

8. 繁殖性に及ぼす影響および催奇形性

(1) ベンスルタッフ原体のラットを用いた繁殖毒性試験

(資料 8-1)

試験機関：(財)日本生物科学研究所

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタッフ原体

検体純度：

供試動物：Wistar系ラット、投与開始時5週齢（P世代投与開始時体重；雄 125～142 g、雌 108～147 g）

1群雌雄各P世代；25～26匹、F₁世代；25匹、F₂世代；52～88匹

投与期間：P世代：投与開始からF_{1b}児離乳時までの30～35週間、F₁世代：離乳時からF_{2b}児離乳時までの29～36週間、F₂世代：離乳時から13週齢まで10週間

(1982年2月24日～1983年7月)

投与方法：粉碎した検体 0、5、40、300 ppmを添加した飼料を自由に摂取させた。

[投与量設定根拠]

交配・調整・選抜および観察・検査項目：概要を表にまとめた。

一般状態および死亡率：試験期間中、全動物の一般状態および生死を毎日観察した。

体重、摂餌量および摂水量：育成期間中は、全動物について体重、摂餌量および摂水量を週1回測定した。ただし、検体投与開始直後の4日間は毎日測定した。

繁殖期間中は、雄について体重、摂餌量および摂水量を週1回測定し、雌について、体重は妊娠0、1、7、11、14、17および21日ならびに哺育1、4、7、14および21日に、摂餌量および摂水量は妊娠1、7、11、14、17および21日ならびに哺育1、4、7、14および21日に測定した。

哺乳児については、生後1、4、7、14および21日に体重を個別に測定した。

交配および妊娠の確認：発情前期にある雌を選んで雄のケージに入れ、1対1で一晩交配した。その翌朝に膣栓または膣垢中に精子が発見された場合に交尾が行われたと判断した。交尾が確認された雌はその日を妊娠0日とし、さらに交尾確認後4日から6日までの3日間にわたって膣垢の観察を続けた。

繁殖性に関する指標：交配、妊娠期間の観察に基づき、次の指標を算出した。

雄の交尾率 (%) = (交尾を確認した雄数 / 交配に用いた雄数) × 100

雌の交尾率 (%) = (交尾を確認した雌数 / 交配に用いた雌数) × 100

雄の授胎率 (%) = (雌を妊娠させた雄数 / 交尾を確認した雄数) × 100

雌の妊娠率 (%) = (妊娠した雌数 / 交尾を確認した雌数) × 100

分娩率 (%) = (生存児を分娩した雌数 / 妊娠雌数) × 100

妊娠期間 = 交尾を確認した日から分娩日までの日数

出産児数 = 分娩日における生存児数および死亡児数の合計

性比 (%) = (雄児数 / 出産児数) × 100

出生率 (%) = (総出産児数 / 着床痕数) × 100

血液学的検査項目：F_{1a} 哺乳児に耳介および尾の皮膚の蒼白がみられたので、各世代の剖検時に一部の動物を選んで血液学的に検査した。F_{1a} 哺乳児および離乳後の F_{1b} 児動物は各群雌雄各 6 匹、F₁ 世代の親動物は各群雌雄各 10 匹についてヘマトクリット値 (Ht) を測定した。F_{2a} 哺乳児および離乳後の F_{2b} 児動物は各腹雌雄各 1 匹について Ht を測定した。さらに、F_{2a} 哺乳児は各群雌雄各 6 匹および離乳後の F_{2b} 児動物は各群雌雄各 10 匹について、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb) および Ht を測定し、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) を算出した。また、白血球数 (WBC) の測定およびハインツ小体の検査を行った。

病理組織学的検査：P 世代の親動物については剖検の後に各群雌雄各 6 匹について下記の主要臓器の重量を測定し、体重比を求めた。

離乳後の F_{1b} および F_{2b} 児動物については剖検の後に各群雌雄各 6 匹、F₁ 世代の親動物は剖検の後に各群雌雄各 10 匹について下記の主要臓器の重量を測定し、体重比を求め、病理組織学的に検査した。

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、副腎、胸腺、甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、前立腺、子宮、脳

生存児数：生後 1、4 (間引き：1 腹当たりの哺乳児数が 8 匹より多い場合、可能な限り雄 4 匹、雌 4 匹になるよう調整した)、7、14 および 21 日に腹毎に生存児数を数え、平均生存児数を求めた。また、次の式から生後 4 日における児動物の生

存率と生後 21 日における離乳率を計算した。

生存率 (%) = (生後 4 日の児数調整前の生存児数 / 出産児数) × 100

離乳率 (%) = (生後 21 日の生存児数 / 生後 4 日の児数調整後の生存児数) × 100

発育・発達に関する観察：第 2 産児 (F_{1b} と F_{2b} 哺乳児) については、哺育期間中形態学的発育、運動機能の発達および感覚機能の発達に関する観察を行った。

形態学的発育；耳介の展開、切歯の萌出、眼瞼の開裂および精巣の下降について観察し、これらが完了した平均日齢を求めた。耳介の展開については、生後 3 日 (3 日齢) における平均達成率として表した。

運動機能の発達；正向反射と四肢歩行について観察した。正向反射は仰臥位から正向位をとるのに要する時間 (秒) として表し、生後 7 日 (7 日齢) の哺乳児について調べた。四肢歩行については、四肢による歩行ができる平均日齢で表した。

感覚機能の発達；聴覚性驚愕反応、視覚試験および疼痛反応について各腹雌雄各 2 匹の観察を行い、正常な反応が認められた動物の頻度で表した。

性成熟に関する観察項目：離乳後の F_{1b} および F_{2b} 児動物について性成熟の観察を行った。

雄については陰茎形成の完了する日齢を求め、雌では膣開口および初発情を観察し、それらが認められる日齢を求めた。

試験の概要

世代	期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	育成期間 (15週)		一般状態および生死の観察 (毎日) 体重、摂餌量および摂水量測定を週1回。ただし、投与開始直後の4日間は毎日測定。
	第1回交配 (3週間)	雌1対雄1で3週間を限度として交尾が確認されるまで同居 翌日、膣栓あるいは膣垢中の精子の有無を調べて交尾の有無を確認 交尾が確認された日を妊娠0日とする	雄: 体重、摂餌量、摂水量測定を週1回 雌: 体重測定; 妊娠0、1、7、11、14、17、21日、哺育1、4、7、14、21日 摂餌量、摂水量測定; 妊娠1、7、11、14、17、21日、哺育1、4、7、14、21日
	妊娠 (3週)		交配、妊娠期間の観察
	出産		出生日、産児数 (生存および死亡) を記録
	哺育 (3週)	$[F_{1a}]$ 哺育4日に同腹児数を8匹 (可能な限り雌雄各4匹) に調整	分娩日の生存児の性別を記録 生後1、4、7、14、21日の生存児数、児動物個別体重測定 哺育期間の観察
	離乳	F_{1a} 児の離乳・安楽殺 F_{1a} 哺乳児から Ht 測定用に各群雌雄各6匹を選抜 (第1回交配に準ずる)	F_{1a} 児の剖検 F_{1a} 児の Ht 測定
	第2回交配 妊娠 (3週)		(第1回交配に準ずる)
	出産		(第1回交配に準ずる)
	哺育 (3週)	$[F_{1b}]$	哺育期間の観察 F_{1b} 児の形態学的発育、運動機能の発達、感覚機能の発達を検査
	離乳	親動物の剖検 (臓器重量用に各群雌雄各6匹を選抜) F_{1b} 児の離乳 F_{1b} 7週齢の時点で離乳児から継代用に各群雌雄各25匹 (各腹から雌雄2匹を限度)、Ht 測定用に各群雌雄各6匹、臓器重量・病理組織学検査用に各群雌雄各6匹を選抜。非選抜児は安楽殺	親動物の主要臓器を秤量 F_{1b} 児の性成熟の観察 継代用以外の F_{1b} 離乳児の剖検 Ht 測定 臓器重量測定および病理組織学的検査
F_1	育成期間 (4週)		
	育成期間 (13週)		(P世代に準ずる)
	第1回交配 妊娠 (3週)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	出産	$[F_{2a}]$	(P世代に準ずる)
	哺育 (3週)	(P世代に準ずる)	(P世代に準ずる)
	離乳	F_{2a} 哺乳児から Ht 測定用に各腹雌雄各1匹、血液学的検査用に各群雌雄各6匹選抜	F_{1b} 児の Ht 測定 F_{1b} 児の血液学的検査
F_2	第2回交配 妊娠 (3週)		(P世代に準ずる)
	出産	$[F_{2b}]$	(P世代に準ずる)
	哺育 (3週)	親動物から Ht 測定用に各群雌雄各10匹、臓器重量・病理組織学検査用に各群雌雄各10匹選抜	親動物の Ht 測定 親動物の臓器重量測定、剖検および病理組織学的検査 (P世代に準ずる)
離乳			
育成期間 (10週)	F_{2b} 離乳児から Ht 測定用に各腹雌雄各1匹、血液学的検査用に各群雌雄各10匹、臓器重量・病理組織学検査用に各群雌雄各6匹を選抜	F_{2b} 児の剖検 F_{2b} 児の Ht 測定 F_{2b} 児の血液学的検査 F_{2b} 児の臓器重量測定、病理組織学的検査	

結果：概要を表に示した。

試験期間を通じて、検体投与に起因すると考えられる死亡は認められなかった申請者注¹。一般状態の変化として、F₁世代およびF₂世代の300 ppm群のほぼ全ての動物に皮膚および眼底部の蒼白が認められた。これらの動物の血液学的検査ではHt、Hb、MCV、MCHおよびMCHCが対照群と比較して有意な低値を示したことから、検体を300 ppmで投与することによりF₁世代およびF₂世代の動物に低色素性小球性貧血が発現したものと考えられた申請者注²。

体重では、300 ppm群のF₁世代およびF₂世代に増加抑制が認められた。しかし、これらの動物の体重は検体投与開始時、すなわち離乳時にすでに対照群より有意に低値であった。また、P世代の親動物の体重は300 ppm群と対照群でほぼ同じであったことから、認められた体重増加抑制は離乳後の動物に対する検体の直接的な影響というより、哺育期間中の哺乳児に対する影響を反映した可能性が考えられた申請者注³。

摂餌量および摂水量では、300 ppm群で減少傾向が認められたが、育成期間の3～7週または繁殖期間の哺育14～21日に認められているので、離乳前後における低体重に関連した変化と思われた申請者注⁴。

申請者注1：死亡の発現頻度について

PおよびF₁世代の親動物において、対照群を含む雌雄で死亡が認められたが、死亡前に観察された症状に一定の傾向が認められないことから、いずれの死亡も検体投与に起因しない偶発性のものと判断した。

申請者注2：血液学的検査について

F_{2a}雌雄児の300 ppm群ではWBCの低値が、F_{2b}雌雄児の300 ppm群ではRBCの高値も認められていることから、これらも検体投与の影響と判断した。その他、F_{1a}雄児の40 ppm群においてHtの低値がみられたが、世代間で再現性のない変化であった。また、F_{2b}雌児の5 ppm群において、Htの高値が認められたが、40および300 ppm群にみられない変化であることから、検体投与の影響とは考えられなかった。

申請者注3：体重について

F₁世代の300 ppm群雌雄の体重は投与の継続で回復する傾向を示したが、雄では32週齢まで、雌では11週齢まで、対照群との間に有意差が継続して認められた。また、F₂児についても13週齢の剖検時まで一貫して低値を示した。これらのことから離乳後も検体投与の影響を受けたものと判断した。

申請者注4：摂餌量および摂水量について

PおよびF₁世代の300 ppm群の母動物で哺育期間の摂餌および摂水量が減少した。F₁世代の300 ppm群雄児は離乳から6週齢まで、雌児は離乳から5週齢まで摂餌および摂水量の低値を示し、F₁世代の300 ppm群雄は7週齢で継代して以降8～11週齢まで摂水量の低値を認めた。また、F₂世代の300 ppm群雄児は離乳から7週齢まで、雌児は離乳から5週齢まで低値を示した。これらは発育抑制に関連した変化と考えられた。その他の期間の摂餌量、摂水量および摂餌効率についても有意差が各群でみられたが、明らかな用量相関性がないか、世代間で一貫性がないか、試験期間中に一定の傾向がない変化であることから、それらは検体投与の影響とは考えられなかった。

繁殖成績には検体投与の影響は認められなかった^{申請者注5}。

哺乳児における運動および感覚機能の発達に検体投与の影響は認められなかったが、300 ppm 群に体重増加抑制と精巢の下降遅延が認められ、検体投与による哺乳児の発育抑制が明らかであった。この哺乳児に対する発育抑制の影響は離乳後の F_{1b} および F_{2b} 児動物にも認められ、300 ppm 群で膾開口および初発情が観察された平均日齢が有意に遅延した^{申請者注6}。

最終剖検では、F₁ 世代および F₂ 世代において対照群を含む全ての群で腎盂拡張が高頻度に認められた。腎盂拡張の出現率は対照群より投与群で高い傾向がみられたが、投与量との関連は明らかでなかった^{申請者注7}。

臓器重量に関しては、いずれの世代でも 300 ppm 群雄に腎臓重量および体重比の増加が認められたが、病理組織学検査で異常は認められなかった。300 ppm 群の離乳後の F_{1b} 雄児動物、F₁ 雌雄親動物および F_{2b} 雄児動物に、心臓重量又は体重比の増加が認められた。この変化はこれら動物に認められた貧血の影響による可能性があるが、原因は明らかでなく、病理組織学的検査で心臓に異常は認められなかった^{申請者注7}。

申請者注 5：繁殖成績について

P および F₁ 世代の 40 ppm 群で統計学的な差がみられる項目が認められたが、いずれも 300 ppm 群では認められない変化であることから、検体投与の影響とは考えられなかった。

申請者注 6：児の形態学的発育、運動機能および感覚機能の発達、ならびに性成熟について

F₂ 児の切歯萌出が 300 ppm 群で短縮したが、F₁ 児の対照群とほぼ同時期に完了していることから、検体投与に関連しない偶発性の変化と判断した。その他の形態学的発育に関する観察項目にも統計学的な差がみられたが、用量相関性がない変化であることから検体投与の影響とは考えられなかった。運動機能の発達に関する項目では、四肢歩行的日齢が 300 ppm 群の F₁ 雄児で僅かに遅延したが、F₁ 雌児および F₂ 児に同様の変化はみられていないことから、偶発性の変化と考えられた。また、性成熟に関する項目では、陰茎形成が 300 ppm 群の F₁ 児で有意に遅延した。F₂ 児では有意差はなかったもののその平均日齢は F₁ 児より遅い傾向を示した。これらのことから陰茎形成も他の性成熟に関する項目と同様に検体投与による発育抑制に伴って遅延するものと判断した。一方、陰茎形成の短縮が F₂ 世代の 5 および 40 ppm 群で認められたが、300 ppm 群でみられた遅延とは逆方向の変化であることから検体投与の影響ではないと判断した。

申請者注 7：剖検、臓器重量および病理学的検査について

腎盂拡張が F₁ および F₂ 世代でみられたが、その殆どが片側性の変化であった。両側性変化の発現頻度は 5 および 300 ppm 群の F_{1b} 雌児のみで増加したが、F₁ 雌親および F_{2b} 児に同様の変化は認められなかった。また、腎臓重量の高値が各世代の 300 ppm 群で認められたが、いずれの世代も片性のみの変化か重量あるいは対体重比のみの変化であり、病理組織学的変化も認められなかった。これらのことから、本試験でみられた腎臓の変化に対する毒性学的意義は低いと判断した。さらに心臓重量の高値が 300 ppm 群の F₁ および F₂ 世代で認められたが、病理組織学的変化はみられず、貧血に対する代償性変化である可能性が高いことから、検体投与の直接的な影響ではないと判断した。40 ppm 群の F_{1b} 雄児でも心臓の対体重比が高値を示したが、剖検と同時に実施した Ht に変化がみられず、同群の F₁ 親や F₂ 児に同様の傾向が認められないことから、偶発性の変化と考えられた。その他の臓器重量にも各世代、各群で対照群と比較して統計学的な差がみられたが、明らかな用量相関性がないか、世代間で一貫性がないか、重量あるいは対体重比のみの変化であることから、検体投与の影響ではないと判断した。

3 世代にわたってベンスルタツプ原体を飼料に混入して投与した場合、300 ppm 群の P および F₁ 世代の母動物で哺育期間中の摂餌量および摂水量の低値、F₁ 世代の親動物で皮膚や眼底部の蒼白および Ht の低値が認められた。また F₁ および F₂ 児動物に皮膚蒼白、Hb、Ht、MCV、MCH および MCHC の低値、体重、摂餌量および摂水量の低値ならびに精巣下降、膣開口および初発情観察日の日齢遅延がみられた。繁殖成績には何ら影響はみられなかった。

以上の結果から、ベンスルタツプ原体の親動物および児に対する一般毒性学的無毒性量は 40 ppm (P : 雄 2.69 mg/kg/日、雌 3.12 mg/kg/日、F₁ : 雄 2.52 mg/kg/日、雌 2.91 mg/kg/日) と考えられた。また、繁殖性に対する無毒性量は 300 ppm (P : 雄 20.08 mg/kg/日、雌 23.27 mg/kg/日、F₁ : 雄 21.46 mg/kg/日、雌 24.27 mg/kg/日) と考えられた^{申請者注 8}。

申請者注 8 : 報告書で考察されていない項目を含めて、以下の通り結論した。

3 世代にわたってベンスルタツプ原体を飼料に混入して投与した場合、300 ppm 群において、P および F₁ 世代の母動物で哺育期間中の摂餌量および摂水量の低値、F₁ 世代の親動物で皮膚や眼底部の蒼白、体重および Ht の低値、また F₁ および F₂ 児動物に皮膚蒼白、血液学的検査項目の変動 (F₁ : Ht の減少、F₂ : Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC および WBC の減少ならびに RBC の増加)、摂餌量および摂水量の低値ならびに体重増加抑制とそれに関連した性成熟 (精巣下降、陰茎形成、膣開口および初発情) の遅延が認められた。繁殖成績には何ら影響はみられなかった。これらのことから、ベンスルタツプ原体の親動物および児に対する一般毒性学的無毒性量は 40 ppm (P : 雄 2.69 mg/kg/日、雌 3.12 mg/kg/日、F₁ : 雄 2.52 mg/kg/日、雌 2.91 mg/kg/日) と考えられた。また、繁殖性に対する無毒性量は 300 ppm (P : 雄 20.08 mg/kg/日、雌 23.27 mg/kg/日、F₁ : 雄 21.46 mg/kg/日、雌 24.27 mg/kg/日) と考えられた。

結果の概要

世代		親: P			児: F _{1a} , F _{1b}			親: F ₁		児: F _{2a} , F _{2b}		
投与群 (ppm)		0	5	40	300	0	5	40	300			
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25			
	雌	25	26*	25	25	25	25	25	25			
一般状態										検体投与に起因した異常は認められなかった		皮膚および眼底部の蒼白
死亡数	雄	1	0	0	0	0	0	0	0			
	雌	0	1	0	1	0	0	0	0	3		
体重	雄	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	↓: 21, 23~32週 ↓: 14~20週, 22週 ↓: 7~13週		
	雌	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	↓: 10, 11週, ↓: 9週 ↓: 7, 8週		
摂餌量	雄	—	↑: 14, 23, 28, 29週 ↑: 1日, 1, 2週	↑: 1, 5週 ↑: 20, 22週 ↑↑: 1日, 26週 ↓: 25週 ↓↓: 28週	↑: 1週, ↑: 14, 20, 22, 26週 ↑↑: 1日 ↓: 2日, 3, 27週 ↓: 21週 ↓↓: 25週	—	↑: 8週	↑: 7週	有意差なし			
	雌	—	↑: 第2回妊娠17日 ↑: 7週 ↓: 2日	↑: 第2回妊娠17日 ↓: 2日	↑: 第2回妊娠17日 ↓: 2日, 14週 ↓: 第2回哺育7日 ↓: 第1回哺育4, 14日, 第2回哺育21日	—	↓: 20週, 第1回妊娠7日 ↓: 12週	↑: 第1回妊娠21日, 第1回哺育14日, 第1回哺育21日 ↑: 第1回哺育4日 ↑↑: 第1回哺育7日 ↓: 9, 10週, 第1回妊娠7日 ↓: 16週,	↑: 11, 15週, 第1回妊娠11日 ↓: 第1回哺育21日, 第2回哺育7日 ↓: 第2回哺育21日			
摂水量	雄	—	有意差なし	↑: 6, 19, 20, 26週 ↑: 5週 ↓: 13週	↑: 6, 7, 10, 23, 24, 26, 28週 ↑: 5, 17, 20, 29週 ↓: 2, 3日, 2, 3週 ↓: 1週	—	有意差なし	↑: 7週	↓: 9~11週 ↓: 8週			
	雌	—	↑: 7週, 第1回妊娠1, 14日, 第2回妊娠14, 17日, 第2回哺育14日	↑: 第1回妊娠1日, 第2回妊娠17日 ↓: 12週	↓: 10, 11週, ↓: 9, 12, 14, 15週 ↓: 第2回哺育7, 21日	—	↑: 第1回妊娠11日	↑: 第1回妊娠17日, 第2回妊娠21日 ↑: 第1回妊娠11日	↑: 第1回妊娠11日 ↓: 18週 ↓: 第2回哺育21日			
摂餌効率	雄	—	↑: 10, 18, 21, 28週 ↑: 7週	↑: 29週, ↑: 25週 ↑↑: 19, 28週 ↓: 5, 22週 ↓↓: 1, 27週	↑: 7, 10, 15週 ↑: 25週 ↑↑: 19週 ↓: 16, 20週 ↓: 22週 ↓↓: 1週	—	↑: 25, 30週	↑: 25週	↑: 8, 11週 ↑↑: 25週			
	雌	—	↑: 9週 ↓: 第1回哺育1週	↑: 9, 15週	↑: 9週, 第2回哺育3週	—	有意差なし	↓: 7週, 第1回妊娠1週	↑: 13週, 第2回哺育2週 ↑: 第2回妊娠2週 ↓: 第1回妊娠3週			

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

—: 対照群 対照群との有意差の検定 (↑↓: p < 0.05, ↑↑↓: p < 0.01, ↑↑↓↓: p < 0.001)

Student の t 検定: 体重、摂餌量、摂水量、摂餌効率

Fisher の直接確率計算法: 一般状態

*: 投与4日に死亡したため1匹を補充した。

結果の概要 (つづき)

世代		親: P				親: F ₁				
投与群 (ppm)		0	5	40	300	0	5	40	300	
動物数	雄	25	25	25	25	25	25	25	25	
	雌	25	25	25	25	25	25	25	25	
育成期 検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	—	0.33	2.69	20.08	—	0.31 ~0.64*	2.52 ~5.19*	21.46 ~40.14*	
	雌	—	0.39	3.12	23.27	—	0.36 ~0.63*	2.91 ~5.20*	24.27 ~40.00*	
交尾率 (%)	a	100	96.0	100	100	100	100	100	91.7	
	b	100	96.0	96.0	100	88.0	92.0	100	82.6	
交尾率 (%)	a	100	96.0	100	100	100	100	100	95.8	
	b	100	96.0	96.0	100	88.0	92.0	100	82.6	
雄の授胎 率 (%)	a	100	100	96.0	92.0	88.0	88.0	80.0	81.8	
	b	91.7	100	91.7	95.8	95.5	91.3	92.0	78.9	
雌の妊娠 率 (%)	a	100	100	96.0	92.0	88.0	88.0	80.0	78.3	
	b	96.0	100	91.7	95.8	95.5	91.3	92.0	78.9	
分娩率 (%)	a	100	100	100	95.7	100	100	100	100	
	b	95.8	100	100	100	100	100	100	100	
妊娠期間 (日)	a	21.8	21.8	21.7	22.0	21.9	21.7	21.9	21.9	
	b	21.9	21.8	↓21.6	21.8	21.8	21.7	↑22.1	22.0	
出産児数	a	14.2	12.9	14.2	13.8	14.6	13.4	14.7	13.8	
	b	15.0	14.8	15.0	14.3	14.9	14.2	13.1	15.6	
分娩 生存児数	a	13.4	12.5	13.5	13.3	14.1	13.0	14.0	13.2	
	b	13.9	14.0	14.0	13.7	14.3	13.1	↓10.9	14.6	
分娩 死亡児数	a	0.7	0.4	0.6	0.5	0.5	0.4	0.7	0.6	
	b	1.0	0.8	1.0	0.6	0.5	1.0	↑2.2	1.0	
性比 (雄%)	a	54.5	51.0	55.8	52.0	49.1	50.3	48.4	51.9	
	b	48.8	51.6	48.9	48.5	48.5	45.4	51.3	49.3	
出生率 (%)		92.5	93.1	92.5	92.3	90.8	92.9	85.7	90.2	
Ht (%)	雄	/	/	/	/	44.8	45.6	45.8	45.1	
	雌	/	/	/	/	47.4	47.5	47.3	↓↓42.4	
臓器 重量	雄	重量	—	↑:副腎(合計)	有意差なし	↑↑:腎臓(右、左、合計)	—	有意差なし	有意差なし	↓:前立腺
		対体重比	—	↑:副腎(合計)	有意差なし	↑:腎臓(右、左、合計)	—	有意差なし	↓:左副腎	↑:心臓、↑:右腎臓、↑:腎臓(左、合計)、↓:前立腺
	雌	重量	—	有意差なし	↓:肝臓、肺	有意差なし	—	有意差なし	有意差なし	↑:腎臓(右、左、合計)、心臓
		対体重比	—	↓:肺、右卵巣	有意差なし	↓:脾臓、↓:肝臓	—	有意差なし	↓:肺、副腎(左、合計)、↓:右副腎	↓:肝臓、右副腎
剖検	雄	検体投与に起因した異常なし				検体投与に起因した異常なし				
	雌	検体投与に起因した異常なし				検体投与に起因した異常なし				
病理組織学的 検査		検体投与に起因した異常なし				投与に起因した異常なし				

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

—: 対照群 /: 検査せず。

*: (7~20週齢の平均検体摂取量) ~ (3~6週齢時の平均検体摂取量) を示した。

** : 腎盂拡張(合計)は両側性あるいは片側性変化を示した動物の総数を示す

対照群との有意差の検定 (↑↓: p < 0.05, ↑↑↓↓: p < 0.01, ↑↑↓↓↓: p < 0.001)

Student の t 検定: 出生率、妊娠期間、出産児数、性比、臓器重量および対体重比、血液学的検査の結果

Fisher の直接確率計算法: 交尾率、授胎率、妊娠率、分娩率の結果、剖検、病理組織学的検査

結果の概要 (つづき)

世代		親: P 児: F _{1a} , F _{1b}				親: F ₁ 児: F _{2a} , F _{2b}					
投与群 (ppm)		0	5	40	300	0	5	40	300		
一般状態		検体投与に起因した異常なし				皮膚蒼白	検体投与に起因した異常なし				
							皮膚および眼底部の蒼白				
生存 児 数	生後 1 日	a	13.4	11.8	13.5	13.3	13.9	12.9	13.8	12.4	
		b	13.8	13.3	14.0	13.7	14.2	13.0	↓10.9	14.6	
	生後 4 日 間引き前	a	13.1	11.0	13.3	12.5	13.3	12.8	13.6	12.1	
		b	13.6	13.1	13.7	13.0	13.9	12.9	↓10.8	13.9	
	生後 4 日 間引き後	a	7.9	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	
		b	8.0	8.0	8.0	7.9	8.0	8.0	7.9	8.0	
	生後 7 日	a	7.9	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	7.9	
		b	8.0	8.0	8.0	7.9	8.0	8.0	7.9	8.0	
	生後 14 日	a	7.9	8.0	8.0	7.9	7.9	7.9	8.0	7.9	
		b	8.0	8.0	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.6	
	生後 21 日	a	7.9	7.8	7.9	7.7	7.9	7.9	7.9	7.5	
		b	8.0	8.0	7.9	7.8	7.9	7.9	7.8	7.6	
	生存率 (生後 4 日)	a	89.7	86.4	94.0	85.5	91.0	95.8	93.7	88.6	
		b	86.6	90.1	90.4	86.5	93.2	91.0	83.5	88.2	
離乳率	a	99.5	97.0	98.9	96.3	98.8	98.9	98.8	94.1		
	b	99.4	99.5	98.8	98.0	98.8	98.8	98.1	95.5		
児 動 物	生後 1 日	雄	a	6.2	6.5	6.2	6.1	6.3	6.6	6.7	6.3
			b	6.5	6.6	6.4	6.2	6.3	6.7	↑↑7.0	6.4
		雌	a	5.9	6.1	6.0	5.8	6.0	6.2	6.4	5.9
			b	6.1	6.2	6.0	6.0	6.2	6.3	↑6.8	6.1
	生後 4 日 間引き前	雄	a	9.0	9.6	9.1	8.8	9.5	9.9	10.1	9.4
			b	9.4	9.9	9.4	9.1	9.7	10.2	↑10.9	9.0
		雌	a	8.6	9.2	8.9	8.5	9.0	9.5	9.8	8.8
			b	8.8	9.5	9.1	8.7	9.4	9.7	↑10.7	8.8
	生後 4 日 間引き後	雄	a	9.2	9.8	9.3	9.1	9.8	10.1	10.3	9.7
			b	9.8	10.3	9.8	9.5	9.9	10.4	↑11.1	9.5
		雌	a	8.8	9.4	9.1	8.6	9.3	9.7	10.0	9.0
			b	9.2	9.8	9.4	9.1	9.7	9.9	↑10.9	9.1
	生後 7 日	雄	a	14.4	14.6	14.0	13.4	16.1	15.9	16.7	14.7
			b	15.3	16.1	15.3	↓13.3	15.6	16.2	↑17.4	↓↓13.0
		雌	a	13.8	13.9	13.8	12.7	15.3	15.3	16.2	13.9
			b	14.6	15.3	14.7	↓13.1	15.3	15.5	↑16.8	↓↓12.7
	生後 14 日	雄	a	29.1	28.4	27.4	↓↓24.2	32.8	32.2	33.8	↓↓27.4
			b	31.0	32.3	30.9	↓↓25.7	31.9	32.7	↑34.2	↓↓24.3
		雌	a	27.6	26.8	26.9	↓23.7	31.8	31.3	32.8	↓↓25.6
			b	29.8	31.0	30.1	↓26.0	30.9	31.6	↑33.5	↓↓23.9
	生後 21 日	雄	a	48.1	47.3	45.1	↓↓38.2	52.6	52.3	54.2	↓↓42.7
			b	50.5	51.7	50.0	↓↓41.0	52.1	53.0	↑56.1	↓↓39.8
		雌	a	45.2	45.0	44.3	↓↓37.8	50.6	50.3	52.1	↓↓40.4
			b	48.6	49.4	47.8	↓↓41.4	50.2	51.4	↑54.3	↓↓39.0

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↑ ↓: p < 0.05, ↑ ↓: p < 0.01, ↑ ↑ ↓ ↓: p < 0.001)

Student の t 検定

結果の概要 (つづき)

世代		親: P				児: F _{1b} , F _{1c}			
投与群 (ppm)		0	5	40	300	親: F ₁		児: F _{2a} , F _{2b}	
		0	5	40	300	0	5	40	300
形態学的発育	哺育3日の耳介の展開 (%)	雄 70.3	72.3	60.8	68.7	75.3	76.5	↑95.5	89.7
		雌 71.2	69.9	59.8	70.9	80.2	79.2	↑100	89.5
	切歯の萌出 (日齢)	雄 9.1	9.7	↑9.8	9.5	9.7	9.7	9.3	↓8.9
		雌 9.3	↑10.0	↑9.9	9.3	9.8	9.8	9.1	↓9.0
	眼瞼の開裂 (日齢)	雄 15.2	15.0	15.4	15.5	15.1	15.1	↓14.5	15.2
		雌 15.2	15.0	15.2	15.2	15.0	15.0	↓14.3	14.9
	精巣の下降 (日齢)	19.7	19.6	19.9	↑22.6	19.5	19.9	19.7	↑20.5
運動機能の発達	正向反射 (秒)	雄 1.7	1.6	1.7	1.3	2.2	2.7	4.0	2.7
		雌 3.6	1.4	3.0	1.6	3.5	2.8	2.4	2.2
	四肢歩行 (日齢)	雄 14.0	14.0	14.0	↑14.3	14.0	14.0	14.0	14.0
		雌 14.0	14.1	14.0	14.1	14.1	14.0	14.0	14.0
感覚機能の発達	聴覚性驚愕反応 (%)	雄 100	100	100	100	100	100	100	100
		雌 100	100	100	100	100	100	100	100
	視覚試験 (%)	雄 100	100	100	100	100	100	100	100
		雌 100	100	100	100	100	100	100	100
	疼痛反応 (%)	雄 100	100	100	100	100	100	100	100
	雌 100	100	100	100	100	100	100	100	
性成熟	陰茎形成 (日)	45.4	45.3	45.2	↑47.6	46.6	↓45.2	↓44.4	48.1
	臍開口 (日)	34.5	34.8	34.7	↑40.8	34.6	34.5	34.5	↑39.2
	初発情 (日)	雌 36.8	36.9	37.1	↑42.5	37.0	36.7	37.4	↑42.2
生後3~7週死亡数	雄	0	0	0	1	0	0	3	1
	雌	4	1	3	1	3	0	4	1
生後8~13週死亡数	雄	—	—	—	—	0	0	0	0
	雌	—	—	—	—	0	1	1	1
体重 F _{1b} : 3~7週齢 F _{2a} : 3~13週齢	雄	—	有意差なし	有意差なし	↓↓: 22~24日、生後3~7週	—	有意差なし	↑: 5週 ↑: 6~13週	↓↓: 22~24日、3~11週 ↓: 12、13週
	雌	—	有意差なし	有意差なし	↓↓: 22~24日、3~7週	—	有意差なし	↑: 22日	↓↓: 22~24日、3~10週 ↓: 11~13週
摂餌量 F _{1b} : 3~6週齢 F _{2a} : 3~12週齢	雄	—	↑: 3週	有意差なし	↓↓: 22、24日、3、5週 ↓: 23日、4、6週	—	有意差なし	↑: 6、7、9、13週 ↑: 10週 ↑: 11、12週	↓↓: 22~24日、3、5週 ↓: 4、7週 ↑: 11週
	雌	—	有意差なし	有意差なし	↓↓: 22~24日、4週 ↓: 3、5週	—	有意差なし	↑: 12週	↓↓: 22~24日、5週 ↓: 3、4週
摂水量 F _{1b} : 3~6週齢 F _{2a} : 3~13週齢	雄	—	有意差なし	有意差なし	↓↓: 23、24日、3~6週 ↓: 22日	—	↑: 23、24日、3、4、6、13週 ↑: 12週	↑: 6、9、12週 ↑: 7、10、11、13週	↓↓: 22~24日、3、5週 ↓: 4、7週
	雌	—	有意差なし	有意差なし	↓↓: 23、24日、3~5週 ↓: 22日	—	↑: 23日 ↑: 24、3週	有意差なし	↓↓: 22~24日、3~5週
摂餌効率 F _{1b} : 3~6週齢 F _{2a} : 3~12週齢	雄	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	—	有意差なし	有意差なし	↑: 7週 ↑: 10週
	雌	—	有意差なし	有意差なし	↑: 5週 ↑: 6週	—	有意差なし	↓: 11週	↑: 5、7週 ↑: 6週

太枠内は検体投与の影響であることを示す。*: F_{1b}, F_{2a}のみ検査。—: 対照群 /: 検査せず。

対照群との有意差の検定 (↑ ↓: p < 0.05, ↑ ↓: p < 0.01, ↑ ↓: p < 0.001)

Student の t 検定: 体重、摂餌量、摂水量、摂餌効率、哺乳児の形態学的発育と運動機能の発達に関するデータ、児動物の性成熟に関するデータ

Fisher の直接確率計算法: 感覚機能と正向反射に関するデータ

結果の概要 (つづき)

世代		親: P				親: F ₁				
投与群 (ppm)		0	5	40	300	0	5	40	300	
Ht (%)	F _{1a} , F _{2a} : 3週齢	雄 30.2	29.5	↓26.9	↓20.0	30.7	30.4	32.1	↓↓20.3	
	雌	29.7	30.1	29.0	↓21.7	32.2	33.2	32.7	↓↓20.2	
	F _{1b} : 7週齢	雄 42.1	42.1	40.8	↓↓31.1	45.8	45.4	45.3	↓↓39.9	
	雌	43.3	41.8	42.7	↓↓33.7	42.9	43.6	43.1	42.3	
血液学的検査	F _{2a} : 3週齢	雄	/	/	/	-	有意差なし	有意差なし	↓: MCV, ↓↓: Hb, Ht, MCH, MCHC, WBC	
		雌	/	/	/	-	有意差なし	有意差なし	↓: MCHC, WBC ↓↓: Hb, Ht, MCV, MCH	
	F _{2b} : 13週齢	雄	/	/	/	-	有意差なし	有意差なし	↓: Hb, Ht, MCHC ↓↓: MCV, MCH ↑: RBC	
		雌	/	/	/	-	↑: Ht	有意差なし	↓: MCHC, ↓: Hb ↓↓: MCV, MCH ↑: RBC	
児動物	臓器重量 F _{1b} : 7週齢 F _{2b} : 13週齢	重量	-	有意差なし	有意差なし	↓: 肺、右精巣、脳	-	↑: 肝臓	↑: 脾臓、左腎臓、下垂体 ↑: 肝臓	↑: 腎臓 (合計)、心臓
		対体重比	-	有意差なし	↑: 心臓	↑: 腎臓 (右、合計) ↑: 左腎臓 ↑: 心臓 ↑: 脳 ↑: 脾臓	-	↓: 心臓、精巣 (右、左、合計)	↑: 肝臓	有意差なし
	雌	重量	-	有意差なし	有意差なし	↓: 副腎 (右、合計)、卵巣 (右、合計)	-	有意差なし	有意差なし	↓: 肝臓
		対体重比	-	↓: 腎臓 (合計)、右副腎、右卵巣 ↓: 右腎臓	↓: 卵巣 (合計)	↓: 卵巣 (右、合計) ↑: 肺	-	↓: 肝臓	↓: 肝臓	↑: 右腎臓 ↓: 肝臓
剖検 F _{1b} : 7週齢 F _{2b} : 13週齢	雄	検体投与に起因した異常なし				-	↑: 腎盂拡張 (合計) **, ↑: 腎盂拡張 (片側性)	有意差なし	↑: 腎盂拡張 (合計) **, ↑: 腎盂拡張 (片側性)	
	雌	-	↑: 腎盂拡張 (両側性)	有意差なし	↑: 腎盂拡張 (合計) **, ↑: 腎盂拡張 (両側性)	-	有意差なし	有意差なし	↑: 腎盂拡張 (合計) **, ↑: 腎盂拡張 (片側性)	
病理組織学的検査		検体投与に起因した異常なし				検体投与に起因した異常なし				

太枠内は検体投与の影響であることを示す。 - : 対照群 / : 検査せず。

対照群との有意差の検定 (↑ ↓: p < 0.05, ↑ ↓: p < 0.01, ↑ ↑ ↓ ↓: p < 0.001)

** : 腎盂拡張 (合計) は両側性あるいは片側性変化を示した動物の総数を示す

Student の t 検定 : 臓器重量および対体重比、血液学的検査の結果

Fisher の直接確率計算法 : 剖検、病理組織学的検査

(2) ベンスルタップ原体のラットにおける催奇形性試験

(資料 8-2)

試験機関：(財) 日本生物科学研究所

報告書作成年：1982年

検体：ベンスルタップ原体

検体純度：

供試動物：Wistar系妊娠ラット、交配開始時10週齢（妊娠0日平均体重；146g）、

1群23匹（180mg/kg群は22匹）

投与期間：妊娠7日から17日までの11日間

投与方法：検体を20、60および180mg/kgの割合で1%カルボキシメチルセルロース（CMC）水溶液に懸濁し、妊娠7日*から妊娠17日まで、毎日1回強制経口投与した。投与液量は10mL/kgとした。なお、対照群には1% CMC水溶液10mL/kgを同様に投与した。

*): 陰栓あるいは陰スミア中に精子を確認した日を妊娠0日として起算した。

投与量設定根拠：

観察・検査項目：

母動物；妊娠0日より胎児摘出を行った妊娠21日までの期間、死亡および一般症状を毎日観察した。妊娠0日に体重、妊娠1日に摂餌量および摂水量を測定し、その後、体重、摂餌量および摂水量は妊娠4日および7日より21日までの毎日測定した。妊娠21日にエーテル麻酔下で放血致死させ、開腹し、主要臓器を病理解剖学的に検査した。子宮は、胎児およびその他の内部状態を調べた後、子宮遊離面を切開し、内膜面における着床状態、胎膜、胎児および胎盤の状態を観察した。さらに、卵巣の黄体数から着床率を求めた。胚および胎児の死亡は、内膜面に着床痕跡あるいは米粒大に達しない胎盤遺残を認めたものを妊娠前期死亡、米粒大以上の胎盤遺残およびそれらの胎盤の径よりも小さい胚および胎児死亡を認めたものを妊娠中期死亡、死亡胎児を確認したものを妊娠後期死亡と分類した。それらの総数により胚および胎児の死亡率を算出した。

生存胎児；体重を測定し、性別および外表異常の有無を調べた。胎児のうち、体重の低いもの（雄では対照群の平均胎児体重の88%未満、雌では88.5%未満）を低体重児とした。胎児数の2/3はアルコール固定後、水酸化カリウム水溶液で透徹し、アリザリン赤で染色して骨格透明標本とした。残り1/3の胎児はブアン液で固定し、頭部臓器は前額断を、胸部および腹部の諸臓器は形状および関係位置を実体顕微

鏡で検査した。骨格観察では、化骨進行度の指標として、頸椎、仙椎および尾椎の化骨椎体数、化骨胸骨数、化骨中手骨数および中足骨数を算出した。中手骨および中足骨数については両肢の平均値で表示した。骨格変異については頸肋骨および腰肋骨の出現を調べた。第14肋骨については対称性で、第13肋骨の2/3以上の長さを持ち胸部の形成に関与するものを肋骨とし、この定義からはずれる第14肋骨を腰肋骨とした。

結 果：概要を次頁の表に示した。

母動物；180 mg/kg 群の妊娠ラット 22 匹が摂餌量および摂水量の有意な低下を示し、体重増加の著しい抑制を受け、4 例が重篤な症状（全身性痙攣、チアノーゼ、立毛など）を示し妊娠 10～15 日に死亡した^{申請者注1}。これらのラットには全身性循環障害を示唆する変化および肝臓の混濁が認められた。黄体数は、20 mg/kg 群で有意に多かったが、より高用量での発現がみられず、検体の影響とは考えられなかった。着床数、着床率、胚および胎児の死亡数および死亡率、胎児の生存数、体重および性比に有意差はなかった。

生存胎児；低体重児が各群に 2～8 匹（0.8～4.7%）認められたが、検体投与量との相関は認められなかった。対照群との間に有意差の認められたものは 60 および 180 mg/kg 群の頸椎椎体の化骨数減少であった。その他 20 mg/kg 群において下顎部浮腫、60 mg/kg 群において僧帽弁狭窄および 180 mg/kg 群において腰椎化が各 1 例にみられたが、検体投与量との相関は認められないか、出現率は低いものだった^{申請者注2}。

以上の結果より、ペンスルタップ原体を妊娠ラットに投与したときの母動物における無毒性量は 60 mg/kg/日、胎児における無毒性量は 180 mg/kg/日であった。また、最高用量の 180 mg/kg/日でも、催奇形作用を及ぼさないと判断された^{申請者注3}。

申請者注1：摂餌量および摂水量について

180 mg/kg 群で妊娠 19 日の摂餌量と妊娠 17 および 20 日の摂水量が高値を示したが、一過性で投与期間中にみられた低値とは逆の変化であることから毒性学的意義の低いものと判断した。

申請者注2：頸椎椎体の化骨数減少について

他の骨化進行度の指標（仙椎、尾椎、胸椎、中手骨および中足骨）に差はみられず、胎児体重への影響もみられないことから、偶発的な変化であり、検体投与との関連はない変化であると判断した。

申請者注3：母動物と胎児の無毒性量について

報告書に記載は無いが、毒性発現の有無およびその用量から判断し、申請者が追記した。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	20	60	180
1群当たり動物数		23	23	23	22 ^{a)}
死亡数 (率)		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (18.2%)
一般状態		—	検体投与に起因した異常なし		b)
平均 体重 (g)	妊娠 9 日	168	168	167	↓162
	妊娠 10 日	171	172	171	↓164
	妊娠 11 日	175	175	174	↓168
	妊娠 12 日	179	179	178	↓171
	妊娠 14 日	186	186	185	↓179
摂餌量 (g)	妊娠 8 日	14	15	14	↓↓12
	妊娠 9 日	15	15	14	↓↓11
	妊娠 10 日	14	15	14	↓12
	妊娠 11 日	15	15	15	↓12
	妊娠 19 日	16	17	17	↑18
摂水量 (mL)	妊娠 9 日	23	23	22	↓20
	妊娠 10 日	24	24	23	↓20
	妊娠 11 日	25	24	25	↓22
	妊娠 17 日	32	31	31	↑35
	妊娠 20 日	30	30	30	↑33
肉眼的病理検査		—	検体投与に起因した異常は認められなかった		c)
着床 所見	検査親動物数	23	23	23	18
	平均黄体数	11.0	↑11.9	11.2	11.5*
	平均着床数 (率)	9.7 (87.4%)	10.6 (89.4%)	10.0 (89.0%)	9.7 (84.4%) *
	妊娠前期死亡数	0.4	0.5	0.6	0.4
	妊娠中期死亡数	0.04	0.1	0.04	0
	妊娠後期死亡数	0	0	0	0
	死亡胚/胎児数合計 (率)	0.4 (4.3%)	0.7 (6.6%)	0.6 (5.8%)	0.4 (4.3%)
	平均生存胎児数				
雄	4.5	5.1	5.1	4.7	
雌	4.7	4.8	4.3	4.9	
合計	9.2	9.9	9.3	9.6	

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

— : 対照群

a) 非妊娠 1 例を除く。

b) 死亡動物に、全身性痙攣、元気消失、耳介、四肢および尾の皮膚蒼白、立毛、背湾曲、下痢、尾皮膚のチアノーゼおよび皮温低下、削瘦、後肢浮腫および後肢臍部皮膚のチアノーゼが認められた。

c) 死亡動物に、臍部の浮腫、外鼻孔周囲被毛の赤褐色湿潤、肛門周囲の被毛および皮膚の淡褐色汚染、肝臓のうっ血および混濁、肺のうっ血、胃腸管の空虚、心房および心室の拡張、胸腺の萎縮、脾臓の出血閉塞が認められた。

* : 途中死亡動物 4 例を含む。

t 検定により対照群との有意差を検定した (↑↓ : p < 0.05, ↑↑↓ : p < 0.01, ↑↑↓↓ : p < 0.001)

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	20	60	180	
胎児	生存胎児平均数	9.2	9.9	9.3	9.6	
	生存胎児平均体重 (g)	雄	4.53	4.45	4.53	4.51
		雌	4.25	4.19	4.27	4.19
	生存胎児平均胎盤重量 (mg)	雄	418	449	426	411
		雌	407	433	423	396
	性比 (雄%)	48.3	51.0	52.4	47.8	
	外表観察	検査胎児数 [腹]	212[23]	228[23]	215[23]	173[18]
		下顎部浮腫の胎児数 (率) (腹%)	0.0 (0.0)	0.9 (4.3)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		低体重胎児 ^{d)} 数 (率)	2.4 (17.4)	4.7 (21.7)	0.8 (8.7)	3.1 (27.8)
		外表異常発現数 (率)	2.4 (17.4)	4.7 (21.7)	0.8 (8.7)	3.1 (27.8)
	内臓観察	検査胎児数 [腹] (内臓観察のみ実施した胎児)	69[23]	76[23]	70[23]	58[18]
		僧帽弁の狭窄数 (率) (腹%)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.4 (4.3)	0.0 (0.0)
		内臓異常発現数 (率)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.4 (4.3)	0.0 (0.0)
	骨格観察	検査胎児数 [腹] (骨格観察を実施した胎児)	143[23]	152[23]	145[23]	115[18]
		化骨	化骨頸椎椎体数	5.0	4.7	↓4.7
椎体化骨を伴う仙骨数			4.0	4.0	4.0	4.0
尾骨化骨数			7.0	6.7	6.9	6.8
胸骨分節化骨数			5.9	5.9	5.9	5.9
中手骨化骨数			4.0	4.0	4.0	4.0
中足骨化骨数			4.94	4.94	4.98	4.95
変異		頸肋骨率 (%) (腹%)	12.0 (34.8)	5.9 (21.7)	4.4 (13.0)	3.2 (5.6)
		腰肋骨率 (%)	9.3 (34.8)	8.8 (34.8)	10.1 (47.8)	6.9 (33.3)
		12 胸椎出現率 (%)	4.1 (8.7)	0.6 (4.3)	1.2 (8.7)	1.6 (5.6)
異常	腰椎化数 (率) (腹%)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.8 (5.6)	
	異常胎児数 (率)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.8 (5.6)	

d) 雄では対照群の平均胎児体重の 88%未満、雌では 88.5%未満。

t 検定により対照群との有意差を検定した (↑↓: p < 0.05, ↑↓↓: p < 0.01, ↑↑↓↓: p < 0.001)

申請者注: 異常胎児を有する腹数について申請者がカイ二乗検定を実施したが、有意差は認められなかった。

(腹%): 腹の発現率 = [発現胎児をもつ腹数 / 検査腹数] × 100

(3) ペンスルタツプ原体のウサギにおける催奇形性試験

(資料 8-3)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年: 1984 年

検体: ペンスルタツプ原体

検体純度:

供試動物: ニュージーランドホワイト種妊娠ウサギ、1 群 17 匹、週齢は報告書に記載なし
試験開始時体重; 2975~4444 g

投与期間: 妊娠 7 日から 19 日までの 13 日間 (1984 年 4 月 17 日~1984 年 4 月 28 日)

投与方法: 検体を 0.1%カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液に懸濁し、10、25 および 60 mg/kg の割合で妊娠 7 日* から妊娠 19 日まで、毎日 1 回経口投与した。投与液量は妊娠 7 日の個体別体重をもとに 1 mL/kg とした。なお、対照群には 0.1% CMC 溶液のみを同様に投与した。

*) : 人工授精日を妊娠 0 日として起算した。

投与量設定根拠:

観察・検査項目:

母動物; 妊娠 0 日より剖検までの期間、死亡および一般症状を毎日観察した。試験開始時および妊娠 7、10、14、20、24 および 29 日に体重を測定した。妊娠 29 日の体重測定後に T-61[®] Euthanasia 液の静注により全例を安楽殺した。正中線切開により、卵巣とともに子宮を摘出し重量を測定後、内臓について肉眼的病理検査を行った。子宮は長径にそって切開し、胎児を取り出し、腹毎に生存、死亡および早期あるいは後期吸収胚数とその位置、着床部位の数および黄体数を記録した。死亡または流早産した雌については同様な方法で剖検したが、これらの胎児は内臓あるいは骨格検査を実施しなかった。

生存胎児; 各胎児に親動物の識別番号を付け、個体別に子宮位置を示すコード番号を付して、外表観察を行い、体重を測定した。各胎児は外表観察後に切開し、性別を確認後、未固定の状態の内臓を検査した。各腹における約半数の胎児から頭部を採取し、ブアン溶液に固定して切片を作製し、眼球、口蓋、鼻中隔および脳の検査を行った。

内臓検査後、骨格標本 (残り半数の胎児の頭蓋骨を含む) を作製し、奇形、化骨進行度および骨格配列を調べた。

結 果：概要を次表に示した。

母動物；25 mg/kg 群の1例は妊娠11日の投与操作による事故で死亡した。10 mg/kg 群の1例および60 mg/kg 群の2例は妊娠29日の帝王切開前に死亡した^{申請者注¹}。その他、死亡および切迫殺はなかった^{申請者注²}。検体投与の影響と考えられる食欲減退を示す例数の増加が25および60 mg/kg 群の投与期間中と投与終了後の期間に認められた。その他の臨床観察所見は偶発的なものと考えられた^{申請者注³}。

体重増加量は妊娠期間中、25 mg/kg 群において、対照群と比べ統計学的に有意に低く、60 mg/kg 群においても低値であった。投与開始から投与終了後（妊娠7～20日）に25および60 mg/kg 群にみられた体重減少は25 mg/kg 群でより強度であった。平均体重は対照群と投与群の間に統計学的に有意な差は認められなかった^{申請者注⁴}。

妊娠子宮重量は60 mg/kg 群で僅かに低かったが、その他の群は対照群と同等であった。体重から妊娠子宮重量を減じた修正母動物体重には対照群と投与群の間で差は認められなかった^{申請者注⁵}。

申請者注1：投与群で発現した死亡について

10 mg/kg 群でみられた1例の死亡は投与開始日に発現したが、それ以降、同群で死亡は認められなかった。また25 mg/kg 群において検体投与に起因した死亡はなかったことから、偶発性の死亡と判断した。60 mg/kg 群でみられた死亡については、死亡した2例中1例の動物が食欲減退、自発運動の低下および軟便を発現するとともに、投与開始時（妊娠7日）から死亡直近の測定日である妊娠14日までの間に375gの体重減少を示した（妊娠7日体重：3151g、妊娠14日体重：2776g）。これらは対照群にみられない変化であることから、検体投与の影響と判断した。

申請者注2：対照群の安楽殺について

対照群の1例が誤って妊娠28日に安楽殺された。この動物については、その他の妊娠動物と同様妊娠28日までの一般状態および体重は評価に加えた。

申請者注3：臨床観察所見について

自発運動の低下が25および60 mg/kg 群で各3例に、軟便が25および60 mg/kg 群で各1例に認められた。これらの変化は、報告書では検体投与の影響とされていないが、25 mg/kg 群では顕著な体重減少を示した動物に、60 mg/kg 群では死亡動物に認められていることから、低頻度ではあるが、これらの所見も検体投与の影響と判断した。

申請者注4：体重について

投与期間の体重推移を示す妊娠7-20日の体重増加量において、対照群と投与群の間に統計学的な差はなく、明らかな用量相関性も認められていないが、25 mg/kg 群の3例で490～528 gの顕著な体重減少がみられ、妊娠17-23日には自発運動の減少を示した。また、60 mg/kg 群の1例では妊娠7-14日に375 gの体重減少を呈し、妊娠18日に死亡した（妊娠7日の体重と妊娠18日の死亡時体重の差は545 g）。これらのことから、25および60 mg/kg 群では投与期間中の体重に検体投与の影響が認められたと判断した。一方、顕著な体重減少を示した25 mg/kg 群の上記3例の体重は投与期間終了後（妊娠20日から妊娠29日）に回復傾向を示し、投与開始日を基準にした妊娠7-29日の体重増加量に有意差を認めなかったことから、投与開始1週間前の体重値を基準とした妊娠0-29日の体重増加量でみられた25 mg/kg 群の低値は、毒性学的意義の低い変化と判断した。

申請者注5：妊娠子宮重量について

申請者が統計検定を実施したところ、対照群と投与群の間に有意な差はなく、また、各群の着床数や生存胎児数に応じた数値であることから、検体投与との関連性はないと判断した。

剖検時にみられた肉眼的病理所見は偶発的なものと考えられた^{申請者注6}。
妊娠率、黄体数および着床効率是对照群と投与群の間に差は認められなかった。

生存胎児；吸収胚の頻度および生存胎児数はいずれの群においても差がなかった。平均胎児体重は対照群と投与群の間に差を認めなかった。

胎児における外表および内臓の変異および奇形の割合は対照群と投与群の間に差は認められなかった。外表異常として、25 mg/kg 群の1例(1.0%)に膈ヘルニアおよび60 mg/kg 群の1例に水頭症(1.3%)がみられた^{申請者注7}。

内臓検査では、25 mg/kg 群の1例(1.0%)に心室中隔不完全および単一動脈からなる心臓脈管異常がみられ、同群には水頭症および異所性の腎臓が各1例(各1.0%)に認められた^{申請者注8}。

骨格異常では、60 mg/kg 群に頭蓋骨閉鎖50%未満(外表検査で水頭症と認められた胎児)および大きな頭頂骨間隔が各1例(各1.3%)にみられた^{申請者注9}。25および60 mg/kg 群の胎児に骨格変異がみられた腹数および胎児数の明らかな増加がみられたが、これらは、生物学的意義が知られていない肋骨骨端の肥厚がみられた胎児の発現の増加によるものと考えられた^{申請者注10}。

以上の結果より、ベンスルタップ原体を妊娠ウサギに投与したときの母動物および胎児における無毒性量はそれぞれ10 mg/kg/日および60 mg/kg/日と考えられた。また、最高投与量の60 mg/kg/日でも次世代に対して胚・児致死作用および催奇形作用を及ぼさないと判断された^{申請者注11}。

申請者注6：肉眼的病理所見について

いずれの所見も1あるいは2例のみの発現であることから、検体投与に関連しない変化と判断した。

申請者注7：胎児の外表異常について

これらの外表異常は自然発生することが知られている型の1例のみの偶発的変化と考えられ、検体投与の影響ではないと判断した。

申請者注8：胎児の内臓異常について

いずれの所見も自然発生することが知られている型の1例のみの発現であり、検体投与の影響ではないと考えられた。

申請者注9：胎児の骨格異常について

これらの所見はいずれも1例のみの発現であり、偶発的な変化と考えられた。

申請者注10：胎児の骨格変異について

肋骨骨端の肥厚は対照群でも発現しており、申請者が実施した統計検定においても対照群と検体投与群の間に有意な差は認められなかった。また、骨格変異の総発現頻度にも統計学的な差を認めなかったことから、検体投与の影響ではないと判断した。

申請者注11：無毒性量について

報告書中に明確な記載はないが、以上の結果より母動物および胎児における無毒性量は10および60 mg/kg/日であり、また、最高投与量の60 mg/kg/日でも次世代に対して胚・児致死作用および催奇形作用を及ぼさないと判断された。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	10	25	60
1 群当たり動物数		17	17	17	17
妊娠動物数		15	15*	16	16
死亡動物数		1**	1	1	2
流早産動物数		1	0	0	1
一般状態	食欲減退	3	4	8	7
	自発運動の低下	0	0	3	3
	軟便	0	0	1	1
体重増加量 (g)	妊娠 0~7 日	71.1	96.7	55.3	44.6
	妊娠 7~10 日	-37.2	-10.9	-26.6	-63.3
	妊娠 7~20 日	48.0	47.1	-84.5	-34.2
	妊娠 0~29 日	283.2	249.9	↓97.1	139.5
	妊娠 7~29 日	208.5	157.6	40.5	88.5
最終体重 (g)		4144.2	4013.6	3886.9	3872.6
妊娠子宮重量 (g)		457.4	400.6	463.7	398.1
修正母動物体重 (g)		3686.8	3623.1	3423.2	3474.5
肉眼的病理検査		-			
検体投与に起因する異常は認められなかった					
生存胎児の得られた母動物数		13	13	15	13
母動物	平均黄体数	12.1	9.8	11.4	11.5
	平均着床数 (率)	7.8 (67.38%)	7.0 (71.43%)	7.8 (69.30%)	6.5 (56.32%)
	平均早期吸収胚数 (率)	0.8 (9.45%)	1.1 (20.11%)	0.7 (9.81%)	0.5 (6.83%)
	平均後期吸収胚数 (率)	0.0 (0.00%)	0.1 (1.02%)	0.0 (0.00%)	0.0 (0.00%)
	平均吸収胚数 (早期+後期) (率)	0.8 (9.45%)	1.1 (21.14%)	0.7 (9.81%)	0.5 (6.83%)
	平均死亡胎児数	0.0	0.1	0.1	0.0
	平均胎児死亡率 (%)	9.45	22.46	10.55	6.83
	平均生存胎児数 (生存率)	7.0 (90.55%)	5.4 (77.54%)	7.0 (89.45%)	6.0 (93.17%)
	着床所見				

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

- : 対照群

体重については ANOVA または ANCOVA の検定により有意差がある場合、Dunnett の t 検定により対照群との有意差を検定した。ANOVA または ANCOVA の検定において有意差がない場合は検定を終了した。吸収胚数については、Jonckheere の検定を実施した。(↑ ↓ : 対照値に対して有意差あり)

申請者注 : 以下の項目について申請者が統計検定を実施したが、有意差は認められなかった。

Dunnett または Steel 検定 (両側) : 妊娠子宮重量、修正母動物体重、黄体数、着床数、早期吸収胚数、後期吸収胚数、吸収胚数(早期+後期)、死亡胎児数、生存胎児数

Steel 検定 (両側) : 着床率、早期吸収胚率、後期吸収胚率、吸収胚率(早期+後期)、胎児死亡率、生存率

修正母動物体重 = (最終体重 - 妊娠子宮重量)

妊娠率 = (妊娠動物数 / 人工授精した動物数) × 100

生存率 = (妊娠 29 日までの生存動物数 / 試験開始時の動物数) × 100

流早産率 = (妊娠 29 日の帝王切開前に分娩した動物数 / 妊娠動物数) × 100

平均着床効率は [(各腹着床数 / 各腹黄体数) × 100] の群平均

平均吸収胚率は [(各腹吸収胚数 / 各腹着床数) × 100] の群平均 (早期、後期、早期+後期に計算)

平均胎児死亡率 = [(各腹死亡および吸収胚数 / 各腹着床数) × 100] の群平均

平均胎児生存率 = [(各腹生存胎児数 / 各腹着床数) × 100] の群平均

*申請者注 : 全ての胚が吸収された母動物が 1 例みられた

**申請者注 : 妊娠 28 日に誤って安楽殺した動物

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	10	25	60		
生存胎児平均体重 (g)	雄	46.38	47.07	44.85	44.67		
	雌	44.18	44.80	42.60	43.79		
性比 (雄%)		44.85	48.32	55.52	58.81		
外表 観察 (%)	検査胎児数[腹]		91[13]	75[13]	105[15]	78[13]	
	変異	前肢短小	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	
		尾の不完全形成	1.1 (7.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	
	外表変異発現数		1.1 (7.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	
	奇形	水頭症	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	
		臍ヘルニア	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)	
	外表奇形総発現数		0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	1.3 (7.7)	
	胎児 内臓 観察 (%)	検査胎児数 [腹]		91[13]	75[13]	105[15]	78[13]
		変異	肺中葉欠損 (腹%)	8.8 (38.5)	2.7 (15.4)	8.6 (26.7)	6.4 (30.8)
			肺中葉小型化	1.1 (7.7)	1.3 (7.7)	1.9 (6.7)	0.0 (0.0)
心臓小型化			0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	1.9 (13.3)	0.0 (0.0)	
心臓壁肥厚			0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	
心房小型化			0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.9 (13.3)	0.0 (0.0)	
腎臓の侵食			0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	
腎盂の侵食			0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)	
胃小型化			0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	
左卵巣小型化		0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)		
内臓変異総発現数		9.9 (38.5)	6.7 (30.8)	12.4 (40.0)	7.7 (30.8)		
奇形		水頭症	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)	
		肺2右葉、3左葉	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)	
		肺の垂直配列	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)	
		心室中隔不完全	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)	
		単一動脈	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)	
	異所性腎臓	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)		
内臓異常発現数		0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	2.9 (20.0)	0.0 (0.0)		

生存胎児の平均体重について ANOVA または ANCOVA の検定により有意差がある場合、Dunnnett の t 検定により対照群との有意差を検定した。ANOVA または ANCOVA の検定において有意差がない場合は検定を終了した。

申請者注：以下の項目について申請者が統計検定を実施したが、有意差は認められなかった。

Steel 検定 (両側)：性比、外表観察 (胎児の発現率)、内臓観察 (胎児の発現率)

カイ二乗検定：外表観察 (発現胎児をもつ腹数)、内臓観察 (発現胎児をもつ腹数)

(%)：胎児の発現率 = [所見が発現した胎児数 / 観察胎児数] × 100

(腹%)：腹の発現率 = [発現胎児をもつ腹数 / 検査腹数] × 100

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	10	25	60	
胎児	骨格観察 (%)	検査胎児数[腹]	91 [13]	75[13]	105[15]	78[13]
		変異				
		頭蓋骨閉鎖 75%未満 (腹%)	1.1 (7.7)	4.0 (15.4)	3.8 (20.0)	3.8 (15.4)
		頭頂間骨不完全骨化	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)
		頭頂部孔	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	1.3 (7.7)
		舌骨不完全骨化	1.1 (7.7)	1.3 (7.7)	1.0 (6.7)	5.1 (23.1)
		舌骨非癒合	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)
		舌骨翼湾曲	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	1.0 (6.7)	2.6 (15.4)
		肋骨骨化 12 組未満	1.1 (7.7)	0.0 (0.0)	1.9 (13.3)	0.0 (0.0)
		肋骨不完全骨化	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)
		肋骨骨端肥厚	3.3 (15.4)	4.0 (23.1)	9.5 (33.3)	14.1 (46.2)
		肋骨癒合/分岐	2.2 (15.4)	4.0 (15.4)	1.9 (13.3)	0.0 (0.0)
		肋骨不整	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		肋骨小型化	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		隆起を伴う肋骨	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)
		遠位近接肋骨	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)
		胸骨分節二分症	2.2 (7.7)	0.0 (0.0)	2.9 (20.0)	2.6 (7.7)
		胸骨分節癒合	1.1 (7.7)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)
		胸骨分節小型化	0.0 (0.0)	2.7 (7.7)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)
		胸骨分節格子縞	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)
		胸骨分節分岐	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)
		胸椎椎体および弓不整	2.2 (15.4)	1.3 (7.7)	3.8 (20.0)	1.3 (7.7)
		仙椎不整	1.1 (7.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		尾骨不整	1.1 (7.7)	0.0 (0.0)	1.9 (13.3)	0.0 (0.0)
		尾骨 14 未満	1.1 (7.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		腰椎椎体および弓不整*	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (6.7)	0.0 (0.0)
		胸椎椎体不完全骨化*	0.0 (0.0)	2.7 (7.7)	1.9 (13.3)	1.3 (7.7)
		胸椎椎体非癒合*	0.0 (0.0)	2.7 (15.4)	1.0 (6.7)	2.6
		腰椎椎体形態異常*	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)
		骨格変異総発現数*	14.3 (53.8)	24.0 (69.2)	28.6 (73.3)	33.3 (84.6)
		奇形				
		頭蓋骨閉鎖 50%未満*	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)
		大きな頭頂骨間隔*	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)
骨格奇形総発現数*	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (7.7)		

申請者注：以下の項目について申請者が統計検定を実施したが、有意差は認められなかった。

Steel 検定 (両側)：骨格観察 (胎児の発現率)

カイ二乗検定：骨格観察 (発現胎児をもつ腹数)

(%)：胎児の発現率 = [所見が発現した胎児数 / 観察胎児数] × 100

(腹%)：腹の発現率 = [発現胎児をもつ腹数 / 検査腹数] × 100

*：60 mg/kg/日群の個別別表がないため統計検定できなかった。また、当該群の腹%は胎児 1 例のみにみられた場合は 1 腹の母動物に発現したものと算出したが、複数の胎児に観察された場合 (胸椎椎体非癒合) は発現腹数が不明であるため算出できなかった。

9. 変異原性

(1) ベンسلタップ原体の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 9-1)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

報告書作成年：1983年

検体：ベンسلタップ原体

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は2連制とし、プレート法で試験を1回行った。

[用量設定根拠]

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、全ての濃度で、いずれの菌株においても溶媒対照群に比べて復帰変異コロニー数を増加させることはなかった。なお、本試験の S9 mix 存在下では 1000~5000 µg/プレートで、S9 mix 非存在下では 500~5000 µg/プレートで生育阻害が認められた。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、*N*-エチル-*N*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレンおよび 2-アミノアントラセンでは明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、ベンセルタップ原体は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断された。

表中の数値は2連の平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)	0	—	106	8	13	30	7	19	
ベンスルタツプ 原体	1	—	101	9	13	25	6	12	
	5	—	110	8	15	19	11	17	
	10	—	108	8	12	24	3	13	
	50	—	110	10	12	32	11	19	
	100	—	76	5	21	24	14	14	
	500	—	98*	6*	15	39*	6*	19*	
	1000	—	*	**	22*	29*	*	11*	
5000	—	**	**	**	**	**	**		
溶媒対照 (DMSO)	0	+	107	7	13	37	8	26	
ベンスルタツプ 原体	1	+	103	7	16	28	11	27	
	5	+	94	10	10	32	10	35	
	10	+	93	7	16	33	11	34	
	50	+	79	12	15	41	8	26	
	100	+	77	14	12	32	8	30	
	500	+	100	6	19	35	11	32	
	1000	+	95	7*	21	33	9*	27*	
5000	+	**	**	*	**	*	**		
陽性 対照	2-AA	0.5	—	110	— ^{a)}	— ^{a)}	25	— ^{a)}	15
		2	—	— ^{a)}	12	— ^{a)}	— ^{a)}	10	— ^{a)}
		40	—	— ^{a)}	— ^{a)}	17	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}
	2-AA	0.5	+	235	— ^{a)}	— ^{a)}	122	— ^{a)}	133
		2	+	— ^{a)}	210	— ^{a)}	— ^{a)}	88	— ^{a)}
		40	+	— ^{a)}	— ^{a)}	>1000	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}
	AF-2	0.01	—	307	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}
		0.04	—	— ^{a)}	— ^{a)}	223	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}
		0.1	—	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	399	— ^{a)}	— ^{a)}
	ENNG	10	—	— ^{a)}	922	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}
	9-AA	80	—	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	>3000	— ^{a)}
	2-NF	2	—	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	309

a) : 試験を行っていない。

* : 菌株の生育阻止を認めた (やや生育を認めた)。

** : 菌株の生育阻止を認めた (まったく生育を認めなかった)。

DMSO : ジメチルスルホキシド

2-AA : 2-アミノアントラセン

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

ENNG : N-エチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-NF : 2-ニトロフルオレン

(2) ベンスルタップ原体のチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO) を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 9-2)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年: 1984 年

検体: ベンスルタップ原体

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO) を用い、代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下で検体を処理して、6-チオグアニン (6-TG) 耐性コロニーの増殖を指標とするヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 遺伝子座の突然変異誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、S9 mix 存在下および非存在下ともに細胞を検体で 5 時間処理した。処理 1 日後に細胞を播種し、初期毒性による細胞生存率を調べた。また、処理 8 日後に、培養した細胞 200 個当たりのコロニー形成数と、6-TG 添加による突然変異率を調べた。試験は、検体処理群を 2 連制、陰性対照群、溶媒対照群および陽性対照群を 3 連制とし、1 回実施した。

[用量設定根拠];

試験結果: 結果を次頁の表に示した。

S9 mix 存在下および非存在下ともに、60 および 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では、処理 1 日後に細胞生存率が溶媒対照群の 10% 以下となり強い細胞毒性を示したため、40、30、20 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度について 6-TG 耐性の変異コロニー数を指標とする突然変異率を調べた。その結果、検体は S9 mix 存在下および非存在下ともに、溶媒対照群に比べて有意な突然変異率の増加を示さなかった。

一方、陽性対照であるメタンサルホン酸エチルおよび 3-メチルコラントレンは、明らかな突然変異数の増加を示した。

以上の結果より、ベンスルタップ原体は代謝活性化の有無に関わらず、本試験条件下において突然変異性を有しないと判断された。

検体処理群：2連の平均値、溶媒/無処理/陽性対照群：3連の平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	コロニー 形成数/200細胞	突然変異率 ($\times 10^{-6}$)
溶媒対照 (DMSO)	0	—	100.0	178.2	6.5
無処理対照 (Ham's F-12 培地)	0	—	/	178.7	2.4
ベンスルタップ原体	10	—	94.4	181.7	1.1
	20	—	80.1	188.8	3.7
	30	—	34.8	193.9	2.6
	40	—	10.6	153.3	16.2
	50	—	9.0	— ^{b)}	— ^{b)}
	60	—	1.5	— ^{b)}	— ^{b)}
陽性対照 (EMS)	300	—	79.7	138.0	166.4*
溶媒対照 (DMSO)	0	+	100.0	194.8	3.4
無処理対照 (Ham's F-12 培地)	0	+	/	169.4	6.0
ベンスルタップ原体	10	+	23.2	156.7	0.0
	20	+	17.1	181.7	8.1
	30	+	13.8	176.8	0.0
	40	+	11.1	141.7	0.7
	50	+	4.0	— ^{b)}	— ^{b)}
	60	+	0.4	— ^{b)}	— ^{b)}
陽性対照 (3MC)	6.0	+	103.5	169.7	103.7*

a) : 溶媒対照群の細胞生存率を 100%とした。

b) : 試験を行っていない。

* : Student's t-検定、 $p < 0.01$

DSMO : ジメチルスホキシド

EMS : メタンスルホン酸エチル

3MC : 3-メチルコラントレン

(3) ベンスルタツプ原体のマウスを用いた小核試験

(資料 9-3)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1980年

検体：ベンスルタツプ原体

検体純度：

供試動物：(C3H × SWV) F1 雄マウス、9週齢、体重 29.0～35.5 g、1群5匹

試験方法：検体を2%アラビアゴム水溶液に懸濁し、20あるいは200 mg/kgの割合で1回、または10あるいは100 mg/kgを24時間々隔で連続5回、強制経口投与した。陽性対照群には5-フルオロウラシル (5-FU) 25 mg/kgを、陰性対照群には蒸留水 10 mL/kgを5回、同様に連続投与した。

1回投与の動物は投与後30時間に、5回連続投与した動物は最終投与後6時間に頸椎脱臼により屠殺し、ギムザ染色 (G-標本) あるいはニューメチレンブルー染色 (N-標本) による2種類の骨髓塗抹標本を作製した。G-標本では各動物2000個の赤血球 (多染性赤血球および正染性赤血球) を観察し小核を有する赤血球 (小核赤血球) の出現頻度を求め、N-標本では各動物1000個の赤血球について網赤血球の出現頻度を求めた。

[投与量設定根拠]；

結果：結果を次頁の表に示した。

検体を1回または5回投与したいずれの群においても、陰性対照群と比較して、小核赤血球の出現頻度に有意差は認められなかった。また、網赤血球の出現頻度についても、全ての投与群において陰性対照群と比較して差はなく、骨髓毒性は認められなかった。

一方、陽性対照の5-FU投与群では小核赤血球の有意な増加が認められた。

以上の結果から、ベンスルタツプ原体は本試験条件下において、マウス骨髓細胞に対して小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断された。

標本作製時間	薬物	投与量 × 投与回数	観察 動物数	網赤血球 出現頻度 (%) (最小/最大)	小核赤血球 出現頻度 (%) (最小/最大)
5回投与 6時間後	陰性対照 (蒸留水)	10 mL/kg × 5	5	64.3 (62.6/65.8)	0.15 (0.05/0.30)
	ベンスルタップ原体	10 mg/kg × 5	5	66.2 (61.6/69.0)	0.15 (0.05/0.20)
		100 mg/kg × 5	5	67.3 (58.6/75.3)	0.20 (0.10/0.30)
	陽性対照 (5-FU)	25 mg/kg × 5	5	57.2 (50.6/68.8)	1.33* (0.80/1.70)
1回投与 30時間後	ベンスルタップ原体	20 mg/kg × 1	5	67.6 (65.3/69.9)	0.13 (0.05/0.20)
		200 mg/kg × 1	5	64.3 (54.3/71.1)	0.15 (0.10/0.20)

Kastenbaum-Bauman 検定 * : $p \leq 0.01$

5-FU : 5-フルオロウラシル

(4) ペンスルタップ原体のラット肝細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験
(資料 9-4)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年: 1984 年

検 体: ペンスルタップ原体

検体純度:

供試動物: SD 系雄ラット

試験方法: ラット初代培養肝細胞を用いて、不定期 DNA 合成を測定することにより、DNA 損傷性を検定した。ラットの肝臓から肝細胞を調製し、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した各濃度の検体および ^3H -チミジンを含む培地で終夜培養した。暴露期間終了後に細胞を洗浄、固定、乾燥させ、オートラジオグラム用のスライドを作成した。核粒子数から平均の細胞質粒子数を差し引いて、細胞当たりの平均正味核粒子数を算出した。各濃度について、細胞 50 個/スライドを 2 スライド (合計 100 個) 観察した。

溶媒対照、無処理対照および陽性対照についても同様に試験した。

検体処理群の平均正味核粒子数が、溶媒対照値+3SD (標準偏差) を超えて増加し、かつ、連続した 2 濃度で平均正味核粒子数が有意な増加を示した場合、陽性と判定した。

[用量設定根拠]

結 果: 結果を次表に示した。

溶媒対照群と比較して、いずれの検体処理群においても平均正味核粒子数の有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照である 2-アセチルアミノフルオレンでは、平均正味核粒子数の有意な増加が認められた。

以上の結果から、ペンスルタップ原体は本試験条件下において、ラット初代培養肝細胞に不定期 DNA 合成を誘発せず、DNA 修復性を有しないと判断した。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	細胞 生存率 ^{a)} (%)	相対 細胞生存率 ^{b)} (%)	評価 細胞数	平均正味 核粒子数 \pm SD
溶媒対照 (DMSO)	0	91	100.0	100	0.6 \pm 1.3
無処理対照 (WME)	0	91	NA	100	2.1 \pm 2.4
ベンスルタップ 原体	10	92	101.1	100	0.8 \pm 1.9
	15	88	96.7	100	1.2 \pm 1.8
	20	88	96.7	100	1.0 \pm 1.4
	40	63	69.2	50 ^{c)}	1.6 \pm 2.3
	60	35	38.5	100	1.0 \pm 2.0
陽性対照 (2AAF)	0.5	93	102.2	100	20.7 \pm 8.1*

a) : 生存細胞数 / 全細胞数 \times 100

b) : 処理群の細胞生存率 / 溶媒対照群の細胞生存率 \times 100

c) : 1 スライドのみ観察

* : 溶媒対照群の平均+3SD を超える有意な増加が認められた。

SD : 標準偏差

DMSO : ジメチルスルホキシド

WME : Williams' Medium E 培地

NA : 該当なし

2AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

(5) ペンスルタツプ原体のチャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いた *in vitro* 姉妹染色分体交換試験

(資料 9-5)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年: 1984 年

検 体: ペンスルタツプ原体

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-K1) を用い、代謝活性化系 (S9 mix) の存在下および非存在下における姉妹染色分体交換 (SCE) の誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、細胞を S9 mix 存在下および非存在下ともに検体で 2 時間処理した。培地を交換後、5-プロモデオキシウリジンを加えて約 24 時間培養し、染色体標本を作製した。観察は 1 濃度あたり 50 個の分裂中期像について行い、試験を 1 回実施した。

[用量設定根拠]

結 果: 結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの濃度においても、溶媒対照群と比較して、染色体あたりの SCE の出現頻度において統計学的に有意な増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いたメタンサルホン酸エチルおよびシクロホスファミドでは、染色体あたりの SCE の出現頻度に有意な増加が認められた。

以上の結果から、ペンスルタツプ原体は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下において姉妹染色分体交換の誘発性を有しないと判断された。

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	観察 細胞数	SCE 総数	細胞 あたりの SCE 数	観察染色 体数	染色体 あたりの SCE 数
無処理対照 (Ham's F-12 培地)	0	-	50	307	6.14	993	0.31
溶媒対照 (DMSO)	0	-	50	383	7.66	988	0.39
ベンスルタップ 原体	0.25	-	50	356	7.12	998	0.36
	0.85	-	50	415	8.30	997	0.42
	2.5	-	50	402	8.04	1004	0.40
	8.5	-	50	378	7.56	992	0.38
	25	-	50	396	7.92	992	0.40
陽性対照 (EMS)	400	-	50	1507	30.14*	987	1.53*
無処理対照 (Ham's F-12 培地)	0	+	50	387	7.74	989	0.39
溶媒対照 (DMSO)	0	+	50	414	8.28	1000	0.41
ベンスルタップ 原体	0.25	+	50	371	7.42	990	0.38
	0.85	+	50	406	8.12	1003	0.41
	2.5	+	50	393	7.86	987	0.40
	8.5	+	50	422	8.44	1005	0.42
	25	+	50	480	9.60	998	0.48
陽性対照 (CP)	1.4	+	50	971	19.42*	999	0.97*

DMSO : ジメチルスルホキシド

EMS : メタンサルホン酸エチル

CP : シクロホスファミド

* : ANOVA (片側)、 $p < 0.01$

(6) ペンスルタップ原体の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 9-1)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

報告書作成年：1983 年

検体：ペンスルタップ原体

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換修復機構欠損株 (M-45) および野生株 (H-17) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

両菌株を寒天培地上にストリークし、検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して溶液 0.02 mL を直径 10 mm のろ紙に添加して、ストリークの開始点に置いた。一晚培養後、菌の生育阻止帯の長さを測定した。試験は 1 連制で 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を下表に示した。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	S9 mix の有無	阻止帯 (mm)		差 (mm)
			M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)	0 ^{a)}	—	0	0	0
ペンスルタップ 原体	50	—	0	0	0
	100	—	0	0	0
	200	—	0	0	0
	500	—	0	0	0
	1000	—	0	0	0
	2000	—	0	0	0
	5000	—	0	0	0
	10000	—	0	0	0
陰性対照 (カナマイシン)	10 $\mu\text{g}/$ ディスク	—	6	4.5	1.5
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.1 $\mu\text{g}/$ ディスク	—	7	<1	>6*

a) 20 $\mu\text{L}/$ ディスク

* 申請者注：報告書に記載はないが、申請者が算出して記載した。

検体は、いずれの濃度においても H-17 株と M-45 株に全く生育阻止帯を認めなかった。一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照として用いたカナマイシンでは両株に同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ベンスルタップ原体は本試験条件下において DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

10. 生体機能への影響に関する試験
ペンスルタップ原体における薬理試験

(資料 10)

試験機関：臨床医科学研究所

報告書作成年：1984年

検体：ペンスルタップ原体

検体純度：

マウスの中樞神経系に対する作用

マウスにおける一般状態

供試動物：ICR系雄マウス、体重20～27g、1群9匹

投与方法：検体を0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム塩(CMC-Na)溶液に懸濁して0、30、100および300mg/kgの用量で強制経口投与し、投与前および投与30、60、120分後にIrwinの多次元観察法に準じて一般状態を観察した。

結果：30mg/kg群では、60および120分後にやや過敏症状が見られた以外ほとんど影響は見られなかった。100mg/kg群では、投与後20～30分より9例中6例に嘔吐様症状、振戦、攣縮、痙攣に伴う歩行異常および四肢の緊張低下が認められ、この6例中1例が40分に死亡した。300mg/kg群では、投与後15～30分より全例に嘔吐様症状、振戦、攣縮、間代性痙攣およびそれに伴う歩行異常、四肢の麻痺などが認められ、9例中8例が20～40分に死亡し、この際、強直性痙攣および流涎が認められた。

マウスにおける睡眠延長作用

供試動物：ICR系雄マウス、体重20～27g、1群10～11匹

投与方法：検体を0.5%CMC溶液に懸濁して0、10、30および100mg/kgの用量で強制経口投与し、投与後1時間にヘキソバルビタール75mg/kgを腹腔内投与して正向反射が消失してから回復するまでの時間を測定した。陽性対照としてクロルプロマジン10mg/kgを投与し、同様に測定した。

結果：全投与群とも対照群と比較してヘキソバルビタール投与による睡眠時間に差はなかった。一方、クロルプロマジンでは有意な睡眠延長が認められた。

マウスにおける筋弛緩作用

供試動物：ICR系雄マウス、体重20～27g、1群10匹

投与方法：ロータロッド法

マウスを1分間に14回転する直径3cmの回転棒上に乗せ、1分間以上落下

しなかった動物を選抜し、検体を 0.5% CMC-Na 溶液に懸濁して 0、10、30 および 100 mg/kg の用量で強制経口投与し、投与後 30、60、120 分に、上記条件の回転棒に再び 1 分間乗せ、落下するか否かを調べた。

斜板法

マウスを 35 度に傾斜したスリガラス板上に乗せ、10 秒以上落下しなかった動物を選抜し、ロータロッド法と同じ用量の検体を経口投与し、投与後 30、60、120 分にスリガラス板上に再度 10 秒間乗せ、落下するか否かを調べた。いずれも陽性対照として中枢性の筋弛緩作用を有するクロルプロマジン 10 mg/kg を投与し、同様に測定した。

結 果：ロータロッド法および斜板法

100 mg/kg 群で痙攣による落下が 1~2 例見られたのみで、筋弛緩作用は認められなかった。一方、陽性対照であるクロルプロマジンでは明らかな落下作用が認められた。

ネコの自律神経系に対する作用

ネコ瞬膜におよぼす作用

供試動物：ネコ、体重 1.5~4.0 kg

投与方法：ウレタン約 1.2 g/kg および α -クロラロース 80 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下でネコを背位に固定し、頸部を切開して上頸神経節前線維および節後線維を剥離後、節前線維を切断し、節前線維の末梢側に刺激電極を設置した。また、舌動脈にもカニューレを挿入し、デジタルスティミュレーターによる上頸神経節前線維刺激およびノルアドレナリン (NE: 10、40 および 80 μ g/kg) の舌動脈投与により惹起される瞬膜の収縮を、FD ピックアップを介してポリグラフに記録した。また、実験によっては、上頸神経節後線維刺激により惹起される瞬膜の収縮も記録した。検体は 0.5% CMC 生理食塩液に懸濁し、200 mg/kg の用量で腹腔内投与した。

また、節遮断薬であるヘキサメトニウム 2 mg/kg を静脈内投与し、瞬膜収縮におよぼす影響を記録した。

結 果：検体 200 mg/kg の腹腔内投与により、投与後 30 分~1 時間にかけて、上頸神経節の節前線維刺激、節後線維刺激および NE10 μ g/kg により惹起されるすべての瞬膜の収縮反応がほぼ同時に抑制された。この収縮抑制は投与後 2 時間でも回復しなかった。節前および節後神経刺激による収縮に対する抑制程度は同じであった。また、NE による収縮に対する抑制は、NE 量を 40 μ g/kg にすると約 50% となり、80 μ g/kg では検体投与前と同程度まで回復した。ヘキサメトニウム 2 mg/kg 静脈内投与により、節前線維刺激による瞬膜の収縮はほぼ完全に抑制された。

モルモットおよびウサギの消化器系に対する作用

モルモットの摘出回腸に対する作用

供試動物：Hartley系雄モルモット、体重 365~742 g

方 法：モルモットを放血致死後直ちに回腸を摘出し、約 3 cm の長さに切断した回腸片を、空気を通気した Tyrode 液槽に懸垂した。検体は 0.01% Tween 80 を用いて栄養液に懸濁し 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 3×10^{-5} 、 1×10^{-4} g/mL の濃度を用いた。腸管の運動はヘーベルを介して煤煙紙上に記録し、検体の単独の作用と共に ACh (1×10^{-7} g/mL) およびヒスタミン (1×10^{-6} g/mL) を栄養液に溶解し、収縮におよぼす影響についても検討した。

結 果：検体は 1×10^{-4} g/mL までの濃度で摘出モルモット腸管に全く影響を与えなかった。

ACh 1×10^{-7} g/mL およびヒスタミン 1×10^{-6} g/mL による腸管の収縮に対し、検体は 1×10^{-5} g/mL 以下では全く影響を与えず、 1×10^{-4} g/mL でもその懸濁化剤として用いた Tween 80 と比較して、いずれも最大 10% 程度のわずかな収縮抑制を示したに過ぎなかった。

ウサギの摘出回腸の自動運動に対する作用

供試動物：日本白色種雄ウサギ、体重 1.68~3.86 kg

方 法：ウサギを放血致死後直ちに回腸を摘出し、約 3 cm の長さに切断した回腸片を、空気を通気した Tyrode 液槽に懸垂した。検体は 0.01% Tween 80 を用いて栄養液に懸濁し、 1×10^{-5} 、 3×10^{-5} 、 1×10^{-4} g/mL の濃度を用いた。腸管の運動はヘーベルを介して煤煙紙上に記録し、腸管の自動運動におよぼす影響について検討した。

結 果：検体は 1×10^{-4} g/mL でも腸管の自動運動にほとんど影響を与えなかった。検体の懸濁化剤として用いた Tween 80 も、適用濃度の 0.01% で腸管の自動運動にほとんど影響を与えなかった。

イヌの呼吸、循環器系に対する作用

イヌの呼吸、血圧、心電図、心拍数および血流量に対する作用

供試動物：イヌ、体重 7.0~14.0 kg

投与方法：ペントバルビタール 30 mg/kg の静脈内投与による麻酔下でイヌを背位に固定し、呼吸は気管カニューレに装着したサーミスタ式ピックアップにより、心電図は四肢第 II 誘導法により、血圧は右大腿動脈カニューレに接続した圧力トランスジューサーにより、心拍数は心電図の R 波または血圧の脈波を瞬時タコ

メーターを用いて、血流量は左大腿動脈に設置したプローブを介して電磁血流量計で測定し、いずれもポリグラフ上に記録した。検体を 0.5% CMC-Na 生理食塩液に懸濁して 200~600 mg/kg の用量で腹腔内投与した。

さらに、アセチルコリン (ACh) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ による降圧作用および NE 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ による昇圧作用におよぼす影響についても調べた。

結 果：検体 200~400 mg/kg 腹腔内投与では、呼吸、循環系にほとんど変化がみられなかった。600 mg/kg では、ほとんどの例が投与後 30 分から 3.5 時間の間に死亡したが、4 時間以上生存する例もあった。死亡例では呼吸が浅くなるのとほぼ同時に血圧および脈圧が上昇し始め、その後 1 時間以内に呼吸停止した。血圧、脈圧ともに呼吸停止数分前に最高値 (いずれも投与前と比較して血圧 25 mmHg 以上、脈圧 20%以上) を示し、呼吸停止と共に急速に低下した。血流量も血圧と同様な経過をたどった。呼吸の強さに余り変化が見られないうちに呼吸停止する例も見られた。また、心電図にはあまり変化は認められなかったが、心拍数は時間と共に減少する傾向にあった。ACh および NE による血圧反応は、いずれもやや抑制される傾向にあった。

ウサギおよびラットの骨格筋に対する作用

ウサギ腓骨神経-前脛骨筋標本に対する作用

供試動物：日本白色種雄ウサギ、体重 1.68~3.86 kg

方 法：ウサギをウレタン約 1.5 g/kg の腹腔内投与により麻酔し、右側腓骨神経-前脛骨筋標本作製した。腓骨神経を剥離切断後末梢側に刺激電極を設置し、別に前脛骨筋にも針電極を刺入した。2 台のデジタルスティミュレーターを用い、神経および筋に電気刺激を交互に加え、これにより誘発された前脛骨筋の単収縮を、FD ピックアップを介してポリグラフ上に記録した。検体を 0.5% CMC 生理食塩液に懸濁し、400 mg/kg の用量で腹腔内投与した。また、検体に対するネオスチグミン 0.5 mg/kg の影響も調べた。

結 果：検体 400 mg/kg 腹腔内投与により、神経刺激 (間接刺激) および筋肉刺激 (直接刺激) による収縮は共に抑制された。この抑制は呼吸抑制とほぼ同時に出現し、1 時間以上持続した。すなわち、早い例では投与後 30 分頃より、多くの例では投与後 1 時間位から徐々に抑制が始まり、その後漸次増強され、投与後 2 時間には収縮はわずかしか認められなかった。また、神経刺激による収縮が完全に抑制された後も、筋肉刺激による収縮はわずかではあるが観察された。これらの抑制作用はネオスチグミンの静脈内投与により一時的に拮抗された。

ラット摘出横隔神経—横隔膜標本に対する作用

供試動物：SD系雄ラット、体重 271~366 g

方 法：ラットを放血致死後直ちに横隔膜を横隔神経と共に摘出し、95%酸素、5%二酸化炭素の混合ガスを通気した Krebs-Hensleit 液槽に懸垂した。液槽外に設置した刺激電極に横隔神経をのせ、別に液槽内の横隔膜にも刺激電極を設置した。2 台のデジタルスティミュレーターを用い、神経および横隔膜に電気刺激を交互に加え、これにより誘発された横隔膜筋の単収縮を、FD ピックアップを介してポリグラフに記録した。検体は Tween 80 を用いて栄養液に懸濁し、 1×10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} g/mL の懸垂液を調製して、その作用を調べた。

結 果：検体は 1×10^{-6} および 10^{-4} g/mL の濃度で、神経刺激による横隔膜の収縮をわずかに抑制した^{申請者注}。この抑制は、洗浄により回復した。なお、懸濁剤として用いた Tween 80 は 10^{-5} g/mL で神経および筋肉刺激による横隔膜の収縮にほとんど影響を与えなかった。

ウサギの末梢血管系に対する作用

ウサギ耳介灌流におよぼす作用

供試動物：日本白色種雄ウサギ、体重 1.68~3.86 kg

方 法：Krawkow-Pissemiski 法に従って実験を行った。ウサギを放血致死後、耳介を起始部から切断して中心動脈にカニューレを挿入した。空気を通気した Locke-Ringer 液を灌流し、耳介静脈より流出する灌流液の滴下数が 30~40 滴/分となるよう灌流圧を調整して実験を開始した。検体は Tween 80 を用いて栄養液に懸濁して 1×10^{-4} g/mL の濃度で置換法により適用した。検体の単独の作用と共に NE (1×10^{-7} g/mL、0.2 mL) を動脈カニューレにより注入し、血管収縮作用におよぼす影響についても検討した。

結 果：検体は 1×10^{-4} g/mL までの濃度で耳介血管の灌流量に対して何ら影響を及ぼさなかった。

しかし、 1×10^{-7} g/mL の NE 0.2 mL 注入により惹起される血管収縮は、 1×10^{-4} g/mL の検体灌流により 50%以上抑制された。検体の懸濁化剤として用いた 0.01% Tween 80 の灌流により、上記条件による NE の血管収縮はむしろ増強された。

申請者注：検体の 1×10^{-5} g/mL の濃度における横隔膜収縮に対する作用について

報告書では検体の 1×10^{-5} g/mL の横隔膜収縮に対する作用について明確に記載されていないが、申請者が報告書中の収縮反応の典型例の図を確認したところ、検体 1×10^{-5} g/mL の適用は横隔膜刺激および神経刺激のいずれの収縮反応にも作用していないと考えられた。

以上の試験結果より、ベンスルタップ原体は哺乳動物に対して中枢興奮作用、神経筋接合部遮断作用、呼吸抑制、昇圧作用、脈圧および血流量の増加作用を示した。一方、瞬膜に及ぼす影響では、神経節における遮断作用はほとんどないと考えられ、交感神経終末におけるアドレナリン遮断作用を有することが示唆された。この遮断作用は、ノルアドレナリンの量を増加させることにより収縮がほぼ元のレベルまで回復することから、ノルアドレナリンとの競合拮抗によるものと考えられた。また、耳介灌流でのノルアドレナリンによる血管収縮に対する抑制作用が観察されたことも、類似の作用に由来するものと考えられた。平滑筋に対する作用では、摘出回腸に対して全く影響を与えず、摘出横隔膜に対してもほとんど影響を与えなかった。

ベンスルタップ原体の「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系	一般状態 (Irwin 法)	マウス	経口 (0.5% CMC) 0 (溶媒)、 30、100、 300	雄 9	100	30	100 mg/kg 以上で嘔吐 様症状、振戦、痙攣に 伴う歩行異常および四 肢の緊張低下、300 mg/kg では上記に加え 強直性痙攣および流涎 が認められた。100 mg/kg で 1/9 例、300 mg/kg で 8/9 例が死亡 した。
	睡眠延長 作用 (ヘキソ バルビタ ール睡眠)	マウス	経口 (0.5% CMC) 0 (溶媒)、 10、30、 100	雄 10~11	> 100	100	検体投与による睡眠延 長作用は認められなか った。
	筋弛緩 作用 (ロー タロッド 法および 斜板法)	マウス	経口 (0.5% CMC) 0 (溶媒)、 10、30、 100	雄 10	> 100	100	検体投与による筋弛緩 作用は認められなかっ た。
自律神経系	瞬膜に及 ぼす作用	ネコ (麻醉 下)	腹腔内 (0.5% CMC 生理 食塩液) 200	雌雄 匹数 不明	200	< 200	200 mg/kg でアドレナ リン遮断作用あり。神 経節遮断作用なし。
消化器系	摘出回腸	モルモ ット	<i>in vitro</i> (0.01% Tween 80) 1 × 10 ⁻⁶ 、 1 × 10 ⁻⁵ 、 3 × 10 ⁻⁵ 、 1 × 10 ⁻⁴ g/mL	雄	> 1 × 10 ⁻⁴ g/mL	1 × 10 ⁻⁴ g/mL	検体投与による影響は 認められなかった。ACh およびヒスタミンによ る腸管の収縮に対し、 検体は 1 × 10 ⁻⁵ g/mL 以下では全く影響を与 えず、1 × 10 ⁻⁴ g/mL でもわずかな収縮抑制 を示したに過ぎなかつ た。
		ウサギ	<i>in vitro</i> (0.01% Tween 80) 1 × 10 ⁻⁵ 、 3 × 10 ⁻⁵ 、 1 × 10 ⁻⁴ g/mL	雄	> 1 × 10 ⁻⁴ g/mL	1 × 10 ⁻⁴ g/mL	検体投与による影響は 認められなかった。

ベンスルタップ原体の「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」総括表（続き）

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作 用量 (mg/kg)	結果の概要	
呼吸・ 循環器系		イヌ (麻醉下)	腹腔内 (0.5% CMC 生理食塩液)	200~ 400, 600	雌雄 匹数 不明	600	400	600 mg/kg で呼吸抑制、 血圧上昇、脈圧および 血流量が増加し、ほと んどの例が投与後 30 分~3.5 時間に死亡し た。 ACh による降圧、NE に よる昇圧共に抑制。
骨格 筋	腓骨神経- 前脛骨筋	ウサギ (麻醉下)	腹腔内 (0.5% CMC 生理食塩液)	400	雄 匹数 不明	400	< 400	400 mg/kg で神経筋接 合部遮断作用あり。
	摘出横隔神 経-横隔膜	ラット	<i>in vitro</i> (10 ⁻⁵ g/mL Tween 80)	1×10 ⁻⁴ 、 1×10 ⁻⁵ 、 1×10 ⁻⁴ g/mL	雄	> 1 × 10 ⁻⁴ g/mL	1 × 10 ⁻⁴ g/mL	1 × 10 ⁻⁴ g/mL でほとん ど作用なし。
末梢 血管	耳介灌流 (Krawkow- Pissemski 法)	ウサギ	<i>in vitro</i> 耳介灌流 (0.01% Tween 80)	1 × 10 ⁻⁴ g/mL	雄	1 × 10 ⁻⁴ g/mL	< 1 × 10 ⁻⁴ g/mL	1 × 10 ⁻⁴ g/mL までの濃 度で耳介血管の灌流量 に対して影響なし。 1 × 10 ⁻⁴ g/mL で NE に よる血管収縮を 50%以 上抑制

1.1. 解毒法および治療

ベンスルタップ原体のL-システインによる解毒作用

(資料 10)

試験機関：臨床医科学研究所

報告書作成年：1984年

検 体：ベンスルタップ原体

検体純度：

マウスのL-システインによる解毒作用

供試動物：ICR系雄マウス、体重20～27g、1群5または10匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し、320、480、720および1080mg/kgの用量で経口投与した直後に、L-システイン100mg/kgを腹腔内投与し、投与後3時間まで症状を観察し、24時間までの死亡率を求めた。対照群には検体のみを与えた。

結 果：結果の概要を次表に示した。

投与群	検体 (mg/kg)	L-システイン (mg/kg)	動物数	嘔吐の認められた動物 (%)	振戦あるいは間代性痙攣が認められた動物 (%)	死亡率 (%)	LD ₅₀ (mg/kg)
対照群	320	-	5	40	0	0	727 (617～852)*
	480	-	10	70	20	10	
	720	-	10	70	50	40	
	1080	-	10	60	100	100	
L-システイン投与群	320	100	5	40	0	0	950 (777～1459)*
	480	100	10	0	20	0	
	720	100	10	40	30	30	
	1080	100	10	0	70	60	

*：95%信頼限界

検体単独で投与した場合、投与後10分前後より30分にかけて嘔吐様症状が全投与群で観察された。50分までに480mg/kg以上の投与群で用量依存的に振戦又は間代性痙攣がみられ、これら痙攣症状の認められた動物のほとんどは、その後強直性伸展痙攣、四肢の麻痺、運動失調およびチアノーゼなどの症状が見られ、50分までに死亡した。L-システイン100mg/kgを同時投与した場合、検体単独投与と比較して、嘔吐様症状、振戦又は間代性痙攣等の症状の出現および死亡率は減少した。

本試験をもとにProbit法により算出した検体の推定LD₅₀値は、単独の場合727mg/kgであり、L-システインの同時投与では950mg/kgであった。

ネコの自律神経系（瞬膜）におけるL-システインのベンスルタップ原体に対する拮抗作用

供試動物：ネコ、体重 1.5～4.0 kg

投与方法：ウレタン約 1.2 g/kg および α -クロラロース 80 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下でネコを背位に固定し、頸部を切開して上頸神経節前線維および節後線維を剥離後、節前線維を切断し、節前線維の末梢側に刺激電極を設置した。また、舌動脈にもカニューレを挿入し、デジタルスティミュレーターによる上頸神経節前線維刺激およびノルアドレナリン (NE) 10 μ g/kg の舌動脈投与により惹起される瞬膜の収縮を、FD ピックアップを介してポリグラフに記録した。また、実験によっては、上頸神経節後線維刺激により惹起される瞬膜の収縮も記録した。検体は 0.5%CMC 生理食塩液に懸濁し、200 mg/kg の用量で腹腔内投与した。NE を 10 μ g/kg の用量で舌動脈内投与、ネライストキシン誘導体の解毒剤の 1 つである L-システインを 300 mg/kg の用量で静脈内投与した。

結果：検体 200 mg/kg の腹腔内投与により、投与後 30 分～1 時間にかけて、上頸神経節の節前線維刺激、節後線維刺激および NE 10 μ g/kg により惹起されるすべての瞬膜の収縮反応がほぼ同時に抑制された。検体による収縮抑制に対し、L-システインは 300 mg/kg 静脈内投与で何ら拮抗作用を示さなかった。

ウサギの骨格筋（腓骨神経-前脛骨筋標本）におけるL-システインのベンスルタップ原体に対する拮抗作用

供試動物：日本白色種雄ウサギ、体重 1.68～3.86 kg

方法：ウサギをウレタン約 1.5 g/kg の腹腔内投与により麻酔し、右側腓骨神経-前脛骨筋標本作製した。腓骨神経を剥離切断後末梢側に刺激電極を設置し、別に前脛骨筋にも針電極を刺入した。2 台のデジタルスティミュレーターを用い、神経および筋に電気刺激を交互に加え、これにより誘発された前脛骨筋の単収縮を、FD ピックアップを介してポリグラフ上に記録した。検体を 0.5%CMC 生理食塩液に懸濁し、400 mg/kg の用量で腹腔内投与した。さらに、L-システイン 300 mg/kg も静脈内投与し、検体に対する影響を調べた。

結果：検体 400 mg/kg 腹腔内投与により、神経刺激（間接刺激）および筋肉刺激（直接刺激）による収縮は共に抑制された。この抑制は呼吸抑制とほぼ同時に出現し、1 時間以上持続した。すなわち、早い例では投与後 30 分頃より、多くの例では投与後 1 時間位から徐々に抑制が始まり、その後漸次増強され、投与後 2 時間には収縮はわずかしか認められなかった。また、神経刺激による収縮が完全に抑制された後も、筋肉刺激による収縮はわずかではあるが観察された。これらの抑制作用は L-システインの静脈内投与により拮抗された。

ウサギの末梢血管系（耳介灌流）におけるL-システインのベンスルタップ原体に対する拮抗作用

供試動物：日本白色種雄ウサギ、体重 1.68～3.86 kg

方 法：Krawkow-Pissemski 法に従って実験を行った。ウサギを放血致死後、耳介を起始部から切断して中心動脈にカニューレを挿入した。空気を通気した Locke-Ringer 液を灌流し、耳介静脈より流出する灌流液の滴下数が 30～40 滴/分となるよう灌流圧を調整して実験を開始した。検体は Tween 80 を用いて栄養液に懸濁して 1×10^{-4} g/mL の濃度で置換法により適用した。検体の単独の作用と共に NE (1×10^{-7} g/mL、0.2 mL) を動脈カニューレにより注入し、血管収縮作用におよぼす影響についても検討した。さらに、検体、NE および L-システイン 1×10^{-4} g/mL を同時に灌流し、影響を調べた。

結 果：検体は 1×10^{-4} g/mL までの濃度で耳介血管の灌流量に対して何ら影響を及ぼさなかった。

しかし、 1×10^{-7} g/mL の NE 0.2 mL 注入により惹起される血管収縮は、 1×10^{-4} g/mL の検体灌流により 50%以上抑制された。この抑制は検体 1×10^{-4} g/mL と L-システイン 1×10^{-4} g/mL を同時に灌流した場合には認められなかった。検体の懸濁化剤として用いた 0.01% Tween 80 の灌流により、上記条件による NE の血管収縮はむしろ増強された。

以上の試験結果より、L-システインによる解毒作用は、ベンスルタップ原体の神経筋接合部遮断作用、耳介灌流における抗ノルアドレナリン作用には拮抗したが、瞬膜試験におけるノルアドレナリン受容体阻害作用には拮抗しなかった。LD₅₀ からみたマウスの毒性は L-システインの同時投与により軽減された。

12. 補足試験

B. 代謝物を用いた試験成績

<代謝物>

(1) ベンスルタップ代謝物 NTX のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代1)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタップ代謝物 NTX

検体純度：

供試動物：Std:ddY 系雄マウス、約5週齢、体重 23.1~29.1 g、1群10匹

観察期間：14日間

投与方法：検体を蒸留水に溶解し胃管を用いて経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物につき肉眼的検査を行った。

投与後 14 日間の累積死亡率から Litchfield and Wilcoxon 法により LD₅₀ 値を求めた。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	81.9、102.4、128、160、200、250
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	120 (103~140)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 3 時間以内に開始 投与後 3 時間以内に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 5~10 分から発現 投与後 2 日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	< 81.9 (すべての群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	< 81.9 (すべての群で死亡が認められた)

中毒症状として、投与後 5~10 分に全身に振戦が見られた後ケージ内を跳ね回り、のちに死亡した。投与後 1 日の生存例では僅かな振戦が見られたが、この症状は 2 日後には消失した。

剖検所見では、死亡および生存動物共に特記すべき肉眼的変化は認められなかった。

(2) ベンスルタップ代謝物 NTX の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代2)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタップ代謝物 NTX

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は滅菌蒸留水に溶解し、試験は 2 連制とし、プレインキュベーション法で試験を 1 回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の存在下または非存在下、WP2 *uvrA*、TA100 および TA98 株で若干の復帰変異コロニーの増加傾向が見られたが、いずれも 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ まで実施しても 2 倍未満であった。一方、陽性対照として用いた *p*-ジメチルアミノベンゼンジアゾスルホン酸ナトリウム、2-ニトロフルオレン、9-アミノアクリジン塩酸塩および *N*-エチル-*N*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンは S9 mix 非存在下で、2-アミノアントラセンおよび 3,4-ベンツピレンは S9 mix 存在下で、復帰変異コロニー数の顕著な増加を示した。

以上の結果より、ベンスルタップ代謝物 NTX は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断した。

表中の数値は2連の平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			WP2 <i>uvrA</i>	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
溶媒対照(蒸留水)	0	—	50	13	170	14	15	37	
NTX	10	—	54	9	165	13	11	27	
	50	—	55	10	171	15	17	48	
	100	—	56	10	176	24	18	55	
	500	—	61	12	158	13	21	52	
	1000	—	74	10	169	10	15	46	
	5000	—	82	15	179	20	20	51	
溶媒対照(蒸留水)	0	+	71	11	172	5	24	25	
NTX	10	+	73	7	178	5	20	26	
	50	+	80	6	192	5	20	21	
	100	+	73	7	170	1	27	24	
	500	+	59	9	183	4	16	18	
	1000	+	66	7	209	7	27	34	
	5000	+	116	15	293	6	27	37	
陽性 対照	DAPA	25	—	360	— ^{a)}	752	414	231	845
	2NF	1	—	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	288
		2	—	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	229	— ^{a)}
	9AA	40	—	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	740	— ^{a)}	— ^{a)}
	ENNG	2	—	688	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}
		3	—	— ^{a)}	— ^{a)}	368	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}
		5	—	— ^{a)}	157	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}
	2AA	0.5	+	— ^{a)}	— ^{a)}	319	— ^{a)}	131	175
2		+	— ^{a)}	84	— ^{a)}	320	— ^{a)}	— ^{a)}	
80		+	325	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	
B(a)P	5	+	— ^{a)}	— ^{a)}	810	— ^{a)}	— ^{a)}	148	

a) : 試験を行っていない。

DAPA : *p*-ジメチルアミノベンゼンジアゾスルホン酸ナトリウム

2NF : 2-ニトロフルオレン

9AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

ENNG : *N*-エチル-*N*'-ニトロ-*N*'-ニトロソグアニジン

2AA : 2-アミノアントラセン

B(a)P : 3,4-ベンツピレン

(3) ペンスルタッフ代謝物 NTX の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料代2)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1984年

検体：ペンスルタッフ代謝物 NTX

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換え修復機構欠損株 (M-45) および野生株 (H-17) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

両菌株を寒天培地上に重層し、指示菌平板を作成した。検体を滅菌蒸留水に溶解して溶液 0.02 mL を直径 8 mm のペーパーディスクにしみ込ませて 1 時間乾燥後、指示菌平板の中央に置いた。平板は 2 時間 4℃ に保冷した後、37℃ で 18 時間培養して、菌の生育阻止帯の長さを測定した。試験は 2 連制で 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を下表に示した。

表中の数値は 2 連の平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	S9 mix の有無	阻止帯 (mm)		差 (mm) *
			M-45	H-17	
溶媒対照 (蒸留水)	0 ^{a)}	—	0	0	0
NTX	2	—	0	0	0
	20	—	0	0	0
	200	—	0	0	0
	2000	—	0	0	0
陰性対照 (カナマイシン)	40	—	10	10	0
陽性対照 (DAPA)	10	—	11	0	11
陽性対照 (AF-2)	0.01	—	6	0	6

a) 20 $\mu\text{L}/\text{disk}$

DAPA：p-ジメチルアミノベンゼンジアゾスルホン酸ナトリウム

AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

* 申請者注：報告書に記載はないが、申請者が算出して記載した。

検体は、いずれの濃度においても H-17 株と M-45 株の間に全く生育阻止帯を認めなかった。一方、陽性対照として用いた *p*-ジメチルアミノベンゼンジアゾスルホン酸ナトリウムおよび 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミドでは両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照として用いたカナマイシンでは両株に同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ベンスルタップ代謝物 NTX は本試験条件下において DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

(4) ベンスルタップ代謝物 NTXO のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代1)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタップ代謝物 NTXO

検体純度：

供試動物：Std:ddY系雄マウス、約5週齢、体重 23.1~29.1 g、1群 10匹

観察期間：14日間

投与方法：検体を蒸留水に溶解し胃管を用いて経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物につき肉眼的検査を行った。

投与後 14 日間の累積死亡率から Litchfield and Wilcoxon 法により LD₅₀ 値を求めた。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	128、160、200、250、312.5
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	185 (161~213)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 3 時間以内に開始 投与後 3 時間以内に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 5~10 分から発現 投与後 2 日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	< 128 (すべての群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	< 128 (すべての群で死亡が認められた)

中毒症状として、投与後 5~10 分に振戦が見られた後ケージ内を跳ね回り、のちに死亡した。投与後 1 日の生存例では僅かな振戦が見られたが、この症状は 2 日後には消失した。

剖検所見では、死亡および生存動物共に特記すべき肉眼的変化は認められなかった。

(5) ベンスルタップ代謝物 NTXO₂ のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代1)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタップ代謝物 NTXO₂

検体純度：

供試動物：Std:ddY系雄マウス、約5週齢、体重23.1~29.1g、1群10匹

観察期間：7日間

投与方法：検体を蒸留水に溶解し胃管を用いて経口投与した。投与液量は20mL/kgとした。

観察・検査項目：中毒症状および生死を7日間観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物につき肉眼的検査を行った。

投与後7日間の累積死亡率からLitchfield and Wilcoxon法によりLD₅₀値を求めた。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	500、640、800、1000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	690 (575~828)
死亡開始時間 および終了時間	投与後3時間以内に開始 投与後1日に終了
症状発現時間 および消失時間	記載なし
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	< 500 (すべての群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	500

中毒症状として、全投与群で自発運動の減少、心拍数の減少および伏臥が見られ、最高投与量群ではこれらの症状ほか、閉眼およびチアノーゼが散見された。剖検所見では、死亡および生存動物共に特記すべき肉眼的変化は認められなかった。

(6) ベンスルタップ代謝物 DBMP のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代1)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタップ代謝物 DBMP

検体純度：

供試動物：Std:ddY系雄マウス、約5週齢、体重23.1~29.1g、1群10匹

観察期間：7日間

投与方法：検体を蒸留水に溶解し胃管を用いて経口投与した。投与液量は20mL/kgとした。

観察・検査項目：中毒症状および生死を7日間観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物につき肉眼的検査を行った。

投与後7日間の累積死亡率からLitchfield and Wilcoxon法によりLD₅₀値を求めた。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	800、1000、1250、1600、2000、2500
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	1350 (1144~1593)
死亡開始時間 および終了時間	投与後3時間以内に開始 投与後3日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後10~20分から発現 投与後4日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	< 800 (すべての群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	800

中毒症状として、1600 mg/kg以上の群において投与後10~20分に挙尾および振戦が見られ、その後起立不能となって伏臥または背臥して死亡した。1250 mg/kg以下の群では自発運動の減少が見られたが、生存例においては4日後に消失した。

剖検所見では、死亡および生存動物共に特記すべき肉眼的変化は認められなかった。

(7) ベンスルタップ代謝物 DMMP (I) のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代1)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタップ代謝物 DMMP (I)

検体純度：

供試動物：Std:ddY 系雄マウス、約5週齢、体重 23.1~29.1 g、1群10匹

観察期間：7日間

投与方法：検体を蒸留水に溶解し胃管を用いて経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。

観察・検査項目：中毒症状および生死を7日間観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物につき肉眼的検査を行った。

投与後7日間の累積死亡率から Litchfield and Wilcoxon 法により LD₅₀ 値を求めた。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	1000、1280、1600、1800、2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	1720 (1483~1995)
死亡開始時間 および終了時間	投与後3時間以内に開始 投与後3日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後10~20分から発現 投与後2日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	< 1000 (すべての群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1000

中毒症状として、1600 mg/kg 以上の群において投与後10~20分に挙尾および振戦が見られ、その後起立不能となり伏臥して死亡した。1280 mg/kg 以下の群では投与後1日に振戦が散見されたが2日後には消失した。

剖検所見では、死亡および生存動物共に特記すべき肉眼的変化は認められなかった。

(8) ベンスルタップ代謝物 DMMP(I) の異性体のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代1)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタップ代謝物 DMMP(I) の異性体

検体純度：

供試動物：Std:ddY 系雄マウス、約5週齢、体重 23.1~29.1 g、1群10匹

観察期間：7日間

投与方法：検体を蒸留水に溶解し胃管を用いて経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。

観察・検査項目：中毒症状および生死を7日間観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物につき肉眼的検査を行った。

投与後7日間の累積死亡率から Litchfield and Wilcoxon 法により LD₅₀ 値を求めた。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	1000、1250、1600、2000、2500
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	1510 (1280~1782)
死亡開始時間 および終了時間	投与後3時間以内に開始 投与後4日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後10~20分から発現 投与後4日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	< 1000 (すべての群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1000

中毒症状として、1600 mg/kg 以上の群において投与後 10~20 分に挙尾および振戦が見られ、その後起立不能となって伏臥または背臥して死亡した。1250 mg/kg 以下の群では自発運動の減少が見られたが、生存例においては4日後に消失した。

剖検所見では、死亡および生存動物共に特記すべき肉眼的変化は認められなかった。

(9) ベンスルタッフ代謝物 DBSP のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代1)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタッフ代謝物 DBSP

検体純度：

供試動物：Std:ddY 系雄マウス、約5週齢、体重 23.1~29.1 g、1群10匹

観察期間：7日間

投与方法：検体を蒸留水に溶解し胃管を用いて経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。

観察・検査項目：中毒症状および生死を7日間観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物につき肉眼的検査を行った。

投与後7日間の累積死亡率から Litchfield and Wilcoxon 法により LD₅₀ 値を求めた。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000、4000
LD ₅₀ (mg/kg)	> 4000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	投与後発現 投与後1日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	4000

中毒症状として、4000 mg/kg 群に挙尾および自発運動の減少が見られたが、翌日には消失した。

剖検所見では、死亡および生存動物共に特記すべき肉眼的変化は認められなかった。

(10) ベンスルタッフ代謝物 BSFI のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 代 1)

試験機関：武田薬品工業株式会社

報告書作成年：1984 年

検 体：ベンスルタッフ代謝物 BSFI

検体純度：

供試動物：Std: ddY 系雄マウス、約 5 週齢、体重 23.1~29.1 g、1 群 10 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を蒸留水に溶解し胃管を用いて経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。死亡動物および試験終了時の全生存動物につき肉眼的検査を行った。

投与後 14 日間の累積死亡率から Litchfield and Wilcoxon 法により LD₅₀ 値を求めた。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	5000、6400、8000、10000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	8600 (7227~10234)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 3 時間以内に開始 投与後 1 日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 30 分から発現 投与後 1 日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	6400
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000

中毒症状として、8000 および 10000 mg/kg 群において投与後 30 分から自発運動の減少、軟便および伏臥が見られたが、1 日後には消失した。

剖検所見では、死亡および生存動物共に特記すべき肉眼的変化は認められなかった。

C. 製剤を用いた試験成績

1. ベンスルタップ 50%水和剤

(1) ベンスルタップ 50%水和剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 製1-1)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

報告書作成年: 1983年

検体: ベンスルタップ 50%水和剤 (ルーバン水和剤)

検体純度: 50%水和剤

[組成] ベンスルタップ 50.0%
 鉱物質微粉、界面活性剤等 50.0%

供試動物: SD系ラット、週齢: 記載なし、体重: 雄 203~287 g、雌 210~244 g
 1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

投与方法: 検体を生理食塩液に懸濁して経口投与した。投与前に1夜絶食させた。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重を投与前、投与後7日および死亡時あるいは試験終了時に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

雄および雌雄混合の死亡率データをlogit回帰法によって、雌はBehrens-Reed-Muenchの変法によって解析した。

結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	520、720、1000、1800、3200
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄: 2125.2 (1454.3~2796.1) 雌: 1341.6 (1020.9~1763.2)
死亡開始時間 および終了時間	投与後2時間から開始 投与後6日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後1時間から発現 投与後9日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 520 雌 < 520 (すべての投与群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 1000

中毒症状として軟便、活動亢進および着色尿が520 mg/kg群の雌および720 mg/kg群の雌雄で認められた。また、720 mg/kg群では振戦や鼻あるいは眼の赤染も観

察された。これらの症状は投与後 1 日までに回復した。1000、1800、3200 mg/kg 群では、全例に上記のすべての症状のほか、鎮静、僅かな鎮静、粗毛および痙攣が認められた。全生存動物において、これらの症状は投与後 9 日には消失していた。

体重については、生存動物において 1000 mg/kg 群の雌で減少が認められた。また、死亡動物では、1800 mg/kg 以上の群の雌雄で減少が認められた。

剖検所見では、死亡動物に暗あるいは明赤色肺、胃壁の菲薄化、スムーズあるいは赤色の胃内膜、胃中に検体様あるいは赤色の凝固物質、腸管内の赤味あるいは黄味がかかった液体および胃と腸管の拡張が認められた。生存動物に特記すべき肉眼的変化は認められなかった。

(2) ペンスルタップ 50%水和剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 製1-2)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP対応]

報告書作成年：1987年

検体：ペンスルタップ 50%水和剤 (ルーバン水和剤)

検体純度：50%水和剤

[組成] ペンスルタップ 50.0%
 鉱物質微粉、界面活性剤等 50.0%

供試動物：ICR系マウス、6週齢、平均体重；雄 32.4 g、雌 27.8 g、1群雌雄各 10匹

観察期間：14日間

投与方法：検体を蒸留水に懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。対照群には蒸留水のみを同様に投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は投与直前、投与後 3、7、10、14 日および死亡発見時に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験終了時の死亡率から Probit 法により LD₅₀ 値を算出した。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄 0、228、296、385、500、650、845 雌 0、296、385、500、650、845、1099
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 462 (404~525) 雌 620 (547~700)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 10 分から開始 投与後 3 時間に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分から発現 投与後 24 時間に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 < 228 雌 < 296 (すべての投与群で症状が認められた)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 296 雌 385

中毒症状としては、雌雄に関係なく自発運動の低下、振戦、痙攣および鎮静が認められた。体重では、検体投与による影響は認められなかった。

死亡時に流涎がみられ、剖検では、雌雄ともに肺のうっ血が認められたが、生存動物では異常は認められなかった。

(3) ベンスルトップ 50%水和剤のウサギにおける急性経皮毒性試験

(資料 製1-3)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

報告書作成年: 1983年

検体: ベンスルトップ 50%水和剤 (ルーバン水和剤)

検体純度: 50%水和剤

[組成] ベンスルトップ 50.0%
 鉱物質微粉、界面活性剤等 50.0%

供試動物: ニュージーランドホワイ種ウサギ、週齢: 記載なし、

体重: 雄 2199~2359 g、雌 2190~2343 g、1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

投与方法: 刈毛したウサギの背部皮膚に検体を 2000 mg/kg の割合で塗布し、包帯で覆って 24 時間閉塞適用した。24 時間後に包帯を外して残った検体を水で拭いた。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を 14 日間観察した。投与後 1、3、7、10、14 日に適用部位の皮膚反応 (紅斑と浮腫) の有無を観察し、Draize 法を用いて採点した。体重は投与前、投与後 7 日および 14 日に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄共 > 2000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	投与後 1 日から発現 回復は認められなかった
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 2000

死亡例はなく、全動物で中毒症状は認められなかったが、投与部位の皮膚では、非常に軽度な紅斑が投与後 1 日から 3 日まで継続して観察され、非常に軽度な浮腫が投与後 1 日に認められた。さらに、落屑が投与後 7 日から 14 日まで認められた。

また、体重への影響は認められず、剖検所見においても特記すべき肉眼的変化は認められなかった。

(4) ベンスルトップ 50%水和剤のラットにおける急性吸入毒性試験

(資料 製1-4)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

報告書作成年: 1983年

検体: ベンスルトップ 50%水和剤 (ルーバン水和剤)

検体純度: 50%水和剤

[組成] ベンスルトップ 50.0%
 鉱物質微粉、界面活性剂等 50.0%

供試動物: SD系ラット、週齢: 記載なし、

平均体重: 雄 208.4 g、雌 225.7 g、1群雌雄各5匹

観察期間: 15日間

曝露方法: Wright 粉塵送風器を用いて検体のダストを発生させ、4時間全身曝露させた。

なお、1160 mg/m³は発生可能な最高濃度であった。また、対照群として空気のみを通気した。

曝露空気は試験動物の呼吸孔内にのばしたステンレス鋼製探知部を通して、あらかじめ重量を測定した Gelman DM-450 Metricel membrane フィルターを用いて捕集し、重量測定法により実際濃度を求めた。

曝露条件:

設定濃度 (mg/m ³)	7380
実際濃度 (mg/m ³)	1160
空気力学的質量中位径 (μm)	3.12
チャンバー容積 (m ³)	0.1
チャンバー内通気量 (m ³ /分)	0.0167
曝露条件	ダスト 4時間 全身曝露

観察・検査項目: 曝露前、曝露中 30分毎、曝露直後とその後 14日間、中毒症状および生死を観察した。全動物の体重を曝露直前、曝露後 7および 14日に測定した。観察期間終了時の全生存動物につき肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	吸 入
曝露濃度 (mg/ m ³)	0、1160
LC ₅₀ (mg/ m ³)	雌雄共 > 1160
死亡開始 および終了時間	死亡例なし
症状発現 および消失時間	症状発現なし
毒性徴候の認められなかった 最高曝露濃度 (mg/ m ³)	雌雄共 1160
死亡例の認められなかった 最高曝露濃度 (mg/ m ³)	雌雄共 1160

死亡例はなく、全動物で中毒症状も認められなかった。また、体重にも異常は認められなかった。

肉眼的病理検査では、腎盂拡張が検体曝露群の雌 1 例で認められたが、同様の所見は対照群の雄 1 例でも認められており、検体による影響ではないと考えられた。

(5) ベンスルトップ 50%水和剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 製1-5)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

報告書作成年: 1983年

検体: ベンスルトップ 50%水和剤 (ルーバン水和剤)

検体純度: 50%水和剤

[組成]	ベンスルトップ	50.0%
	鉱物質微粉、界面活性剤等	50.0%

供試動物: ニュージーランドホワイト種ウサギ、体重: 雄 2023~2303 g、雌 2193~2543 g
1群雌雄各3匹

観察期間: 検体除去後 72 時間

投与方法: 検体 0.5 g を水で湿潤させ、刈毛した動物の背部に塗布した後、1 × 1.5 インチ (9.7 cm²) のガーゼ (2層) で覆い、4 時間閉塞貼付した。適用後、パッチを取り除き適用部位を水で洗った。

観察項目: 検体除去後 30、60 分、24、48 および 72 時間に適用部位の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫等) を観察し、Draize の判定基準に従って採点した。

結果: 観察した刺激性変化の採点を次頁の表に示した。

紅斑および浮腫のような刺激反応は生じなかった。一次皮膚刺激点は 0.00 であった。

以上の結果から、ベンスルトップ 50%水和剤はウサギの皮膚に対して刺激性はないと結論した。

試験結果

動物 番号	項 目	最高 評点	検体除去後の経過時間			
			30-60分	24時間	48時間	72時間
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
	その他の反応	-	-	-	-	-
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
	その他の反応	-	-	-	-	-
3	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
	その他の反応	-	-	-	-	-
4	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
	その他の反応	-	-	-	-	-
5	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
	その他の反応	-	-	-	-	-
6	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
	その他の反応	-	-	-	-	-
合計	紅斑・痂皮	24	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0
	その他の反応	-	-	-	-	-
平均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
	その他の反応	-	-	-	-	-

(6) ベンスルタップ 50%水和剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 製1-6)

試験機関: Hazleton Laboratories America, Inc.

報告書作成年: 1983年

検体: ベンスルタップ 50%水和剤 (ルーバン水和剤)

検体純度: 50%水和剤

[組成]	ベンスルタップ	50.0%
	鉱物質微粉、界面活性剤等	50.0%

供試動物: ニュージーランドホワイト種ウサギ、体重: 雄 2325~2458 g、雌 2672~2750 g、
1群雌雄各3匹

観察期間: 10日間

投与方法: 予めフルオレッセインナトリウム液を用いて角膜損傷がないことを確認した動物の左眼結膜嚢内に、検体 38 mg を適用し約 1 秒間眼を押さえて閉じた。右眼は無処置対照とした。

観察項目: 適用後 1、24、48、72 時間および 4、7、10 日に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Draize 法に従って刺激性を評価した。また、24 時間の観察の後、左眼にフルオレッセインナトリウム液を点眼して角膜損傷の有無を調べた。

結果: 観察した刺激性変化の採点を次頁の表に示した。

適用後 24 時間に、角膜の 1/4 あるいはそれ以下を覆う評点 1 の混濁が 1 例に、評点 1 の虹彩炎が適用後 1 時間の 2 例に認められた。結膜では、評点 1~3 の発赤が適用後 1 時間から 48 時間まですべての眼に見られ、4 日には 5 例^{申請者注1}に、7 日には 1 例に継続して認められた。また、評点 1~2 の結膜浮腫が適用後 1 時間にすべての眼に、24 時間に 5 例^{申請者注2}に、48 時間には 4 例に継続して見られた。眼脂は評点 1 程度のものが適用後 1 時間のすべての眼に認められ、24 時間には 1 例に継続して認められた。1 例の結膜嚢内では 24 時間に検体の残留が認められ、他の 2 例では角膜が混濁してみえたが、24 時間後のすべての眼においてフルオレッセイン検査は陰性であった。

申請者注 1: 報告書の要約では、「in four eyes」と記載されているが、報告書の結果および表から正しくは「in five eyes」であり、要約の記載は誤記と判断した。

申請者注 2: 報告書の要約および結果では、「in one eye」および「in eye」と記載されているが、表から正しくは「in five eyes」であり、要約および結果の記載は誤記と判断した。

以上の結果より、各観察時間における刺激点数の最大平均値は1時間後の10.3となり、
ベンスルトップ50%水和剤は眼に対して軽度の刺激性が認められた^{申請者注}。

申請者注：Kay & Calandra の評価基準¹⁾に従うと『軽度の刺激性あり』に分類されるため、本剤はウサギの眼に対して軽度の刺激性ありと判断した。

1) J. H. Kay, and J. C. Calandra, Journal of the society of cosmetic chemists, 13: 281-289, 1962.

試験結果

項目	最高 評点	適用後時間										
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日	7日	10日				
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0	
			面積	4	0	0	0	0	0	0	0	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
			結膜	発赤	3	2	2	2	1	1	1	0
				浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0
		眼脂		3	1	1	0	0	0	0	0	
	動物 番号 2	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0	
			面積	4	0	0	0	0	0	0	0	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
			結膜	発赤	3	2	1	1	1	1	0	0
				浮腫	4	1	0	0	0	0	0	0
		眼脂		3	1	0	0	0	0	0	0	
動物 番号 3	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0		
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0		
	虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	0	0		
		結膜	発赤	3	2	1	1	1	1	0	0	
			浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0	
	眼脂		3	1	0	0	0	0	0	0		
動物 番号 4	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0		
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0		
	虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	0	0		
		結膜	発赤	3	2	1	1	0	0	0	0	
			浮腫	4	1	1	0	0	0	0	0	
	眼脂		3	1	0	0	0	0	0	0		
動物 番号 5	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0		
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0		
	虹 彩	2	1	0	0	0	0	0	0	0		
		結膜	発赤	3	3	1	1	1	1	0	0	
			浮腫	4	2	1	1	0	0	0	0	
	眼脂		3	1	0	0	0	0	0	0		
動物 番号 6	角膜 混濁	程度	4	0	1	0	0	0	0	0		
		面積	4	0	1	0	0	0	0	0		
	虹 彩	2	1	0	0	0	0	0	0	0		
		結膜	発赤	3	2	1	1	1	1	0	0	
			浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0	
	眼脂		3	1	0	0	0	0	0	0		
合計*		660	62	31	22	10	10	2	0			
平均		110	10.3	5.2	3.7	1.7	1.7	0.3	0			

* Draize 法による評価点 (最高 110 点/匹)

(7) ベンスルタップ 50%水和剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 製1-7)

試験機関：Hazleton Laboratories America, Inc.

報告書作成年：1984年

検体：ベンスルタップ 50%水和剤 (ルーバン水和剤)

検体純度：50%水和剤

[組成] ベンスルタップ 50.0%
 鉱物質微粉、界面活性剤等 50.0%

供試動物：Hartley 系雌雄モルモット、投与開始時体重：雄 328～515 g、雌 396～500 g、
 1群雌雄各5匹

観察期間：感作開始後 24 日間

試験操作：[Maximization 法]

投与量設定根拠；

感作；一次感作 (経皮)

動物の背面肩部の約 4 × 6 cm を刈毛し、検体処理群には検体の 50%生理食塩液懸濁液、検体対照群には生理食塩液を各 0.5 mL 塗布した。

二次感作 (経皮)

一次感作の 6 日後に肩部を再度剃毛して 10%ラウリル硫酸ナトリウム 0.3 mL を塗布し、翌日に検体処理群には検体の 50%生理食塩液懸濁液 0.3 mL を 2 × 4 cm の濾紙に広げ、2 日間閉塞貼付した。

惹起；二次感作の 2 週間後、動物の腹側部を 5 × 5 cm 剃毛し、検体の 25%生理食塩液懸濁液および生理食塩液を含ませた 2 × 2 cm の濾紙を左右腹側部に 24 時間閉塞貼付した。

観察項目：一次感作終了後 1 および 6 日、二次感作終了後 2 ^{申請者注 1} ～4 日、惹起貼付除去後 24 時間および 48 時間 ^{申請者注 2} に塗布あるいは貼付部位の紅斑の有無等を肉眼

申請者注 1：報告書の表では、「Day 1」と記載されているが、報告書の方法および結果の記載から正しくは「Day2」であり、表の誤記と判断した。

申請者注 2：報告書の表では、「48 hours」「72 hours」と記載されているが、報告書の方法および引用文献から正しくは「24 hours」「48 hours」であり、表の誤記と判断した。

的に観察して、以下の評価方法により採点した。

評点	判定基準
0	変化なし
1	散在性の軽度の発赤
2	中等度のび漫性の発赤
N	壊死
B	亀裂および出血
C	蒼白化

その他、試験期間を通して一般症状、毒性症状および薬理作用を観察し、体重測定を投与開始時および終了時に実施した。

結果：各観察時間における感作変化が認められた動物数を次表に示した。
 惹起後の観察では、検体処理群および対照群のいずれにも皮膚反応は認められなかった。
 試験期間を通じてすべての動物の体重が増加した。

以上の結果から、ペンスルトップ 50%水和剤の皮膚感作性は陰性と判断した。

	群		供試動物数	感作反応動物数								陽性率 (%) 時間	
				24 時間後				48 時間後					
	感作	惹起		皮膚反応評点				皮膚反応評点					
0			1	2	計	0	1	2	計				
検体	50%検体	25%検体	10	10	0	0	0/10	10	0	0	0/10	0	0
	溶媒	25%検体	10	10	0	0	0/10	10	0	0	0/10	0	0

検体：ペンスルトップ 50%水和剤

2. ベンスタップ 2%粉剤

(1) ベンスタップ 2%粉剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 製2-1)

試験機関：(株) 臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1985年

検体：ベンスタップ 2%粉剤 (ルーバン粉剤 DL)

検体純度：2%粉剤

[組成]	ベンスタップ	2.0%
	鉱物質微粉、凝集剤等	98.0%

供試動物：Wistar 系ラット、6 週齢、平均体重；雄 185.3 g、雌 148.5 g、1 群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を 0.5% CMC-Na 溶液に懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。対照群には 0.5% CMC-Na 溶液のみを同様に投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は投与直前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄共 > 5000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	症状発現なし
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000

中毒症状および死亡は認められなかった。

体重および剖検では検体投与による影響は認められなかった。

(2) ベンスルタップ 2%粉剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 製 2-2)

試験機関：(株) 臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1985 年

検 体：ベンスルタップ 2%粉剤 (ルーバン粉剤 DL)

検体純度：2%粉剤

〔組成〕	ベンスルタップ	2.0%
	鉱物質微粉、凝集剤等	98.0%

供試動物：ICR 系マウス、5 週齢、平均体重；雄 26.9 g、雌 23.6 g、1 群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を 0.5% CMC-Na 溶液に懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。対照群には 0.5% CMC-Na 溶液のみを同様に投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は投与直前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	0、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄共 > 5000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	症状発現なし
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000

中毒症状および死亡は認められなかった。

体重および剖検では検体投与による影響は認められなかった。

(3) ベンスルトップ 2%粉剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 製 2-3)

試験機関：(株) 臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1985 年

検 体：ベンスルトップ 2%粉剤 (ルーパン粉剤 DL)

検体純度：2%粉剤

[組成]	ベンスルトップ	2.0%
	鉱物質微粉、凝集剤等	98.0%

供試動物：Wistar 系ラット、7 週齢、平均体重；雄 219.4 g、雌 168.1 g、1 群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

投与方法：剪毛した背部皮膚に、蒸留水で湿らせ検体を塗布した綿布 (4 × 5 cm) を貼付し、絆創膏で固定した。適用 24 時間後に綿布を除去し、適用部位を微温水で洗浄しガーゼを用いて拭き取った。対照群には検体を除き同様の処置をした。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は投与前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 皮
投与量 (mg/kg)	0、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌共 > 2000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	症状発現なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 2000

中毒症状および死亡は認められなかった。

体重および剖検では検体投与による影響は認められなかった。また、適用部位の皮膚に刺激性変化およびその他の異常は認められなかった。

(4) ベンسلタップ 2%粉剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 製 2-4)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1986 年

検 体：ベンسلタップ 2%粉剤 (ルーバン粉剤 DL)

検体純度：2%粉剤

[組成]	ベンسلタップ	2.0%
	鉱物質微粉、凝集剤等	98.0%

供試動物：日本白色種雄ウサギ、週齢は報告書に記載なし、体重 2.41~2.76 kg、1 群 6 匹

観察期間：検体除去後 72 時間

投与方法：動物の背部を剃毛し、2 × 3 cm の試験部位を左右 2 ヶ所に設定した。右側には乳鉢で十分に粉砕した検体 0.5 g を蒸留水で湿らせ塗布したガーゼ (2 × 3 cm) を、左側には対照としてガーゼのみを適用し、ともにサージカルテープで閉塞貼付した。曝露時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は蒸留水を含ませた脱脂綿を用いて拭き取った。

観察項目：検体除去 1、24、48 および 72 時間後に適用部分の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無等を観察し、農林水産省のガイドライン (59 農蚕第 4200 号) に示された判定基準に従って採点した。一般状態もあわせて観察し、体重を適用前、検体除去 24、48 および 72 時間後に測定した。

結 果：観察した刺激性変化の採点は次表のとおりであった。

観察期間を通して、いずれの動物にも皮膚の刺激性変化は認められなかった。

一般状態および体重では検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、ベンセルタップ 2%粉剤はウサギの皮膚に対して刺激性なしと判断された。

動物 番号	項 目	最高 評点	検体除去後の経過時間			
			1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	24	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

(5) ペンスルタップ 2%粉剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 製 2-5)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1985 年

検 体：ペンスルタップ 2%粉剤 (ルーバン粉剤 DL)

検体純度：2%粉剤

[組成]	ペンスルタップ	2.0%
	鉍物質微粉、凝集剤等	98.0%

供試動物：日本白色種雄ウサギ、週齢は報告書に記載なし、体重 2.35~2.69 kg、
非洗眼群 6 匹、洗眼群 3 匹

観察期間：6 日間

投与方法：検体 0.1 g を右眼に適用し、左眼は対照とした。洗眼群 3 匹は適用 2 分後に約 20 mL の生理食塩水で洗眼した。非洗眼群 6 匹については洗眼しなかった。

観察項目：非洗眼群については適用 1、24、48、72 時間、4、5 および 6 日後、洗眼群については適用 1、24、48 および 72 時間後に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、農林水産省のガイドライン (59 農蚕第 4200 号) に示された判定基準に従って採点した。一般状態もあわせて観察し、体重を非洗眼群については適用前、適用 24、48、72 時間および 5 日後、洗眼群については適用前、適用 24、48、72 時間後に測定した。

結 果：観察した刺激性変化の採点は次表のとおりであった。

非洗眼群では、適用 1 時間後に結膜における多少の血管の充血 (評点 1) およびび漫性の深紅色を呈する発赤 (評点 2) がそれぞれ 6 例中 3 例に、また、わずかな腫脹 (評点 1) が 2 例、眼瞼の外反を伴った腫脹 (評点 2) が 3 例、眼瞼の 1/2 の閉鎖を伴った腫脹 (評点 3) が 1 例に認められた。これらの症状は 6 日後には全て消失した。

洗眼群では、適用 1 時間後に結膜における多少の血管の充血 (評点 1) が 3 例中 2 例、び漫性の深紅色を呈する発赤 (評点 2) が 1 例、また、わずかな腫脹 (評点 1) が 1 例、眼瞼の外反を伴った腫脹 (評点 2) が 2 例認められた。これらの症状は、72 時間後には全て消失した。

一般症状および体重では検体による影響は認められなかった。

以上の結果から、ベンスルトップ 2%粉剤はウサギの眼に対して軽度の刺激性を有するが、洗眼により刺激性は軽減されるものと考えられた^{申請者注}。

申請者注：申請者注：Kay & Calandra の評価基準¹⁾に従うと『軽度の刺激性あり』に分類されるため、本剤はウサギの眼に対して軽度の刺激性ありと判断した。

¹⁾ J. H. Kay, and J. C. Calandra, Journal of the society of cosmetic chemists, 13: 281-289, 1962.

項 目		最高 評点	適用後時間								
			1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	4日	5日	6日		
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜混濁	4	0	0	0	0	-	-	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	-	-	-	
		結膜	発赤	3	1	1	1	0	-	-	-
			浮腫	4	2	1	1	0	-	-	-
	動物 番号 2	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	-	
		結膜	発赤	3	1	1	1	1	1	0	-
			浮腫	4	1	1	0	0	0	0	-
	動物 番号 3	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	-	
		結膜	発赤	3	1	1	0	0	0	0	-
			浮腫	4	1	1	1	1	1	0	-
	動物 番号 4	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	0	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	2	1	1	1	1	1	0
			浮腫	4	2	1	1	0	0	0	0
	動物 番号 5	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	-	
		結膜	発赤	3	2	1	1	1	1	0	-
			浮腫	4	2	1	0	0	0	0	-
動物 番号 6	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	0		
	虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	0		
	結膜	発赤	3	2	2	1	1	1	1	0	
		浮腫	4	3	2	1	1	0	0	0	
合 計		78	20	14	9	6	5	2	0		
平 均		13	3.3	2.3	1.5	1.0	0.8	0.3	0		
洗眼群 (3匹平均)	角膜混濁		4	0	0	0	0	-	-	-	
	虹 彩		2	0	0	0	0	-	-	-	
	結膜	発赤	3	1.3	1.0	1.0	0	-	-	-	
		浮腫	4	1.7	0.7	0	0	-	-	-	
	合 計		13	3.0	1.7	1.0	0	-	-	-	

3. ベンスルタップ 4%粒剤

(1) ベンスルタップ 4%粒剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 製3-1)

試験機関：(株) 臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1985年

検体：ベンスルタップ 4%粒剤 (ルーバン粒剤)

検体純度：4%粒剤

[組成]	ベンスルタップ	4.0%
	鉍物質微粉等	96.0%

供試動物：Wistar 系ラット、6週齢、平均体重；雄 178.4 g、雌 140.5 g、1群雌雄各 10匹

観察期間：14日間

投与方法：粉碎した検体を 0.5% CMC-Na 溶液に懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。対照群には 0.5% CMC-Na 溶液のみを同様に投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は投与直前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄共 > 5000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分から発現 投与後 1 時間に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000

中毒症状としては、雌雄に関係なく流涎が認められた。

体重および剖検では検体投与による影響は認められなかった。

(2) ベンスルタップ 4%粒剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 製3-2)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1985年

検体：ベンスルタップ 4%粒剤 (ルーバン粒剤)

検体純度：4%粒剤

[組成]	ベンスルタップ	4.0%
	鋳物質微粉等	96.0%

供試動物：ICR系マウス、5週齢、平均体重；雄 27.8 g、雌 23.8 g、1群雌雄各 10匹

観察期間：14日間

投与方法：粉碎した検体を 0.5% CMC-Na 溶液に懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。投与量は 20 mL/kg とした。対照群には 0.5% CMC-Na 溶液のみを同様に投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は投与直前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄共 > 5000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	症状発現なし
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000

中毒症状および死亡は認められなかった。

体重および剖検では検体投与による影響は認められなかった。

(3) ベンスルトップ 4%粒剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 製3-3)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1985年

検体：ベンスルトップ 4%粒剤 (ルーバン粒剤)

検体純度：4%粒剤

[組成]	ベンスルトップ	4.0%
	鉱物質微粉等	96.0%

供試動物：Wistar 系ラット、7週齢、平均体重；雄 208.8 g、雌 161.7 g、1群雌雄各 10匹

観察期間：14日間

投与方法：剪毛した背部皮膚に、乳鉢を用いて粉碎した検体を蒸留水で湿らせ塗布した綿布 (4 × 5 cm) を貼付し、絆創膏で固定した。適用 24 時間後に綿布を除去し、適用部位を微温水で洗浄しガーゼを用いて拭き取った。対照群には検体を除き同様の処置をした。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重は投与前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	0、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌共 > 2000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	症状発現なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 2000

中毒症状および死亡は認められなかった。

体重および剖検では検体投与による影響は認められなかった。また、適用部位の皮膚に刺激性変化およびその他の異常は認められなかった。

(4) ベンスルトップ 4%粒剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 製 3-4)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1986年

検 体：ベンスルトップ 4%粒剤 (ルーバン粒剤)

検体純度：4%粒剤

[組成]	ベンスルトップ	4.0%
	鉱物質微粉等	96.0%

供試動物：日本白色種雄ウサギ、週齢は報告書に記載なし、体重 2.41~2.83 kg、1群 6匹

観察期間：検体除去後 72 時間

投与方法：動物の背部を剃毛し、2 × 3 cm の試験部位を左右 2 ヶ所に設定した。右側には乳鉢で十分に粉砕した検体 0.5 g を蒸留水で湿らせ塗布したリント布 (2 × 3 cm) を、左側には対照として同量の蒸留水で湿らせたリント布を適用し、ともにサージカルテープで閉塞貼付した。曝露時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は蒸留水を含ませた脱脂綿を用いて拭き取った。

観察項目：検体除去 1、24、48 および 72 時間後に適用部分の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無等を観察し、農林水産省のガイドライン (59 農蚕第 4200 号) に示された判定基準に従って採点した。一般状態もあわせて観察し、体重を適用前、検体除去 24、48 および 72 時間後に測定した。

結 果：観察した刺激性変化の採点は次表のとおりであった。

観察期間を通して、いずれの動物にも皮膚の刺激性変化は認められなかった。

一般状態および体重では検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、ベンスルトップ 4%粒剤はウサギの皮膚に対して刺激性なしと判断された。

動物 番号	項 目	最高 評点	検体除去後の経過時間			
			1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	24	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

(5) ベンスルタップ 4%粒剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 製3-5)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1986年

検体：ベンスルタップ 4%粒剤 (ルーバン粒剤)

検体純度：4%粒剤

[組成]	ベンスルタップ	4.0%
	鋳物質微粉等	96.0%

供試動物：日本白色種雄ウサギ、週齢は報告書に記載なし、体重 2.22~2.88 kg、
非洗眼群 6 匹、洗眼群 3 匹

観察期間：10 日間

投与方法：乳鉢で十分に粉碎した検体 0.1 g を右眼に適用し、左眼は対照とした。洗眼群 3 匹は適用 2 分後に約 20 mL の生理食塩水で洗眼した。非洗眼群 6 匹については洗眼しなかった。

観察項目：非洗眼群については適用 1、24、48、72 時間および 4~10 日後の毎日、洗眼群については適用 1、24、48 および 72 時間後に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、農林水産省のガイドライン (59 農蚕第 4200 号) に示された判定基準に従って採点した。一般状態もあわせて観察し、体重を非洗眼群については適用前、適用 24、48、72 時間、5 および 8 日後、洗眼群については適用前、適用 24、48 および 72 時間後に測定した。

結果：観察した刺激性変化の採点は次表のとおりであった。

非洗眼群では、適用 1 時間後に角膜のび漫性の混濁 (評点 1) が 6 例中 5 例に認められ、結膜においては、多少の血管の充血 (評点 1) が 4 例、び漫性の深紅色を呈する発赤 (評点 2) が 2 例、わずかな腫脹 (評点 1) が 3 例、眼瞼の外反を伴った腫脹 (評点 2) が 3 例に認められた。

角膜の混濁は 48 時間後には全て消失した。結膜の発赤は 24 時間後に最も強くなり、多少の血管の充血 (評点 1) が 1 例、び漫性の深紅色を呈する発赤 (評点 2) が 5 例認められた。これらの症状は 10 日後には全て消失した。結膜浮腫は 24 時間後に最も強くなり、わずかな腫脹 (評点 1) が 2 例、眼瞼の外反を伴った腫脹 (評点 2) が 2 例、眼瞼の 1/2 の閉鎖を伴った腫脹 (評点 3) が 1 例認められた。これらの症状は 5 日後には全て消失した。

洗眼群では、適用 1 時間後に結膜におけるわずかな腫脹 (評点 1) が 3 例中 2 例、眼瞼の外反を伴った腫脹 (評点 2) が 1 例に認められたが、24 時間後には全て消失した。結膜において多少の血管の充血 (評点 1) が 24 時間後に 3 例全例に認められた。これらの症状は、72 時間後には全て消失した。

一般症状および体重では検体による影響は認められなかった。

以上の結果から、ベンスルタップ 4%粒剤はウサギの眼に対して中等度の刺激性を有するが、洗眼により刺激性は軽減されるものと考えられた^{申請者注}。

申請者注：Kay & Calandra の評価基準¹⁾に従うと『中等度の刺激性あり』に分類されるため、本剤はウサギの眼に対して中等度の刺激性ありと判断した。

¹⁾ J. H. Kay, and J. C. Calandra, Journal of the society of cosmetic chemists, 13: 281-289, 1962.

項 目		最高 評点	適用後時間												
			時間				日								
			1	24	48	72	4	5	6	7	8	9	10		
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜混濁	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		虹 彩	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	0
			浮腫	4	2	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	動物 番号 2	角膜混濁	4	1	1	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
		結膜	発赤	3	2	2	2	1	1	1	1	0	-	-	-
			浮腫	4	2	1	1	0	0	0	0	0	-	-	-
	動物 番号 3	角膜混濁	4	1	1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	
		結膜	発赤	3	2	2	1	1	1	0	-	-	-	-	-
			浮腫	4	1	2	1	0	0	0	-	-	-	-	-
	動物 番号 4	角膜混濁	4	1	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	
		結膜	発赤	3	1	2	1	1	1	0	-	-	-	-	-
			浮腫	4	2	1	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	動物 番号 5	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
		結膜	発赤	3	1	1	1	1	1	1	0	-	-	-	
			浮腫	4	1	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
	動物 番号 6	角膜混濁	4	1	1	0	0	0	0	0	0	-	-		
		虹 彩	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-		
		結膜	発赤	3	1	2	1	1	1	1	1	0	-	-	
			浮腫	4	1	2	0	0	0	0	0	0	-	-	
合 計		78	22	25	11	7	7	4	4	2	1	1	0		
平 均		13	3.7	4.2	1.8	1.2	1.2	0.7	0.7	0.3	0.2	0.2	0		
洗眼群 (3匹平均)	角膜混濁	4	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
	虹 彩	2	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
	結膜	発赤	3	0	1.0	0.7	0	-	-	-	-	-	-		
		浮腫	4	1.3	0	0	0	-	-	-	-	-	-		
	合 計		13	1.3	1.0	0.7	0	-	-	-	-	-	-		

(6) ベンスルタップ 4%粒剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 製3-6)

試験機関: Safeparm Laboratories Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年: 1989 年

検体: ベンスルタップ 4%粒剤 (ルーバン粒剤)

検体純度: 4%粒剤

[組成]	ベンスルタップ	4.0%
	鉍物質微粉等	96.0%

供試動物: Hartley 系雌モルモット、投与開始時約 8~10 週齢、
投与開始時体重 320~398 g、1 群 20 匹 (検体処置群) および 10 匹 (検体対照群、陽性対照物質処置群および陽性対照物質対照群)

観察期間: 感作開始後 30 日間

試験操作: [Buehler 法]

投与量設定根拠:

感作; 左腹側部を剪毛し、検体の 75%蒸留水懸濁液 0.5 mL をしみこませたリント布 (約 1.5 × 3.5 cm) を 6 時間閉塞貼付した。感作は、週 1 回の割合で、合計 3 回実施した。

陽性対照物質処置群には、2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) の 0.5%無水エタノール溶液 0.5 mL を同様に処置した。

検体対照群および陽性対照物質対照群には検体を除き同様の処置を行った。

惹起; 最終感作の 2 週間後、剪毛した右腹側部に、検体処置群および検体対照群は検体の 75%蒸留水懸濁液 0.5 mL を、陽性対照物質処置群および陽性対照物質対照群は DNCB の 0.05%無水エタノール溶液 0.5 mL を感作と同様に処置した。

観察項目: 惹起貼付除去後 24 時間および 48 時間に適用部位の紅斑および浮腫の有無等を肉眼的に観察して、以下の基準に従って採点した。体重は試験開始時および終了時に測定した。

評点	判定基準
0	反応なし
1	散在している軽度の発赤
2	中等度のび漫性発赤
3	強度の発赤および腫脹

結果：各観察時間における感作変化が認められた動物数およびその評点を次表に示した。検体処置群および検体対照群では、いずれの観察時間においても適用部位に紅斑、浮腫等の皮膚反応は認められなかった。

一方、陽性対照物質処置群では、評点 1 あるいは 2 の皮膚反応が 9 例中 8 例に認められた。

なお、陽性対照物質処置群の 1 匹が感作開始後 28 日に死亡したが、本試験の正確さに影響を与えるものではなかった。

体重では検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、ペンスルタップ 4% 粒剤の皮膚感作性は陰性と判断した。

	群		供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)		
	感作	惹起		24 時間					48 時間					時間		
				皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計			
				0	1	2	3		0	1	2	3				
検 体	75% 検体	75% 検体	20	20	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
	溶媒	75% 検体	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10	0	0
陽 性 対 照	0.5% DNCB	0.05% DNCB	10	1	7	1	0	8/9*	2	6	1	0	7/9*	88.9	77.8	
	溶媒	0.05% DNCB	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0	

検体：ペンスルタップ 4% 粒剤

*：1 匹が感作開始後 28 日に死亡した。