

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

11) 1年間反復経口投与毒性及び発がん性

(1)ラットを用いた強制経口投与による24カ月間反復経口投与慢性毒性・発がん性併合試験
(資料 11)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2001年

検体純度：

供試動物：系ラット（ ），1群雌雄各80匹，投与開始時6週
齢

投与開始時体重；雄134～250g，雌119～178g

26及び52週間投与後に各群雌雄各10匹を途中計画殺とし，臓器重量測定，肉眼的病理検査及び病理組織学的検査に供した。試験途中死亡動物が多かったところから，雄は98週間投与後，雌は95週間投与後に試験を中止し最終解剖に供した。

投与期間：雄98週間，雌95週間（1997年12月23日～1999年11月12日）

投与方法：検体を に懸濁し0，0.075，0.75及び7.5mg/kg/日の用量（投与容量は2mL/kg）で雄98週間，雌95週間に亘り胃カテーテルで毎日強制経口投与した。各個体の投与量は直近の体重に基づいて計算し，投与液調製は3週間毎に実施した。

用量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び死亡率を毎日2回観察し，触診を含むより詳細な観察を毎週1回実施した。[申請者注：対照群と投与群間の比較にはFisherの直接確率

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

計算法を5及び1%の有意水準で申請者が実施した。]

統計学的に有意な主な臨床症状を表1に示す。

表1. 臨床症状

性別	雄				雌			
	0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
投与量 (mg/kg/日)	0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
臓器/検査動物数	80	80	80	80	80	80	80	80
不整咬合								
消瘦								
震顫								
下腹部膨満								
発声								
軟便								
運動失調								

統計学的有意差：↑↓, P<0.05; ↑↓, P<0.01 (Fisherの直接確率計算法, 申請者実施)

7.5 mg/kg/日群の雄で不整咬合, 震顫, 発声及び軟便の発生頻度が有意に増加し, さらに, 0.75 mg/kg/日群の雄で軟便が有意に増加し, これらの変化は試験期間中, まれに観察されるものかあるいは屠殺前・一般状態悪化時に観察されたものであり, いずれも一時的な発生であることから検体投与との関連性はないと判断した。以上のことから検体投与に関連する臨床症状の異常はなかった。

[申請者注: 統計検定を実施したところ 7.5 mg/kg/日群の雄で不整咬合が有意に増加したが, その発生数はわずかであり, 雌には異常がみられなかったことから, 偶発性変化と判断した。また, 上記以外にも, 0.75 及び0.075mg/kg/日群の雌雄において統計学的な有意差が観察されたが, いずれも投与用量との関連性はないことから, 偶発性変化と判断された。]

試験終了時(雄投与 98 週後, 雌投与 95 週後)の死亡率を表2に示す。

表2. 死亡率(雄 98 週後, 雌 95 週後)

投与量 (mg/kg)		0	0.075	0.75	7.5
死亡率	雄	20/60 ^a (33)	15/60(25)	20/60(33)	17/60(28)
	雌	14/60(23)	17/60(28)	14/60(23)	18/60(30)

統計学的有意差：↑↓ p<0.05 (Cox-tarone binary regression-based test)

a: 死亡動物数 / 投与動物数

括弧内の数字は死亡の発生率(%)を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

検体投与群の死亡率は対照群と同程度であった。

体重変化；投与期間中全動物の体重を投与 14 週まで毎週，その後は 4 週ごとに 1 回測定した。

体重及び体重増加量について統計学的有意差の認められた検査週を表 3 に示す。

表 3. 体重及び体重増加量

検査項目	検査週	性別及び投与量 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		0.075	0.75	7.5	0.075	0.75	7.5
体重	42			↓95			
	82					↓87	
体重増加量	7-8				↓69	↓69	↓77
	8-9			↓83			
	10-11				↑150		
	13-14	↑171					
	14-18						↓68
	30-34			↓71			
	34-38	↑139					
	38-42	↓71		↓63			
	42-46				↓64		
	46-50			↑153			
	62-66					↓#	
	70-74						↓#
	78-82				↓24 ^a		
	1-54			↓91			

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値 (但し, #で示した有意差は対照群あるいは投与群の値が減少値のため算出不可)

a: 対照群の測定値が 0 であるため, 投与群の測定値を記載

統計学的有意差: ↑↓, P<0.05; ↑↓, P<0.01 (Dunnett's test)

体重及び体重増加量について対照群と投与群の間に統計学的有意差が散見されたが, 偶発的なものと考えられ, 検体投与の影響とは考えられなかった。

摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量を投与開始後 13 週までは毎週, その後は 4 週ごとに測定した。投与開始後 13 週までの食餌効率も算出した。

摂餌量について統計学的有意差の認められた検査週を表 4 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 4. 摂餌量

検査週	性別及び投与量 (mg/kg/日)					
	雄			雌		
	0.075	0.75	7.5	0.075	0.75	7.5
1			↓95			
12					↓96	
13	↑105	↑105				
21			↓96			
33			↓92			
37			↓94			
41			↓90			
57			↓93			
81		↑113				
89			↓84			

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

統計学的有意差：↑↓, P<0.05；↑↓, P<0.01 (Dunnett's test)

摂餌量について対照群と投与群の間に統計学的有意差が散見されたが、偶発的なものと考えられ、検体投与の影響とは考えられなかった。

[申請者注：7.5 mg/kg/日群の雄において投与期間中有意な摂餌量の減少が観察されたが、体重及び食事効率には明らかな変化は観察されなかったことから、毒性学的に意義はないと判断された。]

投与群雄雌の食餌効率に異常はなかった。

血液学的検査；投与 13, 27, 53 及び 79 週に各群各性 10 例について、投与 96 週に雌の全生存動物について、投与 99 週に雄の全生存動物について頸静脈から採血した。これらの血液について以下の項目を測定した。

赤血球数, 血色素量, ヘマトクリット, 平均赤血球血色素濃度, 平均赤血球血色素量, 平均赤血球容積, 血小板数, 白血球数, 白血球百分比 (分葉好中球, リンパ球, 単球, 好酸球, 好塩基球), 血球形態, プロトロンビン時間, 活性化部分トロンボプラスチン時間

統計学的有意差または傾向の認められた項目を表 5 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 5. 血液学的検査

検査項目	検査週	性別及び投与量 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		0.075	0.75	7.5	0.075	0.75	7.5
血色素量	96						
ヘマトクリット	96						
平均赤血球容積	13						
	79						
	96						
	99						
平均赤血球血色素量	13						
	27						
	79						
	96						
	99						
血小板数	13						
	53						
単球 (絶対数)	53						
好塩基球 (絶対数)	96						
リンパ球 (相対数)	53						
単球 (相対数)	53						
好塩基球 (相対数)	96						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

<> : 統計学的有意差はないが参考値として記載

* : 対照群の測定値が 0 であるため、投与群の測定値を記載

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$, $P < 0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P < 0.01$ (Dunnett's test)

7.5 mg/kg/日群の雌雄で投与 79 週以後に平均赤血球容積及び平均赤血球血色素量の有意な減少または減少傾向が認められた。しかし、これらの変化は軽度であり、その他に関連する変化が認められなかったことから、毒性所見とは考えられなかった。その他の有意な変化は検査時期にわたる一貫した傾向がないか、または用量依存性がないことから、偶発的なものと考えられた。

血液生化学検査 ; 投与 27, 53, 79, 99 (雄) 及び 96 (雌) 週に各群各性 10 例について頸静脈から採血した。分離した血清について以下の項目を測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

血糖，尿素窒素，クレアチニン，総蛋白，アルブミン，グロブリン，アルブミン／グロブリン比，総ビリルビン，総コレステロール，トリグリセライド，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ，アラニンアミノトランスフェラーゼ，アルカリホスファターゼ， γ -グルタミルトランスペプチダーゼ，カルシウム，無機リン，ナトリウム，カリウム，塩素

統計学的有意差の認められた項目を表 6 に示す。

表 6. 血液生化学検査

検査項目	検査週	性別及び投与量 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		0.075	0.75	7.5	0.075	0.75	7.5
血糖	27						
総蛋白	27						
総ビリルビン	79						
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	27						
	96						
	99						
アラニンアミノトランスフェラーゼ	96						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

統計学的有意差： $\uparrow\downarrow$, $P < 0.05$ ； $\uparrow\downarrow$, $P < 0.01$ (Dunnett's test)

7.5 mg/kg/日群の雌雄で投与 27,96 及び 99 週にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの有意な減少が認められた。しかし，これらの変化は軽度であり，その他に関連する変化が認められなかったことから，毒性所見とは考えられなかった。その他の有意な変化は検査時期にわたる一貫した傾向がないか，または用量依存性がないことから，偶発的なものと考えられた。

尿検査；血液生化学検査と同時期に採取した尿について以下の項目を検査した。

外観，尿量，比重，pH，蛋白質，糖，ケトン体，ビリルビン，潜血，ウロビリノーゲン，尿沈渣鏡検

統計学的有意差の認められた項目を表 7 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 7. 尿検査

検査項目	検査週	性別及び投与量 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		0.075	0.75	7.5	0.075	0.75	7.5
pH	27						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

統計学的有意差： $\uparrow\downarrow$, $P<0.05$ ； $\uparrow\downarrow$, $P<0.01$ (Dunnett's test)

尿 pH について統計学的に有意な変化が認められたが、用量依存性はなく、偶発的なものと考えられた。したがって、検体投与の影響はなかった。

眼科学的検査；投与開始前、投与 27, 52 及び 95 週時に全生存動物について間接検眼鏡により眼科学的検査を実施した。[申請者注：対照群と投与群間の比較には Fisher の直接確率計算法を 5 及び 1% の有意水準で申請者が実施した。]

検体投与の影響はなかった。

臓器重量；26 及び 52 週間投与の途中計画殺時、並びに 98 (雄) 及び 95 (雌) 週間投与後の最終屠殺時に各群各性 10 匹について以下の臓器重量を測定し対体重比及び対脳重量比を算出した。

副腎 (両側), 脳, 精巣上体 (両側), 心臓, 腎臓 (両側), 肝臓, 卵巣 (両側), 下垂体, 前立腺, 脾臓, 精のう (両側), 精巣 (両側), 胸腺, 甲状腺 (上皮小体を含む, 両側), 子宮及び子宮頸管

対照群に比し統計学的有意差の認められた臓器を表 8 に示す。

表 8. 臓器重量

臓器		検査週	性別及び投与量(mg/kg/日)					
			雄			雌		
			0.075	0.75	7.5	0.075	0.75	7.5
心臓	絶対重量	96						
下垂体	対体重比	53						
脾臓	絶対重量	27						
	対脳重比	27						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

統計学的有意差： $\uparrow\downarrow$, $P<0.05$ ； $\uparrow\downarrow$, $P<0.01$ (Dunnett's test)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

いくつかの臓器重量について対照群と投与群の間に統計学的有意差が認められたが、これらの変化はすべて対応する病理組織学的所見がないことから、偶発的なものと考えられた。

肉眼的病理検査；すべての動物について剖検した。

対照群に比し統計学的に有意に変動した所見または検体投与に関連すると考えられる所見を表9に示す。

表9. 肉眼的病理検査

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
全 動 物	臓器/検査動物数		80	80	80	80	80	80	80	80
	外観	眼脂								
	副腎	肥大								
	脳	視床下部圧迫								
	肝臓	赤色点/斑								
	腎臓	びまん性明調化								
	下垂体	腫瘍								
	脾臓	肥大								
	皮膚	痂皮形成								
	乳腺	乳腺腫瘍								
		腫瘍								
	前胃	びらん/潰瘍								
		壁肥厚								

統計学的有意差：↑↓, P<0.05；↑↓, P<0.01 (Fisherの直接確率計算法)

7.5 mg/kg/日群の雌で前胃のびらん/潰瘍及び壁肥厚の発生頻度が増加傾向を示し、これらの変化は病理組織検査において、胃に観察されたびらん/潰瘍、慢性活動性炎症、びまん性過形成に対応すると考えられた。

そのほかに認められた肉眼所見はいずれも本系統の老齢ラットにおいて一般的に観察される変化であると判断された。

[申請者注：7.5 mg/kg/日群の雄で、外観の眼脂が有意に増加したが、他の検査において対応する変化がないことから検体投与の影響ではないと判断された。さらに同群雄において脾臓の肥大が有意に増加したが、病理組織学的に異常はなかったことから、検体投与との関連性はないと判断された。]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織を採取し中性緩衝 10%ホルマリンで固定した。

副腎（両側）、大動脈、脳、盲腸、子宮頸管、結腸、十二指腸、精巣上体（両側）、食道、眼（両側）、大腿骨及び骨髄（遠位端関節面）、ハーダー腺、心臓、回腸、空腸、腎臓（両側）、肉眼的異常部位、肝臓、肺及び主要気管支、リンパ節（顎下部及び腸間膜）、乳腺部（雌のみ）、腫瘍及び周辺組織、骨格筋、視神経（両側）、卵巣（両側）、膵臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺（顎下、両側）、坐骨神経、精のう（両側）、皮膚、脊髄（頸部、胸部、腰部）、脾臓、胸骨及び骨髄、胃、精巣（両側）、胸腺、甲状腺／上皮小体（両側）、舌、気管、膀胱、子宮、陰

対照群及び 7.5 群の全例、並びに 0.075 及び 0.75 群の投与期間中の死亡・屠殺動物を対象として、上記の固定組織を病理組織学的検査に供した。0.075 及び 0.75 mg/kg/日群の計画屠殺動物では肉眼的異常部位、副腎、腫瘍、肺、肝臓、腎臓及び胃を検査した。

[非腫瘍性病変]

主要な非腫瘍性病変を表 10 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 10.非腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
全 動 物	臓器/検査動物数									
	副腎	皮質過形成								
	臓器/検査動物数									
	肝臓	肝細胞変異巢 (好塩基性)								
		単核細胞浸潤								
	臓器/検査動物数									
	腎臓	腎盂鉍質沈着								
	臓器/検査動物数									
	肺	異物								
	臓器/検査動物数									
	腺胃	うっ血								
	臓器/検査動物数									
	前胃	びらん/潰瘍								
		慢性活動性炎症								
		びまん性過形成								
	臓器/検査動物数									
	下垂体	過形成								
	臓器/検査動物数									
	子宮	内膜のう胞状過形成								

副腎、肺、肝臓、腎臓、腺胃及び前胃以外は対照群と高投与群間でのみ統計検定を実施した。

統計学的有意差：↕, P<0.05；↕↕, P<0.01 (Fisher の直接確率計算法)

検体投与による変化が 7.5 mg/kg/日群雌の前胃に認められたが、それらの発生頻度と病変の平均程度を発がん性試験群 (試験途中計画殺動物を除く) について表 11 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 11. 雌ラットの検体投与による非腫瘍性前胃病変

性別	雌			
	0	0.075	0.75	7.5
用量群 (mg/kg/日)				
検査動物数	60	60	60	60
びらん/潰瘍				
慢性活動性炎症				
びまん性過形成				

括弧内の数値は病変の平均発生率(%)

統計学的有意差: $\uparrow\downarrow$, $P<0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P<0.01$ (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

雌の前胃におけるびらん/潰瘍、慢性活動性炎症及びびまん性過形成については、検体の直接刺激による変化と考えられた。雄においてはこれらの病変の頻度と程度に対照群と投与群間に差は認められなかった。

その他の非腫瘍性変化は、用量依存性がないこと、頻度が減少方向であることから検体投与の影響とは判断しなかった。

[腫瘍性病変]

すべての腫瘍性病変を表 15 (後出) に示す。いずれの所見の発生頻度についても統計学的有意差は認められなかった。

表 13 に示すように発がん性試験群において、7.5 mg/kg/日群雌の甲状腺にろ胞細胞腺腫が 3/60 例(5.0%)、ろ胞細胞癌が 2/60 例(3.3%)、それらの合計発生頻度が 5/60 例(8.3%)認められた。一方、これらの腫瘍が対照群 (0/60 例) に発生しなかったところから、両病変の合計発生頻度に統計学的有意差が計算された。しかし、表 12 の背景データに示すように対照群の雌ラットに甲状腺ろ胞細胞腺腫の発生がなかったことがむしろ稀であり、各投与群の各甲状腺腫瘍の発生率は背景データの上限以下であった。また、雄にはこれらの腫瘍発生頻度に異常がなかったこと、甲状腺の非腫瘍性病変の種類、頻度及び程度に対照群と投与群間に差を認めなかったことを総合的に判断すると、本試験におけるこれらの腫瘍発生が検体投与の影響であるとは考えられなかった。

表 12. 甲状腺ろ胞細胞腺腫の背景データ (SD 系雌ラット)

試験	A	B	C
ろ胞細胞腺腫	14.5a (2.6)	5.0 (1.2)	4.0 (0.8)
ろ胞細胞癌	5.8 (1.1)	1.7 (0.1)	8.5 (1.1)

a: 最大発生率(%), 括弧内の数値は病変の平均発生率(%)

試験 A: Charles river LAB.

試験 B: Covance, Madison

試験 C: Covance, Vienna

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 13. 甲状腺ろ胞細胞腫瘍の発生頻度

性別	雄				雌			
	0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
用量群(mg/kg/日)								
検査動物数	60	49	43	60	60	43	47	60
ろ胞細胞腺腫								
ろ胞細胞癌								
腺腫及び癌								

括弧内の数値は病変の平均発生率(%)

統計学的有意差：↑↓, P<0.05；↑↓, P<0.01 (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

雄ラットの前胃腫瘍性病変を表 14 に示す。7.5 及び 0.75 mg/kg/日群の各雄 2 例の前胃において扁平上皮細胞腫瘍（扁平上皮乳頭腫及び扁平上皮癌）が認められた。前胃におけるこれらの腫瘍の発生はおおむね背景データ内(背景データ：平均 3%)であり、対照群及び投与群間に差は認められなかった。また、表 10 に示すように前胃の前癌病変（異形成を伴う重度過形成）がみられなかったこと、これらの投与群の発生頻度に用量依存性がないことから、これらの腫瘍の発生が検体投与に関連するとは考えられなかった。[申請者注：なお、前述したように雌の前胃において慢性活動性炎症及びびまん性過形成の発生頻度の増加が 7.5 mg/kg/日群にみられたが、雌には腫瘍性病変は、いずれの投与群においても見られなかった。]

表 14. 雄ラットの前胃腫瘍性病変

性別	雄			
	0	0.075	0.75	7.5
用量群 (mg/kg/日)				
検査動物数	60	60	60	60
扁平上皮乳頭腫(B)				
扁平上皮癌(M)				

括弧内の数値は病変の平均発生率(%)

統計学的有意差：↑↓, P<0.05；↑↓, P<0.01 (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

以上の結果から、ラットを用いた強制経口投与による 24 カ月間反復経口投与毒性・発がん性併合試験における毒性影響として、7.5 mg/kg/日群の肉眼的病理検査において雌で前胃のびらん／潰瘍及びび壁肥厚が認められ、病理組織検査において、雌で前胃の非腫瘍性病変(びらん／潰瘍、慢性活動性炎症、びまん性過形成)が認められた。したがって、無毒性量 (NOAEL) は雄で 7.5 mg/kg/日、雌で 0.75 mg/kg/日群であると判断された。

また、催腫瘍性はないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

表 15. 腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌				
	用量群 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5	
53 週 途 中 計 画 殺 動 物	臓器/検査動物数										
	甲状腺	C細胞腺腫(B)									
	臓器/検査動物数										
	下垂体	腺腫(B)									
	臓器/検査動物数										
	皮膚	線維腫(B)									
		角化棘細胞腫(B)									
		線維肉腫(M)									
		無色素性黒色腫(M)									
	臓器/検査動物数										
	乳腺	線維腺腫(B)									
		癌(M)									
	臓器/検査動物数										
	子宮	内膜間質ポリープ(B)									
	臓器/検査動物数										
	造血器腫瘍	悪性リンパ腫(M)									

(B) ; 良性腫瘍 (M) ; 悪性腫瘍

副腎, 肺, 肝臓, 腎臓, 腺胃及び前胃以外は対照群と高投与群間でのみ統計検定を実施した。

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$, $P < 0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P < 0.01$ (Fisher の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 15. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	用量群 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
最終 計画 殺 動物	臓器/検査動物数									
	副腎, 皮質	皮質腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	副腎, 髄質	褐色細胞腫(B)								
		悪性褐色細胞腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	肝臓	肝細胞腺腫(B)								
		肝細胞癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	腎臓	尿細管腺腫(B)								
		脂肪肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	腺胃	癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	前胃	扁平上皮乳頭腫(B)								
		扁平上皮癌(M)								
		線維肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	脳	顆粒細胞腫(B)								
		神経膠星状細胞腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	甲状腺	C細胞腺腫(B)								
		ろ胞細胞腺腫(B)								
		C細胞癌(M)								
		ろ胞細胞癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	下垂体	腺腫(B)								
		癌(M)								
臓器/検査動物数										
膵臓	腺房細胞腺腫(B)									
	島細胞腺腫(B)									
	島細胞腺癌(M)									

(B) ; 良性腫瘍 (M) ; 悪性腫瘍

副腎, 肺, 肝臓, 腎臓, 腺胃及び前胃以外は対照群と高投与群間でのみ統計検定を実施した。

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$, $P < 0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P < 0.01$ (Fisher の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 15. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	用量群 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
最終 計 画 殺 動 物	臓器/検査動物数									
	皮膚	線維腫(B)								
		扁平上皮乳頭腫(B)								
		角化棘細胞腫(B)								
		基底細胞腫(B)								
		線維肉腫(M)								
		無色素性黒色腫(M)								
		扁平上皮癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	精巣	間細胞腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	乳腺	線維腺腫(B)								
		癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	子宮頸管	内膜間質ポリープ(B)								
	臓器/検査動物数									
	子宮	内膜間質ポリープ(B)								
	臓器/検査動物数									
	腔	顆粒細胞腫(B)								
	臓器/検査動物数									
造血器腫瘍	悪性リンパ腫(M)									

(B) ; 良性腫瘍 (M) ; 悪性腫瘍

副腎, 肺, 肝臓, 腎臓, 腺胃及び前胃以外は対照群と高投与群間でのみ統計検定を実施した。

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$, $P < 0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P < 0.01$ (Fisher の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

表 15. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	用量群 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
死亡・ 切迫殺動物	臓器/検査動物数									
	副腎, 皮質	皮質腺腫(B)								
		皮質癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	副腎, 髄質	褐色細胞腫(B)								
		悪性褐色細胞腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	肝臓	肝細胞腺腫(B)								
		肝細胞癌(M)								
		血管肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	腎臓	尿細管腺腫(B)								
		尿細管癌(M)								
		移行上皮癌(M)								
		腎臓間葉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	前胃	扁平上皮癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	脳	神経膠星状細胞腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	甲状腺	C細胞腺腫(B)								
		ろ胞細胞腺腫(B)								
		C細胞癌(M)								
		ろ胞細胞癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	上皮小体	腺腫(B)								
臓器/検査動物数										
胸腺	上皮性胸腺腫(B)									
	胸腺癌(M)									
臓器/検査動物数										
脾臓	血管肉腫(M)									

(B) ; 良性腫瘍 (M) ; 悪性腫瘍

副腎, 肺, 肝臓, 腎臓, 腺胃及び前胃以外は対照群と高投与群間でのみ統計検定を実施した。

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$, $P<0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P<0.01$ (Fisher の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 15. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	用量群 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
死 亡 ・ 切 迫 殺 動 物	臓器/検査動物数									
	腸間膜リン パ節	血管肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	下垂体	腺腫(B)								
		癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	心臓	心内膜神経鞘腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	膵臓	腺房細胞腺腫(B)								
		島細胞腺腫(B)								
		腺房細胞腺癌(M)								
		島細胞腺癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	皮膚	骨外性骨腫(B)								
		線維腫(B)								
		扁平上皮乳頭腫(B)								
		角化棘細胞腫(B)								
		基底細胞腫(B)								
		悪性神経鞘腫(M)								
		線維肉腫(M)								
		無色素性黒色腫(M)								
		扁平上皮癌(M)								
		ジンバル腺癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	乳腺	線維腺腫(B)								
		癌(M)								
		腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
前立腺	癌(M)									
臓器/検査動物数										
精巣	間細胞腫(B)									
臓器/検査動物数										
子宮頸管	内膜間質ポリープ (B)									
	顆粒細胞腫(B)									

(B) ; 良性腫瘍 (M) ; 悪性腫瘍

副腎, 肺, 肝臓, 腎臓, 腺胃及び前胃以外は対照群と高投与群間でのみ統計検定を実施した。

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$, $P < 0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P < 0.01$ (Fisher の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 15. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	用量群 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
死 亡 ・ 切 迫 殺 動 物	臓器/検査動物数									
	子宮	内膜間質ポリープ(B)								
		癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	膣	間質ポリープ(B)								
		間質肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	造血器腫瘍	悪性リンパ腫(M)								
		組織球性肉腫(M)								
		LGL 白血病(M)								
		顆粒球性白血病(M)								
		悪性線維性組織球腫(M)								
		肥満細胞性白血病(M)								
	臓器/検査動物数									
腹腔	線維肉腫(M)									

(B) ; 良性腫瘍 (M) ; 悪性腫瘍

副腎, 肺, 肝臓, 腎臓, 腺胃及び前胃以外は対照群と高投与群間でのみ統計検定を実施した。

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$, $P < 0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P < 0.01$ (Fisher の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 15. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	用量群 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
全 動 物	臓器/検査動物数									
	副腎, 皮質	皮質腺腫(B)								
		皮質癌(M)								
	臓器/検査動物									
	副腎, 髓質	褐色細胞腫(B)								
		悪性褐色細胞腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	肝臓	肝細胞腺腫(B)								
		肝細胞癌(M)								
		血管肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	腎臓	尿細管腺腫(B)								
		尿細管癌(M)								
		移行上皮癌(M)								
		腎臓間葉腫(M)								
		脂肪肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	腺胃	癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	前胃	扁平上皮乳頭腫(B)								
		扁平上皮癌(M)								
		線維肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	脳	顆粒細胞腫(B)								
		神経膠星状細胞腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	甲状腺	C細胞腺腫(B)								
		ろ胞細胞腺腫(B)								
C細胞癌(M)										
ろ胞細胞癌(M)										
臓器/検査動物数										
上皮小体	腺腫(B)									

(B) ; 良性腫瘍 (M) ; 悪性腫瘍

副腎, 肺, 肝臓, 腎臓, 腺胃及び前胃以外は対照群と高投与群間でのみ統計検定を実施した。

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$, $P < 0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P < 0.01$ (Fisher の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 15. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	用量群 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
全 動 物	臓器/検査動物数									
	胸腺	上皮性胸腺腫(B)								
		胸腺癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	脾臓	血管肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	腸間膜リン パ節	血管肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	下垂体	腺腫(B)								
		癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	心臓	心内膜神経鞘腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	膵臓	腺房細胞腺腫(B)								
		島細胞腺腫(B)								
		腺房細胞腺癌(M)								
		島細胞腺癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	皮膚	骨外性骨腫(B)								
		線維腫(B)								
		扁平上皮乳頭腫(B)								
		角化棘細胞腫(B)								
		基底細胞腫(B)								
		悪性神経鞘腫(M)								
		線維肉腫(M)								
		無色素性黒色腫(M)								
		扁平上皮癌(M)								
	ジンバル腺癌(M)									
臓器/検査動物数										
乳腺	線維腺腫(B)									
	癌(M)									
	腺腫(B)									

(B) ; 良性腫瘍 (M) ; 悪性腫瘍

副腎, 肺, 肝臓, 腎臓, 腺胃及び前胃以外は対照群と高投与群間でのみ統計検定を実施した。

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$, $P < 0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P < 0.01$ (Fisher の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

表 15. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	用量群 (mg/kg/日)		0	0.075	0.75	7.5	0	0.075	0.75	7.5
全 動 物	臓器/検査動物数									
	前立腺	癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	精巣	間細胞腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	子宮頸管	内膜間質ポリープ (B)								
		顆粒細胞腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	子宮	内膜間質ポリープ(B)								
		癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	膣	顆粒細胞腫(B)								
		間質ポリープ(B)								
		間質肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	造血器腫瘍	悪性リンパ腫(M)								
		組織球性肉腫(M)								
		LGL 白血病(M)								
		顆粒球性白血病(M)								
		悪性線維性組織球腫(M)								
臓器/検査動物数										
腹腔	線維肉腫(M)									
合 計	検査動物数									
	腫瘍数	良性								
		悪性								
	腫瘍総数									
	担腫瘍動物数	良性								
悪性										
担腫瘍動物数										

(B) ; 良性腫瘍 (M) ; 悪性腫瘍

副腎, 肺, 肝臓, 腎臓, 腺胃及び前胃以外は対照群と高投与群間でのみ統計検定を実施した。

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$, $P < 0.05$; $\uparrow\downarrow$, $P < 0.01$ (Fisher の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(2)マウスを用いた強制経口投与による 78 週間発がん性試験 (資料 12)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2001 年

検体純度:

供試動物: 系マウス (), 1 群雌雄各 60 匹,
投与開始時 40~46 日齢, 投与開始時体重; 雄 25.2~34.4 g, 雌 15.6~26.7 g

投与期間: 78 週間 (1997 年 12 月 24 日~1999 年 7 月 7 日)

投与方法: 検体を に懸濁し 0, 0.6, 6 及び 60 mg/kg/日の投与用量 (投与容量は 5 mL/kg) で, 78 週間に亘り胃カテーテルで毎日強制経口投与した。強制経口投与を開始後, 60 mg/kg/日群の死亡率が高くなったことから, 投与量を投与 43 日に 50 mg/kg/日, 投与 325 日に 30 mg/kg/日に低下させた。投与液調製は 3 週間毎に実施した。各個体の投与量は直近の体重に基づいて計算した。

用量設定根拠;

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態及び死亡率を毎日 2 回観察し, 触診を含むより詳細な観察を毎週 1 回実施した。

試験終了時 (投与 78 週) の死亡率を表 1 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 1. 死亡率

投与量 (mg/kg)		0	0.6	6	60/50/30 ^b
死亡率	雄	6/60 ^a (10)	13/60(22)	12/60(20)	↑38/60(63)
	雌	15/60(25)	16/60(27)	14/60(23)	↑28/60(47)

統計学的有意差：↑↓ p<0.05, ↑↓ p<0.01 (Cox-Tarone Test)

a：死亡動物数 / 投与動物数

括弧内の数字は死亡の発生率 (%) を示す。

b：高用量は投与開始時に 60 mg/kg/日であったが、投与 43 日 (投与 7 週) に 50 mg/kg/日に、投与 325 日 (投与 47 週) に 30 mg/kg/日に低下させた。

60 mg/kg/日群雌雄における死亡が予想された以上に認められたため、高用量を投与 43 日 (投与 7 週) に 50 mg/kg/日に下げた。その後死亡例の急増は改善されたものの、他の用量群に比し相変わらず死亡数の漸増傾向が特に雄で持続し、試験期間終了時に十分な発がん性評価に足る動物数の確保が危ぶまれたことから、投与 325 日 (投与 47 週) に高用量を 30 mg/kg/日に再度低下させた。その結果、死亡数の増加は他の用量群と同程度に改善された。ほとんどの動物で死因を特定できなかった。60/50/30 mg/kg/日群の雌雄において 78 週間投与終了後の死亡率が有意な高値を示し、投与との関連性がみられた。

一般状態において投与に関連すると考えられる症状を表 2 に示す。

表 2. 一般状態

検査時期	性別	雄				雌			
	投与量(mg/kg/日)	0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
1-42 日	所見/検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
	運動失調								
	行動不活発								
	糞便減少								
	異常呼吸音								
	呼吸不整								
	努力性呼吸								
	低体温								
	耳介蒼白								
	全身蒼白								
	被毛粗剛								

統計学的有意差：↑↓ p<0.05, ↑↓ p<0.01 (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 2. 一般状態(続き)

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与量(mg/kg/日)	0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
43- 324 日	所見/検査動物数	60	60	60	50	59	59	60	56
	円背位								
	遠位尾部浮腫								
	運動失調								
	行動不活発								
	接触到敏感								
	口部透明分泌物								
	糞便減少								
	無排便								
	眼球変色/暗赤色								
	眼瞼半開 (periorbital squinting)								
	異常呼吸音								
	呼吸不整								
	努力性呼吸								
	低体温								
	耳介蒼白								
全身蒼白									
被毛粗剛									
被毛黄色化									

統計学的有意差：↑↓ p<0.05, ↑↓ p<0.01 (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

60 mg/kg/日群で投与開始から投与 42 日までに投与に関連した様々な症状(運動失調, 行動不活発, 糞便減少, 異常呼吸音, 低体温, 全身蒼白)が認められた。投与 43 日に高用量を 50mg/kg/日に低下させたものの, それまでに認められた症状の発生頻度が増加し, さらにその他の症状(円背位, 接触到敏感, 口部透明分泌物, 無排便, 眼球変色/暗赤色)も認められるようになった。投与 325 日に高用量を 30mg/kg/日に低下させたところ, これらの症状の発生頻度の減少または消失が認められた。

[申請者注: 統計学的解析を実施したところ投与 1-42 日あるいは 43-324 日に統計学的に有意に増加した臨床症状として円背位, 運動失調, 行動不活発, 糞便減少, 異常呼吸音, 呼吸不整, 低体温, 全身蒼白, 遠位尾部浮腫, 口部透明分泌物, 無排便, 努力性呼吸, 被毛粗剛, 被毛黄色化がみられ検体投与との関連性が推察された。30 mg/kg/日群に低下させた 325 日以降の臨床症状には統計学的に有意な増加は観

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

察されなかった。]

6 mg/kg/日以下の投与群には雌雄とも死亡率及び一般状態において検体投与による影響はなかった。

体重変化；投与期間中全動物の体重を投与 14 週まで毎週 1 回，その後は 4 週に 1 回測定した。

体重及び体重増加量について統計学的有意差の認められた検査週を表 3 に示す。

表 3. 体重及び体重増加量

検査項目	検査週	投与量 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		0.6	6	60/50/30	0.6	6	60/50/30
体重	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
	9						
	10						
	11						
	12						
	13						
	14						
	18						
	22						
	26						
30							
38							

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値
 統計学的有意差: ↑↓ p<0.05 (Dunnett's test)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 3. 体重及び体重増加量(続き)

検査項目	検査週	投与量 (mg/kg/日)					
		雄			雌		
		0.6	6	60/50/30	0.6	6	60/50/30
体重増加量	1-2						
	2-3						
	4-5						
	5-6						
	6-7						
	9-10						
	11-12						
	12-13						
	14-18						
	18-22						
	22-26						
	26-30						
	30-34						
	34-38						
	42-46						
	54-58						
58-62							
70-74							

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値 (但し, #で示した有意差は対照群あるいは投与群の値が 0 あるいは減少値のため算出不可)
統計学的有意差: $\uparrow \downarrow p < 0.05$ (Dunnett's test)

投与群の雄では体重に一貫性のある有意な変化はなく、体重増加量の有意な変化が散見されたが、体重の有意な変化に直接的に関連することはなく、毒性影響とは考えられなかった。

すべての投与群の雌で投与期間の前半に有意な高体重が認められ、体重増加量の有意な増加も認められた。体重に有意差の認められる検査時期が用量依存性に増加したことから、検体投与との関連が示唆されるが、このような影響は一過性であり、毒性影響であるとは考えられなかった。投与 47 週に高用量を 30 mg/kg/日に低下させた後は、雌の体重に有意差は認められなかった。

したがって、雌雄いずれにも投与による毒性影響は認められなかった。

摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量を投与開始後 13 週までは毎週、その後は 4 週ごとに測定した。投与開始後 13 週までの食餌効率も算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

摂餌量について統計学的有意差の認められた検査週を表 4 に示す。

表 4. 摂餌量

検査週	投与量 (mg/kg/日)					
	雄			雌		
	0.6	6	60/50/30	0.6	6	60/50/30
1						
2						
3						
4						
6						
25						
37						
53						
61						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値
統計学的有意差: $\uparrow\downarrow p<0.05$ (Dunnett's test)

すべての投与群の雄で摂餌量の有意な変化が散見され、体重増加量の変化に関連していたが、投与による影響とは考えられなかった。

60/50/30 mg/kg/日群の雌で投与 1-4 週に摂餌量が有意に増加した。6 mg/kg/日群の雌で投与 1 週に、0.6 mg/kg/日群の雌で投与 3 週に摂餌量が有意に増加した。これらの変化は検体投与に関連すると考えられるものの、健康状態に有害影響を及ぼすことはなく、毒性学的意義があるとは考えられなかった。投与 7 週に高用量を 50 mg/kg/日に低下させた後は、摂餌量の有意な増加は認められなかった。したがって、雌雄いずれにも摂餌量について投与による毒性影響は認められなかった。

食餌効率について投与による影響は認められなかった。

血液学的検査；78 週間投与終了後に雌雄の全生存例について眼窩静脈から採血した。これらの血液について以下の項目を測定した。

赤血球数，血色素量，ヘマトクリット，平均赤血球血色素濃度，平均赤血球血色素量，平均赤血球容積，血小板数，白血球数，白血球百分比，血球状態，統計学的有意差または傾向の認められた項目を表 5 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

表 5. 血液学的検査成績

検査項目	投与量 (mg/kg/日)					
	雄			雌		
	0.6	6	60/50/30	0.6	6	60/50/30
赤血球数						
平均赤血球容積						
平均赤血球血色素量						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

統計学的有意差: $\uparrow \downarrow p < 0.05$ (Dunnett's test)

<>: 統計学的有意差はないが参考値として記載

雌の 60/50/30 mg/kg/日群において平均赤血球容積及び平均赤血球血色素量が減少した。これらの所見は軽度に小型の赤血球が産生されたことを示唆しているが、当該投与群で赤血球数が増加傾向を示したため、血色素量及びヘマトクリットへの影響はなかった。したがって、これらの変化は検体投与による毒性影響とは判断しなかった。

その他の雌雄の投与群に検体投与の影響はなかった。

臓器重量; 78 週間投与終了後の最終解剖時に各群雌雄各 10 匹について以下の臓器重量を測定し対体重比及び対脳重量比を算出した。

副腎 (両側), 脳, 精巣上体 (両側), 心臓, 腎臓 (両側), 肝臓及び胆嚢, 卵巣 (両側), 下垂体, 前立腺, 脾臓, 精のう (両側), 精巣 (両側), 胸腺, 甲状腺 (上皮小体を含む, 両側), 子宮及び子宮頸管

対照群に比し有意差が見られた臓器重量を表 6 に示す。

表 6. 臓器重量

検査項目		投与量(mg/kg/日)					
		雄			雌		
		0.6	6	60/50/30	0.6	6	60/50/30
脳	絶対重量						
甲状腺	絶対重量						
	対体重比						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

統計学的有意差: $\uparrow \downarrow p < 0.05$ (Dunnett's test)

60/50/30 mg/kg/日群では、雌で脳の絶対重量が低下し、雄の甲状腺の絶対重量及

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

び対体重比が低下した。

6 mg/kg/日群の雄で甲状腺の対体重比が低下した。

[申請者注：これらの変化は病理組織学的異常を伴っていないところから偶発的変化と判断した。]

その他の臓器重量に異常はなかった。

肉眼的病理検査；すべての動物について剖検した。

対照群に比し有意に増減したか、あるいは特記すべき所見を表7に示す。

表7. 肉眼的病理検査

所見／ 投与量(mg/kg/日)	雄				雌			
	0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
肺：白色斑・点 腫瘍								
前胃：壁肥厚 白色斑・点 腫瘍								
膨隆部								
卵巣：のう胞								
皮膚：皮下水腫								
腎臓：のう胞								
外陰部被毛汚濁								
消化管拡張								
脾臓：腫大								

統計学的有意差：↑↓ p<0.05, ↑↓ p<0.01 (Fisher-Irwin の直接確率計算法)

60/50/30 mg/kg/日群の雄及び／または雌において肺の白色斑・点及び腫瘍が対照群に比し有意差はなかったものの多く観察され、また、前胃部の壁肥厚、白色斑・点、腫瘍及び膨隆部が本群のみに認められた。これらの所見は病理組織学的異常を伴っていたところから検体投与の影響と判断した。

6 mg/kg/日以下の投与群の雌雄において検体投与による異常はなかった。

[申請者注：60/50/30 mg/kg/日群の雄において消化管拡張が13例にみられ発生頻度の有意な増加が観察されたが、この変化の観察された動物において病理組織学的検査で認められた胃の変化との間には明らかな対応が認められなかったこと並びに雄のみの変化であることから、検体投与との関連性は明らかではないことから、偶発性変化であろうと判断された。]

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、以下の組織を採取し中性

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

緩衝 10%ホルマリンで固定した。

副腎(両側), 大動脈, 脳, 盲腸, 子宮頸管, 結腸, 十二指腸, 精巣上体 (両側), 食道, 眼 (両側), 大腿骨及び骨髄 (遠位端関節面), 胆嚢, ハーダー腺, 心臓, 回腸, 空腸, 腎臓 (両側), 肉眼的異常部位, 肝臓, 肺及び主要気管支, リンパ節 (顎下部及び腸間膜), 乳腺部 (雌のみ), 腫瘤及び周辺組織, 骨格筋, 視神経 (両側), 卵巣 (両側), 睪腺, 下垂体, 前立腺, 直腸, 唾液腺 (顎下, 両側), 坐骨神経, 精のう (両側), 皮膚, 脊髄 (頸部, 胸部, 腰部), 脾臓, 胸骨及び骨髄, 胃, 精巣 (両側), 胸腺, 甲状腺/上皮小体 (両側), 舌, 気管, 膀胱, 子宮, 膣

対照群及び 60/50/30 mg/kg/日群の動物全例, 並びに 0.6 mg/kg/日及び 6 mg/kg/日群の投与期間中の死亡・屠殺動物全例を対象として, 上記の固定組織について病理標本を作製し, 鏡検した。0.6 mg/kg/日及び 6 mg/kg/日群の最終計画殺動物は肉眼的異常部位, 腫瘤, 肺, 肝臓, 腎臓, 胃及びハーダー腺を検査した。

検体投与によると判断した変化を表 8 に示す。

表 8. 病理組織学的検査

所見/	雄				雌			
	0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
投与量 (mg/kg/日)								
検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60
肺: 細気管支肺胞腺腫								
細気管支肺胞癌								
細気管支肺胞腺腫/癌 ^a								
ハーダー腺: 腺腫								
前胃: 角化亢進								
扁平上皮過形成								
炎症性変化 ^b								
扁平上皮乳頭腫								
扁平上皮癌								
扁平上皮乳頭腫/癌								

統計学的有意差: $\uparrow\downarrow$ $p < 0.05$, $\uparrow\downarrow$ $p < 0.01$ (Fisher-Irwin の直接確率計算法)

a: 集計及び統計検定 (Fisher の直接確率計算法) を申請者が実施

b: 慢性炎症、慢性活動性炎症 (chronic-active inflammation) 及び潰瘍のいずれかの所見を持つ個体数を炎症性変化として申請者が集計し, 統計検定を実施した。

[非腫瘍性病変]

主要な非腫瘍性病変を表 9 (後出) に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

60/50/30 mg/kg/日群の雌雄で前胃の角化亢進及び扁平上皮過形成の発生頻度が増加した。これらの病変は検体の局所刺激に起因すると考えられる。

[申請者注：報告書では慢性炎症、慢性活動性炎症及び潰瘍の所見は個別に集計されていたが、これらの所見は病理組織学に炎症性変化として共通の組織変化と判断されることから、これらの所見のいずれかを持つ動物数を申請者が集計し、統計検定を実施したところ、雌雄ともに 60/50/30 mg/kg/日群において有意な増加が観察された。

60/50/30 mg/kg/日群の雌雄で肺の慢性活動性炎症 (Chronic active inflammation) の有意な増加が観察された。本変化は対照群との差は軽度であるが、雌雄ともに観察されており、通常の慢性炎症よりも強い炎症反応であることから、何らかの検体投与との影響が認められた。]

[腫瘍性病変]

すべての腫瘍性病変を表 10 (後出) に示す。

60/50/30 mg/kg/日群において、雌で肺の細気管支肺胞腺腫及び癌が対照群に比し増加し、剖検所見での白色斑・点及び腫瘍の頻度増加に対応していた。[申請者注：肺の細気管支肺胞腺腫あるいは癌を持つ個体を集計し、統計検定を実施したところ、60/50/30 mg/kg/日群の雄において統計学的に有意な差ではないが発生頻度の増加傾向が認められ、検体投与の影響が推察された。雌では肺の細気管支肺胞腺腫あるいは癌の発生数は有意な増加であった。]また、ハーダー腺腺腫が 60/50/30 mg/kg/日群の雌雄において対照群に比し有意に増加した。

肺の細気管支肺胞腺腫及び癌並びにハーダー腺腺腫の発生頻度の増加あるいは増加傾向については検体の主要代謝物であるニトロメタンによる影響であると考えられる。米国 NTP (National Toxicological Program) において B6C3F1 マウスを用いて実施したニトロメタンの 2 年間吸入試験では肺の細気管支肺胞腺腫及び癌、並びにハーダー腺癌の発生頻度が増加し、マウスにおける発がん性が示された

(NTP report series No. 461, 1997)。[申請者注：ラット代謝試験 (資料 代 1-1) では、クロルピクリンの主要排泄経路は呼気であり、呼気中の主要同定代謝物の $^{14}\text{CO}_2$ に加えて 10% AD 未満であるがニトロメタンも呼気中に排出されているのが確認され、マウスにおいても同様の傾向が認められた (資料 代 1-2)。なお、ハーダー腺についてはげっ歯類特有の臓器であり、ヒトにはない。したがって、本試験で観察されたマウスにおけるハーダー腺腺腫の発生頻度の増加がヒトに対するリスクとなる可能性はないと考えられる。]

60/50/30 mg/kg/日群において前胃の扁平上皮乳頭腫が雄 1 例、雌 6 例に、扁平上皮癌が雄 1 例、雌 3 例に観察され、扁平上皮乳頭腫及び扁平上皮癌単独では有意な差ではなかったが乳頭腫あるいは癌のいずれかを持つ個体の頻度が雌において対照群に比し有意に増加した。雌雄の前胃にみられた非腫瘍性病変 (角化亢進及び

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

扁平上皮過形成) がみられたことから、これらの腫瘍性病変は検体の局所刺激に起因すると考えられる。

[申請者注：前述したように、雌雄ともに 60/50/30 mg/kg/日群において前胃の炎症性変化の有意な増加が観察されたが、本変化は検体投与による粘膜に対する持続的な刺激があることを示唆しており、この持続的な刺激により粘膜上皮の増殖性変化を引き起こし、同群の前胃にみられた角化亢進、扁平上皮過形成に加えて扁平上皮腫瘍を発生した原因であろうと推察された。]

細胞増殖活性；78 週間投与後に対照群及び 60/50/30 mg/kg/日群のそれぞれ雌雄各 6 匹を対象として、ハーダー腺及び肺の細胞増殖活性を PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) 染色法で検査した。

細胞増殖活性の結果を表 11 に示す。

表 11. ハーダー腺と肺の細胞増殖活性 (PCNA 標識率)

性別	雄		雌	
	0	60/50/30	0	60/50/30
臓器/投与量 (mg/kg/日)				
ハーダー腺 ^a				
肺 ^b				

a：観察倍率 x200 で無作為に選択した 5 視野における S 期の標識細胞数。

b：観察倍率 x400 で無作為に選択した 10 視野における全標識細胞数。

統計学的有意差：↑↓ p<0.05 (Student's t-test)

60/50/30 mg/kg/日群の雌雄ともにハーダー腺及び肺の細胞増殖活性の亢進は示されなかった。

以上の結果から、マウスを用いた強制経口投与による 78 週間発がん性試験における毒性影響として、60/50/30 mg/kg/日群の雌雄で死亡率の増加及び毒性症状が認められ、前胃の角化亢進及び扁平上皮過形成が観察され、さらに雌雄の肺の細気管支肺胞腺腫及び癌、雌雄のハーダー腺腫の発生頻度が増加し、雌の前胃の扁平上皮乳頭腫/扁平上皮癌の発生頻度が増加した。[申請者注：60/50/30 mg/kg/日群の雌雄で肺の慢性活動性炎症 (Chronic active inflammation) の有意な増加が観察された。]雌雄とも 6 mg/kg/日群に異常は認められなかった。したがって、無毒性量 (NOAEL) は 6 mg/kg/日と判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

表 9.非腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量(mg/kg/日)		0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
全 動 物	臓器/検査動物数									
	ハーダー腺	慢性炎症								
	臓器/検査動物数									
	腎臓	のう胞								
		慢性炎症								
		慢性進行性腎症								
	臓器/検査動物数									
	肝臓	慢性炎症								
		慢性活動性炎症								
	臓器/検査動物数									
	肺	慢性炎症								
		慢性活動性炎症								
	臓器/検査動物数									
	腺胃	慢性炎症								
	臓器/検査動物数									
	前胃	角化亢進								
		扁平上皮過形成								
	臓器/検査動物数									
	眼	網様体鉾質沈着								
	臓器/検査動物数									
	腸間膜リンパ節	出血								
	臓器/検査動物数									
	副腎皮質	紡錘形細胞過形成								
		色素貪食細胞浸潤								
	臓器/検査動物数									
	回腸	アミロイド								
	臓器/検査動物数									
	顎下腺	慢性炎症								
臓器/検査動物数										
精のう	分泌亢進									
臓器/検査動物数										
卵巣	のう胞									

ハーダー腺、腎臓、肝臓、肺、腺胃及び前胃の病変は対照群と全投与群間で統計検定を実施し、その他の臓器の病変は対照群と 60/50/30 mg/kg/日群間で統計検定を実施した。

統計学的有意差：↑↓ p<0.05, ↑↓ p<0.01 (Fisher-Irwin の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 10. 腫瘍性病変

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量(mg/kg/日)		0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
最終 計画 殺 動物	臓器/検査動物数									
	肝臓	肝細胞腺腫(B)								
		血管腫(B)								
		肝細胞癌(M)								
		血管肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	肺	細気管支肺胞腺腫(B)								
		細気管支肺胞癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	前胃	扁平上皮乳頭腫(B)								
		扁平上皮癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	甲状腺	ろ胞細胞腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	腸間膜 リンパ節	血管腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	ハーダー腺	腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	下垂体	腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	皮膚	扁平上皮乳頭腫(B)								
		線維肉腫(M)								
		血管肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	精巣	間細胞腫(B)								
	臓器/検査動物数									
精巣上体	平滑筋腫(B)									

ハーダー腺, 腎臓, 肝臓, 肺, 腺胃及び前胃の病変は対照群と全投与群間で統計検定を実施し, その他の臓器の病変は対照群と 60/50/30 mg/kg/日群間で統計検定を実施した。

統計学的有意差: $\uparrow\downarrow p<0.05$, $\uparrow\downarrow p<0.01$ (Fisher-Irwin の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 10. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量(mg/kg/日)		0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
最終 計画 殺 動物	臓器/検査動物数									
	子宮 頸管	平滑筋腫(B)								
		内膜間質ポリープ(B)								
	臓器/検査動物数									
	子宮	血管腫(B)								
		平滑筋腫(B)								
		内膜間質ポリープ(B)								
	臓器/検査動物数									
	卵巣	腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	包皮	線維腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	リンパ	悪性リンパ腫(M)								
	造血器系	組織球性肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	骨(他部位)	扁平上皮癌(M)								

ハーダー腺, 腎臓, 肝臓, 肺, 腺胃及び前胃の病変は対照群と全投与群間で統計検定を実施し, その他の臓器の病変は対照群と 60/50/30 mg/kg/日群間で統計検定を実施した。

統計学的有意差: $\uparrow\downarrow$ $p<0.05$, $\uparrow\downarrow$ $p<0.01$ (Fisher-Irwin の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 10. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量(mg/kg/日)		0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
死亡・ 切迫殺動物	臓器/検査動物数									
	肝臓	肝細胞腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	肺	細気管支肺腺腫(B)								
		細気管支肺胞癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	腺胃	平滑筋肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	前胃	扁平上皮乳頭腫(B)								
		扁平上皮癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	副腎皮質	腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	ハーダー腺	腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	骨格筋	血管腫(B)								
		線維肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	皮膚	扁平上皮乳頭腫(B)								
		線維肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	乳腺 (雌)	癌(M)								
		未分化肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	子宮	血管腫(B)								
		平滑筋腫(M)								
		平滑筋肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	リンパ 造血器 系	悪性リンパ腫(M)								
		悪性線維性組織球腫 (M)								
組織球性肉腫(M)										
臓器/検査動物数										
ジンバ ル腺	扁平上皮癌(M)									
臓器/検査動物数										
皮下	線維肉腫(M)									
臓器/検査動物数										
胸腔	線維肉腫(M)									

対照群と全投与群間で統計検定を実施した。

統計学的有意差：↑↓ p<0.05, ↑↓ p<0.01 (Fisher-Irwin の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 10. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量(mg/kg/日)		0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
全 動 物	臓器/検査動物数		60	60	60	60	60	60	60	60
	肝臓	肝細胞腺腫(B)								
		血管腫(B)								
		肝細胞癌(M)								
		血管肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	肺	細気管支肺胞腺腫(B)								
		細気管支肺胞癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	腺胃	平滑筋肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	前胃	扁平上皮乳頭腫(B)								
		扁平上皮癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	甲状腺	ろ胞細胞腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	腸間膜リンパ節	血管腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	副腎皮質	腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	ハーダー腺	腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	下垂体	腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	骨格筋	血管腫(B)								
		線維肉腫(M)								

ハーダー腺、腎臓、肝臓、肺、腺胃及び前胃の病変は対照群と全投与群間で統計検定を実施し、その他の臓器の病変は対照群と 60/50/30 mg/kg/日群間で統計検定を実施した。

統計学的有意差：↑↓ p<0.05, ↑↓ p<0.01 (Fisher-Irwin の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 10. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量(mg/kg/日)		0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
全 動 物	臓器/検査動物数		60	15	17	60	60	20	13	60
	皮膚	扁平上皮乳頭腫(B)								
		線維肉腫(M)								
		血管肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	乳腺 (雌)	癌(M)								
		未分化肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	精巣	間細胞腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	精巣上体	平滑筋腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	子宮 頸管	平滑筋腫(B)								
		内膜間質ポリープ(B)								
	臓器/検査動物数									
	子宮	血管腫(B)								
		平滑筋腫(B)								
		内膜間質ポリープ(B)								
		平滑筋肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	卵巣	腺腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	包皮	線維腫(B)								
	臓器/検査動物数									
	リンパ 造血器 系	悪性リンパ腫(M)								
		悪性線維性組織球腫 (M)								
		組織球性肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
ジンバル腺	扁平上皮癌(M)									

ハーダー腺, 腎臓, 肝臓, 肺, 腺胃及び前胃の病変は対照群と全投与群間で統計検定を実施し, その他の臓器の病変は対照群と 60/50/30 mg/kg/日群間で統計検定を実施した。

統計学的有意差: $\uparrow\downarrow$ $p < 0.05$, $\uparrow\downarrow$ $p < 0.01$ (Fisher-Irwin の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 10. 腫瘍性病変 (続き)

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与量(mg/kg/日)		0	0.6	6	60/50/30	0	0.6	6	60/50/30
全 動 物	臓器/検査動物数									
	皮下	線維肉腫(M)								
	臓器/検査動物数									
	骨(他部位)	扁平上皮癌(M)								
	臓器/検査動物数									
	胸腔	線維肉腫(M)								
合 計	検査動物数									
	腫瘍数	良性								
		悪性								
	腫瘍総数									
	担腫瘍動物数	良性								
		悪性								
担腫瘍動物数										

ハーダー腺, 腎臓, 肝臓, 肺, 腺胃及び前胃の病変は対照群と全投与群間で統計検定を実施し, その他の臓器の病変は対照群と 60/50/30 mg/kg/日群間で統計検定を実施した。

統計学的有意差: $\uparrow\downarrow p<0.05$, $\uparrow\downarrow p<0.01$ (Fisher-Irwin の直接確率計算法)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(3) イヌを用いた強制経口投与による 1 年間反復経口投与毒性試験 (資料 13)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1994 年

検体純度：

供試動物： 犬，1 群雌雄各 4 匹，投与開始時 約 6 カ月齢，
投与開始時体重；雄 10.9～14.7 kg，雌 7.8～12.1 kg

投与期間：1 年間（1992 年 6 月 24 日～1993 年 6 月 24 日）

投与方法：検体を 0.1，1.0 及び 5.0 mg/kg/日の用量（それぞれ 1.0，10 及び 50 mg/mL の濃度）で懸濁し，1 日 1 回 1 年間に亘りゼラチンカプセルで強制経口投与した（投与用量は 0.1 mg/kg）。対照群の動物には媒体のみを同様に与えた。

用量設定根拠：

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び死亡について毎日少なくとも 2 回観察した。さらに，詳細な症状観察を週 1 回行った。試験開始前，第 3，6，9 ヶ月及び試験終了前に各 1 回詳細な身体検査を行った。

投与に関連すると考えられる症状を表 1 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 1. 一般状態

検査 時期	性別	雄				雌			
	投与量(mg/kg/日)	0	0.1	1.0	5.0	0	0.1	1.0	5.0
1-13 週	所見/検査動物数								
	下痢								
	嘔吐								
	飼料嘔吐								
	泡沫嘔吐								
	軟便								
	流涎								
14-26 週	所見/検査動物数								
	下痢								
	嘔吐								
	飼料嘔吐								
	泡沫嘔吐								
	軟便								
	流涎								
27-39 週	所見/検査動物数								
	下痢								
	嘔吐								
	飼料嘔吐								
	泡沫嘔吐								
	軟便								
	流涎								
40-52 週	所見/検査動物数								
	下痢								
	嘔吐								
	飼料嘔吐								
	泡沫嘔吐								
	軟便								
	退色便								
流涎									

統計学的有意差：↑↓, P<0.05; ↑↓, P<0.01 (Fisher の直接確率計算法, 申請者実施)

5.0 mg/kg/日群において雌雄に飼料嘔吐が、雌において泡沫嘔吐の頻度の有意な増加が散見された。検体投与に関連すると思われた。軟便/下痢及び流涎の発生率と頻度の増加がみられ、40-52週に退色便が雌雄各2匹に観察された。1.0 mg/kg/日群雄において1-13週に飼料嘔吐が有意に増加した。0.1 mg/kg/日群に検体投与による異常はなかった。

試験期間中に死亡例はなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

[申請者注：1.0 mg/kg/日群雄に観察された有意な飼料嘔吐については、それ以降の発生数が対照群とほぼ同様であることから、明らかな毒性変化とは判断しなかった。]

体重変化；各動物について投与開始前（第0週），第1週から14週までは毎週，それ以降は4週間隔で体重を測定した。

対照群と比較して傾向の認められた検査週を表2に示す。

表2. 体重

検査週	性別及び投与量(mg/kg/日)					
	雄			雌		
	0.1	1.0	5.0	0.1	1.0	5.0
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
18						
22						
26						
30						
34						
38						
42						
46						
50						
52						

表中の数値は対照群を100とした場合の値

<>：統計学的有意差はないが参考値として提示

統計学的有意差： \downarrow p<0.05, $\uparrow\downarrow$ p<0.01 (Dunnett's test)

5.0 mg/kg/日群の雄で投与期間を通じて低体重傾向が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

5.0 mg/kg/日群の雌並びに 1.0 及び 0.1 mg/kg/日群の雌雄では体重への影響は認められなかった。

摂餌量：各動物について第 1 週から 14 週までは毎週、それ以降は 4 週ごとに 1 回測定した。

統計学的有意差の認められた検査週を表 3 に示す。

表 3. 摂餌量

検査週	性別及び投与量(mg/kg/日)					
	雄			雌		
	0.1	1.0	5.0	0.1	1.0	5.0
2						
7						
9						
26						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

統計学的有意差：↑↓ p<0.05, ↑↓ p<0.01 (Dunnett's test)

[申請者注：対照群と比較して摂餌量の有意な変化が認められたが、散発的であり、投与による影響とは考えられなかった。したがって、いずれの投与群の雌雄でも投与による影響は認められなかった。]

血液学的検査；全動物について投与開始前並びに第 3, 6, 9 及び 12 ヶ月に、一晚絶食させて頸静脈から採血し、以下の項目を測定した。

白血球数, 赤血球数, 血色素量, ヘマトクリット値, 平均赤血球容積, 平均赤血球血色素量, 平均赤血球血色素濃度, 血小板数, 網赤血球数, 分葉核好中球数, リンパ球数

統計学的有意差または傾向の認められた項目を表 4 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 4. 血液学的検査

検査項目	検査 時期 (月)	性別及び投与量(mg/kg/日)					
		雄			雌		
		0.1	1.0	5.0	0.1	1.0	5.0
血色素量	3						
	6						
	9						
	12						
平均赤血球容積	3						
	6						
	9						
	12						
平均赤血球血色素量	3						
	6						
	9						
	12						
血小板数	12						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

<> : 統計学的有意差はないが参考値として提示

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$ $p < 0.05$, $\uparrow\downarrow$ $p < 0.01$ (Dunnett's test)

血色素量が 5.0 mg/kg/日群の雄で試験期間を通して対照と比べ減少傾向を示した。しかし、この血色素量の変化には対照と比較して統計学的に有意な差はみられず、これらの動物の投与期間中の血色素量の平均値 (15.5~16.7 g/dL) は背景対照値の範囲 (13.7~18.8 g/dL) 内であった。5.0 mg/kg/日群の雌雄の平均赤血球容積と平均赤血球血色素量が試験期間を通して減少または減少傾向を示した。

[申請者注：その他いくつかの項目に投与群と対照群の間で統計学的に有意な差がみられたが、用量依存性がないか、または単発的な発生であることから、投与に関連するとは考えられなかった。血色素量が 5.0 mg/kg/日群の雄で減少傾向を示したが、背景データの範囲内の変化であることから偶発性変化であることが確認された。また、5.0 mg/kg/日群の雌雄にみられた平均赤血球容積と平均赤血球血色素量の減少または減少傾向については、赤血球数、血色素量及びヘマトクリット値には検体投与の影響がみられなかったことから、毒性学的な意義はないと判断された。]

血液生化学検査；全動物について投与開始前並びに第 3, 6, 9 及び 12 ヶ月に、一晚絶食させて頸静脈から採血し、以下の項目を測定した。

ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン、アルカリホスファターゼ、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

総ビリルビン, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, アラニンアミノトランスフェラーゼ, クレアチンホスホキナーゼ, 尿素窒素, クレアチニン, 総蛋白, アルブミン, グロブリン, コレステロール, 血糖

統計学的有意差または傾向の認められた項目を表5に示す。

表5. 血液生化学検査

検査項目	検査時期 (月)	性別及び投与量(mg/kg/日)					
		雄			雌		
		0.1	1.0	5.0	0.1	1.0	5.0
カルシウム	6						
	9						
	12						
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	3						
	6						
	9						
	12						
アラニンアミノトランスフェラーゼ	12						
総蛋白	3						
	6						
	9						
	12						
アルブミン	3						
	6						
	9						
	12						
グロブリン	3						
	6						
	9						
	12						
血糖	6						
	9						

表中の数値は対照群を 100 とした場合の値

<> : 統計学的有意差はないが参考値として記載

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow$ $p < 0.05$, $\uparrow\downarrow$ $p < 0.01$ (Dunnett's test)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

カルシウム値が 5.0 mg/kg/日群の雌雄とも 6 から 12 ヶ月の間に減少または減少傾向を示した。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), 総蛋白, アルブミン及びグロブリンの値が 5.0 mg/kg/日の雌雄とも試験期間を通して減少または減少傾向を示し, 検体投与の影響と判断された。但し, AST 値の低下の毒性学的意義は疑わしい。

[申請者注: 投与群の他のいくつかの値にも対照群と比較して統計学的有意差がみられたが, 用量依存性がないか, または投与期間を通じた一貫した傾向がないことから, 投与に関連するとは考えられなかった。]

尿検査; 全動物について, 投与開始前並びに第 3, 6, 9 及び 12 ヶ月に一晚絶食させて代謝ケージ内で尿を集め, 以下の項目を調べた。Dunnett の多重比較検定を 1 及び 5 %の有意水準で実施した。

量, 比重, pH, ブドウ糖, ビリルビン, ケトン体, 潜血, 蛋白, ウロビリノーゲン, 窒素, 白血球, 混濁度, 色, 沈渣

尿検査において検体投与の影響はなかった。

眼科学的検査; 投与開始前並びに第 3, 6, 9 及び 12 ヶ月に全動物の角膜, 結膜, 強膜, 虹彩及び眼底について, 間接検眼鏡検査を行った。

眼検査において検体投与の影響はなかった。

臓器重量; 投与期間終了後, 全動物について以下の臓器重量を測定し, 最終体重または脳重量に対する相対重量を計算した。Dunnett の多重比較検定を 1 及び 5 %の有意水準で実施した。

脳, 肝臓, 腎臓, 精巣, 卵巣

最終屠殺時に, 統計学的に有意な, あるいは投与に関連する臓器重量の変化はいずれの投与群においてもみられなかった。

肉眼的病理検査; 投与期間終了後, 全動物をペントバルビタールの静脈内投与後に放血致死させ, 肉眼的病理検査を行った。[申請者注: 対照群と投与群間の比較には Fisher の直接確率計算法を 5 及び 1%の有意水準で申請者が実施した。]

最終屠殺した雌雄いずれにも, 投与に関連する肉眼的変化は観察されなかった。これらの動物にみられたすべての肉眼的変化は, 検体投与に関連しない自然発生的で偶発的なものと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

病理組織学的検査；全動物について以下の組織標本を作製して検鏡した。

脳（延髄/橋，小脳皮質，大脳皮質），下垂体，眼と視神経（両側），甲状腺/上皮小体（両側），胸腺部，気管，肺と主気管支（両側），心臓，大動脈，唾液腺/下顎（両側），肝臓（6片，各葉1片），胆嚢，脾臓（3箇所），腎臓（両側），副腎（両側），膵臓，精巣と精巣上体（両側），卵巣（両側），子宮と子宮頸，膣，食道，胃，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，膀胱，リンパ節（下顎（両側），気管気管支，腸間膜），骨格筋（大腿部），坐骨神経，脊髓（頸髄，胸髄，腰髄），骨（大腿骨，肋骨，胸骨），骨髓（大腿骨，肋骨，胸骨），骨髓塗抹，前立腺，乳腺（雌のみ），皮膚，すべての肉眼的病変部

【申請者注：対照群と投与群間の比較には Fisher の直接確率計算法を 5 及び 1% の有意水準で申請者が実施した。】

投与群の最終屠殺雄または雌動物の組織のいずれにも，検体投与に関連する病理組織学的変化は観察されなかった。

以上の結果から，イヌを用いたカプセル投与による 1 年間反復経口投与毒性試験の影響として，5.0 mg/kg/日の用量で雌雄に嘔吐，軟便/下痢及び流涎の発生率と頻度の増加が認められ，退色便も観察された。また，雄の体重が試験を通して低下し，雌雄ともカルシウム，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST），総蛋白，アルブミン及びグロブリンの値が減少した（AST 値の減少の毒性学的意義は疑わしい）。0.1 及び 1.0 mg/kg/日の用量では，検体投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。したがって，無毒性量（NOAEL）は雌雄とも 1.0 mg/kg/日であると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

12) 繁殖毒性及び催奇形性

(1) ラットを用いた繁殖毒性試験

(資料 14)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2000 年

検体純度：

供試動物：系 SD ラット[]，1 群 P 世代雄 30 匹，雌 30 匹 (F1 世代雄 25 匹，雌 25 匹)，投与開始時雄 6 週齢，雌 5 週齢，投与開始時体重；雄 215.2～245.3 g，雌 126.5～156.8 g

投与期間：P 世代；投与開始から F1 児離乳後の剖検までの約 15 週間
F1 世代；離乳時から F2 児離乳後の剖検までの約 17 週間
(動物試験期間，1999 年 2 月 1 日～1999 年 9 月 11 日)

投与方法：検体を 0.2，1.0 または 5.0 mg/kg/日の用量で に懸濁し，各動物の直近の体重に基づき (2 mL/kg) 1 日 1 回胃カテーテルを用いて強制経口投与した。なお，対照群の動物には溶媒の のみを同様に投与した。

用量設定根拠；

交配・調整・選抜及び観察・検査項目：概要を次々頁の表にまとめた。

親動物：

一般状態及び死亡；全動物の一般状態と死亡の有無を試験期間中毎日 2 回 (投与前と後) 観察した。児動物は全動物について一般状態と死亡の有無を哺育期間中毎日 1 回以上観察した。死亡動物は発見後速やかに剖検し，所見を記録した。

体重；雄は投与開始時とその後剖検まで週 1 回，雌は投与開始時と交配前まで週 1 回，その後妊娠 0，7，14 及び 21 日と分娩後 0，7，14 及び 21 日に体重を測定した (分娩確認日 = 分娩後 0 日)。児動物は生後 0，4 (数調整の前と後)，7 日，14 日及び

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

21日に雌雄別にまとめて測定し、雌雄ごとの平均体重を求めた。各腹の雌雄ごとの平均体重を基にして、各群の雌雄ごとの平均体重を計算した。

摂餌量；雌雄とも投与開始から交配前まで週1回、さらに雌は妊娠6・7、13・14及び20・21日と分娩後0・1、6・7、13・14及び20・21日について摂餌量を算出した。

交配及び妊娠の確認；同群内の雌雄を1対1で同居させて交配を行なった。F1動物の交配時は、兄妹交配を避けた。同居期間中毎日、膣垢中の精子の有無を調べ、精子を認めた場合に交尾成立と判断し、その日を妊娠0日とした。妊娠は、分娩によって、また剖検時に子宮内の着床痕の有無を調べることによって確認した。

繁殖性に関する指標；育成、交配、妊娠及び哺育の各期間と剖検時に、以下の指標について調べた。

性成熟 = F1についてのみ、雄の包皮分離（生後28日以降）と雌の膣開口（生後35日以降）の日齢

発情周期 = 交配前2週間（F1についてのみ）と同居後交尾が確認されるまでの性周期

交尾成立までの発情回数 = 雌雄の同居開始から交尾成立までに要した発情回数

交尾率（%） = $[\text{交尾を認めた雄(雌)数} / \text{交配に用いた雄(雌)数}] \times 100$

受胎率（%） = $[\text{妊娠雌数(妊性の確認された雄数)} / \text{交尾を認めた雌(雄)数}] \times 100$

出産率（%） = $(\text{生存児を出産した雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100$

妊娠期間 = 交尾を認めた日（妊娠0日）から分娩完了日（分娩後0日）までの日数

着床数 = 子宮内の着床痕の数

出生率（%） = $(\text{出産生存児数} / \text{着床数}) \times 100$

性比 = $(\text{雄生存児数} / \text{全生存児数}) \times 100$

奇形率（%） = $(\text{奇形児数} / \text{出産生存児数}) \times 100$

4日生存率（%） = $(\text{生後4日の哺育児数調整前の生存児数} / \text{出産生存児数}) \times 100$

離乳率（%） = $(\text{離乳時の生存児数} / \text{生後4日の哺育児数調整後の生存児数}) \times 100$

精子検査 = F1雄についてのみ、数、生存率（活性を示す精子の百分率）及び奇形率（奇形精子の百分率）

精子検査；F1各群6匹について精子検査を行い、精子数、精子の生存率、精子の活動性及び奇形率を観察した。

病理学的検査；

肉眼的病理検査；すべての親及び児動物の外表と内臓・組織を肉眼により病理学的に検査した。

病理組織学的検査；対照群と高用量群のP及びF1全親動物の下垂体、胃、精巣（左右）、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

精巣上体（左右），精囊，凝固腺，前立腺，膣，子宮（体部，頸管部），卵巣（左右）及び肉眼的異常部位，さらに低用量群と中間用量群の P 及び F1 全親動物の胃と肉眼的異常部位について病理組織学的に検査した。

試験の概要

世代	期間（週）	作業手順	試験項目
P	育成（8）	一般状態及び死亡の有無の観察（投与期間中毎日） 体重及び摂餌量測定（投与期間中原則として毎週）	一般状態，死亡 体重，摂餌量
	交配（3）	雌雄 1 対 1 で同居交配，性周期観察，膣垢中の精子で交尾を確認（妊娠 0 日）	交尾率，交尾成立までの 発情回数
	妊娠（3）		受胎率
	出産	出産状況の観察（生後 0 日）	出産率，妊娠期間
	哺育（3）	出産児の生死，性，外表所見，生存（生後 0, 4, 7, 14, 21 日）の観察，体重測定（生後 0, 4, 7, 14, 21 日）死亡児の剖検 同腹児数調整（生後 4 日，原則として雌雄各 4 匹） 選抜されなかった生後 4 日齢児の剖検	児の一般状態，死亡，出 産生存児数，出生率，奇 形率，性比，生存率，体 重， 剖検所見
F1	離乳	生後 21 日 F1 親動物の選抜（各腹雌雄各 1~2 匹を選抜） 選抜されなかった F1 離乳児の剖検 P 親動物の剖検，病理組織学的検査 (P 親動物及び F1 児動物に準ずる)	離乳率 剖検所見 着床数，剖検所見，病理 組織学的所見
	育成（8）	性成熟（雄，包皮分離；雌，膣開口）の観察 性周期観察（交配前 2 週間）	(P 親動物及び F1 児動物 に準ずる) 性成熟
F1	交配（3）	兄妹交配は避けた	性周期（発情回数）
	妊娠（3）		
	出産		
	哺育（3）		
F2	離乳	F1 雄親動物の精子検査	精子の数，生存率及び 奇形率

交配期間は最長で 3 週間

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

結 果：概要を以下の表に示す。

世代		親：P 児：F1				親：F1 児：F2				
投与量 (mg/kg/日)		0	0.2	1.0	5.0	0	0.2	1.0	5.0	
動物数	雄	30	30	30	30	25	25	25	24	
	雌	30	30	30	30	25	25	25	25	
親動物	一般状態									
	流涎	雄								
		雌								
	死亡数	雄								
		雌								
	体重	雄								
		雌								
	摂餌量	雄								
		雌								
	剖検所見									
	前胃 粘膜肥厚	雄								
		雌								
	腺胃 粘膜白濁	雄								
		雌								
	病理組織学的所見									
	前胃 角化亢進	雄								
		雌								
	前胃 粘膜上皮 過形成	雄								
雌										

統計学的有意差：Dunnett's test (体重, 摂餌量, 繁殖性に関する指標) $\uparrow\downarrow p<0.05$, $\uparrow\downarrow p<0.01$
 Fisher の直接確率計算法 (一般状態, 剖検所見, 病理組織学的所見) [申請者実施] $\uparrow\downarrow p<0.05$, $\uparrow\downarrow p<0.01$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

結果 (続き) :

世代		親 : P 児 : F1				親 : F1 児 : F2				
投与量 (mg/kg/日)		0	0.2	1.0	5.0	0	0.2	1.0	5.0	
動物数		雄	30	30	30	30	25	25	25	24
		雌	30	30	30	30	25	25	25	25
親動物	雄	包皮分離(%)								
		28日齢								
		交尾率(%)								
		受胎率(%)								
		精子検査								
		数(x10 ⁸) ^a								
		生存率(%) ^a								
	奇形率(%) ^a									
	雌	膣開口(%)								
		35日齢								
		36日齢								
		37日齢								
		38日齢								
		交配前2週間中の発情回数 ^a								
交尾成立までの発情回数 ^a										
交尾率(%)										
受胎率(%)										
出産率(%)										
妊娠期間(日) ^a										
着床数 ^a										

a: 平均値

統計学的有意差 : χ^2 検定 (交尾率, 受胎率, 出産率) $\uparrow\downarrow p<0.05$, $\uparrow\downarrow p<0.01$

Dunnett's test (体重, 摂餌量, 繁殖性に関する指標) $\uparrow\downarrow p<0.05$, $\uparrow\downarrow p<0.01$

Fisher の直接確率計算法 (一般状態, 剖検所見, 病理組織学的所見) [申請者実施] $\uparrow\downarrow p<0.05$, $\uparrow\downarrow p<0.01$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

結果 (続き) :

世代		親 : P 児 : F1				親 : F1 児 : F2				
投与量 (mg/kg/日)		0	0.2	1.0	5.0	0	0.2	1.0	5.0	
児 動 物	一般状態									
	出産生存児数 ^a									
	出生率(%) ^a									
	奇形率(%)									
	性比(%) ^a									
	4日生存率(%) ^a									
	離乳率(%) ^a									
	体重	雄								
		雌								
剖検所見										

a: 平均値

統計学的有意差: Dunnett's test (体重, 摂餌量, 繁殖性に関する指標) $\uparrow\downarrow p<0.05$, $\uparrow\downarrow p<0.01$
Fisher の直接確率計算法 (一般状態, 剖検所見, 病理組織学的所見) [申請者実施] $\uparrow\downarrow p<0.05$, $\uparrow\downarrow p<0.01$

親動物 (P 及び F1) の観察において, 5.0 mg/kg/日群の P 及び F1 雌雄に流涎がみられ, 病理組織学的検査で前胃の角化亢進と粘膜上皮過形成が認められた。これらの変化は用量設定試験においても認められており, 検体投与の影響と考えられた。

[申請者注: 統計検定を実施したところ 5.0 mg/kg/日群の P の雌雄及び F1 雄の流涎に統計学的に有意な差がみられた。また, 剖検では 5.0 mg/kg/日群の F1 の雄に腺胃粘膜白濁が, 病理組織学的検査では 5.0 mg/kg/日群で, P の雌雄と F1 雄に前胃の角化亢進並びに P, F1 の雌雄に粘膜上皮過形成が認められ, これらの所見について統計学的に有意な差がみられ, 検体投与の影響と考えられた。]各投与群の P 動物の雄で数週, 雌で妊娠 21 日にそれぞれ摂餌量の有意な低値が, また低用量群の F1 雌で第 1~2 週に体重の有意な低値がみられたが, いずれも用量相関性がないことから, 検体投与に関連のない偶発的なものと考えられた。そのほかの一般毒性学的指標, また繁殖に関するいずれの指標にも最高用量の 5.0 mg/kg/日まで影響は認められなかった。

児動物 (F1 及び F2) の観察では, 低用量群の F1 雄で生後 14 日の, F1 雌で哺育期間を通した体重, また高用量群の F1 雌で生後 0 日の体重に有意な低値がみられたが, F2 児には変化がみられていないことから, 検体投与とは関連のない偶発的なものと考えられた。そのほかの指標にも検体投与によると考えられる影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

以上、本試験条件下で 5.0 mg/kg/日の投与によって P 及び F1 雌雄親動物に流涎、前胃の角化亢進と粘膜上皮過形成が認められた。[申請者注：F1 の雄に認められた腺胃粘膜白濁は病理組織学的検査において変化がみられたため、検体投与の影響と考えられた。]以上のことから、本剤の一般毒性的影響に関して親動物に対する無毒性量は 1.0 mg/kg/日、また児動物の発育に関する無毒性量は 5.0 mg/kg/日と判断される。繁殖能力に関しては、最高用量の 5.0 mg/kg/日でも影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(2)ラットを用いた催奇形性試験

(資料 15)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1994年

検体純度：

供試動物：系ラット[]ラット (13週齢), 1群雌 24匹

投与開始時体重；雌 231~290 g

投与期間：25日間 (1993年6月21日~7月15日)

投与方法：検体を に懸濁し, 0, 1, 5 及び 30 mg/kg/日の用量 (投与容量は 1 mL/kg) で, 妊娠 6~15 日 (交尾確認日を妊娠 0 日とした) の 10 日間毎日 1 回胃カテーテルを用いて経口投与した。なお, 対照群の動物には のみを同様に投与した。
用量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物；一般状態と死亡について試験期間中 (妊娠 0~20 日) 毎日少なくとも 1 回観察した。体重を妊娠 0 日, 6~15 日の毎日及び 20 日に測定し, これらの各体重値から妊娠 0 日の体重値を減じた体重増加量と妊娠 20 日の体重値から妊娠子宮重量を減じた補正体重をそれぞれ算出した。摂餌量を妊娠 0~6 日, 6~9 日, 9~12 日, 12~15 日及び 15~20 日の各期間について測定した。妊娠 20 日に帝王切開と肉眼による病理学的検査を行い, 子宮を摘出して妊娠子宮重量を測定した。帝王切開時に卵巣の妊娠黄体数, 子宮内の着床数, 生存胎児数及び死亡胎児・吸収胚数を記録した。

生存胎児；全生存胎児について性別を判定し, 体重と胎盤重量を測定して外表の奇形学的検査を行った。その後, 各腹約半数の胎児の内臓と残り約半数の胎児の骨格につい

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

て奇形学的に検査した。

結 果：概要を次頁以降の表に示した。

母動物に対する影響；30 mg/kg/日投与群で，母動物に投与期間中流涎の出現頻度の有意な増加がみられ，妊娠 11～20 日の体重，妊娠 8～20 日の体重増加量，妊娠 20 日の補正体重及び妊娠 6～15 日の摂餌量に有意な低値がみられた。また，剖検所見として前胃壁の肥厚が全例に認められた。1 及び 5 mg/kg/日投与群では，いずれの指標にも検体投与の影響は認められなかった。

胎児に対する影響；母動物に対して悪影響がみられた 30 mg/kg/日投与群においても，胎児に対する影響は認められなかった。各投与群における胎児死亡吸収率は対照群の値より低く，生存胎児数，性比，胎児体重及び胎盤重量にも有意差はみられなかった。奇形学的検査では，1 mg/kg/日投与群において左側臍動脈（内臓変異）の出現頻度が統計学的に有意に高かったが，5 及び 30 mg/kg/日投与群ではこの変異の出現頻度に有意差はみられなかったことから，偶発的なものと考えられた。検体投与に関連した奇形または変異の増加は認められなかった。

[申請者注：腹ごとの胎児の変化について集計し，統計検定を実施したところ 1 mg/kg/日投与群において左側臍動脈（内臓変異）の出現頻度が統計学的に有意に高かったが，5 及び 30 mg/kg/日投与群ではこの変異の出現頻度に有意差はみられなかったことから，偶発的なものと考えられた。]

以上の結果より，本剤をラットの妊娠 6～15 日に経口投与した場合，30 mg/kg/日投与群の母動物で流涎の出現頻度の増加，体重，体重増加量，補正体重及び摂餌量の有意な低値，並びに前胃壁の肥厚が認められたが，胎児ではいずれの投与群においても検体投与の影響は認められなかった。したがって，本試験における無毒性量は母動物に対して 5 mg/kg/日，胎児に対して 30 mg/kg/日であり，催奇形性は陰性であると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	1	5	30	
1 群当りの動物数		24	24	24	24	
母動物	妊娠数					
	死亡数					
	一般状態 (頻度)					
	体重					
	体重増加量					
	摂餌量					
	妊娠子宮重量 (g) ^a					
	補正体重 (g) ^a					
	剖検所見 (頻度)					
	着床所見	非妊娠動物数				
		妊娠動物数				
		妊娠黄体数 ^a				
		着床数 ^a				
胎児死亡吸収率 (%) ^a						
	生存胎児数 ^a					
胎児	検査胎児数					
	性比 ^b					
	体重 (mg) ^a	雄				
		雌				
	胎盤重量 (mg) ^a					
	外表検査	検査胎児数				
		奇形	胎児数			
			小眼球症			
			口蓋裂			
			象鼻			
			生殖突起低形成			
			鎖肛			
	無指					
	内臓検査	検査胎児数				
		奇形	胎児数			
			側脳室拡張			
			甲状腺低形成			
右側大動脈弓						
血管輪						
心室中隔欠損						
変異		胎児数 (腹数)				
		胸腺頸部残留				
		腎盂拡張				
	尿管拡張					
	左側臍動脈					

^a: 群平均値, ^b: 総生存雄胎児数/ 総生存胎児数, ()内は腹数

↓: $p \leq 0.05$, ↓↑: $p \leq 0.01$, ∩: $p \leq 0.001$ [多重比較 (体重, 体重増加量, 補正体重, 摂餌量), Fisher の直接確率計算法 (一般状態, 剖検所見, 奇形/変異の出現頻度), Mann-Whitney の U 検定 (胎児死亡吸収率)]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 結果の概要 (続き)

投与群 (mg/kg/日)		0	1	5	30	
胎児	骨格検査	検査胎児数	159 (21)	149 (20)	184 (24)	153 (21)
		胎児数				
	奇形	頭蓋骨異形成				
		頸椎椎弓癒合				
		胸椎椎体骨化核分離				
		橈骨彎曲				
		尺骨彎曲				
	変異	胎児数				
		頸肋				
		第 13 肋骨短縮				
		腰肋				
		波状肋骨				
		腰椎仙椎化				
		仙椎前椎骨数 25				
		仙椎前椎骨数 27				
		胸骨分節分離				
	奇形胎児を有する腹の出現頻度					
	変異胎児を有する腹の出現頻度					

□: 群平均値, b: 総生存雄胎児数/ 総生存胎児数, ()内は腹数

↑↓: $p \leq 0.05$, ↑↓: $p \leq 0.01$, ∪: $p \leq 0.001$ [多重比較 (体重, 体重増加量, 補正体重, 摂餌量), Fisher の直接確率計算法 (一般状態, 剖検所見, 奇形/変異の出現頻度), Mann-Whitney の U 検定 (胎児死亡吸収率)]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(3)ウサギを用いた催奇形性試験

(資料 16)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1994 年

検体純度：

供試動物：ウサギ (18 週齢)，1 群雌 18 匹

投与開始時体重 3492～4437 g

投与期間：33 日間 (1993 年 7 月 12 日～8 月 13 日)

投与方法：検体を に懸濁し，0，1，3 及び 10 mg/kg/日の用量 (投与容量は 1 mL/kg) で，妊娠 6～18 日 (人工授精の翌日を妊娠 0 日とした) の 13 日間毎日 1 回胃カテーテルを用いて経口投与した。なお，対照群の動物には のみを同様に投与した。投与用量は，用量設定試験の結果に基づいて設定した。

用量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物；一般状態と死亡について試験期間中 (妊娠 0～27 日) 毎日少なくとも 1 回観察した。死亡や流産のみられた動物は，速やかに剖検して所見を記録した。体重を妊娠 0 日，6～18 日の毎日，24 日及び 27 日に測定し，これらの各体重値から妊娠 0 日の体重値を減じた体重増加量と妊娠 27 日の体重値から妊娠子宮重量を減じた補正体重をそれぞれ算出した。摂餌量を 2 日ごとに測定した (最後の測定間隔は 1 日)。妊娠 27 日に帝王切開と肉眼による病理学的検査を行い，子宮を摘出して妊娠子宮重量を測定した。帝王切開時に卵巣の妊娠黄体数，子宮内の着床数，生存胎児数及び死亡胎児・吸収胚数を記録した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

生存胎児；全生存胎児について性別を判定し、体重と胎盤重量を測定して外表の奇形学的検査を行った。その後、全生存胎児の内臓と骨格について奇形学的に検査した。

結 果：概要を以下の表に示した。

母動物に対する影響；本試験では、用量設定試験の結果に基づいて、母動物における致死量の 1/3 量に相当する 10 mg/kg/日の用量を高用量として用いたが、いずれの投与群においても母動物には検体投与の影響は認められなかった。

1 及び 10 mg/kg/日投与群において、投与終了後の期間中に母動物の死亡が 1 例ずつ観察されたが、死亡はいずれも単発例であり、投与期間の後半から投与終了後の期間にかけて摂餌の停止と著しい体重減少がみられた個体に認められていること、対照群においても同様の変化（摂餌の停止と著しい体重減少）がみられた 1 匹に流産が観察されていることから、母動物の死亡は検体の直接的な影響によるものではなく、投与のストレスによる摂餌停止とそれに伴って著しい体重減少が引き起こされた結果生じたものであると考えられる。

胎児に対する影響；生存胎児の奇形学的検査の結果、対照群を含む各群で種々の奇形や変異が観察された。骨格変異である腰肋については、3 mg/kg/日投与群における出現頻度に有意な高値がみられたが、10 mg/kg/日投与群における出現頻度は対照群の値とほぼ同じであり、これは偶発的な変動と考えられた。その他の奇形及び変異の出現頻度には、対照群と各投与群の間で有意な差は認められなかった。そのほかの指標にも検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果より、本剤をウサギの妊娠 6～18 日に経口投与した場合、いずれの投与群においても母動物及び胎児に検体投与の影響は認められなかった。したがって、本試験における無毒性量は母動物及び胎児に対して 10 mg/kg/日であり、催奇形性は陰性であると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	1	3	10	
1群当りの動物数		18	18	18	18	
母動物	妊娠数					
	流産数					
	死亡数					
	一般状態					
	体重					
	体重増加量					
	摂餌量					
	妊娠子宮重量 (g) ^a					
	補正体重 (g) ^a					
	剖検所見					
	着床所見	非妊娠動物数				
		帝王切開時生存妊娠雌数				
		全胚吸収腹数				
		妊娠黄体数 ^a				
着床数 ^a						
胎児死亡吸収率 (%) ^a						
生存胎児数 ^a						
胎児	検査胎児数					
	性比 ^b					
	体重 (g) ^a	雄				
		雌				
	胎盤重量 (mg) ^a					
	外表検査	検査胎児数				
		奇形胎児数				
	内臓検査	検査胎児数				
		奇形	胎児数			
			心室中隔欠損を伴う肺動脈減形成			
			右肺葉癒合			
			停留精巣			
		変異	胎児数			
			胸腺頸部残留			
	腎盂拡張					
	骨格検査	検査胎児数				
		奇形	胎児数			
			頭頂骨分離			
			頭頂骨癒合			
			胸椎椎体骨化核分離			
			第11, 12肋骨基部の過剰骨			
胸骨分節癒合						

^a: 群平均値, ^b: 総生存雄胎児数/ 総生存胎児数, () 内は腹数

統計学的有意差: $\uparrow, \downarrow, p < 0.05$ (Fisherの直接確率計算法, 奇形/変異の出現頻度)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 結果の概要 (続き)

投与群 (mg/kg/日)			0	1	3	10	
胎児	骨格検査	変異	胎児数				
			胸骨分節分離				
			頸肋				
			腰肋				
			仙椎前椎骨数 27				
			第 13 肋骨を伴う 仙椎前椎骨数 27				
			仙椎前椎骨数 25				
		奇形胎児を有する腹の出現頻度					
		変異胎児を有する腹の出現頻度					

a: 群平均値, b: 総生存雄胎児数/ 総生存胎児数, () 内は腹数

統計学的有意差: $\uparrow, \downarrow, p < 0.05$ (Fisher の直接確率計算法, 奇形/変異の出現頻度)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

13) 変異原性

(1)細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 17)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 5 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び TA1538) を用い、アロクロールで誘導したラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いてプレート法で変異原性を検索した。

検体はエタノールを溶媒として用い、投与容量は 50 μ L/プレートとした。突然変異試験の用量は用量設定試験の結果に基づいて S9 mix 非存在下は 10, 33, 100, 333 及び 1000 μ g/プレートの 5 用量, S9 mix 存在下は 33, 100, 333, 1000 及び 3333 μ g/プレートの 5 用量とした。各用量 3 枚のプレートで実施した。陽性対照試験及び溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニー数を計数した。

結果の判定は、少なくとも 1 菌株において用量相関性及び再現性を伴う復帰変異コロニー数の上昇 (検体処理群において TA1535, TA1537 及び TA1538 株は溶媒対照値の 3 倍以上, TA98 及び TA100 株は溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー) が認められる場合を陽性と判定した。突然変異試験において陽性の結果が得られたため、確認試験を実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を表 2~4 に示した。

突然変異試験において (表 2), S9 mix 非存在下の TA1535 及び TA1537 株で溶媒対照に比しそれぞれ 26.2 倍及び 88.0 倍の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。また, TA98 株の S9 mix 存在下では最高 1.9 倍の用量相関性を伴う上昇が認められた。このため用量を変更して確認試験を実施した。確認試験 1 回目では全菌株を用いて実施し (表 3), 確認試験 2 回目では TA1535 株及び TA1537 株の S9 mix 非存在下について実施した (表 4)。

その結果, 確認試験 1 回目では S9 mix 存在下の TA98 株で用量相関性を伴う最高 4.1 倍の復帰変異コロニー数の上昇が再び認められた。しかし, S9 mix 非存在下の

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

TA1535 及び TA1537 株では独立した 2 回の確認試験において復帰変異コロニー数の顕著な上昇は認められず、再現性はなかった。

以上の結果より、本試験条件下における本検体の細菌に対する突然変異誘発性は TA98 株の S9 mix 存在下において陽性であると結論された。

表 1. 用量設定試験成績

薬 剤	用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	TA100			
		復帰変異コロニー数/プレート			
		S9 Mix (+)		S9 Mix (-)	
溶媒対照 (エタノール)	50 μL				
検 体	10				
	33				
	67				
	100				
	333				
	667				
	1000				
	3333				
	6667				
10000					

*バックグラウンドの菌の生育状態コード：1 = 正常，2 = 軽度な減少，
3 = 中等度の減少，4 = 極度の減少，5 = 生育なし，

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 2. 突然変異試験成績

薬 剤	用量 ($\mu\text{g}/$ 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			TA98		TA1537		TA1538								
溶媒対照 (エタノール)	50 μL	—																		
検 体	10	—																		
	33	—																		
	100	—																		
	333	—																		
	1000	—																		
陽性対照 SA	1.0	—																		
2-NF	1.0	—																		
ICR-191	2.0	—																		
溶媒対照 (エタノール)	50 μL	+																		
検 体	33	+																		
	100	+																		
	333	+																		
	1000	+																		
	3333	+																		
陽性対照 2-AA	0.5	+																		

数値は3枚のプレートの平均値。NT：試験を行っていない。

*バックグラウンドの菌の生育状態コード(3枚のプレートの平均)：1=正常，2=軽度な減少，3=中等度の減少，4=極度の減少，5=生育なし

SA：アジ化ナトリウム，2-NF：2-ニトロフルオレン，ICR-191：N-(2-クロロエチル)-N-(6-クロロ-2-メチルピリジン-9-イル)-1,3-プロパンジアミン 2 塩酸塩，2-AA：2-アミノアントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 3. 確認試験成績 (1回目)

薬 剤	用量 (μg / 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	TA98	TA1537	TA1538			
溶媒対照 (エタノール)	50 μL	—								
検 体	10	—								
	20	—								
	33	—								
	50	—								
	100	—								
	200	—								
	333	—								
500	—									
陽性対照 SA	1.0	—								
2-NF	1.0	—								
ICR-191	2.0	—								
溶媒対照 (エタノール)	50 μL	+								
検 体	10	+								
	33	+								
	100	+								
	333	+								
	500	+								
陽性対照 2-AA	0.5	+								

数値は3枚のプレートの平均値。NT: 試験を行っていない。

*バックグラウンドの菌の生育状態コード (3枚のプレートの平均): 1 = 正常, 2 = 軽度な減少

SA: アジ化ナトリウム, 2-NF: 2-ニトロフルオレン, ICR-191: *N*(2-クロロエチル)-*N*(6-クロロ-2-メキシアクリジン-9-イル)-1,3-プロパンジアミン 2 塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアトラセン

表 4. 確認試験成績 (2回目)

薬 剤	用量 (μg / プレート)	復帰変異コロニー数/プレート			
		TA1535		TA1537	
		S9 Mix (-)		S9 Mix (-)	
溶媒対照 (エタノール)	50 μL				
検 体	10				
	20				
	33				
	50				
	100				
	200				
	333				
	1000				
陽性対照 SA	1.0				
ICR-191	2.0				

数値は3枚のプレートの平均値。NT: 試験を行っていない。

*バックグラウンドの菌の生育状態コード (3枚のプレートの平均): 1 = 正常,

2 = 軽度な減少, 3 = 中等度の減少, 4 = 極度の減少

SA: アジ化ナトリウム, ICR-191: *N*(2-クロロエチル)-*N*(6-クロロ-2-メキシアクリジン-9-イル)-1,3-プロパンジアミン 2 塩酸塩

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(参考)

ガイドライン上では、本試験で検定した菌株の他に大腸菌 WP2 *uvrA*, WP2 *uvrA*φKM101 又はサルモネラ菌 TA102 を用いた試験が必要であるが、文献的に Moriya ら (1983) と Kawai ら (1987) において、いずれも大腸菌株で弱陽性又は陽性の結果が得られている。

参考文献

- 1) Moriya, M., Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato and Y. Shirasu, 1983. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. Mut. Res. 116:185-216. DPR Vol.199-038, Rec. No.20207.
- 2) Kawai, A., S. Goto, Y. Matsumoto, and H. Matsushita, 1987. Mutagenicity of aliphatic and aromatic nitro compounds. Jpn. J. Ind. Health 29:34-54.

以下に参考文献 1)及び 2) を要約する。

参考文献 1)

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 5 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び TA1538) 及び大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) を用い、ラット薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いてプレート法で変異原性を検索した。

試験用量は、検定菌株に毒性を示さない限り 5000 µg/プレート を最高用量とした。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニー数を計数した。

試験結果：各検定菌株における判定結果を下表に示し、TA100 株における用量相関曲線を下図に示す。

薬 剤	変異原性判定結果					
	塩基対置換型			フレームシフト型		
	WP2 <i>uvrA</i>	TA100	TA1535	TA98	TA1537	TA1538
検体	+w	+s	-	+w	-	-

+: 陽性。自然誘発変異コロニー数より 100 多い (TA100) 又は 3 倍以上の変異コロニー数が認められ (その他菌株), 用量相関も認められる。

+w: 弱陽性。変異コロニー数は上記の陽性判定基準に満たないが, 用量相関が認められる。

-: 陰性

s: S9 mix 存在下

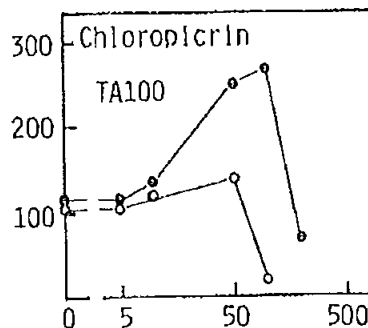


図 TA100 株における用量相関曲線

縦軸：復帰変異コロニー数/プレート, 横軸：検体用量(µg/プレート)

●: +S9, ○: -S9

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

参考文献 2)

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98 及び TA100) 並びに大腸菌 *Escherichia coli* (WP2uvrA) KM101) を用い、ラット薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下、プレインキュベーション法で変異原性を検索した。

検体は DMSO に溶解し、生育阻害が認められない場合は 5000, 2500, 1000, 500, 250 及び 100 µg/プレートで、生育阻害が認められた場合はさらに希釈して試験に供した。各濃度につき 2 枚のプレートを用いて実施した。

試験結果：各検定菌株における結果を下表に示し、用量相関曲線を下図に示す。

薬 剤		復帰変異コロニー数/ mg 検体						
		塩基対置換型				フレームシフト型		
		TA100		WP2uvrA KM101		TA98		
		+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	
検 体		4830	—	16260	8830	690	—	
		濃度 (µg/プレート)	復帰変異コロニー数/プレート (平均値±標準偏差)					
陽性対照	BaP	2.5	799±98	/	/	460±90	/	
	2NF	2.5	/	734±111	/	/	493±74	
	2AA	1	/	/	520±213	/	/	
	AF-2	0.005	/	/	/	722±284	/	
陰性対照(自然復帰変異)			147±17	149±14	143±10	90±25	49±8	46±9

— : 陰性

BaP : ベンゾ(a)ピレン, 2NF : 2-ニトロフルオレン, 2AA : 2-アミノアントラセン, AF-2 : 2-(7-フルオロ)-3-(5-ニトロ-2-フルオロ)アクリルアミド

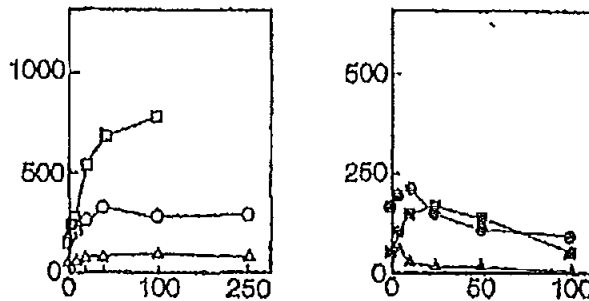


図 各検定菌株における用量相関曲線

縦軸：復帰変異コロニー数/プレート，横軸：検体濃度 (µg/プレート)

○ : TA100 +S9, ● : TA100 -S9

□ : WP2uvrA KM101 +S9, ■ : WP2uvrA KM101 -S9

△ : TA98 +S9, ▲ : TA98 -S9

検体は、試験した 3 菌株に対して変異原性を示し、特に S9 存在下の WP2uvrA KM101 に対して強い突然変異誘発性を示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(2)チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株 (CHL/U) を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 18)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1989 年

検体純度：

試験方法：チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株 (CHL/U) を用いて、代謝活性化及び非活性化によって検体の染色体異常誘発性を検索した。検体は DMSO に溶解して用いた。

直接法による染色体異常試験では、検体処理から 24 及び 48 時間後に染色体標本作製した。代謝活性化法による染色体異常試験では、検体処理から 6 時間培養後に新しい培地に交換し、さらに 18 時間培養した後に染色体標本作製した。

直接法、代謝活性化法ともに溶媒対照及び陽性対照を設け、各試験群並びに各濃度につき 2 枚のプレートを用いた。各プレートあたり 100 個、各濃度あたり 200 個のよく広がった中期分裂像を観察し、構造的染色体異常及び倍数性細胞の出現数を計数した。

構造的染色体異常の最終判定についてはギャップのみが認められた細胞を含めて評価した。判定基準は次の通りとした；5%未満 陰性 (-)，5%以上 10%未満 疑陽性 (±)，10%以上 陽性 (+)。

用量設定根拠：

試験結果：結果を表 2～6 に示した。

直接法 24 時間処理群では、構造的染色体異常細胞の出現頻度並びに倍数性細胞の出現頻度ともに高濃度群の 5.00 µg/mL において上昇し、疑陽性 (±) と判定された。最高濃度の 10.00 µg/mL 処理群では細胞がほとんど死滅していた。48 時間処理群では、構造的染色体異常細胞の出現頻度においても倍数性細胞の出現頻度においても明らかな増加は認められなかった。

代謝活性化法による染色体異常試験では構造的染色体異常細胞の出現頻度は高濃度群の 30.00 µg/mL において上昇し、疑陽性 (±) と判定された。倍数性細胞の出

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

現頻度は溶媒対照と同程度であった。

追加試験の直接法 24 時間処理群において、構造的染色体異常細胞の出現頻度に濃度依存性は認められなかったものの、最高 22.5%であり、陽性 (+) 結果を示した。倍数性細胞の増加は観察されなかった。代謝活性化法においても構造的染色体異常細胞の出現頻度は最高 32.5%であり、陽性 (+) と判定された。

一方、陽性対照として用いた *N*-メチル-*N*'-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン は直接法で、1,2-ベンツピレンは代謝活性化法でいずれも染色体異常を有する細胞の出現率が 10%以上であり、陽性であった。また、溶媒対照群における異常細胞出現頻度は、0~2.0%の範囲内であった。

追加試験を含む以上の結果より、直接法 (24 時間) 及び代謝活性化法で染色体異常誘発性が偽陽性~陽性と判定されたことから、本検体は薬物代謝酵素系の有無にかかわらず、CHU/IU 細胞に対し、染色体構造異常を誘発するものと結論された。

表 1 細胞増殖抑制試験

直接法 (検体 48 時間処理)			代謝活性化法 (6 時間処理*)		
濃度 (µg/mL)	生存率 (%)	(平均)	濃度 (µg/mL)	生存率 (%)	(平均)
0			0		
2.52			15.8		
3.15			23.7		
3.93			35.6		
4.92			53.3		
6.14					

*検体を S9 Mix 存在下で 6 時間処理し、培地交換後さらに 18 時間培養した 50%増殖抑制濃度；直接法 4.98 µg/mL, 代謝活性化法 27.2 µg/mL

表 2 染色体異常試験 (直接法：24 時間処理)

薬剤	濃度 (µg/mL)	観察細胞数	構造的染色体異常を有する細胞数					異常細胞出現頻度 (%)		倍数性細胞出現頻度 (%)	最終判定
			gap	染色分体型		染色体型	その他	+gap	-gap		
				切断	交換						
溶媒対照 (DMSO)	0	200									
検体	1.25	200									
	2.50	200									
	5.00	200									
	10.00	—*									
陽性対照 (MNNG)	2	200									

gap:ギャップ, MNNG:*N*-メチル-*N*'-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン

*:細胞毒性あり

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 3 染色体異常試験 (直接法 : 48 時間処理)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	観察 細胞 数	構造的染色体異常を有する細胞数					異常細胞出現頻度 (%)		倍数性 細胞出 現頻度 (%)	最終 判定	
			gap	染色分体型		染色体型		その他	+gap			-gap
				切断	交換	切断	交換					
溶媒対照 (DMSO)	0	200										
検体	1.25	200										
	2.50	200										
	5.00	200										
	10.00	—*										
陽性対照 (MNNG)	2	200										

gap:ギャップ, MNNG:*N*-メチル-*N*'-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン

*:細胞毒性あり

表 4 染色体異常試験 (代謝活性化法 : +S9 Mix, 6 時間処理*)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	観察 細胞 数	構造的染色体異常を有する細胞数					異常細胞出現頻度 (%)		倍数性 細胞出 現頻度 (%)	最終 判定	
			gap	染色分体型		染色体型		その他	+gap			-gap
				切断	交換	切断	交換					
溶媒対照 (DMSO)	0	200										
検体	7.50	200										
	15.00	200										
	30.00	200										
	60.00	—*										
陽性対照 [B(a)P]	30	200										

* +S9 Mix で 6 時間検体処理, 培地交換後 18 時間培養

gap:ギャップ, B(a)P:1,2-ベンツピレン

*:細胞毒性あり

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 5 染色体異常試験追加試験（直接法：24 時間処理）

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	観察 細胞 数	構造的染色体異常を有する細胞数					異常細胞出現頻度 (%)		倍数性 細胞出 現頻度 (%)	最終 判定	
			gap	染色分体型		染色体型		その他	+gap			-gap
				切断	交換	切断	交換					
溶媒対照 (DMSO)	0	200										
検体	3.00	200										
	5.00	200										
	7.00	—*										

gap:ギャップ
*:細胞毒性あり

表 6 染色体異常試験追加試験（代謝活性化法：+S9 Mix, 6 時間処理*）

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	観察 細胞 数	構造的染色体異常を有する細胞数					異常細胞出現頻度 (%)		倍数性 細胞出 現頻度 (%)	最終 判定	
			gap	染色分体型		染色体型		その他	+gap			-gap
				切断	交換	切断	交換					
溶媒対照 (DMSO)	0	200										
検体	20.0	200										
	30.0	200										
	40.0	200										

* +S9 Mix で 6 時間検体処理, 培地交換後 18 時間培養
gap:ギャップ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(3)マウスを用いた小核試験

(資料 19)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2001年

検体純度：

供試動物：系（ ）雄マウス（7週齢，平均体重 32.5 g；28.2 g ～ 36.6 g）
一群雄 5 匹

試験方法：骨髓細胞における検体の小核誘発性を検索した。検体は水に難溶であるため，
を溶媒として用いた。

検体を 25, 50 及び 100 mg/kg/日の 3 用量で 1 日 1 回，24 時間間隔で 2 回強制経口投与を行なった。陰性対照群はオリーブ油を投与した。陽性対照群はマイトマイシン C を 10 mg/kg の用量で単回強制経口投与した。検体投与群及び陰性対照群は 2 回目投与から 24 時間後に，陽性対照群は投与 24 時間後に両側大腿骨を摘出して骨髓塗抹標本作製した。標本はメタノールで固定し，3%ギムザ液で染色した。

1 動物につき多染性赤血球 2000 個を観察し，小核を有する多染性赤血球の頻度を求めた。また，1000 個の赤血球を観察し，多染性赤血球の割合について求めた。

用量設定根拠：

試験結果：骨髓標本の観察結果を次頁の表に示した。

試験期間中に死亡した動物は認められなかった。また，臨床症状においても異常は認められなかった。

検体投与群では，いずれの用量においても小核を有する多染性赤血球の頻度に有意な増加は認められなかった。一方，マイトマイシン C を投与した陽性対照群では，小核を有する多染性赤血球の頻度に明らかな増加が認められた。

以上の結果より，検体は本試験条件下において，マウスの骨髓細胞において，小核を誘発しないものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 骨髓標本観察結果

薬 剤	用 量 (mg/kg/日)	匹 数	小核を有する多染性赤血球 の割合 (%) ^{a)}		多染性赤血球の割合 (%) ^{b)}	
			平均±標準偏差 (範囲)	判定 ^{c)}	平均±標準偏差 (範囲)	判定 ^{d)}
陰性対照群 (オリーブ油)	0	5				
検 体	25	5				
	50	5				
	100	5				
陽性対照群 (マイトマイシンC)	10	5				

標本作製時間は最終投与 24 時間後

a) : 小核を有する多染性赤血球 / 多染性赤血球 (%)

b) : 多染性赤血球 / (多染性赤血球 + 正染性赤血球) (%)

c) : Kastenbaum-Bowman の数表による検定を用いて判定

d) : Wilcoxon の順位和検定を用いて判定

- : 対照群と比較して統計学的に有意差なし (p>0.05)

e) : 統計検定は実施していないが、陰性対照群に比し明らかな増加が認められる

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(4)細菌を用いた DNA 修復試験 (Rec-Assay)

(資料 20)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1989 年

検体純度：

試験方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の DNA 組換修復能保持株 (H17) 及び欠損株 (M45) を用いて、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9) の存在下及び非存在下で、胞子法により DNA 損傷の誘発性を検索した。

検体は DMSO に溶解して用いた。

直接法：直径 8 mm、厚さ 1.5 mm のペーパーディスクに試験溶液 50 μ L をしみ込ませ、固化した胞子寒天平板培地上に置いた。平板は 5°C で 24 時間放置後、37°C で 24 時間培養した。

代謝活性化法：直接法と同様のペーパーディスクに試験溶液 25 μ L 及び補酵素溶液 25 μ L をしみ込ませ、S9 添加胞子寒天平板培地上に置いた。平板は 37°C で 24 時間培養した。

直接法では溶媒対照、陰性対照及び陽性対照を、代謝活性化法では溶媒対照及び陽性対照を設け、各群並びに各濃度につき、3 系列で試験した。培養後、生育阻止帯の直径を測定し、ペーパーディスクの直径を引いて解析した。両株の生育阻止帯の差が 2 mm 以上 4 mm 未満、かつその比が 1.2 以上の場合を疑陽性、4 mm 以上、かつその比が 1.2 以上の場合を陽性と判定した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は代謝活性化の有無にかかわらず、組換修復能保持株 (H17) 及び組換修復能欠損株 (M45) 両株に対し、生育阻止帯を誘起しなかった。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C 及び Trp-P-1 では、組換修復能保持株 (H17) に比べ組換修復能欠損株 (M45) に著明な生育阻止帯を誘起し、その差はマイトマイシン C では 9.7 mm、トリプトファン-P-1 (Trp-P-1) では 7.5 mm であった。一方、陰性対照として用いたカナマイシンは両株に同程度の生育阻止帯を誘起し、その差は 0.3 mm であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下において、DNA 損傷誘起性を有しないものと判断される。

表 1. 濃度設定試験結果：

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 又は $\mu\text{g}/\text{ml}$)	S9 の 有無	生育阻止帯の径 (mm)		差 (mm)	判定
			M45 株 (平均)	H17 株 (平均)		
溶媒対照 (DMSO)	0	-				
検体	664	-				
	2,214	-				
	7,380	-				
	24,600	-				
	82,000	-				
溶媒対照 (DMSO)	0	+				
検体	332	+				
	1,107	+				
	3,690	+				
	12,300	+				
	41,000	+				

*：寒天平板培地全体に試験菌株の生育阻害が認められた

表 2. 試験結果：

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 又は $\mu\text{g}/\text{ml}$)	S9 の 有無	生育阻止帯の径* (mm)		差 (mm) (M45 - H17)	判定
			M45 株	H17 株		
溶媒対照 (DMSO)	0	-				
検体	188	-				
	375	-				
	750	-				
	1,500	-				
	3,000	-				
	6,000	-				
陰性対照 (カナマイシン)	0.3	-				
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.02	-				
溶媒対照 (DMSO)	0	+				
検体	93.8	+				
	188	+				
	375	+				
	750	+				
	1,500	+				
	3,000	+				
陽性対照 (Trp-P-1)	20	+				

*生育阻止帯の径の値は 3 系列の平均

Trp-P-1: トリプトファン-P-1

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(5)ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (資料 21)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1990 年

検体純度:

試験方法: ラット初代培養肝細胞を用いて不定期 DNA 合成誘発能をオートラジオグラフィ測定法により検索した。健康な成熟雄 Fischer 344 ラットの肝臓から Williams らの方法に従い、初代培養肝細胞を分離、培養した。William's Medium E (WME) 培地で 90 から 180 分間培養後、試験に供した。検体はエタノールに溶解した。ラット初代培養肝細胞を洗い、血清を含まない培地に再播種した (5×10^5 個/プレート)。検体溶液 (0.0001 から 0.009 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の 8 用量) 並びに ^3H -チミジンを最終濃度 10 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ で加えた。試験は 3 連で実施した。陽性対照として 7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン (DMBA) をジメチルスルホキシドに溶解して用いる群及び溶媒対照群 (検体の溶媒対照としてエタノール, 陽性対照の溶媒対照として DMSO) についても同時に試験した。18 から 20 時間薬剤処理後、オートラジオグラフィにより ^3H -チミジンの取り込みを測定した。各処理群につき 3 枚のスライドについて各 50 個の細胞の核グレイン数を計数した。平均細胞核グレイン数から核の大きさに相当する核に近接した 3 箇所の細胞質グレイン数の平均を引いて、正味の核グレイン数を求めた。また、修復細胞 (正味核グレイン数が 5 個以上の細胞) の割合について求めた。

UDS 試験と並行して予備試験と同様の方法で培養液中の LDH 活性を測定し、細胞毒性の評価を行った。細胞毒性試験は 2 連で実施した。

結果の判定は、少なくとも 1 用量で平均正味核グレイン数の有意 (溶媒対照より少なくとも 5 個以上増加した場合に有意な増加とする) な増加が認められ、用量相関性を伴う場合、並びに用量相関性は欠くが、平均正味核グレイン数の有意な上昇が連続した 2 用量で認められる場合は陽性と判定した。いかなる用量においても正味核グレイン数に有意な上昇が認められない場合は陰性であると判定した。また、2 回の独立した試験の結果、明瞭な用量相関性は認められないが、正味核グレイン数の有意な上昇には再現性がある場合は陽性であると判定した。

用量設定根拠:

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

試験結果：結果を次頁以降の表に示した。

UDS 試験及び確認試験ともに検体について 0.0003 から 0.009 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の 7 用量で試験を実施したが、0.009 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 区では強い細胞毒性のため検鏡による UDS の評価が不可能であった。従って、0.0003, 0.001, 0.003, 0.004, 0.005 及び 0.006 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の 6 用量で評価した。

2 回の UDS 試験の結果、検体はいかなる用量においても有意な平均正味核グレイン数の上昇を誘発しなかった。一方、陽性対照群では明らかに正味核グレイン数の上昇が認められ、試験の有効性が確認された。

以上の結果より、本試験条件下では本検体はラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験において陰性であると結論された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

表 1. UDS 試験成績

薬剤	濃度	相対生存率	アイト番号	計数核数	正味核ゲイン数 平均±標準偏差	各処理群の 正味核ゲイン数 平均±標準偏差	正味核ゲイン数 が 5 個以上の 細胞の割合
WME (培地対照)		102%	12A 12B 12C	50 50 50			
エタノール (検体の 溶媒対照)	10 µL/mL	100%	10A 10B 10C	50 50 50			
検体	0.0003 µL/mL	100%	24A 24B 24C	50 50 50			
	0.001 µL/mL	100%	21A 21B 21C	50 50 50			
	0.003 µL/mL	80%	20A 20B 20C	50 50 50			
	0.004 µL/mL	64%	27A 27B 27C	50 50 50			
	0.005 µL/mL	48%	26A 26B 26C	50 50 50			
	0.006 µL/mL	29%	25A 25B 25C	50 50 50			
	0.009 µL/mL						
DMSO (DMBA の 溶媒対照)	10 µL/mL	100%	16A 16B 16C	50 50 50			
陽性対照 DMBA	3.0 µg/mL	74%	14A 14B 14C	50 50 50			
	10.0 µg/mL	73%	15A 15B 15C	50 50 50			

相対生存率 = 100% - 相対毒性 (UDS 試験と並行して実施した細胞毒性試験の結果より)

* 有意 (平均正味核ゲイン数が溶媒対照に比し 5 個以上増加した場合を有意な増加とした)

DMBA ; 7,12-ジメチルベンゾ(a)アントラセン

注 1 : 細胞毒性により UDS の評価不可能

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

表 2. UDS 確認試験成績

薬剤	濃度	相対生存率	試料番号	計数核数	正味核グレイ数 平均±標準偏差	各処理群の 正味核グレイ数 平均±標準偏差	正味核グレイ数が5個以上の細胞の割合
WME (培地対照)		98%	12A	50	-0.8 ± 2.7		
			12B	50	-0.3 ± 2.3		
			12C	50	-1.8 ± 2.2		
エタノール (検体の 溶媒対照)	10 µL/mL	100%	14A	50	-0.6 ± 2.0		
			14B	50	-0.4 ± 2.8		
			14C	50	-1.5 ± 2.8		
検体	0.0003 µL/mL	100%	24A	50	-3.7 ± 2.9		
			24B	50	-4.2 ± 3.1		
			24C	50	-2.8 ± 2.9		
	0.001 µL/mL	98%	21A	50	-2.7 ± 3.0		
			21B	50	-2.0 ± 2.6		
			21C	50	-2.1 ± 2.5		
	0.003 µL/mL	91%	22A	50	-2.8 ± 3.3		
			22B	50	-1.7 ± 3.1		
			22C	50	-2.0 ± 2.7		
	0.004 µL/mL	72%	25A	50	-2.5 ± 2.8		
			25B	50	-1.6 ± 2.5		
			25C	50	-1.4 ± 2.7		
	0.005 µL/mL	66%	27A	50	-2.1 ± 2.9		
			27B	50	-3.0 ± 2.9		
			27C	50	-1.7 ± 2.6		
	0.006 µL/mL	51%	20A	50	-2.0 ± 3.6		
			20B	50	-2.9 ± 3.4		
			20C	50	-1.4 ± 2.9		
	0.009 µL/mL						
DMSO (DMBAの 溶媒対照)	10 µL/mL	100%	10A	50	-0.6 ± 2.5		
			10B	50	-1.0 ± 3.3		
			10C	50	-0.7 ± 2.8		
陽性対照 DMBA	3.0 µg/mL	97%	11A	50	15.5 ± 5.0		
			11B	50	24.1 ± 7.9		
			11C	50	12.9 ± 4.9		
	5.0 µg/mL	95%	16A	50	29.0 ± 12.8		
			16B	50	34.0 ± 13.4		
			16C	50	27.1 ± 7.6		

相対生存率 = 100% - 相対毒性 (UDS 試験と並行して実施した細胞毒性試験の結果より)

* 有意 (平均正味核グレイ数が溶媒対照に比し5個以上増加した場合を有意な増加とした)

DMBA ; 7,12-ジメチルベンズ(a)アントレン

注1 : 細胞毒性により UDS の評価不可能

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

(6) 遺伝子突然変異誘発性

L5178Y (TK⁺/) マウスリンフォーマ細胞を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 22)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検体純度：

試験方法：L5178Y (TK⁺/) マウスリンフォーマ細胞のチミジンキナーゼ遺伝子座における突然変異頻度を指標とした遺伝子突然変異試験を Clieve らの方法に従って実施した。試験はアロクロールで誘導されたラット肝臓の S9 Mix の存在下及び非存在下で実施した。

検体はエタノールに希釈して用いた。培養液中での溶媒の最終濃度は 1%(v/v)とした。

細胞を血清を含まない培地 (FoP) に懸濁し、S9 Mix 存在下及び非存在下で 4 時間、検体処理を行った。溶媒対照及び陽性対照 (-S9 Mix ; エチルメタンスルホネート, +S9 Mix ; 7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン) 並びに陽性対照の溶媒 (ジメチルスルホキシド) についても同時に試験した。2 日間の発現時間経過後、突然変異体を検索するためにクローニング用ソフトアガーに細胞及びトリフルオロチミジン (TFT, 最終濃度 3 µg/mL) を加え、3 枚のプレートに播種した (1×10⁶ 個/プレート)。これと並行してコロニー形成率を検索するために、クローニング用ソフトアガーに細胞を希釈して加え、同様に 3 枚のプレートに播種した (200 個/プレート)。37±1°C, 5±1%CO₂, 高湿度条件下で 10 から 12 日間培養後コロニーを計数した。

突然変異試験でクローニングを実施した濃度は S9 Mix 非存在下の場合 0.038~0.5 nL/mL, S9 Mix 存在下は 0.89~12 nL/mL であった (濃度あたり 1 系列)。

確認試験はより毒性レベルの高い用量においてのデータを得るために S9 Mix 非存在下は 0.36~0.75 nL/mL, S9 Mix 存在下は 9~16 nL/mL の濃度でクローニングを実施した (濃度あたり 2 系列)。

結果の判定は次の基準に従った。用量相関性を伴い、10%以上の総生存率を示す 3 用量で溶媒対照に比し 2 倍以上の突然変異頻度が認められる場合は陽性と判定した。10%以上の総生存率を示すいかなる用量においても溶媒対照の 2 倍以上の突然変異の上昇が認められず、用量相関性も認められない場合は陰性と判定した。

用量設定根拠：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

試験結果：結果を次頁以降の表に示した。

突然変異試験及び確認試験ともにかかなる用量においても溶媒対照の 2 倍以上の平均突然変異頻度の上昇は認められなかった。一方、陽性対照群では溶媒対照の 2 倍以上の平均突然変異頻度の上昇が認められ、試験の有効性が確認された。

以上の結果より、本試験条件下では本検体は L5178Y (TK-/+) マウスリンフォーマ細胞を用いた遺伝子突然変異試験において陰性であると結論された。

表 1. 突然変異試験成績 (-S9 Mix)

薬剤 濃度 (nL/mL)	相対細胞懸濁液 生存率 (%) ^a	相対コロニー形 成率 (%) ^b	相対総生 存率 (%) ^c	突然変異コロニー 数/プレート ^d	コロニー数/ プレート ^e	突然変異 頻度 ^f
溶媒対照群 (平均) エタノール A エタノール B						
検体処理群 0.038 0.05 0.067 0.089 0.12 0.16 0.21 0.28 0.38 0.5						
陽性対照群 溶媒 (DMSO) A 溶媒 (DMSO) B EMS 0.25 μL/mL 0.5 μL/mL						

^a : (処理群における細胞懸濁液生存率* / 溶媒対照群の平均細胞懸濁液生存率) × 100

(* = 播種 1 日後細胞濃度 / 播種細胞数 × 播種 2 日後細胞濃度 / 補正細胞数)

^b : 溶媒対照の平均を 100% とした場合の処理群のコロニー形成率

^c : 相対細胞懸濁液生存率 (%) × 相対コロニー形成率 (%) / 100

^d : TFT プレート (突然変異体検索用) 3 枚の平均コロニー数

^e : V.C. プレート (細胞毒性検索用) 3 枚の平均コロニー数

^f : 10⁶ 生存細胞あたりの突然変異頻度, () 内の数値は平均値【申請者計算】

EMS : エチルメタンスルホネート

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 2. 突然変異試験成績 (+S9 Mix)

薬剤 濃度 (nL/mL)	相対細胞懸濁液 生存率 (%) ^a	相対コロニー形 成率 (%) ^b	相対総生 存率 (%) ^c	突然変異コロニー 数/プレート ^d	コロニー数/ プレート ^e	突然変 異頻度 ^f
溶媒対照群 (平均) エタノール A エタノール B						
検体処理群 0.89 1.2 1.6 2.1 2.8 3.8 5.0 6.7 8.9 12 16 21						
陽性対照群 溶媒 (DMSO) A 溶媒 (DMSO) B DMBA 2.5 μL/mL 5 μL/mL						

a: (処理群における細胞懸濁液生存率* / 溶媒対照群の平均細胞懸濁液生存率) × 100

(* = 播種 1 日後細胞濃度 / 播種細胞数 × 播種 2 日後細胞濃度 / 補正細胞数)

b: 溶媒対照の平均を 100% とした場合の処理群のコロニー形成率

c: 相対細胞懸濁液生存率 (%) × 相対コロニー形成率 (%) / 100

d: TFT プレート (突然変異体検索用) 3 枚の平均コロニー数

e: V.C. プレート (細胞毒性検索用) 3 枚の平均コロニー数

f: 10⁶ 生存細胞あたりの突然変異頻度, () 内の数値は平均値【申請者計算】

++: 細胞毒性によりクローニング不可

DMBA: 7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 3. 確認試験成績 (-S9 Mix)

薬剤 濃度 (nL/mL)	相対細胞懸濁液 生存率 (%) ^a	相対コロニー形 成率 (%) ^b	相対総生 存率 (%) ^c	突然変異コロニー 数/プレート ^d	コロニー数/ プレート ^e	突然変 異頻度 ^f
溶媒対照群 (平均) エタノール A エタノール B						
検体処理群 0.36 A 0.36 B 0.46 A 0.46 B 0.56 A 0.56 B 0.65 A 0.65 B 0.75 A 0.75 B						
陽性対照群 溶媒 (DMSO) A 溶媒 (DMSO) B EMS 0.25 L/mL 0.5 L/mL						

^a: (処理群における細胞懸濁液生存率*/溶媒対照群の平均細胞懸濁液生存率) × 100

(* = 播種 1 日後細胞濃度/播種細胞数 × 播種 2 日後細胞濃度/補正細胞数)

^b: 溶媒対照の平均を 100%とした場合の処理群のコロニー形成率

^c: 相対細胞懸濁液生存率 (%) × 相対コロニー形成率 (%) / 100

^d: TFT プレート (突然変異体検索用) 3 枚の平均コロニー数

^e: V.C.プレート (細胞毒性検索用) 3 枚の平均コロニー数

^f: 10⁶ 生存細胞あたりの突然変異頻度, () 内の数値は平均値【申請者計算】

EMS: エチルメタンサルホネート

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 4. 確認試験成績 (+S9 Mix)

薬剤 濃度 (nL/mL)	相対細胞懸濁液 生存率 (%) ^a	相対コロニー形 成率 (%) ^b	相対総生 存率 (%) ^c	突然変異コロニー 数/プレート ^d	コロニー数/ プレート ^e	突然変 異頻度 ^f
溶媒対照群 (平均) エタノール A エタノール B						
検体処理群 9 A 9 B 10 A 10 B 12 A 12 B 14 A 14 B 16 A 16 B						
陽性対照群 溶媒 (DMSO) A 溶媒 (DMSO) B DMBA 2.5 L/mL 5 L/mL						

^a: (処理群における細胞懸濁液生存率* / 溶媒対照群の平均細胞懸濁液生存率) × 100

(* = 播種 1 日後細胞濃度 / 播種細胞数 × 播種 2 日後細胞濃度 / 補正細胞数)

^b: 溶媒対照の平均を 100%とした場合の処理群のコロニー形成率

^c: 相対細胞懸濁液生存率 (%) × 相対コロニー形成率 (%) / 100

^d: TFT プレート (突然変異体検索用) 3 枚の平均コロニー数

^e: V.C.プレート (細胞毒性検索用) 3 枚の平均コロニー数

^f: 10⁶ 生存細胞あたりの突然変異頻度, () 内の数値は平均値【申請者計算】

DMBA : 7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

14) 生体機能影響

クロルピクリンにおける薬理試験

(資料 23)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1994年

検体純度：

1) マウス及びラットの一般症状及び行動に対する作用

①マウスにおける一般状態

供試動物：系 SPF マウス，入荷時 7 週齢，体重 雄 29.9～36.3 g 雌 24.6～30.1 g，

1 群雌雄各 3 匹

投与方法：検体を，に懸濁させ，0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/kg の用量で腹腔内投与し，Irwin の方法に従って一般状態を観察した。

結果：雌雄マウスともに 12.5 mg/kg 以上の投与群で，投与後 30 分以降に自発運動の低下，反応性の低下などの運動性の低下，運動失調，筋緊張の低下，眼裂の縮小，体温低下，皮膚色の異常（チアノーゼ），呼吸数の減少などの自律神経系の抑制を主徴する非特異的な抑制性の症状を示し死亡した。さらに雌では 25 mg/kg 以上の投与群に警戒性の低下，受動態の発現などの認知力の低下，体姿勢の異常，正向反射，角膜反射の低下も認められた。雌雄とも 12.5 及び 50 mg/kg 投与群の全例 (3/3) が投与後 7 日以内に死亡した。25 mg/kg 投与群では，雌では全例 (3/3) が 7 日以内に死亡したが，雄 1/3 例は 7 日間生存した。生存マウスにみられた異常症状は投与後 6 時間以内に消失した。6.25 mg/kg 以下の投与群では雌雄とも検体投与による明確な異常症状は認められなかった。

②ラットにおける一般状態

供試動物：系 SPF 雄ラット，入荷時 7 週齢，体重 302～352 g，1 群 3 匹

投与方法：検体を，に懸濁させ，0, 0.20, 0.78, 3.13, 12.5, 50, 200 mg/kg の用量で静脈内投与し，Irwin の方法に従って一般状態を観察した。

結果：3.13 mg/kg 以上の投与群において投与後数分に，発声，攻撃性の亢進，旋回とよろめき歩調を合併した自発運動の亢進などの興奮性症状が観察された。200 mg/kg 投与群では自発運動の亢進，痙攣などの興奮性の症状に続いて位置視覚の低下，驚き反応の低下などの非特異的な抑制性の症状を発現し，投与後数分以内に全例死亡した。50 mg/kg 投与群でも 3 例中 2 例が投与後 30 分以内に死亡した。生存した 1 例にみられた異常症状は投与後 1 日以内に回復した。3.13, 12.5 mg/kg 投与群にみられた異常症状も投与後 1 時間以内に回復した。0.78 mg/kg 以

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

下の投与群には検体投与による明確な異常症状は認められなかった。

2) マウス及びラットの中樞神経系に対する作用

①マウスにおける睡眠延長作用

供試動物：系 SPF 雄マウス，入荷時 7 週齢，体重 30.4～41.8 g，1 群 10 匹

投与方法：検体を，に懸濁させ，0，1.56，3.13，6.25，12.5，25 mg/kg の用量で腹腔内投与し，その 1 時間後にヘキソバルビタール 100 mg/kg を皮下投与して睡眠時間（正向反射の消失から回復までの時間）を測定した。

結 果：

表 1. マウスにおける睡眠延長作用

投与量 (mg/kg)	平均睡眠時間	
	(分)	対照群を 100 とした場合の値
0		
1.56		
3.13		
6.25		
12.5		
25		

統計学的有意差：↑ $p \leq 0.05$ ↑ $p \leq 0.01$ (Student の t 検定)

6.25 mg/kg 以上の投与群において睡眠時間の有意な延長が認められた。3.13 mg/kg 以下の投与群には検体投与によると思われる明確な変化は認められなかった。

②ラットの自然脳波に対する作用

供試動物：系 SPF 雄ラット，入荷時 7 週齢，体重 336～422 g，1 群 3 匹

投与方法：ペントバルビタールナトリウム麻酔下のラット脳に電極装着手術を行い 7 日間の回復期間を置いた。検体を，に懸濁させ，0，3.13，12.5，50 mg/kg の用量で静脈内投与し，無麻酔下で脳波を測定した。

結 果：50 mg/kg 投与群の 3 例中 1 例において投与後数分に徐波の出現が観察された。さらに，別の 1 例では投与後 30 分に電気活性の低下が認められた。50 mg/kg 投与群の全例が投与後 3 日以内に死亡した。12.5 mg/kg 以下の投与群には検体投与による明確な変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

③ラットの体温に対する作用

供試動物： 系 SPF 雄ラット，入荷時 7 週齢，体重 288～334 g，1 群 5 匹

投与方法：検体を， に懸濁させ，0，0.78，3.13，12.5，50 mg/kg の用量で静脈内投与し，直腸温を測定した。

結 果：

表 2. ラットの体温に対する作用 (°C)

投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間					
		数分	30分	1時間	3時間	6時間	1日
0							
0.78							
3.13							
12.5							
50							

投与量 (mg/kg)	投与後時間					
	2日	3日	4日	5日	6日	7日
0						
0.78						
3.13						
12.5						
50						

表中の数値は検体投与前の値を 100 とした場合の値

各測定時点の対照群と比較した。

統計学的有意差：↑↓ $p \leq 0.05$, ↑↓ $p \leq 0.01$, ↑↓ $p \leq 0.001$ (Student の t 検定)

50 mg/kg 投与群の 1 例において投与後 30 分に体温低下が認められた。50 mg/kg 投与群の全例が投与後 1 時間以内に死亡した。さらに，12.5 mg/kg 投与群においても投与後数時間から 6 日にかけて体温の低下がみられた。3.13 mg/kg 以下の投与群には検体投与によると思われる明確な変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

3) ラット及びウサギの呼吸, 循環器系に対する作用

①無麻酔雄ラットの呼吸, 血圧, 心電図, 心拍数に対する静脈内投与の作用

供試動物: 系 SPF 雄ラット, 入荷時 7 週齢, 体重 293~362 g, 1 群 4 匹

投与方法: 検体を, に懸濁させ, 0, 3.13, 12.5, 50 mg/kg の用量で静脈内投与し, 無麻酔下で呼吸, 血圧, 心電図, 心拍数を測定した。

結 果:

雄ラットの呼吸, 血圧, 心電図, 心拍数に対する静脈内投与結果を表 3 に示す。

表 3. 無麻酔雄ラットの呼吸, 循環器系に対する作用

項目	投与量 (mg/kg)	投与前	投与中	投与後時間					
				数分	30分	1時間	3時間	6時間	1日
呼吸数 (呼吸/分)	0								
	3.13								
	12.5								
	50								
血 圧 (mmHg) 最高 最低 (平均)	0								
	3.13								
	12.5								
	50								
心拍数 (心拍/分)	0								
	3.13								
	12.5								
	50								

表中の数値は検体投与前の値を 100 とした場合の値
各測定時点の対照群と比較した。

統計学的有意差: $\uparrow\downarrow p \leq 0.05$, $\uparrow\downarrow p \leq 0.01$, $\uparrow\downarrow p \leq 0.001$ (Student の t 検定)

12.5 mg/kg 以上の投与群で, 投与開始直後に一過性の血圧の低下, 呼吸数, 心拍数の減少が認められた。50 mg/kg 投与群では, これらの変化は投与後数分に回復傾向を示し, そののち再び, 血圧の低下, 呼吸数, 心拍数の減少を示し, 全例が投与 30 分以内に死亡した。

3.13 mg/kg 投与群には検体投与によると思われる明確な変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

②無麻酔雄ラットの呼吸、血圧、心電図、心拍数に対する吸入暴露の作用

供試動物：系 SPF 雄ラット，入荷時 7 週齢，体重 295～348 g，1 群 4 匹

投与方法：検体を 0，1，10，100，1000 ppm の濃度で 30 分間吸入暴露し，無麻酔下で呼吸，血圧，心電図，心拍数を測定した。

結 果：

雄ラットの呼吸数，血圧，心電図及び心拍数に対する吸入暴露結果を表 4 に示す。

表 4. 無麻酔雄ラットの呼吸、血圧、心電図、心拍数に対する吸入暴露の作用

項目	濃度 (ppm)	暴露前	暴露中		投与後時間					
			開始	15 分	数分	30 分	1 時間	3 時間	6 時間	1 日
呼吸数 (呼吸/分)	0									
	1									
	10									
	100									
	1000									
血 圧 (mmHg) 最高 最低 (平均)	0									
	1									
	10									
	100									
	1000									
心拍数 (心拍/分)	0									
	1									
	10									
	100									
	1000									

表中の数値は検体投与前の値を 100 とした場合の値

各測定時点の対照群と比較した。

統計学的有意差：↑↓ $p \leq 0.05$, ↑↓ $p \leq 0.01$, ↑↓ $p \leq 0.001$ (Student の t 検定)

10 ppm 群に暴露終了後から 6 時間の間に血圧低下，心拍数の減少がみられ，4 例中 1 例が暴露後 1 日以内に死亡した。100 ppm 以上の暴露群において，暴露開始直後に血圧の低下，呼吸数，心拍数の減少が認められた。100 ppm 群では呼吸数

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

はそのまま減少したが、血圧と心拍数は暴露終了直後から終了後 30 分にかけて回復傾向を示したのち徐々に減少し、全例が暴露終了後 2 時間以内に死亡した。1000 ppm では、血圧、呼吸数、心拍数は暴露開始直後の変化に続いてそのまま減少し、全例が 30 分の暴露時間内に死亡した。さらに、10 ppm 以上の暴露群に、異常呼吸パターンとしてあえぎ呼吸や持続性吸息的呼吸、心電図の異常として不整脈も観察された。

1 ppm 群には検体投与による明確な変化は認められなかった。

③無麻酔雄ウサギの呼吸、血圧、心電図、心拍数に対する作用

供試動物： 雄ウサギ、入荷時 10 週齢、体重 2.35～2.91 kg、1 群 4 匹

投与方法：検体を、 に懸濁させ、0, 0.20, 0.78, 3.13, 12.5, 50 mg/kg の用量で静脈内投与し、無麻酔下で呼吸、血圧、心電図、心拍数を測定した。

結 果：

雄ウサギの呼吸、血圧、心電図、心拍数の静脈内投与結果を表 5 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 5. 無麻酔雄ウサギの呼吸, 血圧, 心電図, 心拍数に対する作用

項目	投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間					
			数分	30分	1時間	3時間	6時間	1日
呼吸数 (呼吸/分)	0							
	0.20							
	0.78							
	3.13							
	12.5							
	50							
血 圧 (mmHg) 最高 最低 (平均)	0							
	0.20							
	0.78							
	3.13							
	12.5							
	50							
心拍数 (心拍/分)	0							
	0.20							
	0.78							
	3.13							
	12.5							
	50							

表中の数値は検体投与前の値を 100 とした場合の値

各測定時点の対照群と比較した。

統計学的有意差 : $\uparrow\downarrow p \leq 0.05$, $\uparrow\downarrow p \leq 0.01$, $\uparrow\downarrow p \leq 0.001$ (Student の t 検定)

0.78 mg/kg 以上の投与群で、投与開始直後に一過性の体動を伴った血圧上昇並びに呼吸数減少が認められた。3.13, 12.5 mg/kg 投与群では、投与直後の変化は投与 3 時間以内に一旦回復し、投与後 6 時間から 1 日にかけて再び、血圧の低下、呼吸数、心拍数の減少を示した。3.13 mg/kg 投与群の 4 例中 1 例、12.5 mg/kg 投与群の 4 例中 2 例が投与後 1 日以内に死亡した。50 mg/kg 投与群では、投与直後の変化に続いて急激な呼吸数の減少、血圧の低下、心拍数の減少を示し、全例が投与後 3 時間以内に死亡した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

0.20 mg/kg 投与群には検体投与による明確な変化は認められなかった。

4) モルモットの自律神経系に対する作用

モルモットの摘出輸精管に対する作用

供試動物： 系 SPF 雄モルモット，入荷時 7 週齢，体重 504~607 g，4 標本/濃度

投与方法：検体を， に懸濁させ，マグヌス管での最終濃度が 0, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} g/mL となるように適用し，マグヌス管に懸垂した摘出輸精管に対する検体の作用を調べた。また，ノルアドレナリンと High K^+ で惹起した収縮に対する検体の作用も調べた。さらに，アンタゴニストとしてテトロドトキシン，フェントラミン， α , β -メチレン及び ATP アトロピンを前処置した際の収縮に及ぼす影響も調べた。

結果：

モルモットの摘出輸精管に対する結果を表 6 に示す。

表 6. モルモットの摘出輸精管に対する作用

濃度 (g/mL)	アゴニスト	
	ノルアドレナリン	High K^+
0		
10^{-7}		
10^{-6}		
10^{-5}		
10^{-4}		

表中の数値は検体適用前の収縮を 100 とした場合の値

統計学的有意差： $\uparrow\downarrow p \leq 0.05$ ， $\uparrow\downarrow p \leq 0.01$ (Paired t 検定あるいは対応のある t 検定)

10^{-3} g/mL の濃度群の検査値は報告書に記載なし。

10^{-4} g/mL の濃度で適用後から徐々に発現する持続性収縮と適用後 1~2 分で発現する一過性収縮が認められた。 10^{-3} g/mL を適用しても持続性収縮が認められたが，その程度は 10^{-4} g/mL に比べて小さかった。 10^{-6} g/mL 以下の濃度では明確な変化は認められなかった。

10^{-4} g/mL を適用した時の一過性収縮は，Na チャンネル拮抗薬であるテトロドトキシンと α -受容体拮抗薬であるフェントラミンの前処置によって消失したが， α ， β -メチレン ATP による ATP 受容体の脱感作，ムスカリン様受容体拮抗薬であるアトロピンによる前処置では影響はみられなかった。また，持続性収縮はいずれの拮抗薬処置を行っても影響されなかった。

ノルアドレナリン，High K^+ による収縮は検体を 10^{-4} g/mL 適用することにより有意に抑制された。 10^{-5} g/mL 以下ではいずれの場合も明確な抑制は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。
た。

5) マウス及びモルモットの消化器に対する作用

①マウスの小腸炭末輸送能に対する作用

供試動物：系 SPF 雄マウス，入荷時 7 週齢，体重 27.7~34.6 g，1 群 10 匹

投与方法：マウスは検体投与前に約 17 時間絶食させた。検体を，

に懸濁させ，0，1.56，3.13，6.25，12.5，25 mg/kg の用量でを腹腔内投与し，投与 1 時間後に炭末懸濁液を経口投与した。投与 30 分後にマウスを屠殺し小腸を摘出して全小腸の長さに対する炭末移動距離の比率(%)を求めた。

結 果：

マウスの小腸炭末輸送能に対する結果を表 7 に示す。

表 7. マウスの小腸炭末輸送能に対する作用

投与量 (mg/kg)	平均炭末移動率	
	対全小腸 (%)	対照群 100 とした場合の値
0		
1.56		
3.13		
6.25		
12.5		
25		

統計学的有意差：↑↓ $p \leq 0.05$, ↑↓ $p \leq 0.01$, ↑↓ $p \leq 0.001$ (Student の t 検定)

6.25 mg/kg 以上の投与群において炭末輸送能の有意な抑制が認められた。

3.13 mg/kg 以下の投与群には検体投与による明確な変化は認められなかった。

②モルモットの摘出回腸に対する作用

供試動物：系 SPF 雄モルモット，入荷時 7 週齢，体重 504~607 g，4 標本/濃度

投与方法：検体を，に懸濁させ，マグヌス管での最終濃度が 0， 10^{-7} ， 10^{-6} ， 10^{-5} ， 10^{-4} ， 10^{-3} g/mL となるように適用し，マグヌス管に懸垂した摘出回腸に対する検体の作用を調べた。また，アセチルコリン，ヒスタミン，High K^+ によって惹起した収縮に対する検体の作用も調べた。さらにテトロドトキシン，アトロピン及びジフェンヒドラミンの前処置による収縮への影響も検討した。

結 果：

モルモットの摘出回腸に対する結果を表 8 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 8. モルモットの摘出回腸に対する作用

濃度 (g/mL)	アゴニスト		
	アセチルコリン	ヒスタミン	High K ⁺
0			
10 ⁻⁷			
10 ⁻⁶			
10 ⁻⁵			
10 ⁻⁴			

表中の数値は検体適用前の収縮を 100 とした場合の値
 統計学的有意差：↑↓ p ≤ 0.05, ↑↓ p ≤ 0.01, ↑↓ p ≤ 0.001 (Paired t 検定)
 10⁻⁸ g/mL の濃度群の検査値は報告書に記載なし。

10⁻⁴ g/mL の濃度で適用直後に一過性の収縮の発現が認められた。しかしながら 10⁻³ g/mL に濃度を上げると、一過性収縮は認められなかった。10⁻⁵ g/mL 以下の濃度では明確な変化は認められなかった。

10⁻⁴ g/mL の濃度で適用した時の一過性収縮は、テトロドトキシンとアトロピン前処置によって抑制される傾向にあったが、ヒスタミン拮抗薬であるジフェンヒドラミンの前処置では影響は認められなかった。

アセチルコリン、ヒスタミン、High K⁺による収縮は 10⁻⁵ g/mL 以上を適用すると有意に抑制された。10⁻⁶ g/mL 以下の濃度ではいずれの場合も明確な抑制は認められなかった。

6) ラットの骨格筋に及ぼす作用

①ラットの横隔膜神経筋標本に対する作用

供試動物：系 SPF 雄ラット，入荷時 7 週齢，体重 348～420 g，4 標本/濃度

投与方法：検体を，に懸濁させ，0，10⁻⁷，10⁻⁶，10⁻⁵，10⁻⁴ g/mL の濃度となるように漸増適用し，マグヌス管に懸垂した摘出横隔膜神経筋標本の収縮に対する検体の作用を調べた。筋収縮は神経もしくは筋肉の電気刺激によって惹起した。

結 果：

ラットの横隔膜神経筋標本に対する結果を表 9 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

表 9. ラットの横隔膜神経筋標本に対する作用

濃度 (g/mL)	筋収縮	
	筋刺激	神経刺激
0		
10 ⁻⁷		
10 ⁻⁶		
10 ⁻⁵		
10 ⁻⁴		

表中の数値は検体適用前の値を 100 とした場合の値
統計学的有意差：↑↓ p ≤ 0.05, ↑↓ p ≤ 0.01, ↑↓ p ≤ 0.001 (Paired t 検定)

10⁻⁴ g/mL の適用で、間接刺激による収縮の抑制、消失がみられ、この変化と同時に持続性収縮が徐々に発現した。持続性収縮発現期には筋直接刺激による収縮は時間とともに抑制された。

10⁻⁵ g/mL 以下の濃度では検体投与による明確な作用は認められなかった。

7) ラットの血液に対する作用

ラットの血液（溶血と凝固）に対する作用

供試動物：系 SPF 雄ラット，入荷時 7 週齢，体重 334～368 g，1 群 3 匹

投与方法：検体を，に懸濁させ，0, 0.78, 3.13, 12.5, 50 mg/kg の用量で静脈内投与し，検体投与 30 分後及び 1 日後に採血し，凝固の指標としてプロトロンビン時間と活性化部分トロンボプラスチン時間を，溶血の指標として血漿ヘモグロビン濃度を測定した。

結 果：

ラットの血液（溶血と凝固）に対する結果を表 10 に示す。

表 10. ラットの血液（溶血と凝固）に対する作用

投与量 (mg/kg)	血漿ヘモグロビン濃度 (mg/dl)		プロトロンビン時間 (秒)		活性化部分トロンボプラスチン時間 (秒)	
	30 分後	1 日後	30 分後	1 日後	30 分後	1 日後
0						
0.78						
3.13						
12.5						
50						

統計学的有意差：↑↓ p ≤ 0.05, ↑↓ p ≤ 0.01 (Student の t 検定)

投与 30 分後に採血した群では，12.5 mg/kg 以上の投与群に血漿ヘモグロビン濃

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロロピクリン工業会にある。

度の有意な増加がみられた。さらに、50 mg/kg 投与群ではプロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間の明らかな延長が認められた。3.13 mg/kg 以下の投与群には検体投与によると思われる明確な変化は認められなかった。

投与 1 日後には 50 mg/kg 投与群の全例が投与 1 日以内に死亡し採血不能であったが、採血した 12.5 mg/kg 以下の投与群では検体投与によると思われる明確な変化は認められなかった。

8) ラットの肺に対する作用

静脈内投与，吸入暴露後の雄ラットの肺の肉眼的観察

供試動物：系 SPF 雄ラット，入荷時 7 週齢，体重 293～362 g，1 群 4 匹

投与方法：検体を静脈内投与した時と吸入暴露した時の肺の状態を肉眼観察した。呼吸，循環機能検査の 3)-①静脈内投与及び 3)-②吸入暴露で使用したラットを用いて，死亡個体は死亡直後に，1 日目まで生存した個体は 1 日目の検査終了後ペントバルビタールナトリウムで屠殺して肺を調べた。

結 果：

静脈内投与の雄ラットの肺の肉眼的観察結果を表 11 に示す。

表 11. 静脈内投与後の雄ラットの肺の肉眼的観察

所見／		雄			
用量群 (mg/kg)		0	3.13	12.5	50
検査動物数					
肺：	暗赤色				
	水腫				
気管：	腔内泡沫液				

統計学的有意差：↑↓ $p \leq 0.05$ ，↑↓ $p \leq 0.01$ (Fisher 直接確率検定，申請者実施)

吸入暴露の雄ラットの肺の肉眼的観察結果を表 12 に示す。

表 12. 吸入暴露後の雄ラットの肺の肉眼的観察

所見／		雄				
用量群 (ppm)		0	1	10	100	1000
検査動物数		4	4	4	4	4
肺：	暗赤色斑					
	暗赤色					
	水腫					
気管：	腔内泡沫液					

統計学的有意差：↑↓ $p \leq 0.05$ ，↑↓ $p \leq 0.01$ (Fisher 直接確率検定，申請者実施)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

静脈内投与群の 50 mg/kg 投与群に水腫性の肺腫大がみられ、肺は暗赤色の外観を呈していた。さらに気管内には泡沫液の存在が認められた。12.5 mg/kg 以下の投与群の肺には検体によると思われる異常所見は認められなかった。

吸入暴露群では 100 ppm 以上の暴露群に水腫性の肺腫大がみられ、肺は暗赤色の外観を呈していた。さらに気管内には泡沫液の存在が認められた。10 ppm 暴露群では肺に暗赤色斑の散在、水腫性変化が認められた。1 ppm 暴露群の肺には検体投与によると思われる異常所見は認められなかった。

以上の結果より、本剤を 12.5 mg/kg 以上の用量でマウスに腹腔内投与した場合、自律神経系の抑制を主徴とする非特異的な抑制性の症状（自発運動の低下、反応性の低下、運動失調、筋緊張の低下、眼裂の縮小、体温低下、チアノーゼ、呼吸数の減少）が観察され、死亡が認められた。雄ラットでは 3.13 mg/kg 以上を静脈内投与した場合に興奮性の症状（発声、攻撃性の亢進、自発運動の亢進）が観察され、50 mg/kg 以上の用量において死亡が認められた。さらにマウスでは 6.25 mg/kg 以上の腹腔内投与でヘキソバルビタール睡眠時間の延長、小腸炭末輸送能の有意な低下がみられた。ラットでは致死量である 50 mg/kg を静脈内投与したところ抑制性の異常脳波（徐波の出現、電気活性の低下）が認められた。12.5 mg/kg 以上の静脈内投与で体温の低下、一過性の血圧の低下、呼吸数及び心拍数の減少が認められ、吸入暴露では 10 ppm 以上の濃度において血圧低下、心拍数の減少がみられ、100 ppm 以上では呼吸数も減少し全例が死亡した。ウサギにおいても 0.78 mg/kg 以上の静脈内投与で一過性の血圧上昇、呼吸数減少が認められた。その後 3.13 mg/kg 及び 12.5 mg/kg では血圧低下、呼吸数減少、心拍数減少を示し、死亡例が認められた。

血液に対する作用では 12.5 mg/kg 以上の静脈内投与で投与 30 分後に血漿ヘモグロビン濃度が有意に増加し溶血が発現したことが示された。50 mg/kg 以上ではプロトロンビン時間及び活性化トロンボプラスチン時間の有意な延長も認められ、血液凝固機能の抑制が示された。また、検体投与後の肺を肉眼的に観察したところ、50 mg/kg 静脈内投与及び 100 ppm 以上の吸入暴露で水腫性の肺腫大、肺の暗赤色化、気管内泡沫液が認められ、10 ppm 暴露では肺の暗赤色斑散在と水腫性変化が認められた。

試験管内試験では、ラット横隔膜神経筋標本に対し 10^{-4} g/mL の濃度で筋収縮の抑制、消失がみられており、同時に持続性収縮が徐々に発現した。また、同濃度でモルモットの摘出輸精管と摘出回腸に対し一過性収縮を発現した。モルモットの摘出輸精管でみられた一過性収縮はテトロドトキシンとフェントラミンによって拮抗され、回腸でみられた一過性収縮もテトロドトキシンとアトロピンによって拮抗された。また摘出輸精管のアゴニスト収縮が 10^{-4} g/mL の濃度で有意に抑制され、摘出回腸のアゴニスト収縮は 10^{-5} g/mL 以上の濃度で有意に抑制された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

クロルピクリンにおける薬理試験総括表

試験項目	試験動物	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
一般症状及び行動 一般状態 (Irwin法)	マウス	腹腔内 ()	0,1.56, 3.13,6.25, 12.5,25,50	♀3匹 ♂3匹	♀>12.5 ♂>12.5	♀6.25 ♂6.25	25 mg/kg の♂1例を除き 12.5 mg/kg 以上で ♀,♂の全例死亡 12.5 mg/kg以上で認められた症状: 自発運動の低下, 運動性の低下, 運動失調, 筋緊張の低下, 眼裂の縮小, 体温低下, 皮膚色の異常(チアノーゼ), 呼吸数の減少
	ラット	静脈内 ()	0,0.2,0.78, 3.13,12.5, 50,200	♂3匹	♂>3.13	♂0.78	50 mg/kg で 2/3 例が死亡 200 mg/kg で全例死亡 3.13 以上に認められた症状: 発声, 攻撃性の亢進, 自発運動の亢進
中枢神経系 睡眠延長作用	マウス	腹腔内 ()	0,1.56, 3.13,6.25, 12.5,25	♂10匹	♂>6.25	♂3.13	6.25 mg/kg 以上で睡眠時間の有意な延長が認められた。
中枢神経系 自然脳波に 対する作用	ラット	静脈内 ()	0,3.13, 12.5,50	♂3匹	♂50	♂12.5	50 mg/kg 群 1例で投与後数分で徐波の出現を観察。別の 1例で投与後 30分に電気活性の低下。3日以内に全例死亡。
中枢神経系 体温に対する 作用	ラット	静脈内 ()	0,0.78, 3.13,12.5, 50	♂5匹	♂>12.5	♂3.13	12.5 mg/kg の投与で数時間後から 6 日間に体温の低下, 50 mg/kg の投与で 1例に 30分後体温の低下, 1時間後に全例死亡。
呼吸・循環器系 呼吸, 血圧, 心電図, 心拍数 (無麻酔下)	ラット	静脈内 ()	0,3.13, 12.5,50	♂4匹	♂>12.5	♂3.13	12.5 mg/kg の投与で投与開始直後に一過性の血圧の低下, 呼吸数, 心拍数の減少。 50 mg/kg の投与では血圧の低下, 呼吸数, 心拍数, の減少を示し 30分後に全例死亡。
	ラット	吸入 暴露	0,1,10,100, 1000 ppm (30分間)	♂4匹	♂>10 ppm	♂1 ppm	10 ppm 群では暴露終了後から 6 時間の間に血圧低下, 心拍数の減少がみられ 4 例中 1例が 1日以内に死亡。 100 ppm 以上では暴露開始直後から血圧の低下, 呼吸数, 心拍数の減少が認められ, 全例が 2時間以内に死亡。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

クロルピクリンにおける薬理試験総括表(続き)

試験項目	試験動物	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 呼吸, 血圧, 心電図, 心拍数 (無麻酔下)	ウサギ	静脈内 ()	0, 0.20, 0.78, 3.13, 12.5, 50	♂ 4匹	♂ >0.78	♂ 0.20	0.78 mg/kg 以上で投与開始直後に一過性の体動を伴った血圧上昇と呼吸数の減少が認められた。 3.13, 12.5 mg/kg の投与群では投与直後の変化は3時間以内で一旦回復したが6時間後から1日にかけて再び血圧の低下, 呼吸数, 心拍数の減少を示した。 3.13 mg/kg の投与群で1例, 12.5 mg/kg の投与群で2例が1日後以内に死亡。 50 mg/kg の投与群では急激な血圧低下, 呼吸数, 心拍数の減少を示し, 全例が3時間以内に死亡。
自律神経系 モルモットの摘出輸 精管に対する作用	モルモット	()	0, 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻³ g/mL	♂ 4 標本/濃度	♂ >10 ⁻⁴ g/mL	♂ 10 ⁻⁶ g/mL	検体のみを適用した場合, 10 ⁻⁴ g/mL の濃度で持続性収縮と一過性収縮が認められた。10 ⁻³ g/mL を適用しても持続性収縮が認められたが, その程度は10 ⁻⁴ g/mL に比べて小さかった。10 ⁻⁵ g/mL 以下の濃度では明確な変化は認められなかった。
					♂ >10 ⁻⁴ g/mL	♂ 10 ⁻⁶ g/mL	アゴニスト(ノルアドレナリン, high K ⁺)惹起の収縮に対して10 ⁻⁴ g/mL 以上で抑制し, 10 ⁻⁵ g/mL 以下では抑制はなかった。
消化器系 小腸炭末輸送能に 対する作用	マウス	腹腔内 ()	0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25	♂ 10匹	♂ >6.25	♂ 3.13	6.25 mg/kg 以上の投与群で炭末輸送能の有意な抑制が認められた。
消化器系 摘出回腸に対する 作用	モルモット	()	0, 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻³ g/mL	♂ 4 標本/濃度	♂ >10 ⁻⁴ g/mL	♂ 10 ⁻⁶ g/mL	検体のみを適用した場合, 10 ⁻⁴ g/mL の濃度で適用直後に一過性の収縮の発現が認められた。10 ⁻⁵ g/mL 以下の濃度では明確な変化は認められなかった。
					♂ >10 ⁻⁵ g/mL	♂ 10 ⁻⁶ g/mL	アゴニスト(アセチルコリン, ヒスタミン, high K ⁺)惹起の収縮に対して10 ⁻⁵ g/mL 以上で抑制し, 10 ⁻⁶ g/mL 以下では抑制はなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

クロルピクリンにおける薬理試験総括表(続き)

試験項目	試験動物	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
骨格筋に及ぼす作用 横隔膜神経筋標本に対する作用	ラット	()	$0, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}$ g/mL	♂ 4 標本/濃度	♂ 10^{-4} g/mL	♂ 10^{-5} g/mL	10^{-4} g/mLの適用で、間接刺激による収縮の抑制、消失がみられ、この変化と同時に持続性収縮が徐々に発現した。 10^{-5} g/mL以下の濃度では検体投与による明確な作用は認められなかった。
循環器系 血液(溶血と凝固)に対する作用	ラット	静脈内 ()	0, 0.78, 3.13, 12.5, 50	♂ 3匹	・投与 30分後の採血 ♂12.5 ・投与 1日後の採血 なし※	・投与 30分後の採血 ♂3.13 ・投与 1日後の採血 ♂12.5	12.5 mg/kg 以上で血漿ヘモグロビン濃度が増加。さらに、50 mg/kg ではプロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間が延長。 ※50 mg/kg 投与群は投与1日以内に全例が死亡したため検査せず。
循環器系 肺に対する作用	ラット	静脈内 () 吸入 暴露	0, 3.13, 12.5, 50 0, 1, 10, 100, 1000 ppm (30分間)	♂ 4匹 ♂ 4匹	♂50 ♂ >10 ppm	♂12.5 ♂ 1 ppm	静脈内投与群の50 mg/kg 投与群に水腫性の肺腫大、肺の暗赤色化、気管内泡沫液が認められた。 吸入暴露群の100 ppm 以上で水腫性の肺腫大、肺の暗赤色化、気管内泡沫液が認められた。10 ppm で肺の暗赤色斑散在、水腫性変化が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

2. 製剤

1) 急性毒性

(1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 24)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

検体純度：80%くん蒸剤

[組成] クロルピクリン 80%

乳化剤, 安定剤 20%

供試動物：系 SPF ラット, 7 週齢,

体重：雄 190~222 g 雌 161~181 g, 一群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間観察

投与方法：検体を で希釈して経口投与した。投与前 16 時間絶食した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。投与日, 投与後 1, 3, 7 及び 14 日に体重を測定した。死亡動物及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。

結 果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0, 30, 50, 80, 120, 200
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄：132 (106~165) 雌：145 (121~174)
死亡開始時間及び終了時間	投与後 2 時間から開始 投与後 4 時間に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後 15 分から発現 投与後 1 日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄：80 雌：80

中毒症状としては、雌雄とも自発運動の減少、腹臥/横臥、呼吸深大、皮膚の蒼白及びチアノーゼが観察された。

剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(2)ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 25)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

検体純度：80%くん蒸剤

[組成] クロルピクリン 80%

乳化剤, 安定剤 20%

供試動物：系 SPF ラット, 7 週齢,

体重：雄 234~247 g 雌 175~189 g, 一群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間観察

投与方法：検体を で希釈してリント布にのせ, 背部の刈毛皮膚に 24 時間塗布した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。投与日, 投与後 1, 3, 7 及び 14 日に体重を測定した。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
I.D50 (mg/kg)	雄：2000 以上 雌：2000 以上
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	症状発現例なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雄：2000 雌：2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄：2000 雌：2000

中毒症状及び剖検所見では, 特記すべき変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

2) 皮膚及び眼に対する刺激性

(1)ウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 26)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

検体純度：80%くん蒸剤

[組成] クロルピクリン 80%

乳化剤, 安定剤 20%

供試動物： ウサギ, 18 週齢, 体重：2.96~3.22 kg, 一群雌 3 匹

観察期間：3 日間

投与方法： 検体 0.5 mL をリント布に塗布し, 刈毛した動物の背中の皮膚 (2.5 cm×2.5 cm) に適用した。暴露時間は 4 時間とし, 皮膚に残った検体は注射用水で湿らせた脱脂綿で投与部位を清拭した。

観察項目： 検体除去 1, 24, 48 及び 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, 「皮膚反応の評価表 (Draize の基準：1959 年)」に従って採点し, 刺激性の評価及び区分を行った。

結 果： 観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

動物 番号	項目	最高 評点*	暴 露 後 時 間			
			1 時間	24 時間	2 日	3 日
1	紅斑・痂皮	4				
	浮 腫	4				
2	紅斑・痂皮	4				
	浮 腫	4				
3	紅斑・痂皮	4				
	浮 腫	4				
合計	紅斑・痂皮	12				
	浮 腫	12				
平均	紅斑・痂皮	4				
	浮 腫	4				

*：判定基準の最高評点, N：評価不能

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

検体除去 1 時間後から適用部位は黒色の壊死様変化を伴う評点 3 の紅斑及び皮膚の肥厚を伴う評点 2 の浮腫が 3/3 全例に見られた。24 時間後では壊死様変化及び皮膚の肥厚は亢進し、Draize の基準による評価が困難となった。48 及び 72 時間後の評価は不能であった。

以上の結果から、クロルピクリン 80%くん蒸剤はウサギの皮膚に対して、強い腐食性を認めた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

(2)ウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 27)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

検体純度：80%くん蒸剤

[組成] クロルピクリン 80%

乳化剤, 安定剤 20%

供試動物： ウサギ, 15 週齢, 体重：2.68～3.04 kg, 一群雌 3 匹

観察期間： 4 日間

投与方法： 検体 0.1 mL を左眼に適用し, 3 匹は 30 秒後に洗眼した。3 匹については洗眼しなかった。

観察項目： 適用後 1, 24, 48 及び 72 時間後に角膜, 虹彩, 結膜の刺激性変化を観察し, 「眼の刺激性試験の局所反応の判定基準 (Draize の基準：1959 年)」に従って採点した。また, Kay and Calandra の刺激性の評価分類表を参考にした刺激性の評価及び区分を行った。

結 果： 観察した刺激性変化の採点は次頁の表のとおりである。

非洗眼群では, 投与 1 時間後に角膜, 虹彩及び結膜にいずれも強い刺激性が見られ, 平均総評点 (MTS) は 65.0, 24 時間後では 1/3 例の虹彩の観察が不可能となり, 2/3 例の MTS は 90.0 であった。これらの刺激性は 48 時間後以降亢進し, その他の眼の変化として眼瞼周囲の腫脹, 乳白色分泌物及び眼瞼周囲の汚れが見られ, 腐食性により角膜及び虹彩は Draize の基準による評価が不可能となり, Kay and Calandra の刺激性の評価分類表を参考にした刺激性の評価及び区分はできなかった。洗眼群においても非洗眼群と同様の腐食性が認められ, 洗眼効果は認められなかった。

以上の結果から, クロルピクリン 80%くん蒸剤はウサギの眼粘膜に対して, 強い腐食性を認めた。洗眼による刺激性の軽減も見られず, 洗眼効果は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

試験結果：

項 目				最高 評点	適 用 後 時 間					
					1 時 間	24 時 間	2 日	3 日	4 日	
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜 混濁	程度	4						
			面積	4						
		虹彩			2					
		結膜	発赤	3						
			浮腫	4						
			分泌物	3						
	動物 番号 2	角膜 混濁	程度	4						
			面積	4						
		虹彩			2					
		結膜	発赤	3						
			浮腫	4						
			分泌物	3						
	動物 番号 3	角膜 混濁	程度	4						
			面積	4						
		虹彩			2					
		結膜	発赤	3						
			浮腫	4						
			分泌物	3						
合計*				330						
平均*				110						
洗 眼 群 (3匹平均)	角膜 混濁	程度	4							
		面積	4							
	虹 彩			2						
	結膜	発赤	3							
		浮腫	4							
		分泌物	3							
合 計*				110						

*Draize 法による評点 (最高 110 点)

個体別総評点 = (程度 × 面積 × 5) + (虹彩 × 5) + {(発赤 + 浮腫 + 分泌物) × 2}

N : 評価不能, - : 総評点算出不能, # : 評価不能動物を含む

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

3) モルモットを用いた皮膚感作性試験 (資料 28)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2003 年

検体純度: 80%くん蒸剤

[組成] クロルピクリン 80%

乳化剤, 安定剤 20%

供試動物: 系白色モルモット, 6 週齢, 体重 322~414 g,

試験群一群雌 20 匹, 対照群一群雌 10 匹

観察期間: 30 日間 (惹起貼付除去後 48 時間) 観察

試験操作: [Buehler Test 法]

投与量設定根拠;

感作経皮貼付; 感作開始前日に左側胴部を刈毛及び剃毛し, 検体処理群では検体の 0.5%濃度液 0.2 mL を塗布したパッチを 6 時間閉塞貼付した。貼付 6 時間後にパッチを除去し, 注射用水で湿らせた脱脂綿で投与部位を清拭した。

これらの操作は感作開始日, 7 日後及び 14 日後に 3 回行った。刈毛及び剃毛は各感作処理の前日に行った。陽性対照として 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) の 1%エタノール溶液を処理した結果を用いた。

惹起経皮貼付; 感作 27 日後に, 全試験群動物の右側胴部の毛を刈毛及び剃毛した。翌日, 0.1%濃度液を 0.2 mL 塗布したパッチを 6 時間閉塞貼付した。貼付 6 時間後にパッチを除去し, 注射用水で湿らせた脱脂綿で投与部位を清拭した。陽性対照として 0.25%DNCB/エタノール溶液を処理した結果を用いた。

観察項目: 惹起貼付除去の 24 及び 48 時間後に適用部位の紅斑及び痂皮の形成, 浮腫の形成並びにその他の皮膚反応について肉眼的に観察した。

紅斑, 浮腫等の判定は以下の Magnusson and Kligman の基準に従った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はクロルピクリン工業会にある。

- 0 = 肉眼的変化なし
- 1 = 散在性または斑状の紅斑
- 2 = 中等度びまん性紅斑
- 3 = 強い紅斑と浮腫

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す。

群	感作	惹起	供試動物数	感作反応動物数										陽性動物数 ^注	陽性率(%)	
				24時間後					48時間後							
				皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計			
0	1	2	3	0	1	2	3									
検体	0.5%検体	0.1% 検体	20													
	溶媒 注射用水	0.1% 検体	10													
陽性 対照	1%DNCB	0.25% DNCB	10													
	溶媒 エタノール	0.25% DNCB	5													

陽性率 = 評点 1 以上の皮膚反応を示した動物数 / 使用動物数 × 100

注：陽性動物数は惹起貼付除去の 24 あるいは 48 時間後に評点 1 以上の皮膚反応を示した動物数を算出した。

検体処理群の皮膚感作陽性率は 17/20=85%であり、強い皮膚感作性を有するものと考えられた。また、陽性対照群においても陽性率は 100%であった。

以上の結果から、クロルピクリン 80%くん蒸剤の皮膚感作性は陽性であると判断される。