1
	5.05	1.27	1.3	0.0	79.6
	10.1	1.82	8.0	0.0	66.7
	15.2	0.95	1.3	0.0	39.7
	30.3	強い細胞毒性のため銀粒子数測定不可能			0.0

<sup>a)</sup>3反復の平均

<sup>b)</sup>単位面積当りの生存細胞数の溶媒対照に対する比率

(8) マウスを用いた小核試験

(毒性資料No. 原体-37)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1985年

検体の純度：

供試動物：CD-1系マウス (Cr1 UK) 1群10匹 (雌雄各5)

試験方法：コーン油に溶解した検体を110mg/kgの用量で単回強制経口投与した。対照群にはコーン油のみを投与した。陽性対照群はマイトマイシンCを用い、生理食塩液に溶解して4mg/kgを腹腔内に単回投与した。

検体投与群及び対照群は投与24、48及び72時間後に雌雄各5匹を屠殺し、大腿骨骨髓の塗抹標本作製し、メタノール固定後にギムザ染色した。陽性対照群は投与24時間後に屠殺し、同様に骨髓標本作製した。

標本を顕微鏡下で観察し、検査した

用量設定根拠：

結果：骨髓標本の観察結果を表に示した。

検体投与後、雌雄で立毛、円背位、嗜眠、眼瞼下垂、呼吸数減少、運動失調が認められ、雌では振せん、苦悶も短時間認められた。雌1例が死亡した。多染性赤血球中の小核の出現率 (mnp) では投与後のいずれの検査時期にも検体投与群と対照群との間に有意な差はなかった。陽性対照群では有意に増加していた。

多染性赤血球と正染性赤血球の割合 (p/n比) では対照群に比べ、検体投与群では投与後48時間及び陽性対照群では投与後24時間で有意な減少が認められた。従って、骨髓細胞に対する毒性作用があるものと考えられた。

小核を有する正染性赤血球数 (mnn) では投与後のいずれの検査時期にも検体投与群と対照群との間に差は認められなかった。

表. 観察結果 (雌雄)

採取時期 (時間)	薬物	投与量 (mg/kg)	mnp出現率 (%)	p/n比	mnn (%)
24	対照 (コーン油)		0.7	0.961	0
	検体 110	110	0.7	0.766	0.9
	マイトマイシンC	4	▲ 47.5	▼ 0.410	0.9
48	対照 (コーン油)		0.5	1.012	0
	検体 110	110	0.7	▼ 0.579	0.3
72	対照 (コーン油)		0.3	1.159	0.2
	検体	110	0.4	↓ 1.020	0.2

↓ : P<0.05、▲▼ : P<0.001 (Wilcoxon検定)

以上の結果より、本試験条件下において検体は骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、変異原性は陰性と判断された。



### 13. 生体機能への影響に関する試験

#### (1) メチルイソチオシアネートにおける薬理試験

(毒性資料No. 原体-38)

試験機関：

報告書作成年：1986年

検体の純度：

#### (1) ネコの呼吸、循環器系に対する作用

麻酔下における呼吸、血圧、心拍数及び心電図に対する作用

供試動物：雑種雄性ネコ 体重3.30～4.65kg 3匹使用

投与方法：検体をゴマ油に溶解し、18時間以上絶食したネコに100mg/kgの投与量（投与容量3ml/kg）で、単回強制経口投与した。なお、検体はウレタン（1g/kg, 皮下投与）及びペントバルビタールナトリウム（25mg/kg, 腹腔内投与）で麻酔したネコに投与した。

試験項目：呼吸、血圧、心拍数及び心電図について、検体の経口投与前から投与後心停止が起こるまで連続して測定した。また、死亡動物の胃について肉眼的に検査した。

結果：投与直後、血圧の上昇が認められ、その後徐々に下降した。脈圧の減少が投与1時間後より認められた。心電図は投与10分後よりQRS電位の低下が著名となった。呼吸数は投与15～30分後より減少した。心拍数は投与10分後から90分後まで増加した。投与120分後より呼吸数は急激に減少し、著名な血圧の下降、心拍数の減少、心電図QRS電位の低下をきたし、124～127分後に呼吸停止が起こり、後に心停止に至った。胃の剖検では、ほぼ全域にわたり粘膜下出血がみられ、1例では、胃体部幽門側のびらん、うっ血及び点状出血も認められたが、死につながるような重篤な病変ではなかった。

(2) メチルイソチオシアネートにおける薬理試験

(毒性資料No. 原体-39)

試験機関：

報告書作成年：1987年

検体の純度：

1) マウス及びウサギの中枢神経系に対する作用

マウス及びウサギにおける一般状態

供試動物：ddY系マウス、雄、体重24.5～28.5g、1群5匹

日本白色種ウサギ、雄、体重2.47～2.92kg、1群5匹

(報告書に週齢の記載なし)

投与方法：検体をゴマ油に溶解し、10、30及び100mgの投与量（投与容量；マウス 10ml/kg, ウサギ3ml/kg）で、単回強制経口投与した。対照群には同様にゴマ油を投与した。

試験項目：マウスはIrwin法に準じて、ウサギは臨床症状を中心にして、検体投与当日は投与5時間後まで、翌日からは6日後まで行動を観察した。死亡動物は胃腸管を肉眼的に観察した。

結 果：

〈マウス〉

10mg/kg群では異常はみられなかった。

30mg/kg群では、投与日に全例で苛立ち、反応性の亢進、触反応過敏、同側性屈筋反射の亢進がみられた。また、耳介反射、角膜反射の亢進や眼裂の狭まりを示した例も多かった。翌日以降3日後までケージ内の闘争が散見され、6日後でも5例中3例が過敏な状態であった。

100mg/kg群では、30mg/kg群における症状に加え、さらに体温低下、摂食不良、腹臥姿勢、異常行動、異常歩行、呼吸不整、立毛、苦悶反応等がみられた。投与翌日に1例死亡し、さらに3例に振せん、体温低下、体重減少がみられ2日後に死亡した。生存した1例では体重増加抑制がみられ、6日後でも過敏症状が続いた。

死亡例の剖検では、腺胃部の充血、腸管の充出血、尾端部壊死がみられた。

〈ウサギ〉

10mg/kg群では投与日の5例中1例に体温低下が一過性にみられたが一般状態に異常は認めなかった。

30mg/kg群では投与日に全例で体温低下（1.1～2.9℃）がみられ、呼吸促迫、腹臥姿勢を認めた例も観察し、摂食行動の低下もみられた。投与翌日では症状は回復したが2例で体温が低かった（0.5～0.9℃）。6日後まで体重増加抑制がみられた。

100mg/kg群では、全例に腹臥・側臥姿勢、自発運動減少、警戒心

低下、反応性鈍化、体温低下、筋弛緩、血色不良、呼吸促迫の後粗大がみられ、1例では流涙、虹彩赤化も認めた。投与後4時間以内に全例が死亡した。

死亡例の剖検では、全例で胃から回腸にかけて充出血がみられ、1例の胃には潰瘍がみられた。また、静脈血の色調に異常はみられなかった。

## 2) 自律神経系及び平滑筋に及ぼす影響

### (a) 摘出回腸の自動運動に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ、雄、体重2.20～2.24kg、1群3匹

試験方法：ウサギを脱血屠殺後、回腸を摘出し、空気を通じたTyrode液を満たしたマグヌス管中に懸垂した。濃度が $3.8 \times 10^{-8}$ 、 $3.8 \times 10^{-7}$ 、 $3.8 \times 10^{-6}$ 及び $3.8 \times 10^{-5}$ g/mlとなるように検体を添加し、10分間、回腸の自動運動をオシログラフに記録した。

結果：濃度 $3.8 \times 10^{-8}$ では摘出回腸の自動運動に対する作用は認めなかった。検体濃度 $3.8 \times 10^{-7}$ 、 $3.8 \times 10^{-6}$ 及び $3.8 \times 10^{-5}$ では各3、15及び62%の収縮抑制がみられ、洗浄後も回復はみられなかった。

表. 摘出回腸の収縮に対する検体の影響

薬物	検体濃度 (g/ml)	収縮率 (%)
対照	-	100
検体	$3.8 \times 10^{-8}$	100
	$3.8 \times 10^{-7}$	97
	$3.8 \times 10^{-6}$	85
	$3.8 \times 10^{-5}$	38

### (b) 摘出回腸の自動運動における各アゴニストに対する作用

供試動物：Hartley系モルモット、雄、体重300～310g、1群5匹

試験方法：モルモットを脱血屠殺後、回腸を摘出し、空気を通じたTyrode液を満たしたマグヌス管中に懸垂した。濃度が $3.8 \times 10^{-7}$ 、 $3.8 \times 10^{-6}$ 及び $3.8 \times 10^{-5}$ g/mlとなるように検体を添加し、検体添加3分後にアセチルコリン $1 \times 10^{-7}$ g/ml、ヒスタミン $1 \times 10^{-6}$ g/mlまたは塩化バリウム $1 \times 10^{-4}$ g/mlを添加した。10分間、回腸の自動運動をオシログラフに記録した。

結果：モルモットの摘出回腸においては、検体の単独作用は $3.8 \times 10^{-6}$ g/mlまではみられず、 $3.8 \times 10^{-5}$ g/mlで一過性の収縮反応やベースラインの下降がみられた。

アセチルコリン収縮では検体濃度 $3.8 \times 10^{-6}$ g/mlまで作用はみられず、 $3.8 \times 10^{-5}$ g/mlで軽度な収縮抑制がみられた。

ヒスタミン収縮では検体濃度 $3.8 \times 10^{-5}$ g/mlまで作用はみられなか

った。

塩化バリウム収縮では検体濃度 $3.8 \times 10^{-6}$ g/mlまで作用はみられず、 $3.8 \times 10^{-5}$ g/mlで収縮抑制を認め、収縮反応時間の延長傾向があった。さらに3例で観察を続けると、2例で収縮の亢進(26~46%増加)がみられた。これらのことから、検体は高濃度において平滑筋に対して直接刺激作用を有し、塩化バリウムによる筋収縮を抑制し、その後亢進させる傾向にあった。

表. 摘出回腸のアゴニスト収縮に対する検体の影響

薬物	検体濃度 (g/ml)	各アゴニスト添加での収縮率 (%)		
		アセチルコリン	ヒスタミン	塩化バリウム
対照	-	102	101	97
検体	$3.8 \times 10^{-7}$	101	102	97
	$3.8 \times 10^{-6}$	102	102	100
	$3.8 \times 10^{-5}$	91	102	75

(c) 炭末輸送能に対する作用

供試動物：ddY系マウス、雄、体重25.6~30.3g、1群10匹

試験方法：検体をゴマ油に溶解し、10、30及び100mgの投与量(投与容量10ml/kg)で単回強制経口投与した。対照群には同様にゴマ油を投与した。検体投与30分後に5%炭末の懸濁液(10%アラビアゴムに懸濁)を動物当たり0.1ml強制経口投与し、炭末投与30分後に屠殺して小腸に対する炭末の移行率を測定した。

結果：10及び30mg/kgで影響は認めなかった。  
100mg/kgで炭末移行率に抑制がみられた。

表. 炭末輸送能に対する検体の影響

薬物	用量 (mg/kg)	炭末移行率 (%)
対照	-	74.0
検体	10	70.5
	30	71.2
	100	↓39.2

↓：P<0.01 (Student t-検定またはAspin-Welch検定)  
炭末移行率 (%) = 炭末移動長/小腸全長 × 100

### 3) 血液に及ぼす影響

#### (a) 血液凝固に及ぼす影響

供試動物：ddY系マウス、雄、体重158～174g、1群6匹

試験方法：検体をゴマ油に溶解し、10、30及び100mgの投与量（投与容量10ml/kg）で単回強制経口投与した。対照群には同様にゴマ油を投与した。投与1時間後にエーテル麻酔下で腹部大静脈より採血し、クエン酸添加血漿とし、プロトロンビン時間（PT）及び活性化部分トロンビン時間（APTT）を測定した。また、血液の色調も観察した。

結果：いずれの検体投与群ともPT及びAPTTに対照群との差はみられなかった。また、採血した静脈血の色調に異常はみられなかった。

#### (b) 溶血に及ぼす影響

供試動物：日本白色種ウサギ、雄、体重2.05～2.35kg、1群3匹

試験方法：耳静脈より採血しクエン酸添加血液とし、2%赤血球浮遊液を調製した。検体を濃度0.0076%、0.076%及び0.76%（検体の最大溶解濃度）に生理食塩水で調製し被検溶液とした。被検溶液5mlに、2%赤血球浮遊液を0.25ml加え、37°Cで2時間インキュベート後に遠沈し、上清の540nmでの吸光度を分光光度計で測定した。

結果：検体濃度0.0076%及び0.076%では溶血はみられなかった。検体濃度0.76%では25.1%の溶血がみられた。

溶血は高い濃度0.76%（7600ppm）のみでみられ、0.076%（760ppm）では溶血がみられていないことから、実際上の問題となるものではないと考えられた。

表. 検体の溶血に及ぼす影響

薬物 (溶媒)	濃度 (w/v%)	溶血度 (%)
蒸留水	-	100.0
検体 (生理食塩水)	0.0076	0.8
	0.076	0.8
	0.76	25.1

以上、本試験結果及び別の薬理試験報告（毒性資料No. 原体-38）から致死要因は呼吸・循環器系に対する作用によると推定されるが、その毒性も致死量に近い用量でだけみられ、検体による特異的な薬理作用とは考えられなかった。

メチルイソチオシアネート (MITC) の「生体機能への影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要		
呼吸・循環器系に及ぼす影響	ネコ (麻酔下)	経口 (ゴマ油)	100	雄 3	100	-	血圧：一過性上昇し、その後下降 心電図：QRS電位低下 呼吸数：減少 心拍数：90分後まで増加、120分後減少		
中枢神経系に対する作用 一般状態	マウス [Irwin法]	経口 (ゴマ油)	0, 10, 30, 100	雄 5	30	10	30mg/kgで反応性・反射の亢進、過敏等がみられ 100mg/kgでさらに体温低下、摂食不良、腹臥姿勢、異常な行動・歩行、呼吸不整、振せん等がみられ、投与後2日までに4例死亡。		
	ウサギ				10	-	10mg/kgで一過性の体温低下 (1例のみ)。 30mg/kg以上で体温低下、姿勢異常、呼吸亢進、100mg/kgでは加えて、自発運動・反応性減少、粗大呼吸等がみられ全例死亡。		
摘出回腸の自動運動に対する作用	雄ウサギの摘出回腸		検体添加濃度 $3.8 \times 10^8$ $3.8 \times 10^7$ $3.8 \times 10^6$ $3.8 \times 10^5$ (g/ml)		$3.8 \times 10^7$ (g/ml)	$3.8 \times 10^8$ (g/ml)	$3.8 \times 10^7 \sim 3.8 \times 10^5$ の検体濃度範囲で回腸の収縮を3~62%抑制。		
摘出回腸のアゴニスト収縮に対する作用	雄モットの摘出回腸		検体添加濃度 $3.8 \times 10^7$ $3.8 \times 10^6$ $3.8 \times 10^5$ (g/ml)	アゴニスト添加濃度 (g/ml)	$3.8 \times 10^5$ (g/ml)	$3.8 \times 10^6$ (g/ml)	アセチルコリン	$3.8 \times 10^5$ (g/ml)	アセチルコリン収縮： 検体 $3.8 \times 10^5$ で経度(9%)の抑制
				ヒスタミン			-		ヒスタミン収縮：影響なし
				塩化バリウム			$3.8 \times 10^5$ (g/ml)		$3.8 \times 10^6$ (g/ml)
炭末輸送能に対する作用	マウス	経口 (ゴマ油)	0, 10, 30, 100	雄 10	100	30	100mg/kgで炭末移行率に抑制。		

メチルイソチオシアネート (MITC) の「生体機能への影響に関する試験」の総括表  
(続き)

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
血液凝固に及ぼす影響	マウス	経口 (ゴマ油)	0, 10, 30, 100	雄 6	-	100	影響なし。
溶血に及ぼす影響	ウサギ血液 (2%赤血球浮遊液)		検体添加濃度 0.0076 0.076 0.76 (%)		0.76%	0.076%	検体添加濃度0.76%で25.1%溶血。 0.076%以下で影響なし。

(3) 検体投与下でのネコの呼吸、循環器系に対する作用の各種薬剤の影響  
(解毒機構の検討)

(毒性資料No. 原体-40)

試験機関：

報告書作成年：1986年

検体の純度：

目的：

検体投与方法：検体をゴマ油に溶解し、18時間以上絶食したネコに100mg/kgの  
投与量（投与容量3ml/kg）で、単回強制経口投与した。なお、検体はウ  
レタン（1g/kg, 皮下投与）及びペントバルビタールナトリウム（25mg/kg  
，腹腔内投与）で麻酔したネコに投与した。

試験項目：検体投与後、各種薬剤を投与して呼吸、血圧、心拍数及び心電図の  
変化を測定した。

1) 検体投与下での 投与が呼吸、血圧、心拍数及び心電図に及ぼ  
す影響

供試動物：雑種雄性ネコ 体重3.00～3.25kg 3匹使用

試験方法：検体投与10又は30分後より  $1\mu\text{g/kg/分}$  (0.052  
ml/分)で静脈内に持続投与した。

結果： の持続投与により呼吸停止及び心停止に至る時間  
はわずかに延長したが、検体の作用である心電図QRS電位の低下、血  
圧下降及び脈圧減少は改善されなかった。

2) 検体投与下での投与が呼吸、 血圧、心拍数及び心電図に及ぼす  
影響

供試動物：雑種雄性ネコ 体重3.46～4.20kg 4匹使用

試験方法：検体投与10分後に1例は  $50\text{mg/kg}$ を単回静脈投与し、  
3例は  $50\text{mg/kg/hr}$  (0.11ml/min)で静脈内に持続投与した。

結果： の静脈内単回投与又は持続投与のいずれによっても  
検体の作用は改善されなかった。

3) 検体投与下での 投与が呼吸、血圧、心拍数及び心電図に及  
ぼす影響

供試動物：雑種雄性ネコ 体重2.31～2.62kg 4匹使用

試験方法：検体投与10分後より  $251\sim 286\text{mg/kg/hr}$   
(0.11ml/min)で静脈内に持続投与した。



結果： の投与によっても検体の作用は改善されず、むしろ呼吸停止までに要する時間の短縮が認められた。

メチルイソチオシアネート (MITC) の呼吸、循環器系に対する作用への解毒機構の検討の総括表

試験項目	動物種	動物数	薬 剤	投与量及び投与経路	結果の概要
呼吸・循環器系に及ぼす影響	ネコ (麻醉下)	雄 3	①	検体100mg/kg(経口) + ①1 $\mu$ g/kg/分(静脈)	呼吸及び心停止に至る時間はわずかに延長したが、検体の作用は改善されなかった。
		雄 1	②	検体100mg/kg(経口) + ②50mg/kg(経口)	検体の作用は改善されなかった。
		雄 3		検体100mg/kg(経口) + ②50mg/kg/hr.(静脈)	
		雄 4	③	検体100mg/kg(経口) + ③251~286mg/kg/hr. (静脈)	検体の作用は改善されなかった。

生体機能への影響に関する試験(毒性資料No. 原体-38)の結果から、検体の中毒作用は心機能に対する作用が最も重要と考えられたことから、解毒機構を解明する目的で、心機能の亢進作用を有する、検体の主要代謝経路は

であるので、

を静脈内に投与して、各種薬剤による影響を検討したが、検体の作用である心電図QRS電位の低下、血圧下降及び脈圧減少は改善されず、改善効果は認められなかった。

検体の作用は致死量に近い用量でみられ、検体特異的な作用はみられず、解毒機構の解明は困難であった。従って、現状での検体による中毒には対症療法の採用が適切であると考えられた。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

結 果 :

;

;

;

;

## B. 製剤を用いた試験成績

### (1) 40%油剤のラットにおける急性経口毒性試験

(毒性資料 No. 製剤-1)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1984年

検体の純度：40%油剤

・組成   メチルイソチオシアネート   ; 40.0%  
          有機溶剤等                       ; 60.0%

供試動物：ウィスター系ラット (KFM-Han)、8~11週齢、  
          体重：雄172~276g、雌158~195g、1群雌雄各5匹

観察期間：15日間観察

投与方法：検体を2%カルボキシメチルセルロース溶液に懸濁させ、投与用量100、200、300及び1000mg/kg (容量10ml/kg) で12~18時間絶食させたラットに強制経口投与した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を15日間観察した。全試験動物について肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	100、200、300、1000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 165 (104~223) 雌 165 (104~223)
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5日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後1時間から開始 投与後8日に終了
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	100

雌雄で鎮静、呼吸困難、運動失調、痙縮、流涎、粗毛などが観察された。剖検では、死亡例の胃腸に軽度の発赤が認められたが、生存例には肉眼的所見は認められなかった。

(2) 40%油剤のウサギにおける急性経皮毒性試験

(毒性資料 No. 製剤-2)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1985年

検体の純度：40%油剤

・組成   メチルイソチオシアネート   ; 40.0%  
          有機溶剤等                       ; 60.0%

供試動物：ニュージーランド白色ウサギ、14～16週齢、1群雌雄各3匹

体重：雄2.2～3.0kg、雌2.4～3.0kg

観察期間：15日間観察

投与方法：投与24時間前に背部皮膚を約40cm<sup>2</sup>で剪毛した。投与当日、検体をそのまま皮膚に塗布して閉塞包帯で覆い、包帯と伸縮性粘着バンドで固定した。24時間後被覆包帯を除去し、微温湯で皮膚を洗浄した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を15日間観察し、全試験動物について肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 皮
投与量 (mg/kg)	30、80、200、700、2000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 120 (算出不可)
死亡開始時間及び終了時間	投与後1時間から開始 投与後1日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与直後から開始 試験終了時まで観察された
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	80

雌雄で鎮静、呼吸困難、適用部の紅斑、浮腫、壊死などが観察され、治癒傾向は認められなかった。

剖検所見では、肺、肝臓、腎臓、乳房、胸腺に変色（斑状暗赤色、紅斑等）が認められた以外特記すべき変化は認められなかった。

(3) 40%油剤のラットにおける急性吸入毒性試験

(毒性資料 No. 製剤-3)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1986年

検体の純度：40%油剤

・組成   メチルイソチオシアネート   ; 40.0%  
          有機溶剤等                         ; 60.0%

供試動物：ウイスター系ラット (KFM-Han)、9~11週齢、1群雌雄各5匹

体重：雄230~268g、雌186~213g

観察期間：15日間

暴露方法：高圧気流に検体を注入ポンプから供給してエアロゾルを発生させ4時間鼻部暴露させた。アセトンを入れた瓶でエアロゾルを捕集し、ガスクロマトグラフでチャンバー内の濃度を暴露期間中2回測定した。エアロゾル粒子径を4段階カスケードインパクターで暴露期間中3回測定した。

実際濃度 (mg/m <sup>3</sup> )	180	640	1895	2740
粒子径分布 (%)				
> 7 (μm)	32.9	26.6	31.7	27.3
7 ~ 3	32.4	25.0	26.2	31.9
3 ~ 1	14.9	20.4	9.0	27.7
1 >	19.8	28.0	33.2	13.1
空気力学的質量中位径 吸入可能な粒子の割合	報告書に記載なし			
チャンバー容積 (L)	100			
通気量 (L/分)	17.5			
暴露条件	エアロゾル(ミスト)、4時間、鼻部暴露			

観察・検査項目：暴露中及び暴露後15日間、中毒症状及び生死を観察し、暴露日、8及び15日目に体重を測定した。

結 果：

投与方法	吸 入
暴露濃度 (mg/m <sup>3</sup> )	180、640、1895、2740
LC50 (mg/m <sup>3</sup> ) (95%信頼限界)	雌雄 1502 <sup>#</sup> (943~2819)
死亡開始時間及び終了時間	暴露4時間から開始 暴露後3日に終了
症状発現時間及び消失時間	暴露4時間から開始 暴露後9日に終了
死亡例の認められなかった 最高暴露濃度 (mg/m <sup>3</sup> )	640

<sup>#</sup>雌雄の合計死亡率から算出

症状として鎮静、呼吸困難、鼻汁、姿勢異常（腹臥、横臥等）、粗毛等が観察され、1895mg/m<sup>3</sup>以上で死亡がみられ、2740mg/m<sup>3</sup>では暴露中に全例が死亡した。剖検では、死亡例に暗赤色化、胃及び腸管の著明な鼓腸、鼻からの泡沫排泄が認められたが、生存例には特記すべき変化は認められなかった。

(4) 40%油剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(毒性資料 No. 製剤-4)

試験機関：

[GLP対応]  
報告書作成年：1985年

検体の純度：40%油剤

・組成   メチルイソチオシアネート   ; 40.0%  
          有機溶剤等                       ; 60.0%

供試動物：ニュージーランド白色ウサギ、15～16週齢、体重2.3～3.1kg、  
雄4匹、雌2匹

観察期間：7日間

投与方法：投与24時間前に背部皮膚を10×10cmの広さで剪毛した。投与当日、検体0.5mlを皮膚に塗布してガーゼとプラスターで覆い、包帯と伸縮性粘着バンドで固定した。4時間後被覆物を除去し、微温湯で皮膚を洗浄した。

観察項目：検体除去後1、24、48、72時間目及び7日目に、塗布部位の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)を観察し、以下の基準に従って評価した。

紅斑及び痂皮形成	評点
紅斑なし	0
非常に軽度の紅斑(かろうじて識別可能)	1
はっきりとした紅斑	2
中等度ないし高度紅斑	3
高度の紅斑からわずかな痂皮形成(深部損傷まで)	4

浮腫の形成	評点
浮腫なし	0
非常に軽度の浮腫(かろうじて識別可能)	1
軽度浮腫(膨隆による明確な縁が識別可能)	2
中等度浮腫(約1mmの膨隆)	3
高度浮腫(1mm以上の膨隆と暴露範囲を超えた広がり)	4

結果：観察した刺激性変化の採点を次頁の表に示した。

全例で評点2～4の紅斑及び痂皮が認められ、7日後でも認められた。軽度の浮腫も全例で認められ、72時間後に5例では消失したが、1例での消失は7日後であった。

以上の結果から、メチルイソチオシアネート40%油剤はウサギの皮膚に対して強い刺激性があるものと思われる。



表. 皮膚の観察結果

動物番号	項目	最高 評点	暴露後時間 (hrs)				
			1	24	48	72	7日
1	紅斑・痂皮 浮腫	4	2	3	4	4	4
		4	0	1	1	1	0
2	紅斑・痂皮 浮腫	4	4	4	4	4	4
		4	2	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮 浮腫	4	2	3	3	3	4
		4	2	1	0	0	0
4	紅斑・痂皮 浮腫	4	4	4	4	4	4
		4	2	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮 浮腫	4	4	4	4	4	4
		4	2	2	1	0	0
6	紅斑・痂皮 浮腫	4	2	3	3	4	4
		4	2	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮 浮腫	24	18	21	22	23	24
		24	10	4	2	1	0
平均	紅斑・痂皮 浮腫	4	3.0	3.5	3.7	3.8	4.0
		4	1.7	0.7	0.3	0.2	0.0

(5) MITC油剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(毒性資料 No. 製剤-5)

以下の理由から試験成績省略理由書とした。

メチルイソチオシアネート (MITC) は眼に対して強い刺激性があり、原体での眼刺激性試験 (資料No. 原体-9) ではその刺激反応から投与2日に試験を終了させている。また、MITC 20%含有検体を10.0~20.0%の範囲で希釈してウサギの眼に点眼した試験 (資料No. 原体-10) では10%希釈液でも強い刺激性が観察されている。20%油剤 (トラペックサイド油剤) 及び資料No. 原体-10で使用した検体の組成は下記の表に示したように同等のものであり、製剤での試験を実施するまでもなく製剤 (20%油剤) は眼に対して刺激性があると判断されることから、試験を省略した。

成分	20%油剤	資料No. 原体-10の検体
メチルイソチオシアネート	20%	約20%
キシレン	80%	

(6) 40%油剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(毒性資料 No. 製剤-6)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：1985年

検体の純度：40%油剤

・組成   メチルイソチオシアネート   ; 40.0%  
          有機溶剤等                       ; 60.0%

供試動物：ハートレー系モルモット (DUHA KFM)、8~9週齢

体重 雄433~516g、雌437~530g、

投与群 1群20匹 (雌雄各10匹)、対照群 1群10匹 (雌雄各5匹)

観察期間：38日間

試験操作：[Maximization法]

投与量設定根拠；

感 作；肩甲骨周辺の皮膚を剃毛して皮内感作部位とした。皮内感作部位の左右3カ所に下記調製液を0.1ml皮内注射した。

- 1) コーン油とフロイントの完全アジュバンド50：50の混液
- 2) コーン油で1%に希釈した検体
- 3) 上記 1)の混液で1%に希釈した検体

皮内注射1週間後に再び剃毛し、検体の1%液を濾紙パッチ(4cm×4cm)に染み込ませて注射部位に置き、アルミニウム箔と不浸透性粘着テープで被い、さらに伸縮性プラスターで固定した。48時間適用して局所感作した後、被覆物を除去した。

対照群には検体を含ませないで同様の処置を行った。

惹 起；局所感作2週間後に、左側脇腹の皮膚を剃毛し、検体の1%液を染み込ませた濾紙パッチ(2cm×2cm)を局所暴露の場合と同様の方法で適用した。適用24時間後に被覆を除去した。

対照群にはコーン油のみを同様に適用した。

再惹起；初回惹起2週間後に再度全動物の右側脇腹に初回と同様に適用した。対照群にも同濃度の検体を適用した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある

観察項目：惹起暴露24及び48時間後に適用部位の皮膚反応を観察し、Draizeの基準に従って評価した。

結果：結果を下表に示した。

表. 初回惹起結果

群	感作			供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)			
					除去後 24 時間					除去後 48 時間					24 hr	48 hr		
	皮内	局所	惹起		皮膚反応評点					皮膚反応評点								
					0	1	2	3	4	計	0	1	2	3	4	計		
試験群	1% 検体	1% 検体	1% 検体	20	16	4	0	0	0	4/20	17	3	0	0	0	3/20	20	15
対照群	コーン油	コーン油	コーン油	10	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10	0	0
陽性 対照群	DNCB	DNCB	DNCB	14	4	10	0	0	0	10/14	-					-	71	-

陽性対照試験は DNCB を用いて定期的実施された結果 (1985 年 3 月実施)

表. 再惹起結果

群	感作			供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)			
					除去後 24 時間					除去後 48 時間					24 hr	48 hr		
	皮内	局所	惹起		皮膚反応評点					皮膚反応評点								
					0	1	2	3	4	計	0	1	2	3	4	計		
試験群	1% 検体	1% 検体	1% 検体	20	18	2	0	0	0	2/20	19	1	0	0	0	1/20	10	5
対照群	コーン油	コーン油	1% 検体	10	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10	0	0

検体投与群において惹起後、一部の動物に評点1の非常に軽度な紅斑が認められた。

以上の結果からメチルイソチオシアネート40%油剤の皮膚感作性は軽度陽性であると判断した。