カーバグル分散錠 200 mg

医薬品製造販売承認申請書　添付資料

第 2 部：CTD の概要（サマリー）

2.6.6　毒性試験の概要文

株式会社ポーラファルマ

目　次

2.6.6 毒性試験の概要文.....3
2.6.6.1 まとめ.....3
2.6.6.2 単回投与毒性試験.....7
2.6.6.3 反復投与毒性試験.....8
2.6.6.4 遺伝毒性試験.....12
2.6.6.5 がん原性試験.....19
2.6.6.6 生殖発生毒性試験.....20
2.6.6.7 局所刺激性試験.....24
2.6.6.8 その他の毒性試験.....24
2.6.6.9 考察及び結論.....27
2.6.6.10 図表.....31

略語一覧表

略語	定義（英語）	定義（日本語）
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度 - 時間曲線下面積
BMC	Bone Mineral Contents	骨塩量
BMD	Bone Mineral density	骨密度
CMC	Carboxymethylcellulose	カルボキシメチルセルロース
CP	Cyclophosphamide	シクロホスファミド
DXA	Dual-Energy X-ray Absorptiometer	二重エネルギーX 線吸収測定装置
DMSO	Dimethylsulfoxide	ジメチルスルフォキシド
Diaza	Diaza-1,3-Dione-2,4-Carboxy-7-Cycloheptane	ジアザ - 1、3 - ジオン - 2、4 - カルボキシ - 7 - シクロヘプタン
GD	Gestation Day	妊娠日齢
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の基準に関する省令
5-HPA	Hydantoin-5-Propionic Acid	ヒダントイン - 5 - プロピオン酸
MPE	Micronucleated Polychromatic Erythrocytes	小核多染性赤血球
NAGS	N-acethylglutamate synthase	N - アセチルグルタミン酸合成酵素
NE	Normochromatic Erythrocytes	正染性赤血球
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
NOEL	No Observed Effect Level	無作用量
NQO	4-Nitrosoquinoline-N-Oxide	4 - ニトロソキノリン - N - オキシド
OTM	Olive Tail Moment	オリーブテイルモーメント
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	増殖細胞核抗原
PE	Polychromatic Erythrocytes	多染性赤血球

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

カルグルミン酸の安全性を評価するため非臨床毒性試験として、単回投与毒性試験（ラット）、反復投与毒性試験（ラット）、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験（ラット、ウサギ）を実施した。カルグルミン酸の対象疾患は先天性の疾患であり、生後直後から投与が開始される可能性があることから、反復投与毒性試験では新生児ラット及び幼若ラットを用いた。また、生涯にわたり投与を継続する可能性があることから、がん原性試験（ラット）を実施した。更に、カルグルミン酸の不純物である 5-HPA 及び Diaza の遺伝毒性試験を実施した。なお、原薬合成の技術的課題により、不純物の少ない原薬が大量に合成できないため、非げっ歯類の毒性試験は実施できなかった。

全ての毒性試験は GLP を遵守して実施した。毒性試験の一覧を**表 2.6.6-1** に示した。

表 2.6.6-1　毒性試験一覧

試験の種類 及び投与期間	動物種等	投与方法 等	投与量（mg/kg/日） 又は処置濃度	被験物質 （バッチ No）
単回投与毒性試験				カルグルミン酸
単回	ラット	経口	2806*	（KLA1028B）[1)]
		静脈内	238.6**	（KLA1028B）[1)]
反復投与毒性試験				カルグルミン酸
2 週 （分娩後 4～21 日） 26 週間	ラット （日齢 4 日）	経口	0,250,500,1000,2000	（05031001P39）
	ラット （日齢 28 日）	経口	0,500,1000	（05031001P38） （05031001P39） （05031002P42） （08031010P51） （08031010P52）
遺伝毒性試験				カルグルミン酸
復帰突然変異	ネズミチフス菌	*In vitro* S9+、S9-	0~5000 μg/plate	（KLA1028B）[1)]
	ネズミチフス菌	*In vitro* S9+、S9-	0~5000 μg/plate	（04037102）
染色体異常	ヒト末梢リンパ球	*In vitro* S9+、S9-	0,46,144,450, 1408 μg/plate	（KLA1028B）[1)]
	ヒト末梢リンパ球	*In vitro* S9+、S9-	0~1000 μg/plate	（3030804P282）
	ヒト末梢リンパ球	*In vitro* S9-、中和	0,313.9,560.2, 1000 μg/plate	（3030804P282）

表 2.6.6-1 毒性試験一覧（続き）

試験の種類 及び投与期間	動物種等	投与方法等	投与量（mg/kg/日） 又は処置濃度	被験物質 （バッチ No）
小核試験	ラット	経口	0,2210,3940,7040	(KLA1028B) [1)]
	ラット	経口	0,2000,7000	(KLA1028B) [1)] (03030804P282)
小核試験（28 日間）	ラット （日齢 28 日）	経口	0,500,1000	(05031001P38) (05031001P39) (05031002P42)
がん原性試験				カルグルミン酸
104 週	ラット	経口	0,100,300,1000	(12100738) (12100464) (12100465) (12100466) (12100739)
生殖発生毒性試験				カルグルミン酸
雌受胎能、胚・胎児発生 （交配前 15 日～妊娠 17 日）	ラット	経口	0,500,2000	(05031011P63) (05031111P105)
雄受胎能 （交配前 26+2 週～雌妊娠 15 日） 雌：無処置	ラット （26 週間反復投与毒性試験の一部）	経口	0,500,1000	(05031001P38) (05031001P39) (05031002P42) (08031010P51) (08031010P52)
胚・胎児発生 （妊娠 6 日～18 日）	ウサギ	経口	0,250,1000	(05031207P124) (05031212P142) (05031301P143)
出生前後の発生並びに母体の機能 （妊娠 6 日～授乳 21 日）	ラット	経口	0,500,2000	(05031112P106) (05031207P123) (05031207P124)

[1)]：不純物（5-HPA）含量 0.3%

他のバッチは全て、不純物 0.01%未満～0.02%未満

*：予試験：703, 1407, 2811 mg/kg、本試験：2806 mg/kg

**：予試験：21, 70.3, 238.6 mg/kg、本試験：238.6 mg/kg

表 2.6.6-1 毒性試験一覧（続き）

試験の種類 及び投与期間	動物種等	投与方法 等	投与量（mg/kg/日） 又は処置濃度	被験物質
その他の毒性試験（不純物）				
復帰突然変異	ネズミチフス菌・大腸菌	*In vitro* S9+、S9-	0,50,150,500,1500, 5000 μg/plate	5-HPA
染色体異常	ヒト末梢リンパ球	*In vitro* S9+、S9-	0,312.5,625,1250, 2500,5000 μg/plate	5-HPA
小核試験 （1日1回、2日間）	マウス	経口	雄:0, 312.5,625,1250 雌:0, 500,1000,2000	5-HPA
コメット試験 （1日1回、2日間）	マウス	経口	肝臓:0, 312.5,625,1250 胃: 0,625,1250	5-HPA
	マウス	経口	肝臓:0, 30,100,300,600	5-HPA
復帰突然変異	ネズミチフス菌	*In vitro* S9+、S9-	0,50,150,500,1500, 5000 μg/plate	Diaza

2.6.6.1.1 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験はラットを用いて経口投与と静脈内投与により実施された。経口投与の最高濃度である 2806 mg/kg において、一般状態に特記すべき所見は認められず、体重の変動や剖検時の異常も認められなかったため、概略の致死量は 2806 mg/kg 超であると判断した。

また、静脈内投与では、生理食塩水における溶解上限の 238.6 mg/kg で毒性を示さなかったため、概略の致死量は 238.6 mg/kg 超であると判断した。

2.6.6.1.2 反復投与毒性試験

NAGS 欠損症患者ではカルグルミン酸が生涯にわたり投与されることから、反復投与毒性試験では、新生児ラットの 2 週間反復経口投与毒性試験により生後初期の毒性について検討するとともに、幼若ラットの 26 週間反復経口投与毒性試験により長期投与の毒性について検討した。

新生児ラットにおけるカルグルミン酸の 2 週間反復経口投与毒性試験では、2000 mg/kg/日で全例が死亡に至り、1000 mg/kg/日で橙色便、胸腺重量の低下、体重増加抑制および腎盂拡張が認められた。本試験におけるカルグルミン酸の無毒性量（NOAEL）は 500 mg/kg/日と推定された。

幼若ラットにおけるカルグルミン酸の26週間反復経口投与毒性試験では、1000 mg/kg/日群で唾液分泌過多を認めるとともに、肝臓の多巣性肝細胞壊死およびハーダー腺の壊死性炎症の増加がみられた。したがって、本試験における、NOAELは500 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.1.3 遺伝毒性試験

カルグルミン酸の遺伝毒性試験では、不純物である5-HPAの含量が異なる2つのバッチ（規格外の0.3%、規格内の0.05%未満）を用いて、それぞれ復帰突然変異試験、ヒト末梢リンパ球を用いた染色体異常試験および小核試験が実施された。

復帰突然変異試験では陰性と判定された。ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験では陽性（構造異常）であったが、不純物を用いた遺伝毒性試験の結果より不純物が関与している可能性は乏しく、投与液添加後の培地の中和処理により陰性を示したことから、この陽性反応はカルグルミン酸に起因する培地中のpH変化が原因と考えられた。ラット小核試験では、高用量条件下で実施された試験において陽性結果が得られ、小核誘発性を有する可能性を否定できなかった。しかし、幼若ラットを用いた26週間反復経口投与毒性試験の一部として実施した再試験（4週間投与時の骨髄を用いて実施）では陰性を示し、ヒト推定曝露量との安全域を踏まえると、臨床使用下で小核誘発性を示す可能性は低いと考えられた。

2.6.6.1.4 がん原性試験

ラットを用いた2年間反復経口投与がん原性試験では、雌雄共に全ての被験物質群で、弁粘液腫様変化の発生率増加もしくは重症化が、さらに、弁粘液腫様変化に起因したと考えられる僧帽弁血栓症および腎梗塞が認められた。一方で、被験物質に関連すると考えられる腫瘍性病変は観察されなかった。したがって、本試験条件下においてカルグルミン酸は、がん原性を示さないと結論された。

2.6.6.1.5 生殖発生毒性試験

雌受胎能および胚・胎児発生に関する試験では、雌ラットを用いてカルグルミン酸を交配前15日から妊娠17日まで1日1回経口投与した。2000 mg/kg/日で唾液分泌過多及び摂餌量と体重増加の僅かか軽度の減少があった。母動物に対するNOAELは500 mg/kg/日、受胎能と胚・胎児形成に対するNOAELは2000 mg/kg/日と推定された。

幼若ラットの26週間反復経口投与毒性試験内で、雄受胎能と雌性周期への影響を評価した。雄受胎能については、投与26週目から投与雄を非投与雌と交配した。雌性周期については、膣洗浄液により評価した。1000 mg/kg/日で唾液分泌過多が認められた以外、毒性は認められなかったため、雄受胎能と雌性周期に対するNOAELは、1000 mg/kg/日と推定された。

胚・胎児発生毒性試験では、ウサギを用いて器官形成期間中の妊娠雌ウサギに交配後 6 日から 18 日までカルグルミン酸を 250 あるいは 1000 mg/kg/日を 1 日 1 回経口投与した。1000 mg/kg/日投与群で体重増加の減少が認められた。親動物に対する NOAEL は 250 mg/kg/日、発生毒性に対する NOAEL は 1000 mg/kg/日と推定された。

出生前後の発生毒性試験では、妊娠ラットの着床から離乳（妊娠 6 日から分娩 21 日）までカルグルミン酸を 1 日 1 回経口投与した。母動物については、2000 mg/kg 群において 3 例の死亡、唾液過多、妊娠期間の体重増加および摂餌量の減少を認めた。交尾および分娩に関連する毒性変化は観察されなかった。出生児については、2000 mg/kg 群において、授乳開始の 4 日間に高い死亡率を認め、500 mg/kg および 2000 mg/kg 群の体重増加抑制が授乳終了まで認められた。乳汁中に排泄されたカルグルミン酸により、授乳期間中に 500 mg/kg 群の F1 出生児に体重低下がみられたが、交配前期間終了までに対照群と同程度まで回復した。出生児の身体的発達、性成熟において毒性変化は認められず、行動・機能検査においても異常はみられなかった。また、F1 出生児の交尾、受胎能、分娩へも影響は認められなかった。母動物に対する NOAEL は、500 mg/kg/日と判断された。一方で、出生児の体重、摂餌量への影響を考慮し、出生児に対する NOAEL を定めることはできなかった。

2.6.6.1.6 その他の毒性試験

カルグルミン酸の不純物である 5-HPA と Diaza について、遺伝毒性試験が実施された。5-HPA はヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験では陽性を示したが、復帰突然変異試験、ラット小核試験、マウスコメット試験で陰性を示し、生体内で遺伝毒性は示さないと考えられた。Diaza は復帰突然変異試験で陰性を示した。

なお、本資料中に記載したカルグルミン酸について、それぞれのバッチ No.とその純度、不純物の含量、研究報告 No.と試験内容を**表 2. 6. 7. 4** に示す。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

カルグルミン酸の単回投与毒性試験はラットを用いて、経口投与と静脈内投与により実施された。

2.6.6.2.1 ラットを用いた単回経口投与毒性試験

（試験 No. 800/005、添付資料 4. 2. 3. 1-1、概要表 2. 6. 7. 5）

【試験方法】

5～7 週齢の SD ラット（雌雄各 5 匹/群）を用いてカルグルミン酸を単回経口投与した。カルグルミン酸は 1%CMC 溶液に懸濁し、2806 mg/kg を経口投与した。生死を確認するとともに一般状態観察を投与日は投与後 15 分、1、2、4 時間に、翌日以降は 1 日 1 回、14 日

間実施した。体重は投与直前、8 日目および 15 日目に測定した。剖検は、15 日目の一般状態観察の後に行った。

【試験成績】

死亡例は認められなかった。観察期間中の一般状態、体重及び肉眼的所見に異常は認められなかった。

以上の結果から、カルグルミン酸の経口投与における概略の致死量は 2806 mg/kg 超であると判断した。

2.6.6.2.2 ラットを用いた単回静脈内投与毒性試験

(試験 No. 800/008、添付資料 4. 2. 3. 1-2、概要表 2. 6. 7. 5)

【試験方法】

5～7 週齢の SD ラット(雌雄各 5 匹/群)を用いてカルグルミン酸を単回静脈内投与した。カルグルミン酸は無菌生理食塩水 (0.9%) に溶解し、238.6 mg/kg を静脈内投与した。生死を確認するとともに一般状態観察を投与日は投与後 15 分、1、2、4 時間に、翌日以降は 1 日 1 回、14 日間実施した。体重は投与直前、8 日目および 15 日目に測定した。剖検は、15 日目の一般状態観察の後に行った。

【試験成績】

死亡例は認められなかった。観察期間中の一般状態、体重及び肉眼的所見に異常は認められなかった。

以上の結果から、カルグルミン酸の静脈内投与における概略の致死量は 238.6 mg/kg 超であると判断した。なお、238.6 mg/kg は生理食塩水における溶解限界かつ技術的投与可能最大量である。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

新生児 ラットを用いたカルグルミン酸の 2 週間反復経口投与毒性試験と幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験を行った。

2.6.6.3.1 新生児ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験

(試験 No. 20329 TSR、添付資料 4. 2. 3. 2-1、概要表 2. 6. 7. 8A)

【試験方法】

生後 4 日目から 21 日目まで、SD 新生児ラット (雌雄各 8 匹 (雌雄各 4 匹の同腹仔) /群) にカルグルミン酸を 250、500、1000 及び 2000 mg/kg/日を 1 日 1 回経口投与した。投与液は、カルグルミン酸を 1%CMC 溶液に懸濁させ調製し、媒体対照群には 1%CMC 溶液を投与した。ただし、初回投与日に、2000 mg/kg/群にて 1 例の死亡を認めたことから、新たに新生児 5 匹 (雄 2 匹と雌 3 匹) を同群に追加した。

一般状態観察、および死亡確認を毎日行い、体重測定を週 2 回実施した。また、身体的

発達および反射発達の評価を行った。分娩後 22 日目に、血液検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、器官重量測定および病理組織学的検査を実施した。

さらに、トキシコキネティクスのためのサテライト群を 2 群[250 mg/kg/日（低用量群）および 2000 mg/kg/日（高用量群）]を設け、各群雌雄各 9 匹にカルグルミン酸を生後 4 日目から 21 日目まで投与し、最終投与日に 6 時点（0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間）の採血を行った。

【試験成績】

2000 mg/kg/日投与群では 2 日目から 14 日目に、サテライト群を含む全例で死亡が確認された。また、250 mg/kg/日投与群で雌雄各 4 例、500 mg/kg/日投与群で雌雄各 2 例および 1000 mg/kg/日投与群で雌 1 例の死亡が認められた。ただし、500 mg/kg/日以下の投与群の死亡例は、死亡直前の一般状態に異常は認められなかったため、被験物質による影響と判断しなかった。

500 mg/kg/日以下の投与群の生存例では、一般状態に異常は認められなかった。1000 mg/kg/日投与群は、一部の雌雄で橙色便を認め、2000 mg/kg/日投与群は、死亡前に皮膚冷感、四肢蒼白、衰弱が観察された。体重推移は、1000 mg/kg/日投与群で軽度な体重増加の減少を認め、2000 mg/kg/日投与群で、死亡まで顕著な体重増加抑制がみられた。身体的発達および反射発達検査では、1000 mg/kg/日以下の投与群において、異常は認められなかった。2000 mg/kg/日群では、耳介開展、毛の成長と平面立ち直りについて異常は認められなかったが、全例の死亡により、切歯崩出、開眼、耳介管開口、断崖回避と空中立ち直り反射については、評価できなかった。血液学的および血液生化学的検査では、1000 mg/kg/日以下の投与群において、異常は認められなかった。250 mg/kg/日群の雄のみ測定された尿 pH は、溶媒対照群と比較し低値を示した。器官重量は、1000 mg/kg/日投与群で胸腺重量の低下を認めた。剖検では 1000 mg/kg/日投与群で腎盂拡張が認められた。

トキシコキネティクスは、2000 mg/kg/日投与群が全例死亡したため、250 mg/kg/日投与群のみで実施した。最大血漿中薬物濃度は投与 4 時間後に到達し、その血漿中薬物濃度は 39.1～50.4 μg/mL であった。投与 24 時間後においても僅かにカルグルミン酸は検出された。また、血漿中濃度推移に顕著な雌雄差は認められなかった。

以上の結果から、新生児 SD ラットに分娩後 4 日目から 21 日目まで 1 日 1 回 18 日間経口投与したとき、カルグルミン酸は 250 及び 500 mg/kg/日で毒性変化は認められず、1000 mg/kg/日では 1 例の死亡、橙色便、胸腺重量の低下、体重増加抑制および腎盂拡張が認められ、2000 mg/kg/日では全例が死亡した。したがって、NOAEL は 500 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.2 幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験

（試験 No. 20330 TCR、添付資料 4. 2. 3. 2-2、概要表 2. 6. 7. 8B）

【試験方法】

28 日齢の幼若 SD ラット（雌雄各 10 匹/群）を用いて、カルグミン酸を 26 週間反復経口投与した。試験群として、500 及び 1000 mg/kg/日のカルグミン酸投与群と媒体対照（1%CMC）

群を設けた。投与期間は雄 28 週間、雌 26 週間とし、1 日 1 回連続投与した。

一般状態観察は毎日行い、体重および摂餌量測定（13 週間まで週 1 回、それ以降は 4 週間に 1 回）、歯の検査（投与前、投与 2、3、4、8、13 及び 26 週）、体長測定（投与前、投与 4、8、13 及び 25 週）、眼科学的検査（媒体対照群及び高用量群のみ、投与 12 及び 25 週）を実施した。また、骨塩量（BMC）及び骨密度（BMD）を、投与 4、8、13、25 週に各群の雄 5 例を用いて、加えて投与 27 週の剖検時に、各群の生存例のうち 5 例を選び、二重エネルギーX 線吸収測定法（DXA）で測定した。血液検査、血液生化学検査及び尿検査は、生存例について投与 12 および 25 週に実施した。

投与 27 週に雌を、投与 28 週に雄を安楽死させ、また死亡した 3 例の雄についても剖検を行った。器官重量測定は、下記 Table に示した組織を対象に実施した。病理組織学的検査については、媒体対照群、1000 mg/kg/日群、肉眼的異常を示した生存例及び死亡例については下記 Table に示した組織を、500 mg/kg/日群については十二指腸、回腸、腎臓、肝臓、脾臓、胸腺及び右大腿骨を評価した。

生殖機能に関する評価を、本試験の一部として実施した（詳細は、**2.6.6.6.2 ラットを用いた雄受胎能および雌性周期に関する毒性試験（幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験の一部として実施）**に記載）。投与 26 週から、投与雄と薬剤非投与の未交尾雌とを交配させ、生殖腺機能、交尾行動、雄受精能を評価した。薬剤非投与の未交尾雌に子宮摘出（交尾後 15 日）を行い、黄体数、生存および死亡胚の数、着床部位の数および胚吸収の数を評価した。また、投与雄の精液（精巣上体及び精巣）を評価した。なお、投与雌全例について、Day 80-86 および Day 120-Day 133 の性周期を 1 日 1 回、評価した。

免疫毒性については、主要リンパ器官の重量測定を行い、パイエル板（十二指腸及び回腸あるいは空腸）の観察、胸骨及び大腿骨の骨髄細胞性の観察を行った。さらに、最終投与後の血液を採取し、リンパ球サブセットの同定を実施した。

細胞増殖については、十二指腸、空腸、回腸、精巣上体、腎、肝、精巣及び卵巣について、増殖細胞核抗原（PCNA）の免疫組織化学的検査により評価を行った。

さらにトキシコキネティクスのためのサテライト群（各用量に雌雄各 9 例）を設け、投与初日にサテライト群から、また投与 26 週に試験群の 500 及び 1000 mg/kg/日群の 8 例から、8 時点（0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 12 および 24 時間）の採血を行った。また、尿中カルグミン酸量を測定するため、最終投与 24 時間後の尿サンプルを採取した。なお、投与 4 週間後に、各サテライト群のうち、雄5匹と雌5匹を別試験(**2.6.6.4.8 ラット小核試験:試験No. 20334 MAR**）に用いた。

図 2.6.6.3.2-1 重量測定および病理組織学的検査の対象組織

TISSUE PROCEDURE TABLE

Organs	Organ weights	Preservation of tissue	Microscopic examination	PCNA
Macroscopic lesions		X	X	
Adrenals	X	X	X	
Aorta		X		
Brain (including medulla/pons cerebellar and cerebral cortex)		X	X	
Cecum		X	X	
Colon		X	X	
Duodenum		X	X	X
Esophagus		X	X	
Epididymis*	X	X	X	X (right)
Eyes with Harderian glands		X	X	
Right femoral bone with articulation**		X	X	
Heart	X	X	X	
Ileum		X	X	X
Jaws (maxillary-mandibular)		X		
Jejunum		X	X	X
Kidneys	X	X	X	X
Liver	X	X	X	X
Lumbar vertebra (L1 to L5) (bone and cartilage)		X		
Lungs with bronchi		X	X	
Lymph nodes (mandibular and mesenteric)		X	X	
Mammary glands/area		X	X	
Ovaries***	X	X	X	X
Pancreas		X	X	
Pituitary gland		X	X	
Prostate		X	X	
Rectum		X	X	
Right tibia (bone and cartilage)		X		
Salivary glands (sublingual and submaxillary)		X	X	
Sciatic nerve		X	X	
Seminal vesicles		X	X	
Skeletal muscle		X	X	
Skin		X	X	
Spinal cord (cervical, thoracic and lumbar)		X	X	
Spleen	X	X	X	
Sternum with bone marrow		X		
Stomach with forestomach		X	X	
Testis*	X	X	X	X (right)
Thymus	X	X	X	
Thyroids with parathyroids	X	X	X	
Tongue		X		
Trachea		X	X	
Urinary bladder		X	X	
Uterus (horns and cervix)	X	X	X	
Vagina		X	X	

* : right and left organ weighed separately right organ sampled and examined microscopically.

** : for DXA measurements and microscopic examination.

*** : detailed examinations of follicles were not performed as no relevant findings were seen in female genital organs at microscopy.

【試験成績】

カルグルミン酸投与に起因する死亡は投与期間中にみられなかった。一般状態観察では、500mg/kg/日群（雄 1/19 匹、雌 0/19 匹）、1000 mg/kg/日群（雄 10/19 匹、雌 11/19 匹）に唾液

分泌過多が認められ、その他全身毒性を示唆する一般状態所見はみられなかった。体重、摂餌量、歯の検査、体長測定、眼科的検査、BMC、BMD、血液検査、血液生化学検査及び尿検査で、カルグルミン酸投与に起因する異常は認められなかった。また、リンパ器官重量、骨髄細胞性、剖検時のリンパ器官（脾臓、胸腺、リンパ節）およびパイエル板の病理組織学的検査、リンパ球サブセット、PCNA による細胞増殖評価、剖検、器官重量測定において異常は認められなかった。病理組織学的検査では、1000 mg/kg/日群で腎臓の間質単核細胞集簇、肝臓の多巣性肝細胞壊死およびハーダー腺の壊死性炎症の増加を認めた。ただし、腎臓の間質単核細胞集簇については、血液生化学的検査、尿量、臓器重量および病理組織学的検査（PCNA による細胞増殖評価を含む）で腎障害を疑う所見が得られていないことから、毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。その他、雌受胎能評価として実施した性周期への影響は確認されなかった。

トキシコキネティクスでは、初回投与時の血漿中薬物濃度は、雌雄差は認められなかった。また、用量依存的な AUC の増加がみられた。C_{max} は、投与後 2 から 4 時間で達した。消失半減期に、投与用量による変化は認められなかった。投与 26 週間後では、性差および用量に関係なく、C_{max} に投与後 2 から 3 時間で達した。約 3 時間の消失半減期により、血漿中薬物濃度は減少した。T_{max} および $T_{1/2}$ にも、性差および用量による違いはみられなかった。一方で、AUC に雌雄で用量依存性は認められなかったが、尿中のカルグルミン酸量は、雌でのみ用量依存性を認めた。

以上の結果から、幼若ラットにカルグルミン酸を 500 あるいは 1000 mg/kg/日で 26 週間 1 日 1 回強制経口投与したとき、認められた毒性変化は、1000 mg/kg/日群における、唾液分泌過多、肝臓の多巣性肝細胞壊死およびハーダー腺の壊死性炎症であった。したがって、本試験における、NOAEL は 500mg/kg/日と推定された。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験の概要を**表 2. 6. 6. 4-1** に示す。

表2. 6. 6. 4-1 遺伝毒性試験の概要

試験の種類	動物種/系統	投与量又は処置濃度 バッチNo	結果	
			S9mix	変異原性
復帰突然変異試験1	ネズミチフス菌	52～5000 μg/plate KLA1028B[1)]	存在下	陰性
			非存在下	陰性
復帰突然変異試験2	ネズミチフス菌	52～5000 μg/plate 040307102	存在下	陰性
			非存在下	陰性
染色体異常試験1	ヒト末梢リンパ球	24～1408 μg/mL KLA1028B[1)]	存在下	陰性
			非存在下	陽性

染色体異常試験2	ヒト末梢リンパ球	333.3～1000 μg/mL 3030804P282	存在下	陰性
			非存在下	陰性
染色体異常試験3	ヒト末梢リンパ球	313.9～1000 μg/mL 3030804P282	非存在下/中和化	陰性
			非存在下/非中和化	陽性

表2.6.6.4-1 遺伝毒性試験の概要（続き）

試験の種類	動物種/系統	投与量又は処置濃度 バッチNo	結果
小核試験1	雌雄SD系ラット	690～7040 mg/kg単回 KLA1028B/[1)]	陽性(3940,7040 mg/kg)
小核試験2	雌雄SD系ラット	2000及び7000 mg/kg単回 KLA1028B[1)], 03030804P282	陰性
小核試験3（26週間反復経口投与毒性試験のサテライト）	幼若雌雄SD系ラット	500及び1000 mg/kg 4週間 05031001P38,05031001P39 05031002P42	陰性

[1)]：規格外バッチ（不純物5-HPA 0.3%）、他のバッチは、全て規格内（不純物5-HPA0.05未満）

2.6.6.4.1 細菌を用いた復帰突然変異試験-1

(試験 No. 800/001、添付資料 4. 2. 3. 3. 1-1、概要表 2. 6. 7. 9A)

【試験方法】

ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）の TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA102 株を用いて、代謝活性化系（ラット肝 S9）存在下及び非存在下で、プレート法にて復帰突然変異試験を実施した。カルグルミン酸はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解させた。

TA100 株を用いた予備試験により、顕著な毒性と沈殿物が認められなかった 5000 μg/plate を最高用量とした。実験 1 では 52、164、512、1600 と 5000 μg/plate（ハーフ - ログ間隔）の濃度を用いた。実験 2 では詳細に検討するため、用量範囲を狭め、492、878、1568、2800 と 5000 μg/plate（クオーター - ログ間隔）を用いた。

【試験成績】

カルグルミン酸（バッチ No. KLA1028B 処理では、代謝活性化系の存在下及び非存在下とも、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、カルグルミン酸（バッチ No. KLA1028B）の *in vitro* における復帰突然変異原性は陰性と判断した。

2.6.6.4.2 細菌を用いた復帰突然変異試験-2

(試験 No. 800/010、添付資料 4. 2. 3. 3. 1-2、概要表 2. 6. 7. 9B)

高純度のカルグルミン酸（バッチ No. 040307102）の変異原性活性を検討することを目的として実施した。

【試験方法】

ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）の TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA102 株を用いて、代謝活性化系（ラット肝 S9）存在下及び非存在下で、プレート法にて復帰突然変異試験を実施した。カルグルミン酸はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解させた。

TA100 株を用いた予備試験により、顕著な毒性と沈殿物が認められなかった 5000 μg/plate を最高用量とした。実験 1 では 52、164、512、1600 と 5000 μg/plate（ハーフ - ログ間隔）の濃度を用いた。実験 2 では詳細に検討するため、用量範囲を狭め、492、878、1568、2800 と 5000 μg/plate（クオーター - ログ間隔）を用いた。

【試験成績】

カルグルミン酸（バッチ No. 040307102）処理では、代謝活性化系の存在下及び非存在下とも、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、カルグルミン酸（バッチ No. 040307102）の *in vitro* における復帰突然変異原性は陰性と判断した。

2.6.6.4.3 ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-1

(試験 No. 800/009、添付資料 4. 2. 3. 3. 1-3、概要表 2. 6. 7. 9C)

【試験方法】

カルグルミン酸(バッチ No. KLA1028B)の染色体構造異常及び数的異常誘発性の有無を、ヒトリンパ球(提供者 2 名)を用いて評価した。カルグルミン酸はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解させた。最高用量は、DMSO におけるカルグルミン酸の溶解限界から 1408μg/mL とした。また、DMSO 最終濃度は 2%であった。陽性対照は、Cyclophosphamide (CP)と 4-Nitroquinoline N-oxide (NQO)とし、それぞれ代謝活性化系の存在下(S9mix)及び非存在下の条件下(−S9mix)で用いた。

本試験では、2 試験が実施された。実験 1 では、代謝活性化系(S9mix)及び非存在下(−S9mix)の条件で、0.5、1.6、4.8、15、46、144、450 及び 1408 μg/mL の用量を設定し、4 時間の薬剤処理を行い、処理開始から 24 時間後に細胞を回収した。実験 2 では、非代謝活性化系(−S9mix)の条件は、24、44、78、140、248、442、788 及び 1408 μg/mL の用量を設定し、細胞の回収まで 24 時間及び 48 時間の薬剤処理が行われた。代謝活性化系(S9mix)の条件は、S9mix の毒性のため薬剤処理を 4 時間で行い、処理開始から 48 時間後に細胞を回収した。処理開始から細胞回収までの時間を延長することで、実験 1 では検討できなかった細胞周期の遅延についても評価した。また、陽性および媒体対照群についても同様の操作が行われた。

【試験成績】

実験 1 では、染色体異常の誘発反応は認められなかった。

実験 2 では、代謝活性化の条件下における 48 時間の薬剤処理で 442 μg/mL に統計的に有意な異常細胞数の増加を示しが、用量に依存していないため、この変化は、偶発的もしくは生物学的に意味がないものと判断した。一方で、非代謝活性化の条件下で 24 時間の薬剤処理では、442 から 1408 μg/mL までの用量範囲で用量依存性の染色体異常誘発反応(構造異常)を示した。この増加は 788 と 1408 μg/mL で統計的に有意であった。特に、最高用量(1408 μg/mL)では、異常細胞頻度は陰性対照値のほぼ 3 倍であった。

以上の結果から、カルグルミン酸(バッチ No. KLA 1028B)は 788 μg/mL 以上で、非代謝活性化の条件下では、ヒト末梢リンパ球の染色体異常を誘発すると判断した。

2.6.6.4.4 ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-2

(試験 No. [redacted]-R [redacted]0904、添付資料 4. 2. 3. 3. 1-4、概要表 2. 6. 7. 9D)

高純度のカルグルミン酸(バッチ No. 3030804P282)の染色体異常誘発能を検討することを目的として実施した。

【試験方法】

ヒト末梢血リンパ球を用いて染色体異常試験が実施された。本試験は、2 試験が実施された。実験 1 では、代謝活性化系の存在下(S9mix)の条件で、DMSO を溶媒として、カルグ

ルミン酸の用量を 111.1、192.5、333.3、577.4 および 1000 μg/mL と設定した。薬剤処理は 4 時間行い、処理開始から 44 時間後に細胞を回収した。投与液（333.3、577.4 および 1000 μg/mL）は 7.5% 重炭酸ナトリウムを添加し中和化を行った。陽性対照物質として、Cyclophosphamide 0.036 mM（10 μg/ml）を用いた。

実験 2 では、代謝活性化系及び非存在下の条件で、DMSO を溶媒として、カルグルミン酸の用量を 333.3、577.4 および 1000 μg/mL と設定した。非代謝活性化系（−S9mix）では、薬剤処理時間を 20 及び 44 時間設定した。代謝活性化系（S9mix）では 4 時間の薬剤処理後、処理開始から 44 時間後に細胞を回収した。投与液（333.3、577.4 および 1000 μg/mL）は 7.5% 重炭酸ナトリウムを添加し中和化を行った。陽性対照物質として、Mitomycin C 0.75 μM（0.25 μg/mL）を用いた。

【試験成績】

実験 1 および実験 2 ともに、染色体異常の誘発反応は認められなかった。

以上の結果から、カルグルミン酸（バッチ No. 3030804P282）は、培地の中和処理条件下にてヒト末梢リンパ球の染色体異常を誘発しないと判断した。

2.6.6.4.5 ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-3

（試験 No.[redacted]-R [redacted]1108、添付資料 4. 2. 3. 3. 1-5、概要表 2. 6. 7. 9E）

試験 No.800/009 で認められた染色体異常陽性反応の原因究明のため、非代謝活性化系に与える、pH の影響を検討することを目的として実施された。

【試験方法】

高純度のカルグルミン酸（バッチ No. 3030804P282）を用いて、ヒト末梢リンパ球による染色体異常試験が、投与液を中和化もしくは非中和化した条件にて実施された。

非代謝活性化条件の下、DMSO を溶媒として、カルグルミン酸（313.9、560.2 及び 1000 μg/mL）を細胞の回収まで 24 時間処理した。なお、投与液の中和化には、7.5% 重炭酸ナトリウムが添加された。また、溶媒対照物質として DMSO を、陽性対照物質として Mitomycin C 0.75 μM（0.25 μg/mL）を用いた。

【試験成績】

非中和化条件において、カルグルミン酸投与群の 560.2 及び 1000 μg/mL において、染色体構造異常の頻度が統計学的に有意な増加を認めた。一方で、中和化条件では、染色体異常は認められなかった。

以上の結果から、高純度のカルグルミン酸（バッチ No. 3030804P282）は、非代謝活性系において、投与液の非中和化条件では染色体異常を示すが、中和化を行うと染色体異常を誘発しないことが判明した。このことから、試験 No.800/009 で認められた染色体異常陽性反応は、少なくとも、投与液に起因した試験培地中での pH が影響した可能性が見いだされた。

2.6.6.4.6 ラットを用いた小核試験-1

(試験 No. 800/004、添付資料 4. 2. 3. 3. 2-1、概要表 2. 6. 7. 10A)

【試験方法】

予備試験として、5～6 週齢の SD ラット（3 例/雌雄/群）を用い、カルグルミン酸（690、1240、2210、3940 及び 7040 mg/kg）を単回経口投与（10 mL/kg）し、投与後 24 及び 48 時間における骨髄細胞の幼若赤血球を評価対象として小核試験を実施した。その結果、いずれの用量においても、死亡及び一般状態に変化は認められず、多染性赤血球（PCE）と正染性赤血球（NCE）との比（PCE/NCE 比）に減少は認められなかったため、本試験は、7040 mg/kg のみを用いることとした。ただし、予備試験にて、カルグルミン酸の 1%CMC による懸濁液は粘度が高く、正確に投与することが困難であったため、本試験の投与容量は 20 mL/kg にて実施した。

本試験では、5～6 週齢の SD ラット（5 例/雌雄/群）を用い、カルグルミン酸（7040 mg/kg）、溶媒対照（1%CMC）を単回経口投与し、24 及び 48 時間後に骨髄を採取した。また、陽性対照として、Cyclophosphamide（60 mg/kg）を腹腔内投与し、投与後 24 時間で骨髄を採取した。そして、採取した骨髄内赤血球における小核の頻度を評価した。

【試験成績】

カルグルミン酸（7040 mg/kg）において、投与 24 時間後の PCE/NCE 比は減少を示し、平均 MPCE（micronucleated polychromatic erythrocytes、小核を有する多染性赤血球）頻度は、統計学的に有意に増加した。また、その増加に雌雄差は認められなかったが、投与 48 時間において最も高値（溶媒対照の 5.6 倍）を示した。Cyclophosphamide は、雌雄共に統計学的に有意な MPCE 頻度の増加を認めた。そこで、改めて予備試験での骨髄標本を使用し、平均 MPCE 頻度を再評価したところ、3940 および 7040 mg/kg において、上述同様の平均 MPCE 頻度の増加を認めた。一方で、2210 mg/kg 以下における平均 MPCE 頻度は、正常範囲内であった。

以上より、本試験条件下においてカルグルミン酸の 3940 および 7040 mg/kg は、小核誘発性を示した。

2.6.6.4.7 ラットを用いた小核試験-2

(試験 No. [redacted]-R [redacted]0505、添付資料 4. 2. 3. 3. 2-2、概要表 2. 6. 7. 10B)

本試験は、不純物[hydantoin-5-propionic acid (5-HPA)]含有量が異なる 2 つのバッチ[No. 03030804P282 (0.1% 5-HPA)及び KLA1028B (0.3% 5-HPA)]のカルグルミン酸を用いて実施された。

【試験方法】

5～6 週齢の SD ラット（5 例/雌雄/群）を用い、カルグルミン酸（各バッチごとに、2000 及び 7000 mg/kg）、溶媒対照（0.5%CMC）を単回経口投与（20 mL/kg）し、24 及び 48 時間

後に骨髄を採取した。また、陽性対照として、Cyclophosphamide（25mg/kg）を腹腔内投与し、投与後24時間で骨髄を採取した。そして、採取した骨髄内赤血球における小核の頻度を評価した。

【試験成績】

不純物含量の異なる、いずれのバッチのカルグルミン酸においても、染色体異常誘発能は認められなかった。本条件下において、不純物（5-HPA）含有量の異なる２つのカルグルミン酸は、小核誘発性を示さなかった。

2.6.6.4.8 ラットを用いた4週間反復経口投与後の小核試験

（試験No. 20334 MAR、添付資料4. 2. 3. 3. 2-3、概要表2. 6. 7. 10C）

本試験は、幼若ラットを用いた26週間反復経口投与毒性試験（試験No.20330 TCR）の一部として実施された。

【試験方法】

28日齢の幼若SDラット（雌雄各5匹/群）にカルグルミン酸（500あるいは1000 mg/kg/日）を、また溶媒対照として1%CMCを4週間反復経口投与し、29日目に骨髄を採取した。また、陽性対照としてCyclophosphamide（15 mg/kg）を単回経口投与し、24時間後に骨髄を採取した。各動物について、2000個の多染性赤血球（PE）中の小核を有する多染性赤血球（MPE）の数を計測した。また、合計1000個の赤血球（PE＋NE（正染性赤血球））をもとにPE/NE比を算出し、評価した。さらに、追加試験として、溶媒対照群と高用群の雄に対して、同様の計測を再度実施した。

【試験成績】

細胞毒性の指標となるPE/NE比は、雌雄共にカルグルミン酸投与群と溶媒対照群との間で違いは認められなかった。

雌は、カルグルミン酸投与群の平均MPE 頻度は、溶媒対照群と同等であり、有意差はなかった。一方、雄は、1000 mg/kg/日（最高用量）群の平均MPE頻度が、僅かであるが統計学的に有意な増加を認めたが、用量依存性はみられなかった。この僅かな増加の信頼性を検討するため、サンプル数を増加させる目的で、溶媒対照群と高用量群の雄で追加評価を行った。データ解析は、主試験データと追加評価データとを合わせ実施した。その結果、高用量群と溶媒対照群の間に統計学的有意差は認められなかった。したがって、主試験で認められた雄の平均 MPE 頻度の増加は、生物学的に意味がないと判断した。なお、Cyclophosphamideの平均MPE頻度は統計学的に有意な増加（$p<0.001$）を示した。

以上より、本試験条件下において、カルグルミン酸の500および1000 mg/kgは、小核誘発性を示さなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

2.6.6.5.1 ラットを用いた 2 年間反復経口投与がん原性試験

（試験 37470 TCR、添付資料 4.2.3.4.1-1、概要表 2.6.7.11）

【試験方法】

6 週齢の SD ラット（50 匹/性/群）を用い、カルグルミン酸を 1%カルボキシメチルセルロースに懸濁し、100、300、1000 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与（5 mL/kg）した。雄は 104 週間投与後に剖検を行った。雌は、1000 mg/kg 群と溶媒対照群の生存動物減少により、1000 mg/kg 群は投与 97 週で、0, 100 および 300 mg/kg は投与 102 週で剖検を行った。なお、本試験ではトキシコキネティクスは実施しなかった。

【試験成績】

雄について、1000 mg/kg 群での平均体重増加値が、対照群と比較して 10%低下していたことから、最大耐量（MTD）に達していたと考えられる。

カルグルミン酸の生存率への影響は、雄については認められなかったが、雌では 1000 mg/kg 群で生存動物数が 15 匹まで減少したため、97 週で剖検を行った。その他の雌（溶媒対照群、100 および 300 mg/kg 群）は、溶媒対照群の生存動物数が 20 匹に達した 102 週まで試験を継続した。

一般状態観察では、唾液過多が、1000 mg/kg 群の雌雄で高頻度に観察されたが、その他の一般状態に異常は認められなかった。触診可能な腫瘍の発生率（群ごとおよび動物ごと、発生部位、大きさ、形態）は、同系統のラット背景データ範囲内であった。

体重では、雌への影響は認められなかったが、1000 mg/kg 群雄の体重増加は、溶媒対照群と比べ低値を示し、投与 10 週以降に統計学的有意差を認めた。また、この変化に関連して、同群の摂餌量減少も認められた。

血液学的検査では、1000 mg/kg 群雌雄で認められた網状赤血球の僅かな低下は、高週齢に起因するとも考えられたが、被験物質の影響を完全に排除することはできなかった。

血液生化学的検査では、雄の 100 mg/kg 以上の投与群で Na^+ 及び Cl^- の高値が認められた。

病理組織学的検査では、被験物質の投与に関連する前がん病変もしくはがん病変はみられなかった。一方で、被験物質投与に関連すると考えられる非腫瘍性病変が、心臓及び腎臓で認められた。心臓では、雄の全被験物質群及び雌の1000 mg/kg群において、弁の粘液腫様変化の発生率増加を認め、雌雄ともに用量依存的な重症化がみられた。僧帽弁は、一般的に影響が出やすい弁である。僧帽弁血栓症は、粘液腫様変化に起因する変化として、被験物質群にのみ認められた。弁の血栓は、投与33週（約8ヶ月間の投与）から観察され、雌雄共に全ての被験物質群で認められ、さらに雄では用量依存的な発生率の増加及び重症化がみられた。特に、重篤な弁血栓症は、最も可能性のある死因と考えられた。腎臓では、腎梗塞が雌雄共に全ての被験物質群で認められ、その発生率に用量依存的な増加を認めた。腎梗塞は、投与34週（約8ヶ月間の投与）から認められ、僧帽弁血栓症の塞栓が腎動脈を通過したことによる2次的変化であると考えられた。重篤な腎梗塞は、100 mg/kg群雄の1例で

みられた早期死亡の原因とも考えられた。腎臓では、尿細管上皮褐色色素沈着の軽度増加が、300 mg/kg/日群（雌）及び1000 mg/kg/日（雌雄）で認められたが、リポフスチン沈着の増加によるものと考えられ、毒性学的に意義のある変化ではないと判断された。

以上の結果から、非腫瘍性変化として、弁の粘液腫様変化の発生率増加もしくは重症化を認めると共に、被験物質群にて僧帽弁血栓症及び腎梗塞がみられた。一方で、被験物質に関連すると考えられる腫瘍性病変は観察されなかった。したがって、本試験条件下においてカルグルミン酸は、がん原性を示さないと結論された。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 ラットを用いた雌受胎能及び胚・胎児発生毒性試験

（試験 No. 23288RSR、添付資料 4. 2. 3. 5. 1-1、概要表 2. 6. 7. 13A）

【試験方法】

SD 系ラット（雄 10、雌 8 週齢）を用いた。1 群 24 匹の雌のみにカルグルミン酸（500 及び 2000 mg/kg/日）を交配前 15 日から妊娠 17 日まで経口投与した。また、溶媒対照群は 1%CMC を投与した。なお、雄ラット 24 匹は交配のみに用い、カルグルミン酸を投与しなかった。全ての動物に対して、交配は、最大 14 日間設け、交配率及び交尾に要する日数を算出した。

雌は子宮摘出（交配後 20 日）後、黄体数、着床部位、胚吸収数、死亡及び生存胎児数を調べ、剖検による肉眼的観察を行い、受胎率と出産率を計算した。胎児は、体重測定、性別判定に加え、外表、内臓及び骨格検査を実施した。また、着床前もしくは着床後死亡率を算出した。

さらに、カルグルミン酸の血漿中薬物濃度を測定するため、各群雌 6 匹をサテライト群に設定し、妊娠期間中（GD 6-7 及び GD 17-18）に 6 時点（3 匹；投与直前、2 及び 8 時間後、3 匹；1, 4 及び 24 時間後）の採血を行った。

【試験成績】

2000 mg/kg 群において、投与過誤と考えられる 2 例の死亡を認めた。一般状態は、2000 mg/kg/日投与の全ての動物で、投与 7 日以降に唾液分泌過多が確認されたのみであった。体重及び摂餌量については、2000 mg/kg 群において、統計学的に有意な体重増の減少を認めるとともに、交配前及び妊娠期間での摂餌量の軽度な減少を認めた。

交配率、受胎及び出産率に関する指標は、対照群と同等であった。生存及び死亡胎児数、黄体数、胎児の雌雄比への影響は認められなかった。着床前死亡率は、500-2000 mg/kg において低値を示したが、対照群のデータが背景データよりも高い値を示したためと考えられる。胎児外表検査において、奇形や変異は認められず、体重及び内臓検査でも異常は認められなかった。骨格検査において、2000 mg/kg で、上後頭骨の不完全骨化の統計学的に有意な増加がみられ、また胎児及び同腹仔において、第 4 胸骨分節の不完全骨化の増加が見られたが、これらの変化は、母動物の毒性に起因するものと考えられた。

トキシコキネティクスについては、投与2もしくは4時間後に最大血漿中薬物濃度(C_{max})に到達した。C_{max}及びAUCは、500及び2000 mg/kg/日群の間で違いは認められなかった。AUCは、用量依存性に増加したが、C_{max}は4倍の用量の違いに対して、約2倍の増加であった。

以上の結果から、母動物で認められた体重増加の減少及び摂餌量減少を考慮し、母動物に対するNOAELは500 mg/kg/日、受胎能と胚・胎児形成に対するNOAELは2000 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.2 ラットを用いた雄受胎能および雌性周期に関する毒性試験（幼若ラットを用いた26週間反復経口投与毒性試験の一部として実施）

（試験No. 20330 TCR、添付資料4.2.3.2-2、概要表2.6.7.12A、主データ：概要表2.6.7.8B）

【試験方法】

28日齢の幼若SD雄ラットを用いて、カルグミン酸（500及び1000 mg/kg/日）を28週間（26週間＋2週間）反復経口投与した。媒体対照群には、1%CMCを投与した。投与は1日1回連続28週間行った。

生存している投与雄（溶媒対照群 9例、500 mg/kg群 8例、1000 mg/kg群 10例）は、投与26週から、薬剤非投与の未交尾雌と14日間、一対一で同居させた。膣栓あるいは膣垢中の精子確認された日を交尾日とした。交尾後15日に子宮摘出を行い、黄体数、生存及び死亡胚の数と分布、早期及び後期吸収及び着床部位を評価した。非妊娠及び交配未確認雌については、硫化アンモニウム染色にて着床の有無を確認した。精子は精巣上体から採取し、精巣上体と精巣評価を含む精子検査を実施した。

また、性周期の確認のため、Day 80-86及びDay 120-Day 133に1日1回膣洗浄液を採取し、標本スライドを評価した。

【試験成績】

一般状態は、1000 mg/kg/日群でみられた軽度かつ一過性の唾液分泌過多のみであった。雄受胎能については、交配までの期間、交配率、受胎率及び着床前後の胚吸収で異常を認めなかった。精巣上体の精子については、運動能力、数及び形態を、精巣の精子については精子頭部数（組織のグラム当たりに換算）及び精子生産量について、対照群との違いは認められなかった。また、異常な性周期を示す動物は認められなかった。

以上の結果から、カルグルミン酸を1000 mg/kg/日の用量で26週間投与しても、雄受胎能及び雌性周期への影響は認められなかったため、NOAELは1000 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.3 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験

（試験No. 24241 RSL、添付資料4.2.3.5.2-1、概要表2.6.7.14A）

【試験方法】

KBL ニュージーランド白色種の妊娠雌ウサギを用いた。試験群として 250、1000 mg/kg/日のカルグルミン酸投与群及び媒体対照群（1%CMC）を設け、交配後（妊娠）6 日目から 18 日目まで経口投与した（20 例/群）。妊娠 29 日目に剖検し、主要臓器の肉眼的観察及び子宮摘出を行い、黄体数、着床部位、早期及び後期吸収及、生存及び死亡胚の数を調べた。胎児は、体重測定、性別判定に加え、外表、内臓及び骨格検査を実施した。

さらに、トキシコキネティクスのためのサテライト群を 2 群（250 mg/kg/日及び 1000 mg/kg/日）設定し、各群妊娠雌 6 匹を追加した。妊娠 6 日と 18 日に、6 時点（0, 1, 2, 4, 8, 24 時間）の採血を行った。

【試験成績】

母動物について、1000 mg/kg 群にて妊娠 24 日で 1 例の死亡を認めた。この動物は、妊娠 6 日目から摂餌量の減少を認め、著しい体重減少が認められた。一方で、一般状態及び剖検所見において異常は認められておらず、死亡したのは 1 例のみであることから、被験物質投与に関連した変化ではないと考えられた。体重については、1000 mg/kg/日群で体重増加の減少がみられ、特に投与期間初期（妊娠 6 から 9 日の変化）で顕著であった。250 mg/kg/日では、体重増加の僅かな減少を認めたが、統計学的有意差は検出されなかった。正味の体重変化は媒体対照群よりカルグルミン酸投与群で低値を示した。摂餌量については、投与期間初期（妊娠 6 から 9 日変化）における 1000 mg/kg/日群で統計学的に有意な減少が認められた。子宮重量は、1000 mg/kg/日群で媒体対照群と比較して僅かに低値を示したが、統計学的有意差は検出されなかった。剖検による主要臓器の肉眼的観察で、異常所見はみられなかった。

胚・胎児について、子宮内死亡、生存胎児数、胎児体重、雌雄比に、異常は認められなかった。また、外表、内臓検査において、被験物質投与に関連した変化は観察されなかった。一方で、骨格検査において不完全骨化が観察されたが、用量依存性が認められなかったため、被験物質に関連した所見ではないと考えられた。

妊娠ウサギのトキシコキネティクスは、用量依存性を認めたが、妊娠 6 日に比べ妊娠 18 日では、血漿中薬物濃度の低値（C_{max} と AUC は、約 50%減少）を認めた。

以上の結果より、親動物の NOAEL は 250 mg/kg/日、発生毒性に対する NOAEL は 1000 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.4 ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

（試験 No. 24242 RSR、添付資料 4. 2. 3. 5. 3-1、概要表 2. 6. 7. 15A）

【試験方法】

SD 系妊娠雌ラットにカルグルミン酸（500 及び 2000 mg/kg/日）及び媒体対照（1%CMC）を妊娠 6 日から分娩 21 日まで 1 日 1 回経口投与（24 例/群）した。F1 出生児は生後 22 日に選別し、雌雄各 20 匹で構成される F1 世代とした。F1 世代は生殖機能検査まで実施し、雌動物は妊娠 17 日に子宮摘出を行った。

さらに、トキシコキネティクスのためのサテライト群を 2 群（250 mg/kg/日及び 2000 mg/kg/日）設定し、各群妊娠雌 4 匹を追加した。分娩後 17 日の投与 4 時間後に採血を行い、乳汁を採取した。

【試験成績】

母動物において、2000 mg/kg/日群で妊娠 18 日に 2 匹が死亡し、授乳雌の 1 匹が分娩 17 日に死亡した。これらの動物では妊娠期間中の体重増加の減少、妊娠及び授乳期間中の摂餌量の減少を認めた。2000 mg/kg 群のうち 2 例（うち 1 例は妊娠 18 日目に死亡）では盲腸拡張を認め、この変化は被験物質投与に起因する変化と考えられた。一般状態は、いずれの群においても被験物質に関連する変化は認められなかった。体重については、妊娠期間中は、500 mg/kg/日群で体重増加減少を認め、2000 mg/kg/日群では、統計学的に有意な体重増加の減少を認めた。また、授乳期間中は、分娩後 1 から 7 日における体重増加に、2000 mg/kg/日群で統計学的に有意な減少がみられた。摂餌量については、妊娠期間中では、2000 mg/kg/日群で一過性の減少を示し、授乳期間中には、500 及び 2000 mg/kg/日群で僅かな減少がみられた。妊娠率、妊娠期間、同腹生存胎児数、性別比について、異常はみとめられなかった。出生児は全例生存し、外表異常もみられなかった。

F1 動物では、2000 mg/kg/日群で分娩 1 日における同腹生存胎児数の減少及び授乳 4 日以内における出生児の死亡数の高値が認められた。500 及び 2000 mg/kg/日群はいずれも出生児の体重増加を減少させ、出生児体重は生後直後から影響が確認され、授乳 7 日から統計学的に有意な減少を示した。これら体重への影響は、特に 2000 mg/kg/日群で顕著であった。身体的発達及び反射発達検査では、毒性学的変化は認められなかった。

離乳後の F1 動物では、カルグルミン酸投与群において、最初の 1 週間で体重減少を認めたが、交配前期間終了時には媒体対照群と同様の値となった（ただし、2000 mg/kg/日群の雄を除く）。F1 雌の妊娠期間中、カルグルミン酸投与群では、媒体対照群と比べて、体重増加及び摂餌量の低値がみられた。F1 動物の神経行動学的検査では、異常は認められなかった。性成熟については、2000 mg/kg/日群において、膣開口の僅かな遅延がみられたが、受胎能への影響はみられなかった。F1 動物の交配率、交配までの期間、受胎率、妊娠率及び妊娠期間は、いずれの群においても違いは認められなかった。また、F1 動物の剖検においても、異常は認められなかった。

カルグルミン酸の血漿中濃度と乳汁中濃度を投与 4 時間後に測定した。500 及び 2000 mg/kg/日群の平均血漿中濃度はそれぞれ 69.8 μg/mL 及び 179.6 μg/mL であった。また、カルグルミン酸濃度の平均乳汁中濃度は、500 及び 2000 mg/kg/日群でそれぞれ、12.3 μg/mL 及び 36.2 μg/mL であり、血漿中濃度のほぼ 16%及び 21%であった。

以上の結果から、母動物に対する NOAEL は、500 mg/kg/日と推定された。一方で、出生児に関しては、500 mg/kg 群の F1 出生児の体重低下から NOAEL を定めることはできなかった。

2.6.6.7 局所刺激性試験

局所刺激性試験は実施していない。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 不純物 5-HPA の遺伝毒性試験

2.6.6.8.1.1 細菌を用いた復帰突然変異試験

（試験 No. ■-R ■0804、添付資料 4.2.3.7.6-1、概要表 2.6.7.18.1A）

【試験方法】

ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）の TA1535、TA1537、TA98、TA100 株及び大腸菌（*Escherichia coli*）の WP2pKM101 及び WP2uvrA.pKM101 株を用いて、代謝活性化系（ラット肝 S9）存在下及び非存在下で、プレート法にて復帰突然変異試験を実施した。5-HPA はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解させた。

全 6 株を用いた予備試験により、5-HPA の 50、150、500、1500 と 5000 μg/plate の用量を用い、処理時間を 48 時間に設定した。各々の試験は非代謝活性化と代謝活性化（S9mix）の条件下で 2 回実施した。

【試験成績】

5-HPA は、代謝活性化系の存在下及び非存在下とも、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、5-HPA の *in vitro* における復帰突然変異原性は陰性と判断した。

2.6.6.8.1.2 ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

（試験 No. ■-R ■0906、添付資料 4.2.3.7.6-2、概要表 2.6.7.18.1B）

【試験方法】

ヒト末梢血リンパ球を用いて染色体異常試験を実施した。本試験に先立ち、RPMI1640 培地を溶媒として、5-HPA の用量を 312.5、625、1250.、2500 及び 5000 μg/mL と設定し、代謝活性化系の存在下（S9mix）及び非存在下（－S9mix）の条件下で、細胞毒性を評価し、本試験の濃度を決定した。

本試験は、2 試験が実施された。実験 1 では、代謝活性化系の存在下（S9mix）及び非存在下（－S9mix）の条件で、RPMI1640 培地を溶媒として、5-HPA の用量を 1250、2500 及び 5000 μg/mL と設定した。薬剤処理は 4 時間行い、処理開始から 20 時間後に細胞を回収した。投与液は 7.5% 重炭酸ナトリウムを添加し pH 調整を行った。

実験 2 では、非代謝活性化（－S9mix）の条件で、5-HPA を 1500、2000、2500 μg/mL で 20 時間、2500、3000、3500 μg/mL で 44 時間処理した。代謝活性化系（S9mix）では、5-HPA の用量を 1250、2500 及び 5000 μg/mL と設定して、4 時間の薬剤処理時間の後、薬剤処理開始から 20 時間後に細胞を回収した。投与液は 7.5% 重炭酸ナトリウムを添加し pH 調整を行った。

なお、陽性対照物質として、代謝活性化系の非存在下（－S9mix）では Mitomycin C 0.75 μM（0.25 μg/mL）を、代謝活性化系の存在下（S9mix）では、Cyclophosphamide 0.036 mM（10 μg/ml）を用いた。

【試験成績】

非代謝活性化系の 4 時間及び 20 時間処理におけるそれぞれの高用量（5000 及び 2500 μg/mL）において、染色体の構造的な異常頻度（細胞あたりの染色体切断の頻度、構造異常を呈する細胞数）が、統計学的に有意な増加を示した。また、この変化は用量依存性を示した。加えて、20 時間処理において、中用量（2000 μg/mL）で異常細胞の頻度増加を認めた。一方で 44 時間処理では、異常は認められなかった。代謝活性化系では、いずれの用量においても異常はみられなかった。

以上の結果から、5-HPA は培地の中和処理条件下の非代謝活性化系において、染色体異常誘発能を有すると考えられた。

2.6.6.8.1.3 マウスを用いた小核試験

（試験 No. FSR-[redacted]1003、添付資料 4. 2. 3. 7. 6-3、概要表 2. 6. 7. 18. 1C）

【試験方法】

OF1 マウス（5 例/群）を用い、雄マウスに 5-HPA（312.5、625 及び 1250 mg/kg）を、雌マウスに 5-HPA（500、1000 及び 2000 mg/kg）24 時間ごとに 2 回経口投与し、陽性対照として、シクロホスファミド（50 mg/kg）を単回腹腔内投与し、最終投与後 24 時間に骨髄を採取した。標本を作製し、PCE/NCE（多染性赤血球/正染性赤血球）の比及び小核を有する多染性赤血球の出現頻度を算出した。予備試験（1250 及び 2000 mg/kg、24 時間ごとに 2 回経口投与、雌雄各 2 例）において、2000 mg/kg（×2）で雄が 1 例死亡したことから、新たに用量設定試験（雄：1250 mg/kg（×2）、雌：2000 mg/kg（×2）、各 5 例）を実施したところ、死亡例は見られなかった。以上より、小核試験では、雌雄の最高濃度を 1250 mg/kg（雄）、2000 mg/kg（雌）として設定した。

【試験成績】

いずれの用量においても、PCE/NCE の比及び小核を有する多染性赤血球頻度に異常は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下において 5-HPA は染色体異常誘発活性を示さないと結論した。

2.6.6.8.1.4 マウスを用いたコメット試験-1

（試験 No. FSR-[redacted]1004、添付資料 4. 2. 3. 7. 6-4、概要表 2. 6. 7. 18. 1D）

DNA 損傷（一本鎖あるいは二本鎖 DNA 鎖切断及びアルカリ感受性部位）検出のため、肝細胞と胃細胞を用いるコメット試験を実施した。

【試験方法】

雄 OF1 マウス各 4 匹を用いて、5-HPA を 312.5、625 と 1250 mg/kg/日 24 時間ごとに 2 回経口投与し、アルカリ性条件下で肝細胞と胃細胞の *in vivo* コメット試験を実施した。試料は最終投与後 3～6 時間に採取した。溶媒にリン酸緩衝液を用いた。

【試験成績】

5-HPA はマウス胃細胞において、DNA 鎖切断の増大を示さなかった。一方、肝細胞では、5-HPA の低用量と中用量（312.5 と 625 mg/kg/日群）で、オリーブテイルモーメント（OTM）中央値は統計的に有意な増大を示し、5-HPA は DNA 鎖切断あるいはアルカリ不安定な DNA 傷害部位を誘発したが、群内の動物間に感受性の差があった。

以上の結果から、5-HPA は肝細胞で、DNA 損傷を誘発した。一方で、5-HPA 群の雄マウスにおいて、動物間の感受性の差が認められた。

2.6.6.8.1.5 マウスを用いたコメット試験-2

（試験 No. FSR-[redacted]1003、添付資料 4.2.3.7.6-5、概要表 2.6.7.18.1E）

マウスを用いたコメット試験-1（試験 No[redacted]1004）で認められた動物間の感受性の差を考慮し、統計解析の精度向上を目的として、動物数を増やして、肝細胞について再度コメット試験を実施した。

【試験方法】

雄 OF1 マウス各 10 匹/群を用いて、5-HPA（30、100、300 及び 600 mg/kg/日）を 24 時間ごとに 2 回経口投与し、アルカリ性条件下で肝細胞の *in vivo* コメット試験を実施した。試料は最終投与後 3～6 時間に採取した。溶媒にリン酸緩衝液を用いた。

【試験成績】

全ての投与群で、OTM 中央値を統計的に有意に減少させた。しかし、1）対照群における OTM 中央値が最も高かったこと、2）全ての 5-HPA 群の OTM 中央値は、溶媒対照の背景データに近い値であったこと、3）明瞭な用量相関がないこと、及び 4）本試験で OTM 中央値の減少が特に 300 mg/kg/日群にあり、一方、先の試験（FSP-[redacted]1004）で対照群と比較して 312.5 mg/kg/日群（312.5、625、1250 mg/kg の 3 用量で実施）で軽度であるが有意な増大があったことを考慮して、 この作用は生物学的に意味がないと判断した。

以上の結果から、5-HPA は肝細胞で、DNA 損傷を誘発しないと結論した。

2.6.6.8.2 不純物 Diaza の遺伝毒性試験

2.6.6.8.2.1 細菌を用いた復帰突然変異試験

（試験 No. FSR-[redacted]1001、添付資料 4.2.3.7.6-6、概要表 2.6.7.18.2A）

【試験方法】

ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）の TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA102 株を用いて、代謝活性化系（ラット肝 S9）存在下及び非存在下で、プレート法にて復帰突然変異試験を実施した。溶媒にリン酸緩衝液を用いた。

ネズミチフス菌5株を用いた予備試験により、本試験はDiazaを50、150、500、1500と5000 μg/plateの用量で行った。薬剤処理時間は48時間とした。各々の試験は非代謝活性化と代謝活性化（S9mix）の条件下で2回実施した。

【試験成績】

Diazaは非代謝活性化と代謝活性化（S9mix）の条件下、検討したネズミチフス菌5種TA1535、TA1537、TA98、TA100とTA102で変異原性活性を示さなかった。

以上の結果から、Diazaの*in vitro*における復帰突然変異原性は陰性と判断した。

2.6.6.9 考察及び結論

(1) 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験では、ラットへの経口投与（2806 mg/kg）及び静脈内投与（238.6 mg/kg）のいずれにおいても、全身性の症状は認められなかった。

(2) 反復投与毒性試験

NAGS欠損症患者ではカルグルミン酸が生涯にわたり投与されることから、反復投与毒性試験では、新生児ラットの2週間反復経口投与毒性試験により生後初期の毒性について検討するとともに、幼若ラットの26週間反復経口投与毒性試験により長期投与の毒性について検討した。

新生児ラットを用いた2週間反復経口投与毒性試験では、2000 mg/kg/日群で全例の死亡が1000 mg/kg/日群で1例の死亡を認めた。また、1000 mg/kg/日群では、橙色便、体重増加の抑制、胸腺重量の低下、腎盂拡張が認められ、250 mg/kg/日群の雄のみ測定された尿pHは、溶媒対照群と比較し低値を示した。また、剖検においては、250、500及び1000 mg/kg/日群では胃に「黒褐色の内容物、白色の内容物もしくは沈着物」が認められた。白色の内容物は被験物質と考えられ、黒褐色の内容物は、投与過誤による粘膜表面の壊死に起因する変化と考えられた。これらの所見から、本試験での無毒性量は、500 mg/kg/日と考えられた。毒性発現機序の詳細は不明であるが、大量のカルグルミン酸（pH 2.2-3.2（0.5%水溶液））投与により、本薬の過剰な尿中排泄亢進が起こり、腎障害が誘発され、尿pHの低下や腎盂拡張が生じるとともに高用量では、同様の機序による腎障害から心不全に至り死亡した可能性が考えられた。ただし、成熟ラットを用いた雌受胎能及び胚・胎児発生毒性試験における2000 mg/kg/日群で認められた母動物の毒性は、体重増加及び摂餌量の減少のみであったことから、新生児ラットで認められた死亡は、消化管や腎臓等が未熟であるために起きた変化と考えられた。

幼若ラットを用いた26週間反復経口投与毒性試験では、500 mg/kg群以上で一過性の軽度の唾液分泌過多及び摂餌量の低下（雄）を認めた。唾液分泌過多については、カルグルミン酸のpH（酸性）に起因した苦味（刺激）としての変化であると考えられ毒性と判断しなかった。また、摂餌量の低下（雄）は、摂餌量測定の最終日のみで統計学的有意差を認

めたため、頻回のハンドリング（骨塩量測定、TK 採血、交尾など）が原因と考えられるため、本薬による変化ではないと判断した。一方、病理組織学的検査では、腎臓の間質性単核細胞集簇、肝臓の多巣性肝細胞壊死及びハーダー腺の壊死性炎症が認められた。腎臓の間質性単核細胞集簇は、明確な用量依存性は認められないものの、本薬の高用量群（1000 mg/kg）で発現頻度が高い傾向がみられた。しかし、病態の程度に用量相関性は認められず、いずれの病変も Grade 1 を示した。さらに、血液生化学的検査、尿量、臓器重量及び病理組織学的検査（PCNA による細胞増殖評価を含む）において腎障害を疑う結果が得られていないことから、腎臓の間質性単核細胞集簇は、カルグルミン酸の毒性変化と判断しなかった。肝臓の多巣性肝細胞壊死は、明確な用量依存性は認められないものの、高用量群（1000 mg/kg）で頻度高く認められていることから、1000 mg/kg 群で認められた病理組織学的所見は、カルグルミン酸による毒性学的変化と考えられた。また、ハーダー腺の壊死性炎症は、500 mg/kg 群のデータがほとんどないものの、0 mg/kg 群の 6 例に対して、1000 mg/kg 群は 15 例と発現動物数の増加が認められていることから、カルグルミン酸の毒性学的変化と考えられた。ただし、ハーダー腺は、ヒトでは存在しない組織のため、ヒトへの外挿性のない変化と考える。以上から、本試験の無毒性量は、1000 mg/kg/日群で認められた肝臓及びハーダー腺の毒性学的変化から、500 mg/kg/日と考えられた。

一般毒性試験の 2 試験（新生児ラットの 2 週間及び幼若ラットの 26 週間反復経口投与毒性試験）の無毒性量はいずれも 500 mg/kg/日と考えられ、トキシコキネティクスデータから、500 mg/kg/日群（幼若ラットの 26 週間反復経口投与毒性試験）における AUC は、雌雄でそれぞれ 317000、474600 (ng・hr/mL)と算出されるため、シミュレーションによる健常人における 250 mg/kg 投与後の推定 AUC [52815(ng･h/mL)]値と比較すると、安全係数は 6-9 倍と考えられた。

(3) 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験では、Ames 試験で陰性であったが、染色体異常試験における非代謝活性化系条件下で陽性反応が認められた（5-HPA 0.3%）。一方で、高純度のカルグルミン酸（5-HPA 0.1%）を用い、かつ被験物質投与液の添加に起因する培地の酸性化を防ぐ目的で、投与液 pH を中和化した条件で実施した染色体異常試験では、陰性が確認された。さらに、高純度のカルグルミン酸（5-HPA 0.1%）を用い、培地中の pH を中和化した条件と非中和の条件下で実施したところ、投与液の非中和化条件では陽性を示すが、中和化条件では陰性となった。一般に、染色体異常試験の結果の妥当性を疑わせる *in vivo* の条件として pH、浸透圧、析出物が知られている。カルグルミン酸の場合、投与液の析出及び浸透圧については、問題のないことが確認されていること、後述の通り、カルグルミン酸に含まれる不純物が関与する可能性は乏しいと考えられることから、染色体異常試験で認められた陽性反応は、被験物質に起因する培地中の pH 変化が原因と考えられた。また、染色体異常試験で陽性（560.2 μg/mL）及び陰性（442 μg/mL）を示した用量は、ヒト推定 C_{max}（250 mg/kg）の 82 倍及び 65

倍と算出され、陰性用量とヒト推定曝露量(250 mg/kg)との間に十分な安全域が確保されていると考えられた。

一方、カルグルミン酸の不純物である 5-HPA を用いた染色体異常試験では、非代謝活性化系条件下で陽性反応を示したが、Ames 試験、ラット小核試験、マウスコメット試験で陰性を示したことから、本質的に遺伝毒性を示さないと考えられた。これらの結果から、カルグルミン酸の染色体異常試験における非代謝活性化系条件下でみられた陽性反応は、投与液に起因した培地の pH 変化によるものと考えられ、結論としてカルグルミン酸は染色体異常誘発活性を示さないと考えられた。ラット小核試験は、3 試験が行われた。そのうち、単回投与を行った 2 試験では陰性（2000、7000 mg/kg）、と陽性（3940、7040 mg/kg）の結果が得られ、再現性のない試験結果となった。両試験は、OECD ガイドライン（TG474、哺乳類赤血球小核試験、2014 年 9 月 26 日採択）に記載の限界用量をはるかに超えた濃度で試験を実施していること、トキシコキネティクス測定を行っていないこと、「不確か」な結論となったことから、weight of evidence（WOE）を高めた試験計画により再試験（4 週間反復経口投与による小核試験）を実施したところ、陰性が確認された。さらに、4 週間反復経口投与による小核試験で陰性(1000 mg/kg)を示した用量は、ヒト推定 C_{max}(250 mg/kg)と比較し 13/14 倍(雌/雄)であり、十分な安全域が確保されていると考えられた。

以上から、本薬は、高用量条件（3940 mg/kg 以上）での陽性結果から、小核誘発性を完全に否定することはできないが、小核試験における陰性用量（1000 mg/kg）とヒト推定曝露量（250 mg/kg）との間に、十分な安全域を確保していると考えられることから、ヒトで小核誘発を示す可能性は低いものと考えられた。

(4) がん原性試験

がん原性試験では、ラットを用いた 2 年間反復経口投与がん原性試験が実施され、1000 mg/kg/日［ヒト AUC(250 mg/kg)の 17/19 倍（雄/雌）］まで投与したが、腫瘍性病変の発生頻度への影響は認められなかった。

一方、被験物質投与に起因すると考えられる非腫瘍性変化が心臓及び腎臓において認められた。心臓では、弁粘液腫様変化の発生率増加が、雄の全被験物質群（100, 300, 1000 mg/kg/日）及び雌の 1000 mg/kg/日群で認められ、雌雄ともに用量依存的な重症化がみられた。また、僧帽弁血栓症は雌雄共に被験物質群（100, 300, 1000 mg/kg/日）にのみ認められた。ラットでは、加齢に関連した弁の変化（粘液腫様変化を含む）が発生することが報告(*Donnelly,2008*)されている。また、SD ラットを用いた 2 年間の脱イオン水経口投与試験では、85%(188/220)で心内膜粘液腫様変化が認められている(*Elangbam,2002*)。弁粘液腫様変化の発生原因もしくは憎悪要因は解明されていないが、血液生化学的検査結果から、Na^+及びCl^-の高値が認められており、脱水症状が起きていたことが推察された。この変化は、カルグルミン酸投与の過剰な尿中排泄亢進により脱水が生じ、血液が濃縮され、通常よりも弁にかかる負荷が増加した結果、粘液腫様変化が憎悪するとともに、僧帽弁に血栓がつくら

れたものと推察される。

腎臓では、腎梗塞が雌雄共に全ての被験物質群で認められ、その発生率に用量依存的な増加を認めた。腎梗塞は、投与34週（約8ヶ月間の投与）から認められ、僧帽弁血栓症の塞栓が腎動脈を通過したことによる2次的変化であると考えられた。重篤な腎梗塞は、100mg/kg群雄の1例でみられた早期死亡の原因とも考えられた。一方、尿細管上皮褐色色素沈着の軽度増加が、300 mg/kg/日群（雌）及び1000 mg/kg/日（雌雄）で認められ、リポフスチン沈着の増加によるものと考えられた。リポフスチンは、加齢ラットで認められる一般的な変化であることから(*Creasy, 2012*)、毒性学的に意義のある変化ではないと判断された。以上から、カルグルミン酸投与に起因した毒性学的変化は、僧帽弁血栓症及び腎梗塞と考えられた。

僧帽弁血栓症もしくは腎梗塞は、全てのカルグルミン酸投与群（100, 300, 1000 mg/kg/日）で認められているが、上述の通りいずれの変化もラットの加齢性変化である弁粘液腫様変化という素地の上で、カルグルミン酸により悪化した変化と考える。ヒトの臨床用量は、初回投与量として100-250mg/kgが設定されていることから、本試験で認められた非腫瘍性変化（弁粘液腫様変化、僧帽弁血栓症及び腎梗塞）は、ヒトでの投与用量よりも、低い用量で認められた変化である。しかし、「NAGS原発性欠損症患者におけるCarbaglu のレトロスペクティブデータレビュー」によると、23例（投与開始時平均年齢：2歳、平均投与期間：7.9年）の患者について解析した結果、心臓弁膜症もしくは血栓症の報告はなかった。また、僧帽弁血栓症が確認されはじめた週齢（33-34週齢）は、ヒトに外挿すると90-105歳に相当するとされ(*Andreollo,2012*)、対象患者の年齢層では起こらないものと考えられた。さらに、国内臨床試験における血液生化学的検査では、脱水による血液能濃縮を示唆するデータも認められないため、カルグルミン酸投与により、本試験で認められた非腫瘍性変化（弁粘液腫様変化、僧帽弁血栓症、腎梗塞）が臨床使用で起こる可能性は極めて低いものと考える。

(5) 生殖発生毒性試験

ラットを用いた雌受胎能及び胚・胎児発生毒性試験は、母動物の一般毒性学的変化（2000 mg/kg/日；唾液分泌過多、摂餌量及び体重増加の僅かな減少）から無毒性量は500 mg/kg/日と考えられ、受胎能と胚・胎児形成に対する無毒性量は2000 mg/kg/日と推定された。

雄受胎能と雌性周期への影響を、幼若ラットの26週間反復経口投与毒性試験内で評価した。1000 mg/kg/日で唾液分泌過多が認められた以外、毒性は認められなかったため、雄受胎能と雌性周期に対する無毒性量は、1000 mg/kg/日と推定された。

ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験では、1000 mg/kg/日群の母動物で体重増加及び摂餌量の減少が認められことから、親動物に対する無毒性量は250 mg/kg/日と推定され、発生毒性に関する毒性は認められなかったため、胚・胎児に対する無毒性量は1000 mg/kg/日と推定された。また、妊娠ウサギでは血漿中薬物濃度の低下が起こったことから、ヒトで同

様の作用が起こる可能性があるものの、毒性学的には、毒性が減弱すると考えられるため、ヒトへのリスクファクターにはならない反応と考えられる。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、母動物で、2000 mg/kg 群において 3 例の死亡、唾液過多、妊娠期間の体重増加及び摂餌量の減少を認めた。交尾及び分娩に関連する毒性変化は観察されなかった。一方で、カルグルミン酸は乳汁中に、500 及び 2000 mg/kg 群でそれぞれ、12.3 及び 36.2 μg/mL の薬物量が検出された。2000 mg/kg/日群の F1 出生児の、分娩 1 日に同腹生存胎児数の減少及び授乳 4 日以内の出生児死亡数の高値、及び 500 mg/kg 群の F1 出生児の体重低下が認められたが、いずれも乳汁移行が原因と考えられた。ただし、500 mg/kg 群 F1 出生児の体重低下は、交配前期間終了までに対照群と同程度まで回復した。従って、母動物の無毒性量は、500 mg/kg/日と推定された。出生児に関しては、500 mg/kg 群の F1 出生児の体重低下から無毒性量を定めることはできなかったが、母動物に起因する変化であり、出生児に対する直接的作用ではないと考える。

ラット及びウサギの胚・胎児発生毒性試験における胚・胎児発生に関する無毒性量投与時の AUC はそれぞれ 1477919（ng・h/mL）及び 125769（ng・h/mL）であり、シミュレーションによる健常人における 250 mg/kg 投与後の推定 AUC [52815（ng・h/mL）]値と比較すると、安全係数はそれぞれ 28 及び 2.4 倍であった

（6）その他の毒性試験

カルグルミン酸の不純物である 5-HPA および Diaza に関する遺伝毒性試験が実施された。5-HPA は、染色体異常試験では陽性と判断されたが、Ames 試験、ラット小核試験、マウスコメット試験で陰性を示したことから、生体内で遺伝毒性は示さないと考えられた。また、5-HPA は染色体異常試験で 2500 μg/mL 以上で陽性を示したものの、2000 μg/mL 以下では陰性を示した。健常人におけるカルグルミン酸の 250mg/kg 投与後の推定 C_{max} は、6.77 μg/mL [Comparative pharmacokinetic study of OE312 in healthy male volunteers after single oral administration (P[redacted]148)5.3.1.2 参考資料からシミュレーション算出]であり、カルグルミン酸中の 5-HPA 含有量を 0.1%(規格上限値)と仮定すると、5-HPA の血漿中量は 0.00677 μg/mL と算出され、5-HPA 単独で実施した染色体異常試験で陰性を示した濃度(2000 μg/mL)との安全域は、29 万 5000 倍であり、十分な安全域が得られていることから、5-HPA がヒトにおける遺伝毒性発現のリスクとなる可能性は、ほとんどないと考えられた。また、Diaza については、Ames 試験が行われ、陰性を示したことから、遺伝毒性はないと判断された。

以上から、カルグルミン酸の不純物である 5-HPA および Diaza は遺伝毒性を示さないものと考えられた。

2.6.6.10 図表

各項目に記載した。

参考文献

Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? Arq Bras Cir Dig. 2012; 25(1): 49-51.

Creasy D. Reproduction of the rat, mouse, dog, non-human primate and minipig.
In: Background lesions in laboratory animals. A color atlas. E.F McInnes (ed.), Saunders Elsevier 2012; 115.

Donnelly KB. Cardiac valvular pathology: comparative pathology and animal models of acquired cardiac valvular diseases. Toxicol Pathol. 2008; 36(2): 204-17.

Elangbam CS, Colman KA, Lightfoot RM, Tyler RD, Wall HG. Endocardial myxomatous change in Harlan Sprague-Dawley rats (Hsd:S-D) and CD-1 mice: its microscopic resemblance to drug-induced valvulopathy in humans. Toxicol Pathol. 2002; 30(4): 483-91.

カーバグル分散錠 200 mg

医薬品製造販売承認申請書　添付資料

第 2 部：CTD の概要（サマリー）

2.6.7　毒性試験概要表

株式会社ポーラファルマ

目　次

2.6.7 毒性試験概要表.....2
2.6.7.1　毒性試験：一覧表.....2
2.6.7.2　トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験の一覧表.....5
2.6.7.3　トキシコキネティクス: トキシコキネティクス成績の一覧.....6
2.6.7.4　毒性試験: 被験物質（バッチごと）一覧.....7
2.6.7.5　単回投与毒性試験.....9
2.6.7.6　反復投与毒性試験.....10
2.6.7.7　反復投与毒性試験: 重要な試験以外の試験.....11
2.6.7.8　反復投与毒性試験: 重要な試験.....12
2.6.7.9　*in vitro* 遺伝毒性試験.....21
2.6.7.10　*in vivo* 遺伝毒性試験.....35
2.6.7.11　がん原性試験.....42
2.6.7.12　生殖発生毒性試験: 雄受胎能及び雌性周期に関する試験.....60
2.6.7.13　生殖発生毒性試験：雌受胎能及び胚・胎児発生に関する試験.....62
2.6.7.14　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験.....65
2.6.7.15　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験.....69
2.6.7.16　新生児を用いた試験.....75
2.6.7.17　局所刺激性試験.....75
2.6.7.18　その他の毒性試験.....76

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

被験物質：カルグルミン酸及びその不純物ヒダントイン - 5 - プロピオン酸と
ジアザ - 1、3 - ジオン - 2、4 - カルボキシ - 7 - シクロヘプタン

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg）	実施施設	試験番号
単回投与毒性試験	Ico ラット	経口	単回	703、1407、2811、2806	[redacted]	800/005
	Ico ラット	静脈内	単回	21、70.3、238.6	[redacted]	800/008
反復投与毒性試験	SD ラット	経口	14 日	0、250、500、1000、2000	[redacted]	20329 TSR
	SD ラット	経口	26 週間	0、500、1000	[redacted]	20330 TSR
遺伝毒性試験						
Ames 試験	ネズミチフス菌	*In vitro*	-	0～5000μg/plate	[redacted]	800/001
	ネズミチフス菌	*In vitro*	-	0～5000μg/plate	[redacted]	800/010
染色体異常試験	ヒト末梢リンパ球	*In vitro*	-	0、46、144、450、1408 μg/mL	[redacted]	800/009
	ヒト末梢リンパ球	*In vitro*	-	0～1000μg/ml	[redacted]	[redacted]-R[redacted]0904
	ヒト末梢リンパ球	*In vitro*	-	0、313.9、560.2、1000 μg/ml	[redacted]	[redacted]-R[redacted]1108
小核試験	SD ラット	経口	単回	690、1240、2210、3940、7040	[redacted]	800/004
	SD ラット	経口	単回	0、2000、7000	[redacted]	[redacted]-R[redacted]0505
	SD ラット	経口	28 日間	0、500、1000	[redacted]	20334 MAR
がん原性						
がん原性試験	SD ラット	経口	104 週間	0、100、300、1000	[redacted]	37470TCR

試験は全て GLP 準拠して実施。- : 該当せず

[redacted]、[redacted]

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg）	実施施設	試験番号
雌受胎能及び胚・胎児発生	SD ラット	経口	雌：交配前15 日～妊娠17 日	0、500、2000	[redacted]	23288 RSR
雄受胎能（幼若ラット26 週間反復投与毒性試験の一部として実施）	SD ラット	経口	28 週間（26 週間＋2 週間）	0、500、1000	[redacted]	20330 TCR
胚・胎児発生	NAW ウサギ	経口	妊娠6 日～妊娠18 日	0、250、1000	[redacted]	24241 RSL
出生前後の発生並びに母体の機能	SD ラット	経口	妊娠6 日～出産後21 日	0、500、2000	[redacted]	24242 RSR
不純物 5-HPA の毒性						
復帰突然変異	ネズミチフス菌・大腸菌	*In vitro*	-	0、50、150、500、1500、5000 µg/plate	[redacted]	[redacted]-R[redacted]0804
染色体異常	ヒト末梢リンパ球	*In vitro*	-	0、312.5、625、1250、2500、5000 µg/plate	[redacted]	[redacted]-R[redacted]0906
小核試験	OF1 マウス	経口	2 回投与	雄：312.5、625、1250 雌：500、1000、2000	[redacted]	FSR-[redacted]1003
コメット試験 1&2	OF1 マウス	経口	2 回投与	肝臓：312.5、625、1250 胃：625、1250 雄：30、100、300、600	[redacted]	FSR-[redacted]1004 FSR-[redacted]1003

試験は全て GLP 準拠して実施。-：該当せず [redacted]、[redacted]

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

不純物 Diaza の毒性						
復帰突然変異	ネズミチフス菌	*In vitro*	-	0、50、150、500、1500、5000 μg/plate	[redacted]	FSR-[redacted]1001

試験は全て GLP 準拠して実施。-：該当せず

[redacted]、[redacted]

2.6.7.2 トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質：カルグルミン酸

試験項目と用量（mg/kg/日）	動物種	測定日	C_{max}（μg/ml）		AUCt（ng·h/ml）		AUC（ng·h/ml）		試験番号
			雄	雌	雄	雌	雄	雌	
2 週間反復経口投与毒性試験									
250	ラット	投与 12 日目	50.4	39.1	n.d	n.d	n.d	n.d	20329 TSR
26 週間反復経口投与毒性試験									
500	ラット	投与 1 日目	76.7	68.7	474600	317000	477700	322700	20330TSR
500		26 週間	71.6	83.0	534900	562300	537300	564300	
1000		投与 1 日目	85.9	95.5	882200	996900	891100	1009000	
1000		26 週間	78.0	103.8	708100	804400	716400	810400	
雌受胎能及び胚・胎児発生試験									
500	ラット	投与 1 日目	n.d	59.2	n.d	400978	n.d	n.d	23288RSR
500		投与 12 日目	n.d	54.1	n.d	477387	n.d	n.d	
2000		投与 1 日目	n.d	118.3	n.d	1692913	n.d	n.d	
2000		投与 12 日目	n.d	132.9	n.d	1477919	n.d	n.d	
胚・胎児発生試験									
250	ウサギ	投与 1 日目	n.d	12.5	n.d	175646	n.d	184843	24241RSL
250		投与 13 日目	n.d	6.2	n.d	76238	n.d	76716	
1000		投与 1 日目	n.d	42.2	n.d	654427	n.d	804174	
1000		投与 13 日目	n.d	19.9	n.d	125769	n.d	136479	

n.d：データなし

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧（続き）

試験項目と用量（mg/kg/日）	動物種	測定日	C_{max}（μg/ml）		AUCt（ng･h/ml）		AUC（ng･h/ml）		試験番号
			雄	雌	雄	雌	雄	雌	
出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験									
500	ラット	投与 34~36 日目	n.d	69.8*	n.d	n.d	n.d	n.d	24242RSR
2000			n.d	179.6*	n.d	n.d	n.d	n.d	
安全性薬理試験									
1000	イヌ	単回投与後	85.1**	202**	n.d	n.d	n.d	n.d	[redacted]0429P
薬物動態試験									
100	ヒト	単回投与後	2.71	n.d	21126	n.d	22560	n.d	OE312/PK[redacted]-01

*：投与 4 時間後の値、** ：推定 C_{max}（2 時間値）、n.d：データなし

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス成績の一覧

2.6.7.2 に記載した。

2.6.7.4 毒性試験: 被験物質（バッチごと）一覧

2.6.7.4A 被験物質カルグルミン酸のバッチ No. とそれぞれの純度及び不純物の含量

被験物質：カルグルミン酸

バッチ No.	純度（%）	不純物の含量		試験番号	試験の種類
		5-HPA	Diaza		
標準規格	98.0~102.0%	＜0.05%	＜0.05%		EU 承認規格
KLA1028B	99.17	0.3	-	800/005	ラットを用いた単回経口投与毒性試験
				800/008	ラットを用いた単回静脈内投与毒性試験
				800/001	細菌を用いた復帰突然変異試験-1
				800/009	ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-1
				800/004	ラットを用いた小核試験-1
				[redacted]-R[redacted]0505	ラットを用いた小核試験-2
040307102	99.6	＜0.1	-	800/010	細菌を用いた復帰突然変異試験-2
3030804P282	100.9	＜0.01	-	[redacted]-R[redacted]0904	ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-2
([redacted]-R-[redacted]0505:				[redacted]-R[redacted]1108	ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-3
03030804P282)				[redacted]-R-[redacted]0505	ラットを用いた小核試験-2
05031001P38	99.31	＜0.02	-	20330 TCR	幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験
				20334MAR	ラットを用いた 4 週間反復経口投与後の小核試験
05031001P39	100.21	＜0.02	-	20329 TSR	新生児ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験
				20330 TCR	幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験
				20334 MAR	ラットを用いた 4 週間反復経口投与後の小核試験
05031002P42	99.56	＜0.02	-	20330 TCR	幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験
				20334MAR	ラットを用いた 4 週間反復経口投与後の小核試験

-：測定せず（規格項目に設定されていないため）

2.6.7.4A　被験物質カルグルミン酸のバッチ No. とそれぞれの純度及び不純物の含量　（続き）

バッチ No.	純度（%）	不純物の含量		試験番号	試験の種類
		5-HPA	Diaza		
標準規格	98.0~102.0%	＜0.05%	＜0.05%		EU 承認規格
05031011P63	100.15	＜DL*	＜DL**	23288RSR	ラットを用いた雌受胎能及び胚・胎児発生毒性試験
05031111P105	100.5	＜DL*	＜DL**	23288RSR	ラットを用いた雌受胎能及び胚・胎児発生毒性試験
05031112P106	99.91	＜DL*	＜DL**	24242RSR	ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能にる試験
05031207P123	101.05	＜DL*	＜DL**	24242RSR	ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験
05031207P124	100.68	＜DL*	＜DL**	24241RSL 24242RSR	ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験 ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験
05031212P142	101.23	＜DL*	＜DL**	24241RSL	ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験
05031301P143	100.89	＜DL*	＜DL**	24241RSL	ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験
08031010P51	100.30	＜DL*	＜DL**	20330TCR	幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験
08031010P52	100.99	＜DL*	＜DL**	20330TCR	幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験
12100738	99.6	＜DL*	＜DL*	37470TCR	ラットを用いた 2 年間がん原性試験
12100464	100.1	＜DL*	＜DL*	37470TCR	ラットを用いた 2 年間がん原性試験
12100465	100.0	＜DL*	＜DL*	37470TCR	ラットを用いた 2 年間がん原性試験
12100466	100.0	＜DL*	＜DL*	37470TCR	ラットを用いた 2 年間がん原性試験
12100739	99.6	＜DL*	＜DL*	37470TCR	ラットを用いた 2 年間がん原性試験

DL*：検出限界 0.01%m/m、DL**：検出限界 0.005%m/m

2.6.7.5　単回投与毒性試験

被験物質：カルグルミン酸

動物種/系統	投与方法 (溶媒/剤型)	用量	性と群当たりの数	最大非致死量 (mg/kg)	推定致死量 (mg/kg)	特記すべき所見	試験番号 (添付資料番号)
Ico ラット:OFA SD（IOPS Caw）	経口 （1%CMC 懸濁液）	2806	5M、5F	2806	＞2806	一般状態、体重及び肉眼的所見に異常なし。	800/005 (4.2.3.1-1)
Ico ラット：OFA SD（IOPS Caw）	静脈内投与 （0.9%無菌生理食塩水溶液）	238.6	5M、5F	238.6	＞238.6	一般状態、体重及び肉眼的所見に異常なし。	800/008 (4.2.3.1-2)

M：雄、F：雌

2.6.7.6 反復投与毒性試験

被験物質：カルグルミン酸

動物種/系統	投与方法（溶媒/剤型）	投与期間	用量（mg/kg/日）	性と群当たりの数	NOAEL*（mg/kg/日）	特記すべき所見	試験番号
SD ラット： Crl CD(SD) IGS BR	経口 （1%CMC 懸濁液）	2 週間（生後 4 日～21 日）	0 250 500 1000 2000	8M、8F 8M、8F （+9M、9F サテライト群） 8M、8F 8M、8F 10M、11F （+9M、9F サテライト群）	500 mg/kg/日	1000 mg/kg/日： 橙色便、胸腺重量低下、体重増加抑制、腎盂拡張 2000 mg/kg/日： 全例死亡	20329TSR
SD ラット： Crl CD(SD) IGS BR	経口 （1%CMC 懸濁液）	雄：28 週間 雌：26 週間	0 500 1000	10M、10F （+9M、9F サテライト群） 10M、10F （+9M、9F サテライト群） 10M、10F （+9M、9F サテライト群）	500 mg/kg/日	500mg/kg/日： 唾液分泌過多 1000mg/kg/日： 唾液分泌過多、腎間質単核細胞集簇、多巣性肝細胞壊死、ハーダー腺壊死性炎症	20330TSR

*： NOAEL；無毒性量、M：雄、F：雌

2.6.7.7　反復投与毒性試験: 重要な試験以外の試験

該当資料なし

2.6.7.8 反復投与毒性試験: 重要な試験

2.6.7.8A 新生児ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験

被験物質 : カルグルミン酸

Report Title : 2-week toxicity study by oral route (gavage) in newborn rats.

動物種/系統/性 : Sprague Dawley rat/Crl CD(SD) IGS BR/雌雄　　投与期間 : 生後 4～21 日　　試験番号 : 20329 TSR

試験開始日齢 : 4 日　　投与方法 : 経口投与　　添付資料 4.2.3.2-1

初回投与年月 : [redacted]年[redacted]月　　溶媒/投与形態 : 1%CMC 水溶液　　GLP 適用 : 適

無毒性量 : 500 mg/kg/日

1 日 1 回用量（mg/kg/日）:	0（対照群）		250		500		1000		2000	
動物数	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
試験群	8	8	8	8	8	8	8	8	10	11
サテライト群	0	0	9	9	0	0	0	0	9	9
トキシコキネティクス										
C_{max}（μg/mL）	n.d	n.d	50.4	39.1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
AUCt（ng･h/ml）	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d : データなし

2.6.7.8A 新生児ラットを用いた2週間反復経口投与毒性試験 （続き）

1日1回用量（mg/kg/日）：	0（対照群）		250		500		1000		2000	
動物数	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
試験群	8	8	8	8	8	8	8	8	10	11
サテライト群	0	0	9	9	0	0	0	0	9	9
主要所見										
死亡及び屠殺動物数	0	0	4	4	2	2	0	1	19	20
体重（%[a]）	48.7	48.4	+5.5	+3.3	+22.6**	+15.5	+0.8	−0.8	n.d	n.d
一般状態										
橙色便	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
皮膚冷感	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
四肢蒼白	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
衰弱	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Dunnett 検定：*p＜0.05、**p＜0.01、-：所見なし、＋：所見あり、n.d：データなし、M：雄、F：雌

a 主要所見の体重（%）：投与終了時、対照群は群平均を示し、投与群は対照群からの%差異を示す。統計的有意差は実際の値に基づく。

2.6.7.8A 新生児ラットを用いた2週間反復経口投与毒性試験 （続き）

1日1回用量（mg/kg/日）：	0（対照群）		250		500		1000		2000	
動物数	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
試験群	8	8	8	8	8	8	8	8	10	11
サテライト群	0	0	9	9	0	0	0	0	9	9
血液学的検査（試験群）	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査（試験群）	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査（pH）	7.5	n.d.	6.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
器官重量[b]（主要群）：胸腺	0.23825g	0.24025g	+2	+17	−5	−2	−29**	−23**	n.d	n.d
相対重量比（対体重比）	0.512%	0.533%	0.474%	0.550%	0.404%#	0.444%*	0.373%##	0.421%**		
剖検：評価動物数	8	8	8	8	8	8	8	7	7	8
胃										
黒褐色の内容物、白色の内容物もしくは沈着物	0	0	1	1	1	1	0	0	2	9
腎臓										
腎盂拡張	1	0	1	1	0	0	3	0	0	0
病理組織学的検査：										
胃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
追加試験										
身体的及び反射発達[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

b：整数は絶対重量の対照群からの%差、c ：2000 mg/ kg/日群は全例死亡のため、切歯崩出、開眼、耳介管開口、断崖回避及び空中立ち直り反射については、評価できなかった。M：雄、F：雌、-：異常所見なし、＋：所見あり、n.d.：データなし、Dunnett 検定：*p＜0.05、**p＜0.01、Dunn 検定：#p＜0.05、## p＜0.01

2.6.7.8B 幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験　　被験物質：カルグルミン酸

Report Title：26-week toxicity study by oral route (gavage) in young rats.

動物種/系統/性：Sprague Dawley rat/Crl CD(SD) IGS BR/雌雄　　投与期間：雄 28 週間、雌 26 週間　　試験番号：20330 TCR

試験開始日齢：28 日　　投与方法：経口投与　　添付資料 4.2.3.2-2

初回投与年月：[redacted] 年 [redacted] 月　　溶媒/投与形態：1%CMC 水溶液　　GLP 適用：適

無毒性量：500 mg/kg/日

1 日 1 回用量（mg/kg/日）	0（対照群）		500		1000	
動物数：	M	F	M	F	M	F
試験群	10	10	10	10	10	10
サテライト群[a]	9	9	9	9	9	9
トキシコキネティクス						
C_{max}（μg /ml）						
第 1 週 1 日目（サテライト群）	n.d	n.d	76.7	68.7	85.9	95.5
第 26 週 177 日目（試験群）	n.d	n.d	71.6	83.0	78.0	103.8
AUCt（ng･h/ml）						
第 1 週 1 日目（サテライト群）	n.d	n.d	474600	317000	882200	996900
第 26 週 177 日目（試験群）	n.d	n.d	534900	562300	708100	804400

n.d：データなし

2.6.7.8B 幼若ラットを用いた26週間反復経口投与毒性試験 （続き）

1日1回用量（mg/kg/日）	0（対照群）		500		1000	
動物数：	M	F	M	F	M	F
試験群	10	10	10	10	10	10
サテライト群[a]	9	9	9	9	9	9
主要所見：						
死亡及び屠殺動物数	1	0	2	0	0	0
体重（%）[b]	599g	348g	0	−6	−6	−3
摂餌量（%）[b]	24.3g	17.0g	−12**	−9	−11**	+11
一般状態：						
唾液分泌過多	0	0	1/19	0	10/19	11/19

M：雄、F：雌、 Dunnett検定：*p＜0.05、**p＜0.01、

a 投与4週間後、サテライト群は小核試験に用いた。

b 投与期間終了時。対照群は群平均を示し、被験物質群は対照群からの%差を示す。統計的有意差は実測データを用いた。

2.6.7.8B 幼若ラットを用いた26週間反復経口投与毒性試験 （続き）

1日1回用量（mg/kg/日）		0（対照群）		500		1000	
雌雄と動物数：		M	F	M	F	M	F
	試験群	10	10	10	10	10	10
	サテライト群[c]	9	9	9	9	9	9
眼科学的検査		-	-	-	-	-	-
血液学的検査		-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査		-	-	-	-	-	-
尿中pH		7.2	6.4	6.0	6.0	6.2	6.1
器官重量（%）[d]							
相対重量比（%）	腎臓	3.54g (0.61)	2.12g (0.65)	+10 (0.66)	+5 (0.72)	0 (0.65)	+9 (0.74)
	肝臓	14.18g (2.44)	8.06g (2.46)	+6 (2.57)	+3 (2.67)	+1 (2.61)	+11 (2.82*)
	脾臓	0.78g (0.13)	0.56g (0.17)	−9 (0.12)	+5 (0.19)	−5 (0.14)	+12 (0.20)
	胸腺	0.25g (0.04)	0.19g (0.06)	−16 (0.04)	−16 (0.05)	−19 (0.04)	−9 (0.05)
	子宮	該当せず	0.86g (0.27)	該当せず	+1 (0.28)	該当せず	+18 (0.33)

c 投与4週間後、サテライト群は小核試験に用いた。Dunnett検定：*$p<0.05$、-：異常所見なし、M：雄、F：雌、

d 器官重量（%）：対照群絶対器官重量からの%差異。

()内は対体重比

2.6.7.8B 幼若ラットを用いた26週間反復経口投与毒性試験 （続き）

1日1回用量（mg/kg/日）	0（対照群）		500		1000	
雌雄と動物数：	M	F	M	F	M	F
試験群	10	10	10	10	10	10
サテライト群[c]	9	9	9	9	9	9
剖検	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査						
腎臓：評価動物数	10	10	10	10	10	10
間質性単核細胞集簇	0	1	4	1	7	2
肝臓：評価動物数	10	10	10	10	10	10
多巣性肝細胞壊死	0	0	0	1	3	0
ハーダー腺：評価動物数	10	10	2	0	10	10
壊死性炎症	1	5	1	0	6	9
歯	-	-	-	-	-	-
体長（mm）	277±6.5	232±5.9	279±3.9	230±6.1	276±9.1	234±5.5

2.6.7.8B 幼若ラットを用いた26週間反復経口投与毒性試験 （続き）

1日1回用量（mg/kg/日）		0（対照群）		500		1000	
雌雄と動物数：		M	F	M	F	M	F
	試験群	10	10	10	10	10	10
	サテライト群	9	9	9	9	9	9
骨塩量測定 *in vivo*：	右大腿骨[e]	19.77±1.33	14.48±0.63	20.72±2.35	15.93±1.25	18.87±1.08	15.15±1.72
	全骨[e]	16.52±0.70	13.35±0.54	16.61±0.77	13.37±0.18	16.19±0.79	13.93±0.72
骨塩量測定 *ex vivo*：	右大腿骨[f]	28.48±1.45	25.84±0.67	28.59±1.41	25.90±0.93	28.51±1.22	26.57±1.45
雄の交配試験	交配率[g]（%）	100	n.d	100	n.d	100	n.d
	受胎率[h]（%）	100	n.d	88	n.d	90	n.d
	交尾前日数（日）	2.7±0.71	n.d	2.3±1.11	n.d	3.3±1.16	n.d
精液学的検査	運動性精子の率（%）	34.7±26.4	n.d	50.7±22.7	n.d	62.2±24.1	n.d
	正常形態の率（%）	96±2	n.d	99±1	n.d	97±2	n.d
	精子数（10^4/mm^3）	47.9±31.2	n.d	46.4±28.3	n.d	35.1±20.8	n.d
	精子頭部数（10^6/g of testis）	157.6±24.3	n.d	138.6±14.2	n.d	131.8±24.3	n.d
性周期		n.d	-	n.d	-	n.d	-

M：雄、F：雌、 [e]：g/cm^2×100（雄は28週、雌は13週の値）、[f]：Global ；g/cm^2×100、n.d：データなし

[g]：No. of mated animals/No. of paired animals×100、[h]：No. of pregnant female partners/No. of mated pairs×100

-：異常変動なし

2.6.7.8B 幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験 （続き）

1 日 1 回用量（mg/kg/日）		0（対照群）		500		1000	
雌雄と動物数：		M	F	M	F	M	F
	試験群	10	10	10	10	10	10
	サテライト群	9	9	9	9	9	9
免疫毒性	主要リンパ器官の肉眼所見	-	-	-	-	-	-
	骨髄細胞性	-	-	-	-	-	-
リンパ球サブセット	CD3 陽性細胞（%）	52±9	33±9	49±8	35±10	50±6	46±22
	B220 陽性細胞（%）	9±4	3±2	7±3	4±4	11±6	3±1
細胞増殖検査[i]	肝臓（%）	30.0±14.4	33.6±12.9	36.2±14.0	24.6±12.9	43.0±10.6*	53.4±11.4**
	腎臓（%）	17.1±10.9	32.7±15.2	23.2±11.8	17.9±5.0**	25.7±11.7	38.9±12.2
	精巣（%）	36.1±5.3	n.d	54.8±14.9**	n.d	48.6±15.0*	n.d

M：雄、F：雌、-：異常所見なし、n.d：データなし、[i]：PCNA 法、t 検定：*p<0.05、**p<0.01

2.6.7.9　*in vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.9.A　細菌を用いた復帰突然変異試験-1

被験物質：カルグルミン酸

Report Title：Salmonella typhimurium / mammalian microsome plate incorporation assay (Ames test).

試験の種類：細菌を用いる復帰突然変異試験　　独立して実施した試験数：2　　試験番号：800/001

菌株：*Salmonella typhimurium*（TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA102）　　プレート数：3　　添付資料 4.2.3.3.1-1

カルグルミン酸：バッチ No. KLA1028B/96b/cLI　　GLP 適用：適

代謝活性化系：フェノバルビタール及びメチルコラントレン混合物
で処理したラット（OFA SD）肝 S9（凍結乾燥品：IFFA CREDO）

溶媒：DMSO（被験物質、陽性対照物質）

陽性対照物質：非代謝活性化系；アジ化ナトリウム、9 - アミノアクリジン、2 - ニトロフルオレン、t - ブチルハイドロペルオキシド
代謝活性化系；2 - アントラミン

処理：プレート法

細胞毒性：なし

遺伝毒性：なし

2.6.7.9.A 細菌を用いた復帰突然変異試験-1（続き）

被験物質：カルグルミン酸

代謝活性化の有無	試験物質	用量 (μg/plate)	Assay 1：復帰コロニー数（平均）				
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	TA 102
非代謝活性化	溶媒	0	21.7	130.3	22.0	1.7	487.7
	カルグルミン酸	52	15.0	119.7	28.7	2.3	433.3
		164	18.0	109.0	27.3	3.3	458.7
		512	16.7	123.7	22.7	3.3	455.7
		1600	24.7	90.7	19.0	3.7	466.0
		5000	21.3	107.7	14.7	4.0	456.0
	2 - ニトロフルオレン	5	406.7	2775.3	n.d	n.d	n.d
	t - ブチルハイドロペルオキシド	100	n.d	n.d	n.d	n.d	2701.3
	9 - アミノアクリジン	50	n.d	n.d	n.d	112.0	n.d
	アジ化ナトリウム	10	n.d	n.d	2726.0	n.d	n.d
代謝活性化	溶媒	0	36.3	93.7	17.7	4.7	662.3
	カルグルミン酸	52	33.0	120.7	23.7	8.7	591.3
		164	35.7	128.3	19.7	2.0	643.3
		512	32.0	105.7	15.7	3.7	632.0
		1600	31.7	95.7	16.0	1.3	592.7
		5000	27.7	81.0	18.3	3.0	426.3
	2 - アミノアントラセン	5	3879.7	1882.0	363.0	133.7	1801.7

n.d：データなし

2.6.7.9.A　細菌を用いた復帰突然変異試験-1（続き）　　被験物質：カルグルミン酸

Assay 2

代謝活性化	試験物質	用量 (μg/plate)	Assay 2：復帰コロニー数（平均）				
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	TA 102
非代謝活性化	溶媒	0	16.0	130.0	17.0	2.0	464.3
	カルグルミン酸	492	14.7	117.7	19.0	5.3	477.3
		878	12.7	116.7	11.0	2.7	438.0
		1568	17.7	94.7	17.3	1.7	478.0
		2800	15.7	92.3	13.3	1.7	446.7
		5000	12.7	102.3	14.3	1.7	415.7
	2 - ニトロフルオレン	5	200.7	n.d	n.d	n.d	2548.0
	t - ブチルハイドロペルオキシド	100	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	9 - アミノアクリジン	50	n.d	n.d	n.d	96.0	n.d
	アジ化ナトリウム	10	n.d	2238.3	2269.0	n.d	n.d
代謝活性化	溶媒	0	24.7	153.3	12.0	4.0	588.7
	カルグルミン酸	492	34.3	146.0	14.3	2.3	582.0
		878	24.0	153.3	12.7	2.7	542.3
		1568	22.3	120.7	11.3	5.0	544.3
		2800	24.0	101.0	12.7	6.3	544.3
		5000	28.0	124.0	17.7	5.0	479.0
	2 - アミノアントラセン	5	3907.3	2626.7	387.7	137	2322.7

n.d：データなし

2.6.7.9.B 細菌を用いた復帰突然変異試験–2 被験物質:カルグルミン酸

Report Title：N-Carbamyl-L-Glutamic acid - Bacterial reverse mutation test (Plate incorporation).

試験の種類：細菌を用いる復帰突然変異試験　独立して実施した試験数：2　試験番号：800/010

菌株：*Salmonella typhimurium*（TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA102）　プレート数：3　添付資料 4.2.3.3.1-2

カルグルミン酸：バッチ No. 040307102refLJ2　GLP 適用：適

代謝活性化系：フェノバルビタール及びメチルコラントレン混合物

で処理したラット（OFA SD）肝 S9（凍結乾燥品：IFFA CREDO）

溶媒：DMSO（被験物質、陽性対照物質）

陽性対照物質：非代謝活性化系；アジ化ナトリウム、9 - アミノアクリジン、2 - ニトロフルオレン、t - ブチルハイドロペルオキシド

代謝活性化系；2 - アントラミン

処理：プレート法

細胞毒性：なし

遺伝毒性：なし

2.6.7.9.B 細菌を用いた復帰突然変異試験-2 （続き）

被験物質：カルグルミン酸

代謝活性化の有無	試験物質	用量 (μg/plate)	Assay 1：復帰コロニー数（平均）				
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	TA 102
非代謝活性化	溶媒	0	18.3	111.3	31.3	5.3	388.7
	カルグルミン酸	52	20.3	116.7	39.7	7.3	406.0
		164	17.7	123.7	33.7	7.0	354.7
		512	20.0	113.7	35.7	10.3	345.3
		1600	19.3	95.3	36.3	6.3	354.3
		5000	14.7	74.3	30.7	10.0	341.7
	2 - ニトロフルオレン	5	376.7	n.d	n.d	n.d	n.d
	t - ブチルハイドロペルオキシド	100	n.d	n.d	n.d	n.d	2215.7
	9 - アミノアクリジン	50	n.d	n.d	n.d	87.7	n.d
	アジ化ナトリウム	10	n.d	2749.0	2483.3	n.d	n.d
代謝活性化	溶媒	0	38.0	116.0	16.0	8.0	534.3
	カルグルミン酸	52	29.3	99.3	14.7	12.3	459.3
		164	26.7	105.3	21.7	8.3	523.7
		512	29.3	111.0	13.0	6.3	487.3
		1600	35.0	69.3	15.3	10.7	469.0
		5000	31.7	59.0	17.7	9.3	517.0
	2 - アミノアントラセン	5	2863.0	1576.7	258.3	226.7	1374.7

n.d：データなし

2.6.7.9.B 細菌を用いた復帰突然変異試験-2（続き）

被験物質：カルグルミン酸

代謝活性化	試験物質	用量 (μg/plate)	Assay 2：復帰コロニー数（平均）				
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	TA 102
非代謝活性化	溶媒	0	28.3	111.7	31.7	8.3	376.3
	カルグルミン酸	52	23.0	102.7	31.0	9.0	290.3
		164	18.0	101.3	35.3	9.7	314.0
		512	21.0	100.0	40.3	7.0	305.3
		1600	20.3	76.0	29.3	5.7	310.0
		5000	15.7	66.5	35.3	7.3	255.7
	2 - ニトロフルオレン	5	441.3	n.d	n.d	n.d	n.d
	t - ブチルハイドロペルオキシド	100	n.d	n.d	n.d	n.d	2452.3
	9 - アミノアクリジン	50	n.d	n.d	n.d	190.7	n.d
	アジ化ナトリウム	10	n.d	2714.3	2562.0	n.d	n.d
代謝活性化	溶媒	0	33.7	113.7	17.3	10.0	541.0
	カルグルミン酸	52	30.0	88.0	19.7	14.3	463.7
		164	33.3	84.3	19.7	11.3	449.3
		512	33.0	72.0	18.3	9.3	460.0
		1600	27.7	75.0	16.0	13.0	403.3
		5000	30.3	74.0	14.0	11.0	471.3
	2 - アミノアントラセン	5	3863.0	3001.0	243.3	256.7	1352.0

n.d：データなし

2.6.7.9.C　ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-1　　被験物質：カルグルミン酸

Report Title：N-Carbamyl-L-Glutamic acid –In vitro chromosome aberration test in human lymphocytes.

試験の種類：染色体異常試験　　独立して実施した試験数：2　　試験番号：800/009

細胞：ヒトリンパ球の一次培養　　プレート数：2　　添付資料 4.2.3.3.1-3

カルグルミン酸：バッチ No. KLA1028B/96b/cLI　　分析細胞数/培養：100　　GLP 適用：適

代謝活性化系：フェノバルビタール及びメチルコラントレン混合物

で処理したラット（OFA SD）肝 S9（凍結乾燥品：IFFA CREDO）

溶媒：DMSO（被験物質、陽性対照物質）

陽性対照物質：代謝活性化系存在下；シクロホスファミド、代謝活性化系非存在下；4 - ニトロキノリン - N - オキシド

薬剤処理条件：Assay 1：代謝活性化系存在下及び非存在下：4 時間処理-20 時間回復

Assay 2：代謝活性化系存在下で 4 時間-44 時間回復、非存在下で連続 24 及び 48 時間

細胞毒性：Assay 1；なし

Assay 2：代謝活性化系存在下；なし、非存在下；48 時間処理のみ、高濃度範囲で用量依存的な分裂指数の減少

遺伝毒性：Assay 1；なし

Assay 2；S9 添加；なし、非添加；24 時間処理のみ、異常を有する細胞数が濃度依存的に増加、788μg/mL 及び 1408μg/mL で有意な増加

2.6.7.9.C ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-1 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

Assay 1

代謝活性化	試験物質	用量 (μg/ml)	分裂指数 (%)	構造異常の細胞（平均%）		数的異常%
				ギャップ含有	ギャップ除去	
非代謝活性化 (4時間処置)	溶媒	0	3.3	6.0	4.0	0.5
	カルグルミン酸	46	3.8	-	-	-
		144	4.0	3.0	1.0	0.5
		450	3.2	5.5	3.0	0
		1408	3.5	2.5	2.0	0
	4-ニトロキノリン-N-オキシド	1.25	-	26	20*	0
代謝活性化 (4時間処置)	溶媒	0	3.4	5.5	4.0	0
	カルグルミン酸	45	4.0	-	-	-
		144	2.8	5.0	2.5	0
		450	3.8	6.0	4.5	1.0
		1408	4.7	2.0	1.0	0.5
	シクロホスファミド	12.5	-	52	44*	0

χ^2 検定：*p＜0.001、-：データなし

2.6.7.9.C ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-1 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

Assay 2

代謝活性化	試験物質	用量 (μg/ml)	分裂指数 (%)	構造異常の細胞（平均%）		数的異常%
				ギャップ含有	ギャップ除去	
非代謝活性化（24 時間処置）	溶媒	0	2.2	13	12	3.4
	カルグルミン酸	442	1.9	20.0	15.5	1.0
		788	2.2	24.5	21.5**	1.5
		1408	1.5	36.5	33.0*	2.0
	4 - ニトロキノリン - N - オキシド	1.25	-	34	34*	0
非代謝活性化（48 時間処置）	溶媒	0	1.6	7.5	5.5	3.8
	カルグルミン酸	140	1.4	-	-	-
		248	1.0	7.0	6.5	0
		442	0.8	8.5	8.0	3.6
		788	0.4	7.8	6.9	1.9
		1408	0.3	-	-	-
代謝活性化（4 時間処置）	溶媒	0	4.9	2.5	1.5	0
	カルグルミン酸	442	5.3	6.0	4.5**	0.5
		788	5.1	5.0	2.5	0
		1408	5.6	3.0	1.0	0
	シクロホスファミド	12.5	-	36	30*	0

χ^2 検定：*p＜0.001 **p＜0.05、-：データなし

2.6.7.9.D ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-2 被験物質：カルグルミン酸

Report Title：Test for chromosome aberrations by in vitro human lymphocyte metaphase analysis with carbamyl glutamate (OE 312).

試験の種類：染色体異常試験　独立して実施した試験数：2　試験番号：[redacted]-R[redacted]0904

細胞：ヒトリンパ球の一次培養　プレート数：2　添付資料 4.2.3.3.1-4

カルグルミン酸：バッチ No. 3030804P282　分析細胞数/培養：100　GLP 適用：適

代謝活性化系：Aroclor1254 で誘導したラット（SD）肝 S9

溶媒：被験物質；DMSO、マイトマイシン C；蒸留水、シクロホスファミド；RPMI 1640

投与液の中和化：7.5% 重炭酸ナトリウム

陽性対照物質：代謝活性化系存在下；シクロホスファミド、代謝活性化系非存在下；マイトマイシン C

薬剤処理条件：Assay 1：代謝活性化系存在：4 時間処理-40 時間回復

Assay 2：代謝活性化系非存在下で連続 20 及び 44 時間

細胞毒性：Assay 1；なし

Assay 2：代謝活性化系存在下；なし、非存在下；1000 μg/ml の 20 及び 44 時間処理で、分裂指数が統計学的に有意な減少

遺伝毒性：Assay 1；なし

Assay 2；なし

2.6.7.9.D ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-2 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

Assay 1

代謝活性化	試験物質	用量[1)](μg/ml)及びpH[2)]	分裂指数(%)	構造異常の細胞（平均%）		断裂/細胞
				ギャップ含有	ギャップ除去	
代謝活性化（S9mix）（4時間＋40時間回復）	溶媒	0 (pH8.01)	7.3	1.5	1	0.01
	カルグルミン酸	111.1	6.4	-	-	-
		192.5	7.1	-	-	-
		333.3 (pH7.63)	7	4	1.5	0.015
		577.4 (pH7.31)	6.7	3.5	1.5	0.015
		1000 (pH7.01)	6.2	2	1.5	0.015
	シクロホスファミド	10	-	39*	37*	0.62*

χ^2（断裂/細胞を除く：Student検定）：*p＜0.001、1)：培地の中和処理を行った用量（333.3、577.4、1000 μg/ml）、2)：中和処理後の培地pH（細胞への添加前）、-：データなし

2.6.7.9.D ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-2 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

Assay 2

代謝活性化	試験物質	用量[1)](μg/ml)及びpH[2)]	分裂指数(%)	構造異常の細胞（平均%）		断裂/細胞
				ギャップ含有	ギャップ除去	
非代謝活性化（20時間処置）	溶媒	0 (pH8.01)	8	3.5	2.5	0.025
	カルグルミン酸	111.1	7.4	-	-	-
		192.5	8.4	-	-	-
		333.3 (pH7.63)	6.3	4.5	3	0.03
		577.4 (pH7.31)	7.2	3	2	0.02
		1000 (pH7.01)	6.2	2.5	1	0.01
	マイトマイシンC	0.25	-	59*	59*	1.42*
非代謝活性化（44時間処置）	溶媒	0 (pH8.01)	6	3	1.5	0.015
	カルグルミン酸	111.1	5	-	-	-
		192.5	5.2	-	-	-
		333.3 (pH7.63)	4.9	5	1	0.01
		577.4 (pH7.31)	5.4	4	1.5	0.015
		1000 (pH7.01)	3.8	4	2	0.02

χ^2（断裂/細胞を除く：Student検定）： *p＜0.001、1)：培地の中和処理を行った用量（333.3、577.4、1000 μg/ml）、2)：中和処理後の培地pH（細胞への添加前）、-：データなし

2.6.7.9.E ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験-3：S9mix 非存在下 24 時間薬剤処理における中和化の影響

被験物質：カルグルミン酸

Report Title：Test for chromosome aberrations by in vitro human lymphocyte metaphase analysis with carbamyl glutamate (OE 312). Assay with and without neutralization in the absence of S9 and 24-hour treatment.

試験の種類：染色体異常試験　　独立して実施した試験数：1　　試験番号：[redacted]-R[redacted]1108

細胞：ヒトリンパ球の一次培養　　プレート数：2　　添付資料 4.2.3.3.1-5

カルグルミン酸：バッチ No. 3030804P282　　分析細胞数/培養：100　　GLP 適用：適

代謝活性化系：Aroclor1254 で誘導したラット（SD）肝 S9

溶媒：被験物質；DMSO、マイトマイシン C；蒸留水

投与液の中和化：7.5% 重炭酸ナトリウム

陽性対照物質：マイトマイシン C

薬剤処理条件：代謝活性化系非存在下で連続 24 時間

細胞毒性：非中和化及び中和化条件下で最高濃度において、分裂指数の有意な減少

遺伝毒性：非中和化条件下で、異常を有する細胞数の有意な増加、中和化条件下で、異常を有する細胞数の有意な増加はなし。

2.6.7.9.E 染色体異常 3：*In vitro* ヒトリンパ球染色体異常試験：S9mix 非存在下 24 時間処置における中和化の影響（続き）

被験物質：カルグルミン酸

代謝活性化	試験物質	用量（μg/ml）及び pH[1)]	分裂指数（平均%）	構造異常の細胞（平均%）		数的異常（平均%）	断裂/細胞
				ギャップ含有	ギャップ除去		
非代謝活性化（24 時間処置）	溶媒	0 (pH7.32)	9.3	3.5	2	0	0.02
	非中和化条件下のカルグルミン酸	313.9 (pH7.03)	7.7	5	2	0	0.02
		560.2 (pH6.83)	7.9	10**	7*	0	0.07***
		1000 (pH6.51)	3.6**	10**	7*	0	0.07***
	マイトマイシン C	0.25	-	64**	61**	0	1.36***
	溶媒	0	9.3	3.5	2	0	0.02
	中和化条件下のカルグルミン酸	313.3 (pH7.94)	8.2	4	3.5	0	0.035
		560.2 (pH7.57)	8.9	5	3.5	0.5	0.035
		1000 (pH7.18)	6.6**	5	3.5	0.5	0.04

χ^2 検定：*p＜0.05、**p＜0.01、1)：中和処理後の培地 pH（細胞への添加前）、-：データなし

Student 検定（断裂/細胞）：***p＜0.05

2.6.7.10 *in vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.10.A ラットを用いた小核試験-1

被験物質：カルグルミン酸

Report Title：N-Carbamyl-L-Glutamic acid –Rat Erythrocyte Micronucleus Test in Bone Marrow.

試験の種類：ラット骨髄細胞を用いる小核試験
動物種/系統：Sprague-Dawley ラット
週齢：5/6 週齢
カルグルミン酸：バッチ No. KLA1028B
分析対象細胞：骨髄細胞（幼若赤血球）
分析細胞数/動物：1000

投与期間：単回投与
骨髄採取時間：投与後 24、48 時間
投与方法：経口投与
溶媒：1%CMC 注射用水溶液

試験番号：800/004
添付資料 4.2.3.3.2-1
GLP 適用：適

毒性/細胞毒性：投与後 24 時間の時点で、PCN/NCE 比は対照群に比べ有意に減少
遺伝毒性：本試験；7040 mg/kg 投与群において、投与後 24 及び 48 時間で、有意な MPCE 平均頻度の増加を示した。さらに、予備試験の標本を用いて追加評価を行った結果、3940 及び 7040 mg/kg において、投与後 48 時間で有意な MPCE 平均頻度の増加を示した。したがって、カルグルミン酸に小核誘発作用があると判断した。

予備試験：経口投与後 48 時間

試験物質	用量 (mg/kg)	動物数/性	PCE/NCE 比 平均 (±SD)
カルグルミン酸	2210	3M、3F	0.67±0.13
	3940	3M、3F	0.63±0.16
	7040	3M、3F	0.51±0.15

M：雄、F：雌、PCE：多染性赤血球、NCE：正染性赤血球

2.6.7.10.A ラットを用いた小核試験-1 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

本試験

試験物質	用量 (mg/kg)	動物数/性	PCE/NCE 比 平均（±SD）（雌雄合算）	MPCE/1000PCE 平均（±SD）	
				雌雄別	雌雄合算
経口投与後 24 時間					
溶媒	0	5M 5F	0.68±0.36	0.89±0.081 1.59±1.2	1.24±1.08
シクロホスファミド	60	5M 5F	0.24±0.08*	20.46±2.83* 8.64±2.1*	14.55±6.66*
カルグルミン酸	7040	5M 5F	0.40±0,011*	3.08±2.03 2.47±1.74	2.77±1.8*
経口投与後 48 時間					
溶媒	0	5M 5F	0.86±0.44	1.08±0.94 0.60±0.64	0.84±0.80
カルグルミン酸	7040	5M 5F	0.66±0.24	5.12±4.07 4.32±1.43*	4.72±2.91*

PCE：多染性赤血球、NCE：正染性赤血球、MPCE：小核化多染性赤血球、M：雄、F：雌

PCE/NCE 比：Student t 検定；MPCE/1000PCE：Mann-Whitney 検定：*$p<0.05$

MPCE/1000PCE：1000PCE 中の MPCE 出現頻度

2.6.7.10.A ラットを用いた小核試験-1 （続き）

被験物質：カルグルミン酸

予備試験（再評価）：経口投与後 48 時間

試験物質	用量 (mg/kg)	動物数/性	MPCE/1000PCE 平均（±SD）
			雌雄合算
溶媒[a]	0	5M 5F	0.84±0.80
カルグルミン酸	690	3M 3F	1.49±0.77
	1240	3M 3F	1.89±1.06
	2210	3M 3F	1.73±1.02
	3940	3M 3F	3.87±2.88*
	7040	3M 3F	3.61±1.50*

a 溶媒対照は、本試験の 48 時間サンプルを用いた、M：雄、F：雌

Mann-Whitney 検定：*p<0.05、 MPCE/1000PCE：1000PCE 中の MPCE 出現頻度

MPCE：小核化多染性赤血球

2.6.7.10.B ラットを用いた小核試験-2

被験物質：カルグルミン酸

Report Title：Mutagenicity Study using the Micronucleus Test in Rat with N-CarbamylGlutamic acid

試験の種類：ラット骨髄細胞を用いる小核試験
動物種/系統：Sprague-Dawley ラット（IFFA CREDO）
週齢：5/6 週齢
カルグルミン酸：バッチ No. KLA1028B 及び 03030804P282
分析対象細胞：骨髄細胞（幼若赤血球）
分析細胞数/動物：1000
毒性/細胞毒性：7000 mg/kg でラット骨髄における細胞毒性活性
遺伝毒性：なし

投与期間：単回投与
骨髄採取時間：投与後 24、48 時間
投与方法：経口投与
溶媒：0.5%CMC

試験番号：[redacted]-R[redacted]0505
添付資料 4.2.3.3.2-2
GLP 適用：適

2.6.7.10.B ラットを用いた小核試験-2 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

試験物質	用量 (mg/kg)	動物数/性	PCE/NCE 比 平均（±SD） 雌雄合算	MPCE/1000PCE 平均（±SD） 雌雄合算
経口投与後 24 時間				
溶媒	-	5M、5F	2.58±0.48	0.35±0.34
カルグルミン酸 旧バッチ[a]	2000	5M、5F	2.79±0.72	0.20±0.35
	7000	5M、5F	2.06±0.47*	0.75±0.49
カルグルミン酸 新バッチ[b]	2000	5M、5F	2.19±0.51	0.60±0.70
	7000	5M、5F	2.01±0.59*	0.60±0.32
シクロホスファミド	25	5M、5F	1.12±0.30**	9.75±2.15**
経口投与後 48 時間				
溶媒	-	5M、5F	2.58±0.48	0.35±0.34
カルグルミン酸 旧バッチ[a]	2000	5M、5F	2.87±0.55	0.30±0.42
	7000	5M、5F	2.49±0.59	0.45±0.37
カルグルミン酸 新バッチ[b]	2000	5M、5F	3.60±1.23	0.55±0.55
	7000	5M、5F	2.65±1.00	0.55±0.55
シクロホスファミド	25	5M、5F	2.98±0.55	0.35±0.47

a 被験物質カルグルミン酸；バッチ No .KLA1028B、b 被験物質カルグルミン酸；バッチ No.03030804P282、M：雄、F：雌

PCE：多染性赤血球、NCE：正染性赤血球、MPCE：小核化多染性赤血球

PCE/NCE 比：Student t 検定；MPCE/1000PCE：Mann - Whitney 検定：*p<0.05、 **p＜0.01

MPCE/1000PCE：1000PCE 中の MPCE 出現頻度

2.6.7.10.C ラットを用いた 4 週間反復経口投与後の小核試験 被験物質：カルグルミン酸

Report Title：Bone marrow micronucleus test after 4-week treatment by oral route (gavage) in rats.

試験の種類：ラット骨髄細胞を用いる小核試験　投与期間：29 日間（CP：単回投与）　試験番号：20334MAR

動物種/系統：Sprague-Dawley ラット　骨髄採取時間：最終投与後 24 時間　添付資料 4.2.3.3.2-3

日齢：28 日　投与方法：経口投与　GLP 適用：適

カルグルミン酸：バッチ No 05031001P38、05031001P39, 05031001P42　溶媒：1%CMC；被験物質、蒸留水；シクロホスファミド

分析対象細胞：骨髄細胞（幼若赤血球）

分析細胞数/動物：1000（＋追加分析 2000；溶媒対照及び 1000 mg/kg/日群）

毒性/細胞毒性：なし

遺伝毒性：1000 mg/kg/日群の雄で、僅かに有意な MPE の増加が認められたが、用量依存性が無かったことから、この群に関して、サンプル数の増加を目的として、追加評価を実施した。その結果、1000 mg/kg/日群と溶媒対照群の間に統計学的有意差は認められなかったため、最初の試験結果は生物学的な関連性は無いものと結論した。したがって、カルグルミン酸に染色体異常誘発作用はないと判断した。

2.6.7.10.C ラットを用いた4週間反復経口投与後の小核試験 （続き）

被験物質：カルグルミン酸

1日1回29日間反復経口投与24時間後の骨髄小核試験

試験物質	用量 (mg/kg/日)	動物数 /性	PCE/NCE比 平均（±SD）	MPCE/1000PCE 平均（±SD）
溶媒	0	5M	1.0±0.4	1.2±0.6
		5F	0.8±0.5	1.8±1
カルグルミン酸	500	5M	0.9±0.2	2.5±1.8
		5F	1.4±1.0	2.2±0.8
	1000	5M	0.7±0.3	2.5±1.1*
		5F	1.1±0.4	2.1±1.0
シクロホスファミド	15	5M	0.3±0.2**	25.9±7.2***
		5F	0.4±0.1	15.8±6.7***

追加評価

試験物質	用量 (mg/kg/日)	動物数 /性	PCE/NCE比 平均（±SD） （追加評価）	MPCE/1000PCE 平均（±SD） （追加評価）	MPCE/1000PCE 平均（±SD） （主試験データ＋追加評価）
溶媒	0	5M	0.9±0.5	1.8±1.2	1.5±1.2
カルグルミン酸	1000	5M	0.6±0.4	2.0±1.0	2.3±1.0

MPCE：小核化多染性赤血球、PCE：多染性赤血球、NCE：正染性赤血球、M：雄、F：雌

PCE/NCE比：Student t検定；MPCE：Mann - Whitney検定：*p<0.05 **p＜0.01 ***p＜0.001

MPCE/1000PCE：1000PCE中のMPCE出現頻度

2.6.7.11 がん原性試験

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験

被験物質：カルグルミン酸

Report Title：Carcinogenecity study by the oral route(Gavage) in rats

動物種/系統/性：Sprague Dawley rat/Crl CD(SD) IGS BR/雌雄　　試験番号：37470TCR

投与期間：雄；104週間、雌；102週間（溶媒対照、100及び300mg/kg群）、97週間（1000mg/kg群）　　添付資料 4.2.3.4.1-1

試験開始週齢：約6週齢　　投与方法：経口投与　　GLP適用：適

初回投与年月日：雄；2013年[redacted]月[redacted]日、雌；[redacted]年[redacted]月[redacted]日　　溶媒/投与形態：1%CMC水溶液

高用量の設定根拠：ラットにおける26週間反復投与毒性試験（20330TSR）において、1000 mg/kg/日投与群で軽度の一過性唾液分泌過多が認められた以外、毒性変化が確認されなかったことから、無毒性量と判断された1000 mg/kg/日を高用量に設定した。

特記事項：

1) 本試験はFDA フェーズ4コミットメントで要求された試験である。試験実施に当たりトキシコキネティックス試験は、FDA CDC合意により実施していない。

2) 雌の投与期間について、1000 mg/kg群の生存動物数が15匹まで減少したため、97週で剖検を行った。その他の雌（溶媒対照群、100及び300mg/kg群）は、溶媒対照群の生存動物数が20匹に達した102週に剖検を行った。

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
動物数（開始時）	50	50	50	50	50	50	50	50
死亡/瀕死屠殺動物数	26	30	27	33	28	32	29	35
最終剖検例数	24	20	23	17	22	18	21	15
生存率(%)	48	40[a]	46	34[a]	44	36[a]	42	30[b]
平均体重(g)								
投与1週	206	166	205	165	205	168	204	165
投与26週	622	326	613	326	606	332	591*	322
投与54週	710	400	714	399	711	401	667**	398
投与78週	785	470	776	448	761	452	725**	457
投与97週	-	-	-	-	-	-	-	496
投与102週	758	446	788	496	765	508	708	-
投与104週	766	-	778	-	739	-	706	-
平均体重増加(g)								
投与1週～最終投与時	+557	+278	+574	+328	+538	+337*	+504	+330
体重増加率(%)								
対照群との比較	(0)	(0)	(+3)	(+18)	(-3)	(+21)	(-10)	-

a：投与102週、b：投与97週、-：所見なし、NA：評価不能、Dunnett検定：*p＜0.05、**p<0.01

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
動物数（開始時）	50	50	50	50	50	50	50	50
平均摂餌量(g/動物/日)								
1～2週	26.4	19.6	26.8	19.5	27.1	19.7	27.2	24.8
25～26週	29.0	21.4	29.0	20.4	28.7	21.1	28.6	20.0*
53～54週	29.8	21.5	29.5	21.1	29.6	20.8	28.3	21.1
77～78週	31.2	23.0	29.4	20.7	29.4*	23.0	28.2**	22.2
101～102週	28.3	19.7	28.3	19.7	27.3	19.3	26.5	21.8 (97週)
一般状態 a)								
唾液分泌過多（流涎）	8	0	3	2	7	2	39	40
触知腫瘤を有する動物数	11	34	10	36	10	25	8	29
血液学的検査								
白血球 (G/L)	10.16	6.43	9.07	10.06*	8.58	10.42*	9.20	6.07
好中球 (G/L)	2.71	2.05	2.10	3.74	2.69	4.19	2.86	1.65
リンパ球 (G/L)	6.66	3.88	6.30	5.53**	5.25	5.32*	5.53	3.95
単球 (G/L)	0.49	0.34	0.40	0.57	0.43	0.67*	0.56	0.30
網状赤血球 (%)	2.53	4.80	2.43	3.26	1.94	3.52	1.50**	1.92
網状赤血球 (T/L)	0.22	0.30	0.23	0.22	0.17	0.22	0.14**	0.15

a) 発現例数

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き）

被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
血液生化学的検査	(105 週)	(102 週)	(105 週)	(102 週)	(105 週)	(102 週)	(105 週)	(97 週)
Na＋	145.7	141.5	147.4*	142.3	147.8*	142.4	147.8*	141.8
Cl－	99.8	99.9	103.4**	100.3	104.1**	99.4	103.1**	97.1

Dunnett 検定：*p＜0.05、**p<0.01

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
腹腔内（評価動物数）	0	0	0	0	0	0	0	1
線維肉腫	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1
脂肪組織（評価動物数）	4	2	3	4	1	0	2	0
脂肪肉腫	0	1	0	0	0	N.A.	0	N.A.
副腎皮質（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
皮質過形成	21	22	25	16	22	19	17	16
皮質腺腫	2	3	1	2	2	1	4	3
皮質腺癌	0	2	0	1	0	1	0	1
線維肉腫（一部浸潤）	0	0	0	0	0	0	0	1
副腎髄質（評価動物数）	48	47	48	48	48	47	49	48
びまん性過形成	0	2	1	2	1	1	1	0
限局性過形成	10	9	4	6	8	4	8	3
良性褐色細胞腫	2	1	1	1	1	1	3	0
悪性褐色細胞腫	0	1	1	0	0	0	0	0
良性神経節細胞腫	0	0	0	0	1	0	0	0
肝外胆管（評価動物数）	0	0	0	0	1	0	0	0
上皮過形成	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1	N.A.	N.A.	N.A.

a) 発現例数、N.A.:実施せず

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
骨（評価動物数）	1	0	1	0	1	0	2	0
骨腫	0	N.A.	1	N.A.	0	N.A.	0	N.A.
骨肉腫	0	N.A.	0	N.A.	0	N.A.	1	N.A.
脳（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
顆粒細胞過形成	1	0	0	1	0	0	0	0
良性星状膠細胞腫	0	0	1	0	1	0	1	0
悪性星状膠細胞腫	0	1	2	0	2	0	0	0
局所浸潤性腫瘍	0	0	0	1	0	0	1	0
盲腸（評価動物数）	50	49	49	50	49	49	46	49
腺過形成	0	0	0	0	0	1	0	0
陰核腺（評価動物数）		49		50		48		48
扁平上皮過形成		0		1		0		0
結腸（評価動物数）	50	50	50	50	49	50	49	50
顆粒細胞過形成	0	0	0	0	0	0	0	1
横隔膜（評価動物数）	0	1	0	0	0	0	0	0
転移癌	N.A.	1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

a) 発現例数、N.A.:実施せず

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
気管支リンパ節（評価動物数）	0	0	0	0	0	0	2	0
転移癌	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1	N.A.
頸部リンパ節（評価動物数）	2	0	0	0	0	0	1	0
転移癌	1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1	N.A.
精巣上体（評価動物数）	50		50		50		50	
良性中皮腫	1		1		0		0	
前胃（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
扁平上皮過形成	5	2	4	2	6	3	3	2
ハーダー腺（評価動物数）	50	50	50	50	49	50	50	50
限局性腺房細胞過形成	4	2	2	0	4	2	2	1
局所浸潤性腫瘍	0	0	1	0	0	0	0	0
心臓（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
心内膜下過形成	0	0	0	0	0	0	2	0
悪性シュワン細胞腫（心内膜）	0	0	1	0	0	0	0	0
悪性中皮腫（atriocaval）	0	0	1	0	0	0	0	0

a）発現例数、N.A.:実施せず

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き）

被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
血液リンパ細網系（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
悪性リンパ腫	1	1	0	1	0	1	1	0
顆粒球性白血病	1	0	1	0	0	0	1	0
組織球性肉腫	1	1	2	0	4	0	0	0
小腸／十二指腸（評価動物数）	49	50	50	50	50	50	50	50
陰窩過形成	0	0	0	0	0	0	1	1
小腸／空腸（評価動物数）	47	50	45	50	44	49	48	49
陰窩過形成	1	0	0	1	0	1	1	0
小腸／回腸（評価動物数）	48	50	47	50	44	50	47	50
腺癌	0	0	1	0	0	0	0	0
腎臓（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
尿路上皮過形成	20	36	12	33	5	27	6	17
尿細管上皮過形成	2	2	0	0	2	1	0	0
両染性液胞尿細管腺腫	0	0	1	1	0	0	0	0
脂肪腫	0	1	0	0	0	0	0	0

a）発現例数

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
肝臓（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
胆管過形成	22	15	22	13	19	19	19	11
肝細胞腺腫	0	3	1	0	3	2	3	2
胆管腫	0	0	0	1	0	0	0	0
肝細胞癌	3	0	3	0	1	0	1	0
転移癌	0	2	0	0	0	0	0	0
肺（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
細気管支・肺胞過形成	0	0	0	0	1	0	0	0
扁平上皮癌	1	0	0	0	0	0	0	0
転移癌	1	3	0	1	0	1	2	0
乳腺（評価動物数）	1	50	1	50	3	50	0	50
異型過形成	0	4	0	8	0	7	N.A.	8
腺腫	0	0	0	0	1	2	N.A.	0
線維腺腫	0	24	0	25	2	14	N.A.	18
腺癌	0	12	0	19	0	20	N.A.	17
線維腺腫内で発生した腺癌	0	8	0	11	0	5	N.A.	2

a) 発現例数、N.A.:実施せず

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
腸間膜リンパ節（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	49	49
血管腫	0	0	0	0	1	0	0	0
リンパ管腫	1	0	0	0	1	1	0	0
血管肉腫	0	0	0	0	0	0	1	0
血管肉腫（転移）	0	0	0	0	0	0	0	1
視神経（評価動物数）	50	50	50	50	50	48	50	49
局所浸潤性腫瘍	0	0	1	0	1	0	0	0
卵巣（評価動物数）		50		50		50		50
嚢胞状／乳頭状過形成		2		2		1		0
間細胞過形成		32		28		25		24
セルトリ細胞過形成		30		27		27		33
顆粒膜細胞過形成		0		0		0		2
嚢胞腺腫		0		1		0		0
良性セルトリ細胞腫		1		0		0		1
良性顆粒膜細胞腫		1		0		0		0
悪性顆粒膜細胞腫		1		0		0		0

a) 発現例数

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
膵臓（評価動物数）	50	50	49	50	50	50	50	50
膵島細胞過形成	3	7	2	4	1	3	1	6
腺房細胞過形成	1	0	2	1	1	0	1	0
膵島細胞腺腫	0	1	1	1	3	0	2	1
腺房島細胞混合腺腫	0	0	0	0	0	0	1	0
膵島細胞癌	2	0	3	0	1	1	2	0
腺房島細胞混合腺癌	0	1	0	0	0	0	0	0
上皮小体（評価動物数）	48	48	47	49	47	48	49	47
限局性過形成	5	5	6	4	7	1	6	2
腺腫	1	0	0	0	0	0	1	0
腹膜（評価動物数）	0	0	0	0	1	0	0	0
線維肉腫	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1	N.A.	N.A.	N.A.

a) 発現例数、N.A.:実施せず

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
下垂体（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
限局性前葉過形成	15	10	17	13	14	12	15	13
びまん性前葉過形成	0	0	0	2	0	1	0	1
限局性中間葉過形成	0	0	1	0	1	0	0	1
前葉腺腫	26	37	18	32	22	34	23	30
中間葉腺腫	2	0	1	0	0	0	1	0
後葉神経膠細胞腫	0	0	0	1	0	0	0	0
前葉腺癌	0	0	0	1	0	0	1	0
局所浸潤性腫瘍	0	0	1	0	0	0	0	0
包皮腺（評価動物数）	50		50		50		50	
扁平上皮過形成	2		2		1		1	
前立腺（評価動物数）	50		50		50		50	
腺房細胞過形成	0		0		1		0	
精嚢腺（評価動物数）	50		50		50		50	
過形成	1		2		1		1	
骨格筋（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
肉腫 NOS	0	0	1	0	0	0	1	0

a）発現例数

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
皮膚（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
扁平上皮過形成	0	0	0	0	1	0	0	0
扁平上皮乳頭腫	1	0	2	0	2	0	0	0
皮脂腺腫	0	0	0	0	0	0	1	0
角化棘細胞腫	3	0	2	1	3	0	2	0
良性基底細胞腫瘍	0	0	0	0	0	0	1	0
良性毛包腫	0	0	0	0	2	0	0	0
脂肪腫	4	1	2	0	0	1	2	0
線維腫	6	2	8	3	5	1	6	1
神経稜由来の良性腫瘍	1	0	0	0	0	0	0	0
リンパ管腫	0	0	1	0	0	0	0	0
扁平上皮癌	0	0	0	0	0	0	1	0
癌 NOS	0	0	0	0	1	0	0	0
線維肉腫	1	2	3	1	0	0	1	0
多形性線維肉腫	1	0	0	0	0	0	0	0
悪性シュワン細胞腫	0	0	0	0	1	0	0	0
脂肪肉腫	1	0	0	0	0	0	0	0
転移癌	0	0	0	0	0	0	1	0

a）発現例数

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き）

被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
脾臓（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
血管腫	1	0	0	0	0	0	0	0
血管肉腫	0	0	1	0	0	0	1	1
胃／腺胃（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
腺過形成	1	0	0	1	1	0	0	0
精巣	50		50		50		50	
限局性ライディッヒ細胞過形成	5		12		8		7	
ライディッヒ細胞腺腫	0		2		1		3	
胸腺（評価動物数）	48	49	49	50	48	49	49	48
上皮細胞過形成	0	24	1	24	2	23	0	17
悪性胸腺腫	0	1	1	0	0	0	0	0
舌（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
扁平上皮過形成	0	0	1	0	0	0	0	0
気管（評価動物数）	50	50	50	50	50	50	50	50
局所浸潤型C細胞癌	1	0	0	0	0	0	0	0
尿管（評価動物数）	0	0	0	0	0	0	3	0
尿路上皮過形成	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1	N.A.

a) 発現例数、N.A.:実施せず

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き）

被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
甲状腺（評価動物数）	50	50	50	50	50	49	50	50
限局性C細胞過形成	2	11	4	10	7	3	2	3
びまん性C細胞過形成	0	1	2	4	3	1	0	5
限局性濾胞細胞過形成	2	0	6	1	5	1	2	0
濾胞細胞腺腫	1	0	1	0	3	0	1	0
C細胞腺腫	4	1	5	6	2	2	4	2
濾胞細胞癌	0	0	0	0	0	2	0	0
C細胞癌	1	0	1	0	0	0	1	2
良性神経節細胞腫	1	0	0	0	0	0	0	0
膀胱（評価動物数）	50	50	50	50	50	49	50	50
尿路上皮過形成	2	0	1	0	1	0	1	0
移行上皮乳頭腫	0	0	0	0	1	0	1	0
悪性間葉腫瘍	1	0	0	0	0	0	0	0
ジンバル腺（評価動物数）	0	0	1	0	0	0	0	0
癌	N.A.	N.A.	1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

a) 発現例数、N.A.:実施せず

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)	0（対照）		100		300		1000	
性別	M	F	M	F	M	F	M	F
病理組織学的検査[a)]；増殖性病変								
子宮（評価動物数）		50		50		50		50
嚢胞性腺性内膜過形成		5		7		7		7
子宮内膜過形成		1		2		1		3
頚部扁平上皮過形成		0		1		0		1
顆粒細胞過形成		1		0		0		0
良性顆粒細胞腫		0		1		0		0
子宮内膜間質ポリープ		7		2		2		2
子宮内膜間質肉腫		1		1		1		1
膣（評価動物数）		50		50		50		50
顆粒細胞過形成		3		3		2		3
膣間質ポリープ		0		0		2		0
良性顆粒細胞腫		6		5		3		1
局所浸潤性腫瘍		1		1		1		1
外陰部（評価動物数）		0		0		0		1
局所浸潤性腫瘍		N.A.		N.A.		N.A.		1

a) 発現例数、N.A.:実施せず

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量(mg/kg/日)		0（対照）		100		300		1000	
性別		M	F	M	F	M	F	M	F
動物数		50	50	50	50	50	50	50	50
病理組織学的検査[a)]；非増殖性病変									
心臓：									
粘液腫状変化（弁膜）	グレード1	21	24	18	24	14	10	12	16
	グレード2	6	3	8	5	9	8	8	10
	グレード3	1	0	7	1	10	4	12	10
	グレード4	0	0	0	1	1	0	2	1
	合計	28	27	33	31	34	22	34	37
血栓（弁膜）	グレード1	0	0	4	2	4	1	3	3
	グレード2	0	0	1	0	1	0	1	5
	グレード3	0	0	0	0	1	1	2	0
	グレード4	0	0	1	0	2	0	6	0
	合計	0	0	6**	2	8**	2	12**	8**
	所見の初発確認日	NA	NA	D226	D523	D520	D498	D237	D413

a）発現例数、-：所見なし、NA：評価不能

Armitage's trend test, combined gradings：*p<0.05、**p<0.01

2.6.7.11 ラットにおける2年間反復経口投与がん原性試験 （続き）

投与量(mg/kg/日)		0（対照）		100		300		1000	
性別		M	F	M	F	M	F	M	F
動物数		50	50	50	50	50	50	50	50
病理組織学的検査[a)]；非増殖性病変									
腎臓：									
梗塞	グレード1	0	1	2	0	2	1	5	1
	グレード2	0	0	0	0	0	0	3	1
	グレード3	0	0	0	1	3	0	6	2
	グレード4	0	0	1	0	0	1	2	0
	合計	0	1	3*	1	5*	2	16**	4*
	所見の初発確認日	NA	TS	D589	TS	D324	D498	D237	D555
褐色色素；尿細管上皮	グレード1	5	5	4	7	5	10	15	14
	グレード2	0	0	2	0	1	1	7	0
	グレード3	0	0	0	1	0	0	0	0
心臓弁膜血栓及び腎臓梗塞を有する動物数		0	0	2**	0	3**	1	8**	2**

a）発現例数、-：所見なし、NA：評価不能、TS：最終屠殺日

Armitage's trend test, combined gradings：*p<0.05、**p<0.01

2.6.7.12 生殖発生毒性試験: 雄受胎能及び雌性周期に関する試験

2.6.7.12A ラットを用いた雄受胎能及び雌性周期に関する毒性試験

（幼若ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験の一部として実施）　　被験物質：カルグルミン酸

Report Title：26-week toxicity study by oral route (gavage) in young rats.

動物種/系統：Sprague-Dawley ラット　　投与期間：雄；交配前 28 週～妊娠 15 日、未交尾雌；非投与　　試験番号：20330 TSR

試験開始時日齢：28 日　　投与方法：経口投与　　添付資料 4.2.3.2-2

初回投与年月：[redacted] 年 [redacted] 月　　溶媒：1%CMC 水溶液　　GLP 適用：適

特記事項：投与群の雄＋薬剤非投与の未交尾雌

無毒性量：1000 mg/kg/日

1 日 1 回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	1000
雄	トキシコキネティクス C_{max}（μg/ml）	n.d	71.6	78.0
	AUCt（ng･h/ml）	n.d	534900	708100
	動物数	9	8	10
	死亡及び屠殺動物数	0	1	0
	一般状態	-	-	-
	剖検所見	-	-	-
	体重（%）	599g	0	−6
	交配所要日数	2.7	2.3	3.3
	交配確認雄数	9	8	9
	受胎雄数	9	7	9

-：異常所見なし、n.d：データなし、 体重測定：投与期間（26 週間）終了時、対照群は群平均を示し、被験物質群は対照群からの%差異を示す。

2.6.7.12A　ラットを用いた雄受胎能及び雌性周期に関する毒性試験（続き）　　被験物質：カルグルミン酸

1日1回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	1000
雌（未処置）	動物数	9	8	10
	死亡及び屠殺動物数	0	1	0
	一般状態	-	-	-
	剖検	-	-	-
	妊娠雌数	9	7	9
	黄体の平均数	17.2	16.0	16.9
	着床の平均数	16.2	15.1	15.2
	生存胎児の平均数	15.7	14.7	14.4
	胚吸収の平均数	0.4	0.4	0.8
	死亡胎児の数	1	0	0

- ：異常所見なし

1日1回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	1000
雌	動物数	10	10	10
	性周期観察（投与）期間			
	Day 80-86	-	-	-
	Day 120-133	-	-	-

- ：性周期の異常なし

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：雌受胎能及び胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13A ラットを用いた雌受胎能及び胚・胎児発生毒性試験

被験物質：カルグルミン酸

Report Title：Study for effects on fertility and embryo-fetal development by oral route (gavage) in female rats.

動物種/系統：Sprague-Dawley ラット
試験開始時週齢：雄；10 週、雌；8 週
初回投与年月日：[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日
溶媒：1%CMC 精製水溶液
投与期間：交配前 15 日～交配～妊娠 17 日
交尾成立日：妊娠 0 日
帝王切開日：妊娠 20 日
投与方法：経口投与
試験番号：23288 RSR
添付資料 4.2.3.5.1-1
GLP 適用：適
特記事項：サテライト群として各被験物質投与群に雌各 6 匹を追加
無毒性量：500 mg/kg/日（母動物）、2000 mg/kg/日（受胎能と胚・胎児形成）

投与量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	2000
雌：トキシコキネティクス				
C_{max}(μg/mL)	GD 6 日	n.d	59.2	118.3
	GD 17 日	n.d	54.1	132.9
AUCt（ng･h/ml）	GD 6 日	n.d	400978	1692913
	GD 17 日	n.d	477387	1477919
動物数		24	24	24
死亡及び屠殺動物数		0	0	2
一般状態：唾液過多		0	0	23
剖検		0	0	2
交配前体重増加（1 日目から 15 日目）（g）		31	35	33

GD：妊娠日齢、n.d：データなし

2.6.7.13A ラットを用いた雌受胎能及び胚・胎児発生毒性試験 （続き） 被験物質：カルグルミン酸

投与量（mg/kg/日）	0（対照群）	500	2000
妊娠時体重増加（GD0 日から GD18 日）（g）	117	120	108
終了時の体重（GD20 日）（g）	391	398	383
終了時の屠体重量（g）	317.1	318.9	302.0*
正味の重量増加（GD0 から GD20）（g）	71.9	71.9	59.4**
交配前摂餌量（1 日目から 15 日目）（g/日）	19	19	18
妊娠時摂餌量（GD2 日から GD18 日）（g/日）	27	27	26
交配所要日数	2.4	2.2	3.4
精子が確認された雌動物数	24	23	22
妊娠雌数	24	22	21
子宮摘出時に評価した雌の数	23	20	20
流産あるいは全胚吸収の母体数	0	0	0
黄体の平均数	16.7	16.9	16.0
着床の平均数	13.2	14.8	15.1*
着床前死亡率(%)	20.9	12.5**	5.9***
胎児：評価数	23	20	20
生存胎児数	297	282	290
吸収胚＋瘢痕の平均数	0.3	0.6	0.6
死亡胎児数	0	0	0
着床後死亡率(%)	2.0	4.4	4.0
平均胎児体重（g）	3.70	3.65	3.62

GD：妊娠日齢、Dunnett 検定：*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001

2.6.7.13A ラットを用いた雌受胎能及び胚・胎児発生毒性試験 （続き）

被験物質：カルグルミン酸

投与量（mg/kg/日）	0（対照群）	500	2000
胎児性比（%雄）	49.5	51.4	51.2
胎児外表異常	0	0	0
胎児内臓異常	1	0	0
胎児骨格異常	2	2	0
胎児不完全骨化			
上後頭骨	2/153 (1.3%)	8/148 (5.4%)	11/151 (7.3%)*
第4胸骨分節	47/153 (30.7%)	41/148 (27.7%)	53/151 (35.1%)

Fishers exact 検定：*$p<0.05$

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.14A　ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験

被験物質：カルグルミン酸

Report Title：Study for effects on embryo-fetal development by oral route (gavage) in rabbits.

動物種/系統：ウサギ　KBL NZW White　　投与期間：妊娠 6 日～18 日まで　　試験番号：24241 RSL

試験開始時週齢：18～20 週　　交尾成立日：妊娠 0 日　　添付資料 4.2.3.5.2-1

初回投与年月日：[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日　　帝王切開日：妊娠 29 日　　GLP 適用：適

溶媒：1%CMC 水溶液　　投与方法：経口投与

特記事項：サテライト群を各被験物質群群に 6 匹設け、投与初日と最終投与日の血漿中薬物濃度を測定

無毒性量：250 mg/kg/日（F0 雌）、1000 mg/kg/日　（胚・胎児）

1 日 1 回経口投与用量（mg/kg/日）			0（対照群）	250	1000
F0 雌	トキシコキネティクス：				
	C_{max}（μg/mL）	GD6 日	n.d	12.5	42.2
		GD18 日	n.d	6.2	19.9
	AUCt（ng･h/ml）	GD6 日	n.d	175646	184843
		GD18 日	n.d	76238	76716

GD：妊娠日齢

2.6.7.14A ウサギにおける経口投与による胚・胎児発生毒性試験 (続き)

1日1回経口投与用量 (mg/kg/日)		0 (対照群)	250	1000
母動物	評価動物数	20	20<26>	20<26>
	妊娠動物数	18	19<24>	18<25>
	死亡及び屠殺動物数	0	0<0>	0<1>
	流産あるいは全胚吸収の母体数	0	0<0>	0<0>
	一般状態	-	-	-
	剖検	-	-	-

< >:サテライト動物を含む、n.d:データなし、-:異常所見なし

2.6.7.14A ウサギにおける経口投与による胚・胎児発生毒性試験 （続き）

1日1回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	250	1000
母動物	体重変化：(g)			
	6日目から9日目まで	24	7（−71）	−32***（−233）
	6日目から12日目まで	73	53（−27）	4**（−94）
	6日目から15日目まで	142	108（−24）	63*（−56）
	6日目から19日目まで	178	153（−14）	80（−55）
	19日目から29日目まで	234	210（−10）	174（−26）
	GD6日からの正味の体重変化	−106	−185（75）	−186（75）
	摂餌量：(g/日)			
	6日目から9日目まで	160	149（−7）	103***（−36）
	9日目から12日目まで	163	149（−9）	138（−15）
	12日目から15日目まで	132	112（−15）	116（−12）
	15日目から19日目まで	159	145（−9）	134（−16）
	19日目から29日目まで	148	134（−9）	156（6）
	黄体の平均数	11.4	12.2	10.6
	着床の平均数	10.1	11.3	8.9
	着床前消失の平均%	11.7	7.4	15.8

GD：妊娠日齢、Dunnett 検定：*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001（　　）内は対照群からの%変化

2.6.7.14A ウサギにおける経口投与による胚・胎児発生毒性試験 （続き）

1日1回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	250	1000（×4）
胎児	評価母体数	18	19	18
	生存胎児数	169	204	151
	吸収胚＋瘢痕の平均数	0.3	0.3	0.5
	死亡胎児数	7	4	0
	着床後死亡率%	7.1	4.7	5.6
	胎児の平均体重（g）	38.1	34.9	39.9
	胎児雌雄比（%雄）	57.0	57.6	59.0
	胎児所見：外表	-	-	-
	内臓	-	-	-
	骨格	-	-	-

- ：異常所見なし

2.6.7.15　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験.

2.6.7.15A　ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

被験物質：カルグルミン酸

Report Title：Study for effects on pre- and post- natal development by oral route (gavage) in rats.

動物種/系統：Sprague-Dawley ラット　　投与期間：妊娠 6 日～授乳 21 日まで　　試験番号：24242 RSR

試験開始時週齢：10～11 週　　交尾成立日：妊娠 0 日　　添付資料 4.2.3.5.3-1

溶媒：1%CMC 水溶液　　投与方法：経口投与　　GLP 適用：適

特記事項：サテライト群を各被験物質群群に 4 匹設け、分娩後 17 日の投与 4 時間の血漿中及び乳汁中薬物濃度を測定

無毒性量：　500 mg/kg/日（F0 雌）、500 mg/kg/日を下回る（出生児）

1 日 1 回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	1000
F0 雌	トキシコキネティクス（LD17 日）			
	C_{max}（μg/mL）[1)]	n.d	69.8	179.6
	平均乳汁中薬物濃度（μg/mL）[1)]	n.d	12.3	36.2
	動物数	24	24	23（a）
	妊娠動物数	18	22	20
	分娩した妊娠雌の数	18	22	18
	分娩しなかった妊娠雌の数	0	0	2
	妊娠率（%）	100	100	90
	平均妊娠期間（日）	21.4	21.1	21.4
	死亡及び屠殺動物数	0	0	3
	流産又は全胚吸収母体数	0	0	0

（a）サテライト動物の 2/4 匹は分娩しなかったため、試験群の雌 1 匹をサテライト群とした。

（　　）内は低用量との比、-：データなし、[1)]：投与 4 時間後の値、n.d：データなし

2.6.7.15A　ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）　　被験物質：カルグルミン酸

1日1回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	1000
F0 雌	一般状態：妊娠期と授乳期	-	-	-
	剖検所見：盲腸の拡張	0	0	2
	異常分娩	0	0	0
	体重変化（g）			
	妊娠期　6日目から9日目	15	12（−20）	7***（−53）
	9日目から12日目	22	23（5）	21（−5）
	12日目から15日目	23	21（−9）	25（9）
	15日目から20日目	68	67（−1）	51**（−25）
	6日目から20日目	127	123（−3）	108**（−15）
	授乳期　pp1日目から7日目	25	23（−8）	32（28）
	pp7日目から14日目	14	14（0）	16（14）
	pp14日目から21日目	−27	−22（−18）	−23（−15）
	pp1日目から21日目	12	15（25）	25（108）
	摂餌量（g）			
	妊娠期　6日目から9日目	24	24（0）	21**（−13）
	9日目から12日目	26	26（0）	25（−4）
	12日目から15日目	27	27（0）	27（0）
	15日目から20日目	29	29（0）	27（−7）

-：異常所見なし、Dunnett 検定：*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001。（　　）内は対照群からの%差異。

pp：分娩後

2.6.7.15A　ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）　　被験物質：カルグルミン酸

1日1回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	1000
F0 雌	授乳期　pp1 日目から 7 日目	44	40*（−9）	40（−9）
	pp7 日目から 14 日目	63	59（−6）	56**（−11）
	pp14 日目から 21 日目	67	64（−4）	62（−7）
F1 出生児（離乳前）	評価母体数	18	22	18
	死亡産児を有する母動物数	0	0	0
	平均出生児数/腹	12.7	12.6	11.9
	平均生存児数/腹	12.7	12.6	11.9
	平均死亡児数/腹	0	0	0
	平均着床数	14.5	13.7	12.9
	出生 4 日後生存児数	226	274	202**
	出生 4 日後生存率（%）	99.1	98.9	94.4
	21 日目生存児数	141	176	130**
	離乳時生存率（%）	100	100	93.5
	出生児体重変化（%）			
	pp1 日目から 4 日目	3.4	2.9（−15）	3.1（−9）
	pp4 日目から 7 日目	6.6	5.7***（−14）	5.2***（−21）
	pp7 日目から 14 日目	18.2	17.1（−6）	15.9***（−13）
	pp14 日目から 21 日目	18.2	16.7（−8）	15.9*（−13）
	pp4 日目から 21 日目	43.0	39.6*（−8）	36.9***（−14）

Dunnett 検定：*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001、（　　）内は対照群からの%差異。pp：分娩後

2.6.7.15A ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き） 被験物質：カルグルミン酸

1日1回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	1000
F1出生児（離乳前）	出生児の性比（雄）（%）			
	pp0日目	43.4	47.3	50.5
	pp21日目	46.8	47.7	49.2
	身体的発達及び反射発達	-	-	-
	一般状態	-	-	-
	剖検	-	-	-
F1雄（離乳後）	離乳後の評価数	20	20	20
	死亡及び屠殺動物数	0	0	0
	一般状態			
	交配前期	-	-	-
	妊娠期	-	-	-
	剖検	-	-	-
	体重変化（g）：			
	1日目から8日目	41	41（0）	37*（−10）
	8日目から15日目	59	57（−3）	55（−7）
	15日から64日目	366	358（−2）	341（−7）
	摂餌量（g）：			
	1日目から8日目	15	14（−7）	13*（−13）
	8日目から15日目	20	20（0）	19（−5）

-：異常所見なし、Dunnett 検定：*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001。（ ）内は対照群からの%差異

2.6.7.15A ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）

被験物質：カルグルミン酸

1日1回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	1000
F1雄（離乳後）	15日から64日目	32	32（0）	30（−6）
	包皮分離の平均日齢	33	34	34
	感覚機能	-	-	-
	運動機能	59.8	66.3（11）	75.5（26）
	学習及び記憶	-	-	-
	交配した雄の数	18	18	18
	受胎雄の数	16	18	17
F1雌（離乳後）	離乳後評価数	20	20	20
	死亡及び屠殺動物数	0	0	0
	一般状態	-	-	-
	剖検	-	-	-
	交配前の体重変化（g）			
	1日目から8日目	35	37（6）	34（−3）
	8日目から15日目	44	43（−2）	44（0）
	15日目から64日目	154	149（−3）	157（2）
	妊娠期の体重変化（g）：			
	0日目から8日目	47	38（−19）	38（−19）
	8日目から15日目	42	41（−2）	41（−2）
	0日目から15日目	89	79（−11）	79（−11）

-：異常所見なし。（　）内は対照群からの%差異

2.6.7.15A ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き） 被験物質：カルグルミン酸

1日1回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	1000
F1雌（離乳後）	交配前の摂餌量（g）			
	1日目から8日目	14	13（−7）	13（−7）
	8日目から15日目	17	18（6）	17（0）
	15日目から64日目	22	21（−5）	22（0）
	妊娠期の摂餌量（g）：			
	1日目から8日目	27	25（−7）	25*（−7）
	8日目から15日目	31	29（−6）	29（−6）
	膣開口の平均日齢	35	34	-
	感覚機能	-	-	-
	運動機能	87.5	86.1（−2）	91.6（5）
	学習及び記憶	-	-	-
	交配所要日数	2.8	3.4	2.5
	精子が確認された雌動物数	18	18	18
	妊娠動物数	15	16	16
	黄体の平均数	17.7	16.3	15.3
	着床の平均数	16.1	13.7	13.1*
	着床前死亡率%	8.7	15.8	13.9

-：異常所見なし、Dunnett 検定：*$p<0.05$。（ ）内は対照群からの%変化

2.6.7.15A　ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）　　被験物質：カルグルミン酸

1日1回経口投与用量（mg/kg/日）		0（対照群）	500	1000
F2 胎児	平均生存胚数/腹	14.8	12.9	12.8
	平均吸収胚＋瘢痕の数	1.3	0.8	0.4
	死亡胚を有する母体数	0	0	0
	平均死亡胚数/腹	0	0	0
	平均着床後胚消失率(%)	8.3	5.9	2.9

2.6.7.16　新生児を用いた試験

2.6.7.8A　新生児ラットを用いた2週間反復経口投与毒性試験に記載した

2.6.7.17　局所刺激性試験

該当資料なし

2.6.7.18　その他の毒性試験

2.6.7.18.1　不純物 5-HPA の遺伝毒性試験

2.6.7.18.1A　細菌を用いた復帰突然変異試験-

被験物質：ヒダントイン - 5 - プロピオン酸

Report Title：Mutagenicity test on bacteria (Salmonella typhimurium his- and Escherichia coli trp-) using B.N. Ames's technique..

試験の種類：細菌を用いる復帰突然変異試験　　試験番号：[redacted]-R[redacted]0804

菌株：*Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537)、*Escherichia coli* (WP2pKM101、WP2uvrA.pKM101)

独立して実施した試験数：2　　プレート数：3　　添付資料 4.2.3.7.6-1

代謝活性化系：Aroclor1254 で誘導したラット（SD）肝 S9　　GLP 適用：適

溶媒：DMSO（被験物質、陽性対照物質）

陽性対照物質：非代謝活性化系；アジ化ナトリウム、9 - アミノアクリジン、2 - ニトロフルオレン、マイトマイシン C

代謝活性化系；2 - アントラミン、ベンゾ［a］ピレン

処理：プレート法

細胞毒性：なし

遺伝毒性：なし

2.6.7.18.1A 細菌を用いた復帰突然変異試験– （続き）　　被験物質：ヒダントイン - 5 - プロピオン酸

代謝活性化	試験物質	用量 (μg/plate)	Assay 1：復帰コロニー数（平均）					
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2	WP2uvrA
非代謝活性化	溶媒	0	8	4	11	67	26	86
	5-HPA	50	7	7	12	69	27	79
		150	5	2	13	74	22	83
		500	6	2	11	53	31	87
		1500	9	4	8	57	30	93
		5000	5	1	8	57	20	54
	アジ化ナトリウム	1	400	n.d	n.d	558	n.d	n.d
	9 - アミノアクリジン	50	n.d	829	n.d	n.d	n.d	n.d
	2 - ニトロフルオレン	2	n.d	n.d	514	n.d	n.d	n.d
	マイトマイシン C	0.125	n.d	n.d	n.d	n.d	173	n.d
	ニクロム酸カリウム	15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1364
代謝活性化	溶媒	0	11	3	15	86	48	113
	5-HPA	50	10	5	11	99	38	93
		150	7	4	9	78	41	88
		500	9	5	16	84	38	86
		1500	6	2	14	82	47	98
		5000	4	3	11	58	40	84
	2 - アントラミン	2	512	279	2395	2021	n.d	n.d
	ベンゾ［a］ピレン	5	n.d	n.d	n.d	n.d	166	1058

n.d：データなし

2.6.7.18.1A 細菌を用いた復帰突然変異試験– （続き）

被験物質：ヒダントイン - 5 - プロピオン酸

代謝活性化	試験物質	用量 (μg/plate)	Assay 2：復帰コロニー数（平均）					
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2	WP2uvrA
非代謝活性化	溶媒	0	10	3	14	78	21	94
	5-HPA	50	8	3	15	114	17	80
		150	7	5	18	116	20	80
		500	7	4	14	98	16	94
		1500	5	5	10	81	21	89
		5000	4	1	8	67	19	77
	アジ化ナトリウム	1	450	n.d	n.d	509	n.d	n.d
	9 - アミノアクリジン	50	n.d	2111	n.d	n.d	n.d	n.d
	2 - ニトロフルオレン	2	n.d	n.d	694	n.d	n.d	n.d
	マイトマイシン C	0.125	n.d	n.d	n.d	n.d	145	n.d
	ニクロム酸カリウム	15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1036
代謝活性化	溶媒	0	6	11	20	82	42	161
	5-HPA	50	5	11	25	81	29	167
		150	6	5	18	90	42	194
		500	9	5	18	98	46	173
		1500	9	2	17	81	35	176
		5000	8	1	17	62	27	103
	2 - アントラミン	2	142	156	1856	1567	n.d	n.d
	ベンゾ［a］ピレン	5	n.d	n.d	n.d	n.d	182	693

n.d：データなし

2.6.7.18.1B　ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験　　被験物質：ヒダントイン - L - プロピオン酸

Report Title：Test for chromosome aberrations by in vitro human lymphocyte metaphase analysis.

試験の種類：染色体異常試験　　独立して実施した試験数：2　　試験番号：[redacted]-R[redacted]0906

細胞：ヒトリンパ球の一次培養　　プレート数：2　　添付資料 4.2.3.7.6-2

代謝活性化系：Aroclor1254 で誘導したラット（SD）肝 S9　5%,10%　　分析細胞数/培養：100　　GLP 適用：適

溶媒：被験物質；PRMI 1640

pH 調整：7.5%重炭酸ナトリウム

陽性対照物質：代謝活性化系存在下；シクロホスファミド、代謝活性化系非存在下；マイトマイシン C

薬剤処理条件：Assay 1：代謝活性化系存在下（5% S9）及び非存在下：4 時間処理-20 時間回復

Assay 2：代謝活性化系存在下（10% S9）で 4 時間-20 時間回復、非存在下で連続 20 及び 44 時間

細胞毒性：代謝活性化系存在下；最高濃度で僅かではあるが分裂指数の有意な減少

代謝活性化系非存在下；最高濃度で分裂指数の有意な減少

遺伝毒性：代謝活性化系存在下；なし

代謝活性化系非存在下；4 時間及び 20 時間処理で異常を有する細胞数の有意な増加

2.6.7.18.1B ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験 （続き） 被験物質：ヒダントイン - L - プロピオン酸

Assay 1

代謝活性化	試験物質	用量[1]（μg/ml）及びpH[2]	分裂指数（%）	構造異常の細胞（平均%）		断裂/細胞
				ギャップ含有	ギャップ除去	
非代謝活性化	溶媒	0 (pH7.94)	11.7	3.0	2.5	0.025
	5-HPA	312.5	10.9	-	-	-
		625	11	-	-	-
		1250 (pH7.42)	10.2	6.0	1.0	0.01
		2500 (pH6.99)	11.5	6.0	2.5	0.025
		5000 (pH6.51)	9.1*	9.5*	8.5*	0.155*
	マイトマイシンC	0.25	-	60**	57**	0.78
代謝活性化（5% S9mix）	溶媒	0 (pH7.94)	15	2.5	1.0	0.01
	5-HPA	312.5	12.8#	-	-	-
		625	13.8	-	-	-
		1250 (pH7.42)	13.3	4.0	2.0	0.02
		2500 (pH6.99)	11.7*	1.5	1.0	0.01
		5000 (pH6.51)	12.2*	2.5	1.5	0.015
	シクロホスファミド	10	-	42**	38**	0.59

χ^2（断裂/細胞を除く：Student 検定）：#p＜0.05、*p＜0.01、**p＜0.001、-：データなし、1)：培地の中和処理を行った用量（1250～5000 μg/ml）、2)：中和処理後の培地 pH（細胞への添加前）

2.6.7.18.1B ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験 （続き） 被験物質：ヒダントイン - L - プロピオン酸

Assay 2

代謝活性化	試験物質	用量[1] (μg/ml) 及び pH[2]	分裂指数 (%)	構造異常の細胞（平均%）		断裂/細胞
				ギャップ含有	ギャップ除去	
非代謝活性化 (20 時間処置)	溶媒	0	9.2	0.5	0.5	0.005
	5-HPA	1500	8.4	2.5	1	0.01
		2000	6.1**	5.5*	2.5	0.03
		2500 (pH6.99)	4.6**	9.5**	6*	0.07*
		3000	3.3**	-	-	-
	マイトマイシン C	0.25	-	67**	64**	1.62**
非代謝活性化 (44 時間処置)	溶媒	0	7.7	4.5	2.5	0.025
	5-HPA	2500 (pH6.99)	7.3	5	1	0.01
		3000	5.4*	9	5	0.05
		3500	3.7**	8	3.5	0.035
		4000	3.1**	-	-	-
代謝活性化 (10% S9mix)	溶媒	0 (pH7.94)	9.1	2.5	1.0	0.01
	5-HPA	1250 (pH7.42)	8.3	1.0	1.0	0.01
		2500 (pH6.99)	8.4	2.5	2.0	0.02
		5000 (pH6.51)	8.2	1.0	0	0
	シクロホスファミド	10	-	44**	43**	0.73**

χ^2（断裂/細胞を除く：Student 検定）：*p＜0.01、**p＜0.001、-：データなし、1)：培地の中和処理を行った用量（1250～5000 μg/ml）、2)：中和処理後の培地 pH（細胞への添加前）

2.6.7.18.1C マウスを用いた小核試験

被験物質：ヒダントイン - L - プロピオン酸

Report Title：Study of genotoxic activity using the micronucleus test in mice (2 treatments at 24-h intervals with 1 sampling time).

試験の種類：マウス骨髄細胞を用いる小核試験　処理計画：2 回投与（24 時間毎）　試験番号：FSR-[redacted]1003

動物種/系統：OF1　骨髄採取時間：最終投与後 24 時間　添付資料 4.2.3.7.6-3

週齢：5 週　投与方法：経口投与　GLP 適用：適

溶媒：リン酸緩衝液　陽性対照物質：シクロホスファミド

分析対象細胞：骨髄細胞（幼若赤血球）　分析細胞数/動物：1000

毒性/細胞毒性：なし、遺伝毒性：なし

試験物質	用量 (mg/kg/日×2)	動物数/性	PCE/NCE 比 平均（±SD）	MPCE/1000 PCE 平均（±SD）
溶媒	0	5M	2.47±0.51	0.90±0.42
	0	5F	3.30±1.28	0.30±0.45
5-HPA	1250	5M	1.76±0.22*	0.60±0.22
	2000	5F	1.73±0.19*	0.50±0.61
	625	5M	1.89±0.41	0.30±0.27*
	1000	5F	1.83±0.29*	0.10±0.22
	312.5	5M	2.24±0.71	0.50±0.35
	500	5F	2.34±0.40	0.20±0.27
シクロホスファミド	50（×1）	5M	2.41±0.57	13.00±2.24**
	50（×1）	5F	2.10±0.56	14.30±7.16**

PCE：多染性赤血球、NCE：正染性赤血球、MPCE：小核化多染性赤血球、M：雄、F：雌

PCE/NCE 比：Student t 検定；MPCE/1000PCE：Mann - Whitney 検定：*p＜0.05、**p＜0.01

MPCE/1000PCE：1000PCE 中の MPCE 出現頻度

2.6.7.18.1D マウスを用いたコメット試験-1　　被験物質：ヒダントイン - L - プロピオン酸

Report Title：In vivo COMET assay in the mouse study performed on liver and stomach (Two treatments, one sampling time).

試験の種類：マウスを用いたコメット試験　　投与期間：2 回投与、単回（陽性対照物質）　　試験番号：FSR-[redacted]1004

動物種/系統：OF1 雄マウス　　投与方法：経口投与　　添付資料 4.2.3.7.6-4

週齢：5 週　　GLP 適用：適

動物数：4 匹/群（被験物質及び陰性対照群）、3 匹/群（陽性対照群）

対象臓器：胃及び肝臓　　採取時間：最終投与後 3 から 6 時間の 1 時点

溶媒：リン酸緩衝液

陽性対照物質：胃；メチルニトロニトロソグアニジン、肝臓；1、2 - ジメチルヒドラジン

分析細胞数/動物：150

毒性/細胞毒性：なし

遺伝毒性：なし

対象臓器：胃

試験物質	用量 (mg/kg/日 ×2)	OTM 中央値 (600 細胞)	Snedecor の F 検定 (等分散性)	ノンパラメトリック統計評価		ゴースト細胞	
				Kruskall-Wallis p	Mann-Whitney p	ゴースト細胞の相対比	Pairwise t-test p
溶媒	0	1.38	＜0.0001	N.S.	-	-	-
5-HPA	625	0.85			N.S.	1.16	N.S.
	1250	0.89			N.S.	0.89	N.S.
MNNG	200（×1）	20.51	-	-	＜0.0001	1.17	＜0.05

OTM：オリーブテイルモーメント、MNNG：メチルニトロニトロソグアニジン、N.S.：有意差なし、-：データなし

2.6.7.18.1D マウスを用いたコメット試験-1 （続き）　　被験物質：ヒダントイン - L - プロピオン酸

対象臓器：肝臓

試験物質	用量 (mg/kg/日×2)	OTM 中央値 (600 細胞)	Snedecor の F 検定 (等分散性)	ノンパラメトリック統計評価		ゴースト細胞	
				Kruskall-Wallis p	Mann-Whitney p	ゴースト細胞の相対比	Pairwise t-test p
溶媒	0	0.26	＜0.0001	＜0.0001	-	-	-
5-HPA	312.5	0.65			＜0.0001	0.00	＜0.01
	625	0.46			＜0.0001	1.99	＜0.05
	1250	0.14			＜0.0001	1.17	N.S.
DMH	10 （×1）	8.26	-	-	＜0.0001	3.78	＜0.001

OTM：オリーブテイルモーメント、DMH：1、2 - ジメチルヒドラジン、N.S.：有意差なし、-：データなし

2.6.7.18.1E マウスを用いたコメット試験-2　　被験物質：ヒダントイン - L - プロピオン酸

Report Title：In vivo COMET assay in the mouse study performed on liver (Two treatments, one sampling time).

試験の種類：マウスを用いたコメット試験　　投与期間：2 回投与、単回（陽性対照物質）　　試験番号：FSR-[redacted]1003

動物種/系統：OF1 雄マウス　　投与方法：経口投与　　添付資料 4.2.3.7.6-5

週齢：5 週　　GLP 適用：適

動物数：10 匹/群（被験物質及び陰性対照群）、3 匹/群（陽性対照群）

対象臓器：肝臓　　採取時間：最終投与後 3 から 6 時間の 1 時点

溶媒：リン酸緩衝液

陽性対照物質：1、2 - ジメチルヒドラジン

分析細胞数/動物：150

毒性/細胞毒性：なし

遺伝毒性：全ての 5-HPA 群で、OTM 中央値を統計的に有意に減少させた。しかし、1）対照群における OTM 中央値が最も高かったこと、2）全ての 5-HPA 群の OTM 中央値は、溶媒対照の背景データ範囲内にあったこと、3）明瞭な用量相関がないこと、及び 4）本試験で OTM 中央値の減少が特に 300 mg/kg/日群であり、一方、先の試験（FSP-[redacted]1004）で対照群と比較して 312.5 mg/kg/日群（312.5、625、1250 mg/kg の 3 用量で実施）で軽度であるが有意な増大があったことを考慮して、 この作用は生物学的に意味がないと判断した。以上の結果から、5-HPA は肝細胞で、DNA 損傷を誘発しないと結論した。

2.6.7.18.1E マウスを用いたコメット試験-2 （続き）

被験物質：ヒダントイン - L - プロピオン酸

対象臓器：肝

試験物質	用量 (mg/kg/日 ×2)	OTM 中央値 (1500 細胞)	Snedecor の F 検定 (等分散性)	ノンパラメトリック統計評価		ゴースト細胞	
				Kruskall-Wallis p	Mann-Whitney p	ゴースト細胞の相対比	Pairwise t-test p
溶媒	0	1.03	＜0.0001	＜0.0001	-	-	-
5-HPA	30	0.52			＜0.0001	0.82	N.S.
	100	0.53			＜0.0001	0.83	N.S
	300	0.27			＜0.0001	0.64	＜0.001
	600	0.52			＜0.0001	0.95	N.S.
DMH	10 (×1)	25.87	-	-	＜0.0001	1.51	＜0.001

OTM：オリーブテイルモーメント、DMH：1、2 - ジメチルヒドラジン、N.S.：有意差なし、-：データなし

2.6.7.18.2　不純物 Diaza の遺伝毒性試験

2.6.7.18.2A　細菌を用いた復帰突然変異試験　　被験物質：ジアザ - 1、3 - ジオン - 2、4 - カルボキシ - 7 - シクロヘプタン

Report Title：Bacterial mutagenicity test on salmonella typhimurium his- (5 strains) using B.N. Ames's technique.

試験の種類：細菌を用いる復帰突然変異試験　　試験番号：FSR-[redacted]1001

菌株：*Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA102)　　添付資料 4.2.3.7.6-6

独立して実施した試験数：2　　プレート数：3　　GLP 適用：適

代謝活性化系：Aroclor1254 で誘導したラット肝 S9、7.1%

溶媒：リン酸緩衝液；被験物質

蒸留水；アジ化ナトリウム、マイトマイシン C

DMSO；9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、2-アントラミン、ベンゾ[a]ピレン

陽性対照物質：非代謝活性化系；アジ化ナトリウム、9 - アミノアクリジン、2 - ニトロフルオレン、マイトマイシン C

代謝活性化系；2 - アントラミン、ベンゾ［a］ピレン

処理：プレート法（Assay 1 代謝活性化及び非代謝活性化系、Assay 2 の代謝活性化系）

プレインキュベーション法（Assay2 の非代謝活性化系）

細胞毒性：なし、遺伝毒性：なし

2.6.7.18.2A 細菌を用いた復帰突然変異試験 （続き） 被験物質：ジアザ - 1、3 - ジオン - 2、4 - カルボキシ - 7 - シクロヘプタン

Assay 1

代謝活性化	試験物質	用量 (μg/plate)	変異コロニー（平均）				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	TA102
非代謝活性化	溶媒	0	14.0	5.5	14.0	93.0	157.0
	Diaza	50	20.3	5.3	16.7	114.3	181.3
		150	19.7	4.3	17.3	113.7	169.3
		500	23.3	5.7	11.7	103.3	178.0
		1500	22.3	5.3	17.7	108.7	168.7
		5000	31.7	4.7	19.7	101.7	184.0
	アジ化ナトリウム	1	236.7	n.d	n.d	460.0	n.d
	9 - アミノアクリジン	50	n.d	534.7	n.d	n.d	n.d
	2 - ニトロフルオレン	2	n.d	n.d	216.7	n.d	n.d
	マイトマイシン C	0.125	n.d	n.d	n.d	n.d	1530.7
代謝活性化	溶媒	0	8.7	5.0	23.0	105.3	262.0
	Diaza	50	7.7	8.7	24.3	118.7	344.7
		150	9.0	6.7	26.0	132.0	351.3
		500	11.3	5.3	17.3	129.3	368.0
		1500	10.3	9.7	23.3	117.3	402.0
		5000	7.3	6.3	17.7	111.3	328.7
	2 - アントラミン	2	312.7	222.7	2066.7	2178.7	n.d
	ベンゾ[a]ピレン	2	n.d	n.d	n.d	n.d	1061.3

n.d：データなし

2.6.7.18.2A 細菌を用いた復帰突然変異試験 （続き） 被験物質：ジアザ - 1、3 - ジオン - 2、4 - カルボキシ - 7 - シクロヘプタン

Assay 2

代謝活性化	試験物質	用量 (μg/plate	変異コロニー（平均）				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	TA102
非代謝活性化	溶媒	0	26.0	6.7	17.8	112.0	203.3
	Diaza	50	21.0	6.0	14.0	115.0	207.3
		150	26.0	6.3	21.3	134.3	184.0
		500	30.7	6.3	12.0	142.0	228.0
		1500	21.0	6.0	14.7	136.7	240.0
		5000	23.0	4.7	16.0	113.7	221.3
	アジ化ナトリウム	1	378.7	n.d	n.d	682.7	n.d
	9 - アミノアクリジン	50	n.d	1162.0	n.d	n.d	n.d
	2 - ニトロフルオレン	2	n.d	n.d	242.7	n.d	n.d
	マイトマイシン C	0.125	n.d	n.d	n.d	n.d	1525.3
代謝活性化	溶媒	0	11.3	8.0	28.8	89.8	293.0
	Diaza	50	12.3	7.3	24.0	93.7	319.3
		150	12.3	7.7	26.0	120.0	321.3
		500	11.7	6.3	29.0	106.7	344.0
		1500	14.3	7.3	19.3	108.3	340.0
		5000	12.0	6.7	20.0	89.0	356.0
	2 - アントラミン	1	184.0	182.0	2832.0	2005.3	n.d
	ベンゾ[a]ピレン	2	n.d	n.d	n.d	n.d	664.0

n.d：データなし