

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3) マウスを用いた発がん性試験

(資料 No. T-22)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1988 年

検体純度:

供試動物: ICR 系マウス (CrI:CD-1 (ICR) BR)、1 群雌雄各 60 匹、投与開始時約 6 週齢、

体重: 雄 23.0~34.4g、雌 18.4~25.8 g

投与 53 週時に各群雌雄各 10 匹を中間屠殺した。

投与期間: 78 週間 (1986 年 6 月 20 日~1987 年 12 月 24 日)

投与方法: 検体をアセトンに溶解して、0、20、200、1000 及び 3000 ppm の濃度で飼料に混入し、78 週間にわたって随時摂食させた。検体を混入した飼料は 1 週間に 1 回調製した。3000 ppm 投与群には、投与開始後 15 週間は 2000 ppm の濃度で検体を混入した飼料を与えたが、15 週時の血液学的検査結果の評価後、3000ppm に増量した。

用量設定根拠:

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び生存率; 全動物について、生死及び明白な毒性症状の有無を毎日観察し、腫瘍の触診を含む詳細な臨床観察を週 1 回行った。

検体投与に起因すると思われる症状所見は認められなかった。

試験終了時の生存率を次表に示す。

投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000
生存率 (%)	雄	58	66	60	52	↓32
	雌	67	84	80	59	↓48

対照群との有意差検定は、Cox 二元回帰検定の Tarone 改良法及び Kruskal-Wallis 検定を用いて行った (↑↓: $p < 0.05$ 、↑↓: $p < 0.01$)。

3000 ppm 投与群の雌雄の 78 週時までの生存率は、対照群と比較して有意に低く、有意な負の傾向、すなわち投与に関連した減少が認められた。

体重変化: 試験開始後 14 週間は週 1 回、投与 16 週目以降は 4 週間に 1 回体重を測定した。また、試験開始前にも測定した。

投与群と対照群間で生物学的に意義のある差は認められなかった。3000 ppm 投与群雄で

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

は、対照群と比較して第 4 週時以降わずかに低かったが、その差は 5%以内であった。成長率又は体重増加量を解析したところ、統計学的有意差は認められなかった。高用量を 2000 ppm から 3000 ppm に変更した第 16 週以降も、動物の成長パターンに変化は認められなかった。

摂餌量及び食餌効率；試験開始後 14 週間は週 1 回、投与 16 週目以降は 4 週間に 1 回測定し、食餌効率も算出した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		20	200	1000	3000	20	200	1000	3000
摂餌量	16-52	↑105	102	101	101	102	101	102	101

対照群との有意差検定は、Dunnnett 検定を用いて行った (↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)。

表中の数値は変動の日安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

投与 1~13、1~52、1~78 及び 16~78 週の総摂餌量については、対照群と投与群の間に有意差は認められなかった。

20 ppm 投与群の雄では 16~52 週時の平均摂餌量が対照群と比較して有意に高かったが、その他の群ではこの期間の摂餌量はほぼ等しかった。食餌効率には群間で一貫した、もしくはは明らかな投与に関連した変化は認められなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)		20	200	1000	3000
平均検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	2.7	26.4	131.0	407.0
	雌	3.5	33.8	175.0	523.0

血液学的検査；投与 15 及び 27 週時に 0、1000 及び 3000 ppm (投与 15 週時は 2000 ppm) 投与群の各群雌雄各 10 匹を対象とし、投与 53 及び 79 週時には全群の雌雄各 10 匹を対象として、一夜絶食させた後、眼窩静脈叢から血液を採取し、以下の項目の測定を行った。

白血球数、補正白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、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、白血球分類 (投与 53 週及び 79 週のみ)、血球形態 (投与 53 週及び 79 週のみ)、網赤血球比 (投与 53 週及び 79 週のみ)、網赤血球数

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目及び検体投与の影響と考えられる変化がみられた項目を次表に示す。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)							
		雄				雌			
		20	200	1000	3000	20	200	1000	3000
赤血球数	27	—	—		↓92	—	—		↓95
	53				(91)				(92)
	79		↓88		↓86				
ヘモグロビン量	27	—	—		↓93	—	—		(98)
	53				(94)				(93)
ヘマトクリット値	27	—	—		↓92	—	—		(96)
	53				(91)				(93)
分葉核好中球数	53	↓42							

対照群との有意差検定は、Dunnnett 検定を用いて行った (↑↓: $p < 0.05$, ↑↑↓: $p < 0.01$)。

表中の数値は変動の日安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。—: 検査せず。

() は統計学的有意差はないが、参考値として表示。

3000 ppm 投与群では投与 27 及び 53 週時に赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値のわずかな減少が認められ、これらの一部では投与 27 週時にのみ統計学的有意差が認められた。79 週時に認められた投与に関連した変化は、3000 ppm 投与群雄の赤血球数の有意な減少のみであった。しかしながら、投与 79 週時の当該群の平均値 ($8.23 \times 10^6/\mu\text{L}$) は、対照群の実測値 ($6.68 \sim 11.03 \times 10^6/\mu\text{L}$) の範囲内であったため、本試験条件下では赤血球系パラメータの減少自体は、動物の恒常性にほとんど影響しなかったものと考えられた。

200 ppm 投与群の雄でも投与 79 週時に赤血球数の有意な低値が認められたが、1000 ppm 投与群では認められなかったことから、偶発的な変化と考えられた。また、20 ppm 投与群の雄では投与 53 週時に分葉核好中球数の低値がみられたが、高用量群では認められてなかったことから、偶発的な変化と考えられた。

臓器重量; 投与 53 週時の中間屠殺動物と試験終了時の全生存動物を対象とし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、脳 (脳幹全体を含む)、腎臓、肝臓 (胆嚢を含む)、肺 (気管支を含む)、精巢 (精巢上部を含む)、子宮 (卵巣を含む)

対照群に比べ統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

項目		検査 時期 (週)	投与量 (ppm)							
			雄				雌			
			20	200	1000	3000	20	200	1000	3000
肺	重量	53								
	対体重比									
	対脳重量比						↓89			
肝臓	重量	53			(112)	↑116				(120)
	対体重比				↑117	↑127				↑128
	対脳重量比				↑115	↑121				↑118
	重量	79								(112)
	対体重比									↑114
	対脳重量比									↑117
副腎	重量	53	↓45	↓45	↓55	↓64		↑140	↑130	
	対体重比		↓47	↓50	↓62	↓66	↑137	↑141	↑138	
	対脳重量比		↓48	↓52	↓63	↓66	(128)	↑132	↑132	

対照群との有意差検定は、Dunnett 検定を用いて行った (↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

() は統計学的有意差はないが、参考値として表示。

検体投与による影響として、肝臓の重量、対体重比又は対脳重量比の増加が、投与 53 週時には 1000 ppm 投与群の雄ならびに 3000 ppm 投与群の雌雄で、投与 79 週時には 3000 ppm 投与群の雌で認められた。

その他に検体投与に関連した変化は認められなかった^{申請者注1}。投与 53 週時には、副腎の重量ならびに対体重比又は脳重量比が全投与群の雄で有意に減少し、20、200 及び 1000 ppm 群の雌では有意に増加した。しかしながら、雌雄間で変化が一致せず、79 週時にはこのような差は認められなかったため、検体投与に関連したものではないと考えられた^{申請者注2}。

申請者注 1:

申請者注 2:

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

肉眼的病理検査；途中死亡、切迫屠殺、中間屠殺及び試験終了時の全生存動物について剖検を行った。

途中死亡・切迫屠殺動物では、3000 ppm 投与群で腎臓の褪色の発現頻度が増加した。この所見は、これらのマウスの病理組織学的検査で認められたアミロイドーシスの増加に関連しているものと思われた。この所見の発現頻度を次表に示す。

所見	検査時期	投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000
腎臓； 褪色	53 週	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	死亡・切迫殺	6/22	4/19	5/20	7/26	15/34	4/18	2/9	1/11	4/21	8/28
	最終屠殺	1/28	3/31	4/30	1/24	0/16	3/32	5/41	5/39	3/29	3/22

統計解析は実施しなかった。

表中の数値は所見が認められた動物数／検査動物数を示す。

病理組織学的検査；対照群及び 3000 ppm 投与群の中間屠殺及び最終屠殺例、ならびに全群の途中死亡・切迫屠殺例を対象として、以下の組織について病理標本を作成し、検鏡した。さらに、肺、肝臓、腎臓及び全ての腫瘍又は肉眼的病変部は 20、200 及び 1000 ppm 群の中間屠殺及び最終屠殺例についても病理標本を作成し、検鏡した。

腫瘍、肉眼的病変部、副腎、大動脈（胸部）、骨及び骨髄（大腿部）、脳（前脳、中脳及び後脳）、盲腸、結腸、十二指腸、精巣上体、食道、眼球、胆嚢、心臓、ハーダ一腺、回腸、空腸、腎臓、肝臓、気管支、肺、腸間膜リンパ節、乳腺（雌のみ）、卵巣、膵臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺（顎下腺）、坐骨神経、精嚢、骨格筋、皮膚、脊髄（頸部、中胸部、腰部）、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、上皮小体、気管、膀胱、子宮（頸部、体部、角）

〔非腫瘍性病変〕

認められた主要な非腫瘍性病変を表1に示す。

53週時には、顕著な組織学的所見として、1000 ppm 投与群の雄ならびに 3000 ppm 投与群の雌雄に小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。途中死亡・切迫屠殺動物及び最終屠殺動物では、1000 及び 3000 ppm 投与群の雌雄で、検体投与に関連した病理組織学的所見として、肺の多発性両染性肺泡マクロファージ、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、色素増加又は胆管増生が認められた。申請者注3

さらに 3000 ppm 投与群の途中死亡動物では投与に関連した病理組織学的所見として、全身性アミロイドーシスが認められた。アミロイドーシスは、この系統の同齢のマウスで頻繁に認められるが、3000 ppm 投与群での発現頻度増加は、検体投与に関連してこの症状が促進されたことを示している。申請者注31

〔腫瘍性病変〕

認められたすべての腫瘍性病変を表2に示す。

対照群の雌及び投与群の雌雄では、対照群の雄と比較して肺の肺泡／細気管支腺腫及び腺癌の発現頻度が高かった。しかしながら、これらの発現頻度には用量相関性が認められず、発現時期が遅く、最終屠殺動物や全動物において統計学的有意差がみられなかったことから、検体投与とは関係がないものと考えられた。なお、良性及び悪性腫瘍数、総腫瘍数及び担腫瘍動物数は、雌雄ともに群間に差はみられず、腫瘍の発生頻度に検体投与による影響は認められなかった。申請者注4

以上の結果から、検体のマウスに対する 78 週間飼料混入投与による発がん性試験における影響として、3000 ppm 投与群では生存率の低下、赤血球系パラメータの減少（赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の減少）が認められた。1000 及び 3000 ppm 投与群では肝臓重量の増加ならびに肺及び肝臓の病理組織学的変化（肺の多発性両染性肺泡マクロファージ、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、色素増加又は胆管増生）が認められた。さらに、3000 ppm 投与群の途中死亡動物では全身性アミロイドーシスが認められた。アミロイドーシスは、この系統の同齢のマウスでよく認められるが、3000 ppm 投与群での発現頻度の増加は、検体投与に関連してこの症状が悪化したことを示し

申請者注3：

申請者注4：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

ている。200 ppm 投与群ではこのような検体投与に関連した影響が認められなかったことから、無毒性量は 200 ppm（雄：26.4 mg/kg/日、雌：33.8 mg/kg/日）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た。

表1〔非腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000
53 週	副腎	所見\検査動物数	10	0	0	0	10	10	0	0	0	10
		皮質アミロイドーシス	4	0	0	0	8	3	0	0	0	5
	甲状腺	所見\検査動物数	10	0	0	0	10	10	0	0	0	10
		アミロイドーシス	5	0	0	0	8	6	0	0	0	5
	上皮小体	所見\検査動物数	8	0	0	0	7	10	0	0	0	7
		アミロイドーシス	0	0	0	0	1	4	0	0	0	3
	肺	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		肺胞/気管支周囲リンパ球浸潤	8	4	4	8	8	8	9	9	9	6
		肺炎	2	3	1	2	0	0	0	1	2	2
	心臓	所見\検査動物数	10	0	1	1	10	10	0	0	1	10
		アミロイドーシス	4	0	0	0	8	7	0	0	0	5
	脾臓	所見\検査動物数	10	0	2	3	10	10	0	1	1	10
		アミロイドーシス	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	肝臓	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		小葉中心性肝細胞肥大	0	1	1	8*	10*	1	2	2	1	9*
		胆管増生	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		色素増加	0	0	0	0	5*	0	0	0	0	0
		アミロイドーシス	4	3	6	2	4	2	2	2	3	4
		亜急性肝炎	8	10	10	10	10	10	10	9	10	10
		脂肪変性	4	3	0	1	2	1	1	0	1	3
	腎臓	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		単核細胞浸潤	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9
		アミロイドーシス	5	5	5	6	8	6	4	2	3	5
		腎症	5	8	8	7	7	7	8	9	9	8
	前胃	所見\検査動物数	10	0	0	0	10	10	0	0	0	10
		アミロイドーシス	2	0	0	0	5	5	0	0	0	3
腺胃	所見\検査動物数	10	0	0	1	10	10	0	2	0	10	
	アミロイドーシス	2	0	0	0	5	4	0	0	0	4	
十二指腸	所見\検査動物数	10	0	0	0	10	10	0	0	0	10	
	アミロイドーシス	2	0	0	0	5	5	0	0	0	5	
空腸	所見\検査動物数	10	0	0	0	10	10	0	1	0	10	
	アミロイドーシス	3	0	0	0	8	5	0	1	0	5	
回腸	所見\検査動物数	10	0	0	0	10	10	0	0	0	10	
	アミロイドーシス	6	0	0	0	8	8	0	0	0	5	
盲腸	所見\検査動物数	10	0	0	0	10	10	0	0	0	10	
	アミロイドーシス	1	0	0	0	6	0	0	0	0	4	

申請者注：

－：対象臓器なし

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

表1〔非腫瘍性病変〕(つづき)

検査 時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000
53 週	腸間膜リンパ節	所見\検査動物数	10	0	1	1	10	10	0	0	5	10
		アミロイドーシス	3	0	1	0	8	8	0	0	3	4
	精巣	所見\検査動物数	10	0	1	0	10	—	—	—	—	—
		アミロイドーシス	3	0	0	0	6	—	—	—	—	—
	卵巣	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	10	3	4	4	10
		アミロイドーシス	—	—	—	—	—	8	1	2	2	5
死亡・ 切迫殺	副腎	所見\検査動物数	22	19	20	26	34	18	9	11	20	28
		皮質アミロイドーシス	17	16	16	20	31	12	4	8	14	21
	甲状腺	所見\検査動物数	22	19	20	26	33	18	9	11	21	26
		アミロイドーシス	16	17	17	20	30	13	7	8	14	21
	上皮小体	所見\検査動物数	13	17	15	24	27	16	7	9	17	25
		アミロイドーシス	5	11	8	12	21*	7	2	3	9	15
	肺	所見\検査動物数	22	19	20	26	34	18	9	11	21	28
		肺胞/気管支周囲リンパ球浸潤	6	5	7	9	1	8	2	3	6	8
		肺炎	5	5	3	4	11	4	3	1	8	10
		多発性両染色性肺胞マクロファージ	0	0	0	5	6	0	0	0	2	9*
	心臓	所見\検査動物数	22	19	20	26	34	18	9	11	21	28
		アミロイドーシス	16	15	16	21	32	12	4	7	14	23
	脾臓	所見\検査動物数	21	18	20	26	33	18	9	11	20	28
		アミロイドーシス	13	10	12	11	25	11	3	6	10	18
	肝臓	所見\検査動物数	21	19	20	26	31	17	9	11	20	28
		小葉中心性肝細胞肥大	2	1	2	14*	30*	3	1	2	6	18*
		胆管増生	0	0	1	3	7*	0	0	0	0	0
		色素増加	0	0	2	5	14*	1	1	0	1	8
		アミロイドーシス	16	16	14	20	26	9	3	6	13	21
		亜急性肝炎	19	15	18	25	28	14	7	6	16	26
		脂肪変性	1	1	1	1	0	0	0	0	2	3
	腎臓	所見\検査動物数	22	19	20	26	34	18	9	11	21	27
		単核細胞浸潤	19	18	18	22	31	14	5	8	16	24
		アミロイドーシス	17	16	17	21	31	13	7	7	15	21
腎症		18	16	17	19	30	15	6	8	16	24	
前胃	所見\検査動物数	22	18	20	26	34	18	9	11	20	28	
	アミロイドーシス	11	10	8	16	21	8	5	1	10	15	
腺胃	所見\検査動物数	22	18	18	24	32	17	9	11	19	28	
	アミロイドーシス	13	9	9	13	17	7	3	5	12	14	

申請者注:

—: 対象臓器なし

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

表1〔非腫瘍性病変〕(つづき)

検査 時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000
死亡・ 切迫殺	十二指腸	所見\検査動物数	17	13	16	17	21	15	7	8	14	26
		アミロイドーシス	11	8	13	14	19	11	3	5	9	19
	空腸	所見\検査動物数	18	15	16	18	20	15	7	7	15	23
		アミロイドーシス	14	11	13	14	17	11	5	5	11	18
	回腸	所見\検査動物数	19	16	16	19	17	14	5	6	14	25
		アミロイドーシス	17	13	14	16	13	12	4	5	10	21
	盲腸	所見\検査動物数	15	12	15	13	13	9	7	4	10	17
		アミロイドーシス	1	0	0	3	2	0	0	0	0	0
	腸間膜リンパ節	所見\検査動物数	22	19	18	24	29	16	9	11	18	28
		アミロイドーシス	12	10	11	12	20	10	2	4	12	15
	精巣	所見\検査動物数	22	19	20	26	34	—	—	—	—	—
		アミロイドーシス	14	12	14	14	28	—	—	—	—	—
卵巢	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	18	9	11	20	28	
	アミロイドーシス	—	—	—	—	—	11	7	5	13	19	
最終屠殺	副腎	所見\検査動物数	28	0	0	0	16	32	0	0	0	22
		皮質アミロイドーシス	15	0	0	0	0	15	0	0	0	5
	甲状腺	所見\検査動物数	28	0	0	0	16	32	0	0	0	22
		アミロイドーシス	16	0	0	0	1	17	0	0	0	6
	上皮小体	所見\検査動物数	25	0	0	0	12	23	0	0	0	17
		アミロイドーシス	4	0	0	0	0	7	0	0	0	0
	肺	所見\検査動物数	28	31	30	24	16	32	41	39	29	22
		肺胞/気管支周囲リンパ球浸潤	9	20	12	15	11*	27	31	30	19	22
		肺炎	1	2	1	4	0	7	6	11	8	3
		多発性両染性肺胞マクロファージ	0	0	1	5*	8*	0	0	0	3	13*
	心臓	所見\検査動物数	28	0	0	0	16	32	0	2	0	22
		アミロイドーシス	14	0	0	0	1	17	0	0	0	7
	脾臓	所見\検査動物数	28	5	5	2	16	32	10	12	7	22
		アミロイドーシス	6	0	2	0	0	13	8	3	4	3
	肝臓	所見\検査動物数	28	31	30	24	16	32	41	39	29	22
		小葉中心性肝細胞肥大	1	1	1	18*	16*	0	0	0	4*	10*
		胆管増生	0	0	1	4	5*	1	0	0	0	2
		色素増加	0	0	0	7*	11*	2	1	4	5	8*
アミロイドーシス		14	15	15	6	0	17	15	15	8	5	
亜急性肝炎		28	30	29	23	15	32	41	39	29	22	
脂肪変性	6	5	4	3	2	7	5	7	6	3		

申請者注:

—: 対象臓器なし

(つづく)

表1〔非腫瘍性病変〕(つづき)

検査 時期	性別		雄					雌					
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000	
最終 屠殺	腎臓	所見\検査動物数	28	31	30	24	16	32	41	39	29	22	
		単核細胞浸潤	26	30	27	24	14	32	41	38	28	21	
		アミロイドーシス	15	18	16	8	0	17	20	22	11	7	
		腎症	27	27	26	24	16	24	32	30	28	20	
	前胃	所見\検査動物数	28	0	0	0	16	32	0	0	1	22	
		アミロイドーシス	12	0	0	0	0	11	0	0	0	7	
	腺胃	所見\検査動物数	28	0	2	0	16	32	1	4	1	22	
		アミロイドーシス	12	0	1	0	0	11	0	3	1	1	
	十二指腸	所見\検査動物数	28	0	0	0	16	32	0	0	0	22	
		アミロイドーシス	16	0	0	0	1	17	0	0	0	7	
	空腸	所見\検査動物数	28	1	0	0	16	32	0	0	0	22	
		アミロイドーシス	16	1	0	0	1	17	0	0	0	8	
	回腸	所見\検査動物数	28	0	0	0	16	32	1	0	0	22	
		アミロイドーシス	16	0	0	0	1	18	0	0	0	9	
	盲腸	所見\検査動物数	28	2	0	0	16	32	0	1	0	22	
		アミロイドーシス	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	
	腸間膜 リンパ節	所見\検査動物数	28	6	11	7	16	32	13	11	10	22	
		アミロイドーシス	7	3	4	0	2	15	6	3	2	7	
	精巣	所見\検査動物数	28	0	1	0	16	—	—	—	—	—	
		アミロイドーシス	10	0	0	0	0	—	—	—	—	—	
	卵巢	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	32	30	25	18	22	
		アミロイドーシス	—	—	—	—	—	15	11	12	3	5	
	全動物	副腎	所見\検査動物数	60	19	20	26	60	60	9	11	20	60
			皮質アミロイドーシス	36	16	16	20	39	30	4	8	14	31
甲状腺		所見\検査動物数	60	19	20	26	59	60	9	11	21	58	
		アミロイドーシス	37	17	17	20	39	36	7	8	14	32	
上皮小体		所見\検査動物数	46	17	15	24	46	49	7	9	17	49	
		アミロイドーシス	9	11	8	12	22*	18	2	3	9	18	
肺		所見\検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
		肺胞/気管支周囲リン パ球浸潤	23	29	23	32	20	43	42	42	34	36	
		肺炎	8	10	5	10	11	11	9	13	18	15	
		多発性両染性肺胞マク ロファージ	0	0	1	10*	14*	0	0	0	5*	22*	
心臓		所見\検査動物数	60	19	21	27	60	60	9	13	22	60	
		アミロイドーシス	34	15	16	21	41	36	4	7	14	35	

申請者注:

—: 対象臓器なし

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

表1〔非腫瘍性病変〕(つづき)

検査 時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000
全 動 物	脾臓	所見\検査動物数	59	23	27	31	59	60	19	24	28	60
		アミロイドーシス	19	10	14	11	25	25	11	9	14	21
	肝臓	所見\検査動物数	59	60	60	60	57	59	60	60	59	60
		小葉中心性肝細胞肥大	3	3	4	40*	56*	4	3	4	11*	37*
		胆管増生	0	0	2	7*	13*	1	0	0	0	2
		色素増加	0	0	2	12*	30*	3	2	4	6	16*
		アミロイドーシス	34	34	35	28	30	28	20	23	24	30
		亜急性肝炎	55	55	57	58	53	56	58	54	55	58
		脂肪変性	11	9	5	5	4	8	6	7	9	9
	腎臓	所見\検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60	60	59
		単核細胞浸潤	55	58	55	56	55	56	56	56	54	54
		アミロイドーシス	37	39	38	35	39	36	31	31	29	33
		腎症	50	51	51	50	53	46	46	47	53	52
	前胃	所見\検査動物数	60	18	20	26	60	60	9	11	21	60
		アミロイドーシス	25	10	8	16	26	24	5	1	10	25
	腺胃	所見\検査動物数	60	18	20	25	58	59	10	17	20	60
		アミロイドーシス	27	9	10	13	22	22	3	8	13	19
	十二指腸	所見\検査動物数	55	13	16	17	47	57	7	8	14	58
		アミロイドーシス	29	8	13	14	25	33	3	5	9	31
	空腸	所見\検査動物数	56	16	16	18	46	57	7	8	15	55
		アミロイドーシス	33	12	13	14	26	33	5	6	11	31
	回腸	所見\検査動物数	57	16	16	19	43	56	6	6	14	57
		アミロイドーシス	39	13	14	16	22	38	4	5	10	35
	盲腸	所見\検査動物数	53	14	15	13	39	51	7	5	10	49
		アミロイドーシス	2	0	0	3	9*	0	0	0	0	7*
	腸間膜 リンパ節	所見\検査動物数	60	25	30	32	55	58	22	22	33	60
アミロイドーシス		22	13	16	12	30	33	8	7	17	26	
精巣	所見\検査動物数	60	19	22	26	60	—	—	—	—	—	
	アミロイドーシス	27	12	14	14	34	—	—	—	—	—	
卵巢	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	60	42	40	42	60	
	アミロイドーシス	—	—	—	—	—	34	19	19	18	29	

申請者注：

—：対象臓器なし

表2〔腫瘍性病変〕

検査 時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000
53 週	肺	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		肺胞/細気管支腺腫 (B)	1	2	4	2	1	2	2	2	0	1
	肝臓	所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		肝細胞腺腫 (B)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	子宮	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	10	4	5	4	10
		顆粒膜細胞腫 (M)	—	—	—	—	—	0	0	0	1	0
死 亡 ・ 切 迫 殺	下垂体	所見\検査動物数	22	19	20	24	30	18	9	11	20	28
		腺腫 (B)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	甲状腺	所見\検査動物数	22	19	20	26	33	18	9	11	21	26
		濾胞細胞腺腫 (B)	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	肺	所見\検査動物数	22	19	20	26	34	18	9	11	21	28
		肺胞/細気管支腺腫 (B)	0	3	1	7*	8*	1	0	2	4	3
		肺胞/細気管支癌 (M)	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0
	肝臓	所見\検査動物数	21	19	20	26	31	17	9	11	20	28
		肝細胞腺腫 (B)	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1
		肝細胞癌 (M)	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
		血管肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	精巣	所見\検査動物数	22	19	20	26	34	—	—	—	—	—
		間細胞腫 (B)	0	1	0	0	0	—	—	—	—	—
	卵巣	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	18	9	11	20	28
		血管肉腫 (M)	—	—	—	—	—	1	0	0	0	0
		嚢胞腺腫 (B)	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1
	子宮	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	18	9	11	19	28
		内膜間質ポリープ (B)	—	—	—	—	—	3	1	0	1	0
		平滑筋腫 (B)	—	—	—	—	—	1	0	0	0	1
		血管腫 (B)	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1
		平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—	—	0	1	0	1	0
	子宮頸 部	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	18	9	11	19	27
		平滑筋腫 (B)	—	—	—	—	—	0	0	1	0	0
		平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—	—	1	0	0	0	0
ハータ ー腺	所見\検査動物数	21	19	19	26	31	18	9	11	21	28	
	腺腫 (B)	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
乳腺	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	17	9	11	21	27	
	癌 (M)	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1	

申請者注:

(B): 良性腫瘍

(M): 悪性腫瘍

—: 対象臓器なし

(つづく)

表2〔腫瘍性病変〕(つづき)

検査 時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000
死亡・ 切迫殺	前頭部	所見\検査動物数	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		未分化癌 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	腹腔	所見\検査動物数	1	1	1	2	0	2	0	0	1	1
		骨肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	胸腔	所見\検査動物数	2	0	0	0	2	3	0	1	0	0
		骨肉腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	造血系	所見\検査動物数	0	1	2	2	0	2	1	4	3	4
		リンパ球性リンパ腫 (M)	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0
		混合型リンパ腫 (M)	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
		未分化型リンパ腫 (M)	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
		組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		顆粒球性白血病 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	脊柱	所見\検査動物数	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		血管肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	膣	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	1	0	0	0	2
		線維肉腫 (M)	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1
最終 屠殺	下垂体	所見\検査動物数	28	0	0	0	15	32	1	1	0	22
		腺腫 (B)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	甲状腺	所見\検査動物数	28	0	0	0	16	32	0	0	0	22
		濾胞細胞腺腫 (B)	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	肺	所見\検査動物数	28	31	30	24	16	32	41	39	29	22
		肺胞/細気管支腺腫 (B)	4	5	7	2	3	6	10	7	7	6
		肺胞/細気管支癌 (M)	0	0	2	0	0	1	2	0	0	0
	脾臓	所見\検査動物数	28	5	5	2	16	32	10	12	7	22
		血管肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	肝臓	所見\検査動物数	28	31	30	24	16	32	41	39	29	22
		肝細胞腺腫 (B)	1	2	7	4	4	0	0	1	0	3
		肝細胞癌 (M)	2	0	2	2	0	0	1	0	0	0
		血管腫 (B)	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0
		血管肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
	腎臓	所見\検査動物数	28	31	30	24	16	32	41	39	29	22
		腎細胞癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
精囊	所見\検査動物数	28	9	10	7	16	—	—	—	—	—	
	未分化癌 (M)	0	0	0	0	1	—	—	—	—	—	

申請者注:

(B): 良性腫瘍

(M): 悪性腫瘍

—: 対象臓器なし

(つづく)

表2〔腫瘍性病変〕(つづき)

検査 時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000
最終 屠殺	膀胱	所見\検査動物数	28	1	1	2	16	32	0	1	0	21
		癌 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	卵巢	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	32	30	25	18	22
		黄体腫 (B)	—	—	—	—	—	0	1	0	1	1
		絨毛癌 (M)	—	—	—	—	—	0	0	1	0	0
	子宮	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	32	27	32	19	22
		内膜間質ポリープ (B)	—	—	—	—	—	2	2	3	0	0
		平滑筋腫 (B)	—	—	—	—	—	0	1	1	0	0
		血管肉腫 (M)	—	—	—	—	—	0	0	0	1	0
		腺癌 (M)	—	—	—	—	—	0	0	2	0	0
	ハート 腺	所見\検査動物数	28	0	0	0	16	31	0	1	1	21
		腺腫 (B)	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	乳腺	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	32	1	2	0	22
		癌 (M)	—	—	—	—	—	0	1	2	0	0
	皮膚(そ の他の 部位)	所見\検査動物数	9	13	7	11	3	5	9	8	4	2
		扁平上皮乳頭腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		粘液肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		血管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	腹腔	所見\検査動物数	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
		奇形腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	造血系	所見\検査動物数	0	2	0	0	0	1	1	0	1	0
		混合型リンパ腫 (M)	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
		未分化型リンパ腫 (M)	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
		組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
全 動物	下垂体	所見\検査動物数	60	19	20	24	55	60	10	12	20	60
		腺腫 (B)	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
	甲状腺	所見\検査動物数	60	19	20	26	59	60	9	11	21	58
		濾胞細胞腺腫 (B)	1	0	0	0	2	1	0	0	1	0
	肺	所見\検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
		肺胞/細気管支腺腫 (B)	5	10	12	11	12	9	12	11	11	10
		肺胞/細気管支癌 (M)	0	0	2	2	0	1	3	1	0	0
	脾臓	所見\検査動物数	59	23	27	31	59	60	19	24	28	60
		血管肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

申請者注:

(B): 良性腫瘍

(M): 悪性腫瘍

—: 対象臓器なし

(つづく)

表2〔腫瘍性病変〕(つづき)

検査 時期	性別		雄					雌				
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000
全 動 物	肝臓	所見\検査動物数	59	60	60	60	57	59	60	60	59	60
		肝細胞腺腫 (B)	2	4	7	5	5	0	0	1	0	4
		肝細胞癌 (M)	2	0	3	2	0	1	1	0	0	0
		血管腫 (B)	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0
		血管肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0
	腎臓	所見\検査動物数	60	60	60	60	60	60	60	60	60	59
		腎細胞癌 (M)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	精巣	所見\検査動物数	60	19	22	26	60	—	—	—	—	—
		間細胞腫 (B)	0	1	0	0	0	—	—	—	—	—
	精嚢	所見\検査動物数	60	28	30	34	59	—	—	—	—	—
		未分化癌 (M)	0	0	0	0	1	—	—	—	—	—
	膀胱	所見\検査動物数	60	19	20	27	59	59	9	12	19	59
		癌 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	卵巣	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	60	42	40	42	60
		血管肉腫 (M)	—	—	—	—	—	1	0	0	0	0
		黄体腫 (B)	—	—	—	—	—	0	1	0	1	1
		嚢胞腺腫 (B)	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1
		絨毛癌 (M)	—	—	—	—	—	0	0	1	0	0
	子宮	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	60	40	48	42	60
		顆粒膜細胞腫 (M)	—	—	—	—	—	0	0	0	1	0
		内膜間質ポリープ (B)	—	—	—	—	—	5	3	3	1	0
		平滑筋腫 (B)	—	—	—	—	—	1	1	1	0	1
		血管腫 (B)	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1
		血管肉腫 (M)	—	—	—	—	—	0	0	0	1	0
		平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—	—	0	1	0	1	0
	腺癌 (M)	—	—	—	—	—	0	0	2	0	0	
	子宮頸 部	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	60	9	13	19	59
		平滑筋腫 (B)	—	—	—	—	—	0	0	1	0	0
		平滑筋肉腫 (M)	—	—	—	—	—	1	0	0	0	0
	ハーダ ー腺	所見\検査動物数	58	19	19	26	57	59	9	12	22	59
腺腫 (B)		1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	
乳腺	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	59	10	13	21	58	
	癌 (M)	—	—	—	—	—	0	1	2	0	1	

申請者注：

(B)：良性腫瘍

(M)：悪性腫瘍

—：対象臓器なし

(つづく)

表2〔腫瘍性病変〕(つづき)

検査 時期	性別		雄					雌					
	投与量 (ppm)		0	20	200	1000	3000	0	20	200	1000	3000	
全 動 物	皮膚(そ 他の 部位)	所見\検査動物数	17	17	13	20	9	10	13	10	8	6	
		扁平上皮乳頭腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
		粘液肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
		血管腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	前頭部	所見\検査動物数	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
		未分化癌 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	腹腔	所見\検査動物数	2	1	1	2	0	2	0	1	1	2	
		骨肉腫 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
		奇形腫 (B)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	胸腔	所見\検査動物数	2	0	0	0	2	3	0	1	0	0	
		骨肉腫 (M)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	造血系	所見\検査動物数	0	3	2	2	0	3	2	4	4	4	
		リンパ球性リンパ腫 (M)	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0	
		混合型リンパ腫 (M)	0	1	1	0	0	0	1	1	2	1	
		未分化型リンパ腫 (M)	0	2	1	0	0	0	1	1	0	0	
		組織球腫 (M)	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
		顆粒球性白血病 (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
		組織球性肉腫 (M)	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	
	脊柱	所見\検査動物数	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
		血管肉腫 (M)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	膣	所見\検査動物数	—	—	—	—	—	1	0	0	0	2	
		線維肉腫 (M)	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1	
	合 計	検査動物数		60	60	60	60	60	60	60	60	60	
		腫瘍数	良性	9	15	21	19	20	16	19	22	15	19
			悪性	3	3	9	6	3	7	9	11	10	8
		腫瘍総数		12	18	30	25	23	23	28	33	25	27
		担腫瘍動物数	良性	9	15	21	19	17	16	18	19	13	16
悪性			3	3	9	5	3	6	8	10	10	8	
担腫瘍動物数		12	18	28	21	20	21	24	25	20	21		

申請者注：

(B)：良性腫瘍

(M)：悪性腫瘍

—：対象臓器なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(6) 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 No. T-23)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1987 年

検体純度:

供試動物: SD 系ラット (CrI:COBS/CD)、1 群雌雄各 30 匹、投与開始時 6 週齢

投与期間: P 世代; 投与開始から F₁ 児離乳時までの約 19 週間、F₁ 世代; 離乳時から F₂ 児離乳時までの約 21 週間 (1986 年 7 月 23 日~1987 年 4 月 17 日)

投与方法: 検体を 0、5、20、500、2500 ppm 含有した飼料を自由に摂食させた。飼料は週 1 回以上調製して凍結保存し、5 及び 20 ppm 飼料は毎日、500 及び 2500 ppm 飼料は週 3 回取り替えた。

用量設定根拠:

交配・調整・選抜及び観察・検査項目: 概要を次頁の表にまとめた。

一般状態及び死亡率: 全動物について、一般状態及び生死を毎日観察した。

体重: 全群について体重を毎週測定した。また、交尾の確認された雌については、妊娠 0、7、14 及び 21 日ならびに哺育 0、7、14 及び 21 日に体重を測定した。児動物の体重は哺育 0、4、7、14 及び 21 日に測定した。

摂餌量: 5 ppm 投与群及び 20 ppm 投与群は毎日、その他の群は週 3 回測定した。また、交尾の確認された雌について、0、500 及び 2500 ppm 投与群は妊娠 0~2、2~5、5~7、7~9、9~12、12~14、14~16、16~19 及び 19~21 日、5 ppm 投与群及び 20 ppm 投与群は妊娠 0~21 日の間に毎日測定した。哺育期間中については、0、500 及び 2500 ppm 投与群は哺育 0~2、2~5、5~7、7~9、9~12 及び 12~14 日、また 5 ppm 投与群及び 20 ppm 投与群は哺育 0~14 日の間に毎日測定した。

交配及び妊娠の確認: 雌を同群の雄と 1 対 1 で同居させて交配を行い、膣栓又は膣垢中に精子が確認された場合に交尾成立と判断し、妊娠 0 日とした。14 日間同居させても交尾が確認できなかった場合は同じ群の別の雄とさらに 7 日間同居させた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

繁殖性に関する指標；交配、妊娠及び哺育の各期間の観察に基づき次の指標を算出した。

妊娠期間；妊娠 0 日から出産日までの日数

交尾率 (%) = (交尾確認動物数 / 同居させた動物数) × 100

授胎率 (%) = (妊娠させた雄動物数 / 交尾確認雄動物数) × 100

妊娠率 (%) = (妊娠雌動物数 / 交尾確認雌動物数) × 100

出産率 (%) = (生存児を出産した雌動物数 / 妊娠雌動物数) × 100

性比 (%) = 雄児数 / 総児数 × 100

離乳率 (%) = (生後 21 日生存児数 / 生後 4 日児数調整後生存児数) × 100

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

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 (10 週)	雌 1 対雄 1 で同居。交尾は膣栓又は膣垢中の精子で確認 (妊娠 0 日)	生死及び一般状態の観察 (毎日) 体重測定; 週 1 回 摂餌量測定; 5, 20 ppm 群は毎日、0, 500, 2500 ppm 群は週 3 回 性周期; 交配 1 週間前から毎日
	交配 (最長 21 日間)		交尾率、交配期間を記録
	妊娠 (3 週)		体重測定; 妊娠 0, 7, 14, 21 日 摂餌量測定; 5, 20 ppm 群は毎日、0, 500, 2500 ppm 群は妊娠 0, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19, 21 日
	出産 (F ₁)		妊娠期間、出産率を記録 産児の数 (生存及び死亡)、体重、性比を記録
F ₁	哺育 (3 週)	生後 4 日に各同腹児数を 8 匹 (可能ならば雄 4 匹、雌 4 匹) に調整	母動物体重測定; 哺育 0, 7, 14, 21 日 母動物摂餌量測定; 5, 20 ppm 群は哺育 14 日まで毎日、0, 500, 2500 ppm 群は妊娠 0, 2, 5, 7, 9, 12, 14 日 児動物体重測定; 生後 0, 4, 7, 14, 21 日
	離乳	生後 21 日に F ₁ 離乳児から継代用の各群雄 30 匹雌 30 匹を選抜、その他は屠殺 P 世代親動物の屠殺	離乳率を記録 選抜されなかった児動物の肉眼的病理検査 親動物の肉眼的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査
	育成期間 (12 週) 交配 (最長 21 日間) 妊娠 (3 週)	(P 世代に準ずる)	(P 世代に準ずる) (P 世代に準ずる) (P 世代に準ずる)
	出産 (F ₂) 哺育 (3 週)		(P 世代に準ずる) (P 世代に準ずる)
F ₂	離乳	F ₂ 離乳児の屠殺 F ₁ 世代親動物の屠殺	離乳児の肉眼的病理検査 親動物の肉眼的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査

肉眼的病理検査及び臓器重量; P 世代及び F₁ 世代親動物はそれぞれの児動物離乳後、継代用を選抜されなかった F₁ 児動物及び全ての F₂ 児動物は離乳時に安楽死させ、肉眼的病理検査を行った。また、P 世代及び F₁ 世代の全親動物について、以下の臓器の重量を測定した。

精巣上体、卵巣、前立腺、精嚢、精巣、子宮

病理組織学的検査; P 世代及び F₁ 世代親動物の対照群と 2500 ppm 投与群については、以下の組織について病理標本を作成し、鏡検した。

子宮頸部及び膣、精巣上体、卵巣、前立腺、精嚢、精巣、子宮

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

結 果：概要を次頁の表に示した。

親動物；いずれの世代においても、一般状態あるいは死亡率に検体投与に関連した変化は認められなかった。

2500 ppm 投与群の P 世代及び F₁ 世代雄では、試験期間を通じて体重が有意に低かった。P 世代雌の体重は交配前期間、妊娠期間及び哺育期間中、対照動物とほぼ同じであった。F₁ 世代雌の体重は交配前期間から妊娠期間中及び哺育 14 日まで、有意に低値であったが、妊娠期間中の体重増加には検体投与による影響はみられなかった。

P 世代親動物の摂餌量は 2500 ppm 投与群では投与初期に低値を示したが、それ以外は概して検体投与による影響はみられなかった。F₁ 世代雄の摂餌量は試験期間中測定した多くの期間で低かった。F₁ 世代雌の摂餌量は交配前期間では影響がみられなかったが、妊娠 0～2、2～5 及び 9～12 日では低下していた。F₁ 世代雌の哺育期間中の摂餌量には影響がみられなかった。

P 又は F₁ 世代とも生殖能（交尾率、妊娠率、授胎率、出産率及び性周期）には検体投与による影響はみられなかった。P 世代の 500 ppm 投与群及び 2500 ppm 投与群の平均妊娠期間 22.0 日は対照群の 21.7 日より有意に長かったが、検体投与の影響とは考えられなかった^{申請者注 1}。

剖検及び病理組織学的検査では検体投与に関連した変化はみられなかった。臓器重量では、P 世代の 2500 ppm 投与群の雄で精巣重量体重比の有意な増加が認められた。この所見は、同群の雄の体重が増加抑制を示したことと関係があった。F₁ 世代の 2500 ppm 投与群の雄で左精巣上体重量体重比が対照値を有意に上回っていた。この所見は高用量群で認められた最終体重の有意な低値と関係があり、検体の投与とは関係がないと考えられた。また、5 及び 2500 ppm 投与群の雄では、前立腺及び精囊の重量が有意に低かったが、体重比には有意性のある影響は認めなかったため、これらの重量の低下は検体投与と関係があるとは考えられなかった。

児動物；F₁ 世代の 2500 ppm 投与群では、総死産児数が対照群を有意に上回っていた。この所見は F₂ 世代では再現されず、検体の投与と関係があるとは考えられなかった。また、F₁ 世代の 500 ppm 投与群では離乳率が対照群を有意に上回ったが、2500 ppm 投与群では影響がなかったことから検体投与による影響とは考えられなかった。

F₂ 世代の 5、20 及び 500 ppm 投与群では、哺育 1～4 日に死亡した児動物数が対照群を有意に下回り、また離乳率が対照群を有意に上回ったが、検体の投与と関係があるとは考えられなかった^{申請者注 2}。

その他、F₁ 及び F₂ 児動物の同腹児数、体重、生存率及び性比には検体投与による影響は

申請者注 1：

申請者注 2：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

みられなかった。児動物の肉眼的病理検査では、いずれの世代においても検体投与に関連する変化はみられなかった。F₁世代では、腎盂拡張が検体投与群のみに認められたが、この所見の背景対照データは1群あたり1腹1児動物から10腹17児動物の範囲であり、F₂世代の対照群でも同様な発現頻度で認められていることから、検体投与に関連しないと考えられた。

以上の結果より、2世代にわたって検体を飼料中に混入して投与した場合、2500 ppm 投与群で親動物の体重及び摂餌量の低下が認められたが、児動物には何ら影響は認められなかった。また、繁殖能に対しては何ら影響はみられなかった。

したがって、無毒性量は親動物に対しては500 ppm (P:雄 38.77 mg/kg、雌 45.01 mg/kg、F₁:雄 56.95 mg/kg、雌 60.83 mg/kg)、児動物に対しては2500 ppm (F₁:雄 196.27 mg/kg、雌 218.85 mg/kg、F₂:雄 302.08 mg/kg、雌 324.17 mg/kg) と判断される。繁殖については最高投与量の2500 ppmでも影響がなかった。

結果の概要

世代		親：P 児：F ₁					親：F ₁ 児：F ₂						
投与量 (ppm)		対照	5	20	500	2500	対照	5	20	500	2500		
動物数	雄	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30		
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30		
死亡	雄	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
	雌	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0		
一般状態		検体投与に起因する異常なし					検体投与に起因する異常なし						
親動物	体重	雄	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	↓試験7-133日	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	↓試験119-266日	
		雌	育成期	—	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	有意差なし	↓試験147-196日 ↓試験119, 133, 140日
			妊娠中	—	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	有意差なし	↓妊娠7, 14日 ↓妊娠0, 21日
			哺育期	—	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	有意差なし	↓哺育0, 7, 14日
			雄	—	↑試験128-131日	↑試験117-119日 ↑試験119-121日	↑試験128-131日	有意差なし	↓試験0-2日 ↓試験44-47, 56-58日	—	↓試験135-138日	↓試験135-138日 ↓試験175-177日	有意差なし

太枠は検体投与による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)

Dunnnett 検定：体重、摂餌量

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

結果の概要 (つづき)

世代			親 : P 児 : F ₁				親 : F ₁ 児 : F ₂															
投与量 (ppm)			対照	5	20	500	2500	対照	5	20	500	2500										
親動物	摂餌量	雌	-	有意差なし	有意差なし	↑試験 49-51日	↓試験 0-2、 5-7日	-	↓試験 119-121、 121-124、 126-128、 131-133、 180-182日	↓試験 126-128、 131-133、 135-138、 138-140、 152-154、 159-161、 166-168、 173-175、 175-177、 180-182、 184-187日	↑試験 182-184日	↓試験 126-128日										
		妊娠中											-	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし	-	↓妊娠 9-12日	↓妊娠 9-12日	有意差なし	↓妊娠0-2、 2-5、 9-12日
		哺育期											-	↓哺育 12-14日 ↑哺育 9-12日	↑哺育 9-12日	有意差なし	↓哺育 12-14日	-	↑哺育9-12日	↑哺育9-12日	有意差なし	有意差なし

太枠は検体投与による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)

Dunnnett 検定 : 摂餌量

(つづく)

結果の概要 (つづき)

世代		親 : P 児 : F ₁					親 : F ₁ 児 : F ₂						
投与量 (ppm)		対照	5	20	500	2500	対照	5	20	500	2500		
親動物	検体摂取量 ^{a)} (育成期)	雄	—	0.38	1.55	38.77	196.27	—	0.56	2.20	56.95	302.08	
		雌	—	0.44	1.76	45.01	218.85	—	0.56	2.26	60.83	324.17	
	臓器重量	左精巣	重量	1.75	1.79	1.79	1.78	1.76	1.78	1.79	1.79	1.84	1.82
			体重比	0.31	0.32	0.31	0.32	↑0.34	0.30	0.31	0.31	0.31	0.34
		右精巣	重量	1.76	1.78	1.79	1.80	1.77	1.79	1.80	1.76	1.83	1.76
			体重比	0.31	0.33	0.31	0.33	↑0.34	0.30	0.31	0.30	0.31	0.33
	左精巣 上体	重量	0.79	0.81	0.79	0.75	0.80	0.68	0.63	0.68	0.71	0.69	
		体重比	0.14	0.15	0.14	0.14	0.15	0.11	0.11	0.12	0.12	↑0.13	
	前立腺	重量	1.07	0.98	1.13	1.06	0.96	0.84	↓0.66	0.78	0.71	↓0.63	
		体重比	0.19	0.18	0.20	0.19	0.18	0.14	0.11	0.14	0.12	0.12	
	精囊	重量	2.07	1.96	2.26	2.06	1.94	2.09	↓1.82	1.94	1.92	↓1.86	
		体重比	0.36	0.36	0.39	0.37	0.37	0.35	0.31	0.33	0.33	0.35	
	肉眼的病理検査 ^{b)} ; 着床痕なし		6/28	4/30	7/30	6/30	2/30	8/30	6/29	1/30	3/30	5/30	
	病理組織学的検査		検体投与に起因する異常なし					検体投与に起因する異常なし					
	交尾率 (%)	雄	96.7	96.7	86.7	93.3	86.2	96.7	86.7	100	96.7	96.7	
		雌	100	100	100	96.7	96.7	96.7	100	100	96.7	100	
	授胎率 (%)		78.6	82.8	88.5	85.7	96.0	72.4	88.5	96.7	93.1	86.2	
	妊娠率 (%)		78.6	83.3	76.7	82.8	96.6	72.4	79.3	96.7	93.1	83.3	
	出産率 (%)		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	妊娠期間 (日)		21.7	21.9	22.0	↑22.0	↑22.0	22.0	21.9	21.9	21.9	21.9	
児動物	平均産児数		13.5	12.3	12.4	11.9	13.1	12.6	11.0	12.8	12.7	12.8	
	総死産児数		2	5	5	7	↑14	7	6	7	11	10	
	生後1-4日死亡率 (%)		3.3	6.5	3.2	0.0	3.1	14.0	↓3.3	↓5.1	↓3.7	12.5	
	離乳率 (%)		95.0	93.5	96.8	↑99.4	96.9	85.5	↑95.6	↑93.2	↑94.5	86.1	
	生存児数 /腹	生後0日	13.5	12.1	12.2	11.6	12.6	12.2	10.7	12.5	12.3	12.4	
		生後4日 ^{c)}	13.2	12.2	12.0	11.6	12.4	11.7	10.4	12.5	12.3	12.0	
		生後7日	7.9	7.8	7.8	7.5	7.8	7.7	7.6	7.9	8.0	7.8	
		生後14日	7.9	7.8	7.8	7.5	7.8	7.7	7.6	7.8	8.0	7.8	
		生後21日	7.8	7.8	7.8	7.5	7.8	7.7	7.6	7.8	8.0	7.8	
	性比	生後0日	43.9	48.8	45.2	48.6	49.9	49.8	47.4	48.2	50.3	49.2	
生後21日		48.5	50.3	48.3	46.9	49.3	46.9	47.1	50.9	49.3	52.2		

— : 対照群

a) 申請者が算出した。

b) 表中の数値は所見がみられた母動物数/検査母動物数を示す。

c) 児動物数調整前。

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

Dunnnett 検定 : 臓器重量

χ² 検定 : 交尾率、授胎率、妊娠率、病理組織学的検査 (申請者が統計解析を実施した)

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

結果の概要 (つづき)

世代		親 : P 児 : F ₁					親 : F ₁ 児 : F ₂					
投与量 (ppm)		対照	5	20	500	2500	対照	5	20	500	2500	
児動物	体重 (g)	生後0日	6.0	6.0	6.1	6.3	6.1	5.9	6.1	6.1	6.1	5.9
		生後4日 ^{c)}	9.3	9.6	9.8	10.0	9.4	8.9	9.3	9.1	9.2	8.6
		生後7日	14.9	15.4	15.9	15.9	15.0	14.6	14.6	14.9	14.7	13.6
		生後14日	30.8	31.4	32.6	31.4	30.2	28.8	29.6	31.1	29.2	27.3
		生後21日	50.0	49.5	51.6	50.5	47.7	47.1	47.6	49.5	47.9	44.3
	一般状態	検体投与に起因する異常なし					検体投与に起因する異常なし					
肉眼的病理検査 ^{d)} ; 腎盂拡張		0/293	5/300	3/283	↑5/285	5/363	11/259	17/250	8/357	14/335	19/304	

c) 児動物数調整前

d) 表中の数値は所見がみられた胎児数/検査胎児数を示す。

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

Dunnnett 検定 : 児動物体重

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2) ラットにおける催奇形性試験

(資料 No. T-24)

試験機関：Bio/dynamics, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検体純度：83.2%

供試動物：SD 系妊娠ラット (CrI:CD (COBS))、交配開始時 9 週齢、1 群 25 匹

投与期間：妊娠 6 日から 15 日までの 10 日間 (1986 年 8 月 19 日～1986 年 9 月 12 日)

投与方法：検体をカルボキシメチルセルロース+Tween 80 水溶液に懸濁し、0、10、100、350 及び 700 mg/kg/日の投与レベルで妊娠 6*) 日から 15 日までの 10 日間、毎日 1 回強制経口投与した。対照群にはカルボキシメチルセルロース+Tween 80 水溶液を同様に投与した。なお、投与液量は 10 mL/kg 体重/日とし、妊娠 6 日の体重から計算し、最新の体重データに合わせて調整した。

*) 膣垢中に精子を確認した日を妊娠 0 日とした。

用量設定根拠：

観察・検査項目：

母動物；妊娠 0 日から 20 日まで生死、毒性徴候及び異常行動の有無を毎日観察し、妊娠 0、6、10、15 及び 20 日には詳細な身体検査を実施した。また、妊娠 0 日、3 日、6～15 日の毎日及び 20 日に体重を測定し、妊娠 20 日には体重から妊娠子宮重量を減じた補正体重を算出した。摂餌量は妊娠 0～3 日間、3～6 日間、6～15 日 (毎日) 及び 15～20 日間 (期間) について記録した。妊娠 20 日に帝王切開し、黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数、早期及び後期吸収数を検査した。

生存胎児；性別、体重及び外表異常の観察を行った。各同腹児の約半数の胎児については頭部をブアン固定後、内臓異常の有無を顕微解剖法で評価し、固定した頭部について連続切片を作製して、口蓋、眼球及び脳の奇形を調べた。残りの胎児については、アリザリンレッド S 染色により骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。

結 果：概要を次表に示した。

母動物；700 mg/kg/日投与群では、5～10 日間投与後の妊娠 11～16 日に 5 例が死亡した (死亡率 20%) が、それ以下の投与群では死亡例は認められなかった。

350 及び 700 mg/kg/日投与群では、過剰な唾液分泌を示す動物の比率が投与期間中に増加した。また、過剰な流涙及び肛門生殖器部分の皮膚や被毛の汚れも 700 mg/kg/日投与

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

群で発現頻度が高かった。

350 及び 700 mg/kg/日投与群では、投与期間中（妊娠 6～15 日）及び投与後（妊娠 15～20 日）に体重増加量の低下傾向及び有意な低下が認められ、350 mg/kg/日投与群では妊娠 7 日、700 mg/kg/日投与群では妊娠 7、8、9、10 日に摂餌量低下が認められた。700 mg/kg/日投与群の妊娠 6 日で平均摂餌量が対照群より統計学的に有意に高かったが、これは 2 例の異常に高い摂餌量が原因であった。これらの 2 例のデータを除外すれば、700 mg/kg/日投与群の妊娠 6 日の平均摂餌量は対照群値より統計学的に有意に低かった。

母動物の肉眼的剖検所見には、検体投与に関連した影響は認められなかった。

生存胎児；350 及び 700 mg/kg/日投与群において、平均胎児体重が対照群よりも統計学的に有意に低く、少なくとも 1 つの骨格変異を示す胎児の比率が対照群よりも統計学的に有意に高かった。また、明らかな骨化遅延も 350 及び 700 mg/kg/日投与群の胎児に認められた。これらの群では胸椎体の不完全骨化、仙椎横突起の不完全骨化又は未骨化、尾椎横突起の未骨化、第 5 及び第 6 胸骨分節又はその一方の未骨化の発現頻度増加がみられ、700 mg/kg/日投与群ではさらに、胸椎体の分離及び未骨化、頸椎横突起の不完全骨化、腰椎体不完全骨化及び分離、仙椎体の未骨化、尾椎横突起の不完全骨化、尾椎体の未骨化、第 4 胸骨分節未骨化、第 13 肋骨短小の発現頻度増加がみられた^{申請者注 1}。

700 mg/kg/日投与群では、外表奇形を有する胎児の比率（3.6%、8/221 例）及び外表奇形胎児を有する腹の比率（33.3%、6/18 腹）が対照群よりも統計学的に有意に高かった。尾の異常（無尾、短尾、索状尾）が最も多く見られた所見であったが、これらの胎児の多くには内臓や骨格にも奇形が観察された。尾の異常は、母動物の毒性と関連してしばしば見られるラット胎児の奇形であると報告されている^{1,2)}。本試験の最高投与群である 700 mg/kg/日では死亡、体重増加抑制といった重篤な母動物毒性が観察されているため、これらの尾の異常は母動物毒性と関連すると考えられた^{申請者注 2}。

その他には、胎児の外表、内臓及び骨格検査において検体投与に関連する影響は認められなかった^{申請者注 3}。

以上の結果より、検体のラットにおける催奇形性試験において、母動物では、妊娠 11～16 日に 700mg/kg/日投与群で 5 例が死亡した（死亡率 20%）。350 mg/kg/日以上投与群で体重増加抑制、摂餌量低下、過剰唾液分泌の発現頻度増加が認められた。また、700 mg/kg/日投与群では、流涙過剰及び肛門生殖器部分の皮膚や被毛汚れの発現頻度増加が認められたが、黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数、早期及び好機吸収胚数並びに妊娠至急重量には影響が認められなかった。胎児毒性としては、胚・児致死作用は認められなかったが、350 mg/kg/日以上投与群で胎児体重の低下、骨格変異及び化骨遅延が認められた。また、700 mg/kg/日投与群では、外表奇形（尾の異常）が認められたが、外表奇形を有する胎児の多くが、内臓及び骨格奇形も有していた。なお、検体の高用量投与群で認められた奇形及び変異は、母動物に対して重篤な毒性を示す用量でのみで所見が認められたことから、母動物毒性に関連すると考えられ、検体が直接胎児に作用したものではないと推察された。したがって、本試験における母動物及び胎児に対する無毒性量はいずれも 100 mg/kg/日であると考えられた^{申請者注 4}。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

申請者注 1 :

申請者注 2 :

申請者注 3 :

申請者注 4 :

申請者注 5 :

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照	10	100	350	700	
1群当りの動物数		25	25	25	25	25	
母動物	妊娠動物数 (妊娠率) ^F	25 (100)	25 (100)	24 (96)	25 (100)	24 (96)	
	死亡数 ^F	0	0	0	0	↑5 ^{a)}	
	一般状態 ^{b)} ;	流涎過剰 ^F	0/0/0	0/0/0	0/0/0	5/↑9/↑6	2/↑16/↑10
		流涙過剰 ^F	0/2/0	0/1/0	↑6/4/4	0/1/0	↑5/7/4
		肛門生殖器部被毛汚れ ^F	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/1/1	0/↑5/2
	平均体重 (g)	妊娠 10 日 ^D	263	263	260	251	↓248
		妊娠 11 日 ^D	268	270	264	258	↓250
		妊娠 14 日 ^D	284	284	280	273	↓266
		妊娠 15 日 ^D	293	292	288	279	↓271
		妊娠 20 日 ^K	362	362	357	↓337	↓332
	体重増加量 (g)	妊娠 7-8 日 ^D	5	4	5	3	↓-1
		妊娠 9-10 日 ^K	6	6	8	5	↓0
		妊娠 6-15 日 ^D	47	47	45	40	↓28
		妊娠 15-20 日 ^K	70	69	69	↓58	↓58
	摂餌量 (g)	妊娠 6-7 日 ^K	101	103	96	92	↑137
		妊娠 7-8 日 ^D	100	100	96	↓86	↓76
		妊娠 8-9 日 ^K	99	99	95	100	↓75
		妊娠 9-10 日 ^K	102	103	101	97	↓70
		妊娠 10-11 日 ^K	102	105	99	99	↓71
肉眼的病理所見		検体投与に起因する異常なし					
妊娠子宮重量 (g) ^D		81.7	79.8	76.4	73.6	↓60.4	
着床所見	検査母動物数 ^F	25	25	24	25	↓18 ^{c)}	
	平均黄体数 ^K	16.3	16.3	15.5	16.5	15.5	
	平均着床数 ^D	14.9	14.7	14.3	14.6	14.2	
	着床前損失 ^D	0.074	0.091	0.072	0.111	0.085	
	着床後損失 ^K	0.052	0.043	0.036	0.038	0.128	
	平均生存胎児数 ^K	14.1	14.0	13.7	14.0	12.3	
	死亡胎児数	0	0	0	0	0	
	平均吸収胚数 ^K	0.8	0.6	0.5	0.6	1.9	
胎児	性比 (雄/雌)		1.1	1.0	1.0	1.0	0.8
	生存胎児体重 (g)	雄 ^K	3.72	3.71	3.58	↓3.33	↓2.79
		雌 ^K	3.57	3.51	3.38	↓3.18	↓2.77

太枠は検体投与による影響であることを示す。

a) 妊娠 11~16 日に死亡。

b) 表中の数値は妊娠 6 日/10 日/15 日に所見がみられた動物数を示す。

c) 着床部位が肉眼では認められず、硫化アンモニウム染色によって確認できるようになった 1 例を除く。

着床前損失 = (黄体数 - 着床数) / 黄体数

着床後損失 = 吸収胚数 / 着床数

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

D: 一元配置分散分析+Dunnnett 検定, K: Kruskal-Wallis+Dunn 検定, F: Fisher 直接確率検定

(つづく)

結果の概要 (つづき)

		投与量 (mg/kg/日)	対照	10	100	350	700
外 表 検 査		検査胎児 (腹) 数	353 (25)	351 (25)	329 (24)	350 (25)	221 (18)
		奇形のみられた胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	↑8 (↑6)
		脳ヘルニア	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		無尾	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3)
		索状尾	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
		短尾	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
		浮腫	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		鎖肛	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
		無顎	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		変異のみられた胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		ガラス様外観	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
胎 児 動 物 内 臓 検 査		検査胎児 (腹) 数	185 (25)	181 (25)	172 (24)	181 (25)	118 (18)
		奇形のみられた胎児 (腹) 数	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	4 (3)
		脳ヘルニア	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		側脳室拡張	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		大動脈弓の異常	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
		肺動脈の異常	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		腎臓欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		大腸の異常	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		膀胱欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		尿管欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		変異のみられた胎児 (腹) 数	7 (4)	8 (7)	11 (9)	2 (2)	2 (2)
		無名動脈欠損	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		腎盂拡張	1 (1)	3 (2)	3 (3)	0 (0)	0 (0)
		尿管蛇行	2 (1)	4 (4)	5 (5)	0 (0)	1 (1)
	尿管拡張	3 (2)	4 (4)	5 (4)	1 (1)	1 (1)	
骨 格 検 査		検査胎児 (腹) 数	168 (25)	170 (25)	158 (24)	169 (25)	110 (18)
		奇形のみられた胎児 (腹) 数	9 (4)	↓0 (0)	5 (3)	4 (3)	8 (4)
		下顎変形	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		鼓室輪/底蝶形骨癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		鼓室輪前側肥厚	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		底蝶形骨翼状突起変形	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		小眼窩孔	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)

表中の数値は所見がみられた胎児数 (腹数) を示す。

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

Fisher 直接確率検定: 何らかの外表、内臓及び骨格奇形又は変異がみられた胎児 (又は腹) 数

(外表、内臓及び骨格検査における各所見の発現頻度については申請者が実施、有意水準は 0.05 のみ)

(つづく)

結果の概要 (つづき)

		投与量 (mg/kg/日)	対照	10	100	350	700
胎児動物	骨格検査	頸肋	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		頸椎横突起欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		頸椎横突起癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		胸椎/腰椎癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		腰椎数 5	1 (1)	0 (0)	4 (2)	1 (1)	2 (2)
		腰椎数 7	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		腰椎後側変形骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)
		腰椎体癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		腰椎横突起癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		腰椎欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		腰椎横突起過剰	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		仙椎欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		尾椎欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		胸骨分節癒合	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		波状肋骨	7 (2)	↓0 (0)	↓0 (0)	3 (3)	↓0 (0)
		肋骨癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		骨盤過剰骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		変異のみられた胎児 (腹) 数	122 (24)	103 (25)	126 (24)	↑150 (25)	↑106 (18)
		頭頂骨間不完全骨化	48 (17)	35 (14)	40 (16)	51 (19)	19 (10)
		上後頭骨不完全骨化	48 (18)	29 (12)	41 (17)	55 (18)	43 (16)
		側頭鱗骨不完全骨化	1 (1)	4 (4)	1 (1)	2 (1)	0 (0)
		舌骨未骨化	35 (14)	28 (13)	20 (11)	42 (13)	↓6 (↓4)
		頭頂骨不完全骨化	16 (5)	↓6 (6)	↓3 (3)	10 (7)	↓0 (0)
		舌骨不完全骨化	19 (10)	↓5 (5)	15 (7)	↓7 (4)	↓0 (↓0)
		頬骨不完全骨化	13 (5)	4 (4)	8 (5)	14 (10)	↓1 (1)
		前頭骨不完全骨化	3 (2)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		上顎骨不完全骨化	7 (2)	3 (2)	6 (3)	3 (3)	0 (0)
		鼻骨不完全骨化	4 (1)	2 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		頭頂骨間未骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		上後頭骨未骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		上顎骨口蓋突起不完全骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		基底後頭骨不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)
頸椎横突起不完全骨化	7 (4)	0 (0)	5 (2)	12 (4)	↑21 (8)		

太枠は検体投与による影響であることを示す。
表中の数値は所見がみられた胎児数 (腹数) を示す。

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

Fisher 直接確率検定: 何らかの外表、内臓及び骨格奇形又は変異がみられた胎児 (又は腹) 数
(外表、内臓及び骨格検査における各所見の発現頻度については申請者が実施、
有意水準は 0.05 のみ)

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		対照	10	100	350	700	
胎 児 動 物	骨 格 検 査	頸部不連続化骨	0 (0)	4 (2)	↑6 (↑5)	2 (2)	↑8 (↑5)
		頸椎体不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		胸椎体不完全骨化	16 (11)	21 (14)	22 (13)	↑50 (↑20)	↑64 (↑18)
		胸椎体分離	1 (1)	4 (3)	0 (0)	↑8 (6)	↑23 (↑12)
		胸部不連続化骨	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		胸椎体未骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	↑17 (↑8)
		胸椎横突起不完全骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		腰椎横突起不完全骨化	5 (2)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
		腰椎体不完全骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	↑12 (↑7)
		腰椎横突起未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
		腰椎体分離	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	↑5 (3)
		腰椎体未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2)
		腰椎体異常配列	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
		腰椎体変形	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		7 腰椎/12 肋骨対存在	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		仙椎横突起不完全骨化	36 (12)	37 (13)	34 (14)	↑73 (↑21)	33 (14)
		仙椎横突起未骨化	3 (3)	4 (2)	3 (3)	↑20 (10)	↑12 (↑9)
		仙椎横突起/椎体癒合	2 (2)	0 (0)	5 (1)	0 (0)	0 (0)
		仙椎体未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	↑7 (↑5)
		仙椎体不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		尾椎横突起不完全骨化	45 (15)	38 (17)	49 (17)	62 (21)	39 (14)
		尾椎横突起未骨化	14 (8)	11 (5)	18 (10)	↑53 (↑17)	↑35 (12)
		尾椎横突起/椎体癒合	2 (2)	0 (0)	4 (1)	0 (0)	0 (0)
		尾椎体未骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	6 (2)	↑11 (↑7)
		尾椎体不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	2 (2)
		第 5 胸骨分節未骨化 ^{申請者注 5}	48 (18)	41 (19)	↑69 (21)	↑102 (24)	↑88 (18)
		第 6 胸骨分節未骨化	3 (3)	2 (2)	3 (2)	↑18 (10)	↑42 (↑16)
		第 5 胸骨分節分離	2 (2)	1 (1)	2 (2)	1 (1)	0 (0)
		第 6 胸骨分節不完全骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		第 2 胸骨分節未骨化	2 (2)	1 (1)	0 (0)	3 (2)	5 (3)
		第 3 胸骨分節不完全骨化	1 (1)	0 (0)	1 (1)	4 (3)	0 (0)
		第 3 胸骨分節分離	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
第 4 胸骨分節不完全骨化	2 (2)	1 (1)	0 (0)	2 (2)	2 (2)		
第 4 胸骨分節分離	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)		

太枠は検体投与による影響であることを示す。
表中の数値は所見がみられた胎児数 (腹数) を示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: P < 0.05)

Fisher 直接確率検定: (外表、内臓及び骨格検査における各所見の発現頻度については申請者が実施)

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

結果の概要 (つづき)

		投与量 (mg/kg/日)	対照	10	100	350	700
胎 児 動 物	骨 格 検 査	第5 胸骨分節不完全骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		第1 胸骨分節不完全骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	2 (2)	1 (1)
		第2 胸骨分節不完全骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		第1 胸骨分節未骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	3 (2)	1 (1)
		第4 胸骨分節未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (1)	↑5 (3)
		第3 胸骨分節未骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	4 (2)
		第1 胸骨分節分離	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
		第2 胸骨分節分離	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		第13 肋骨短小	4 (3)	1 (1)	6 (5)	8 (6)	↑12 (↑9)
		第1 腰肋痕跡状	2 (2)	3 (2)	1 (1)	1 (1)	5 (5)
		第13 肋骨痕跡状	2 (2)	1 (1)	1 (1)	7 (5)	1 (1)
		肋骨不完全骨化	6 (2)	0 (0)	0 (0)	4 (4)	1 (1)
		肋骨内側肥厚	4 (1)	0 (0)	3 (3)	6 (5)	0 (0)
		第13 肋骨片側存在	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
		第12 肋骨対存在	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	↑6 (2)
		第1 肋骨痕跡状	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		前肢中手骨未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
		後肢中手骨未骨化	2 (2)	0 (0)	0 (0)	6 (2)	5 (2)
		恥骨不完全骨化	10 (6)	5 (3)	4 (3)	7 (4)	9 (7)
		坐骨不完全骨化	7 (5)	4 (3)	1 (1)	3 (3)	6 (5)
坐骨未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (1)	1 (1)		
恥骨未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (1)	1 (1)		

表中の数値は所見がみられた胎児数 (腹数) を示す。

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

Fisher 直接確率検定: (外表、内臓及び骨格検査における各所見の発現頻度については申請者が実施、有意水準は0.05のみ)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 No. T-25)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1987 年

検体純度:

供試動物: New Zealand White 種妊娠ウサギ、1 群雌 20 匹、人工授精開始時 6 ヶ月齢、
体重 2.89~4.18 kg

投与期間: 妊娠 7 日から 19 日までの 13 日間 (1986 年 6 月 23 日~1986 年 7 月 8 日)

投与方法: 検体をカルボキシメチルセルロース・Tween 80 水溶液に懸濁し、0、25、100 及び 300 mg/kg/日の投与レベルで妊娠 7*) 日から 19 日までの 13 日間、毎日 1 回強制経口投与した。対照群にはカルボキシメチルセルロース+Tween 80 水溶液を同様に投与した。なお、投与液量は 5 mL/kg/日とし、毎日の体重変動に合わせて調整した。

*) 人工授精を実施した当日を妊娠 0 日とした。

用量設定根拠:

観察・検査項目:

母動物; 一般症状、妊娠状態及び生死を毎日観察し、妊娠 0 日から 29 日まで毎日体重及び摂餌量を測定した。妊娠 29 日目に帝王切開し、黄体数、着床数及び着床位置、早期及び後期吸収胚数、生存及び死亡死胎児数を検査した。

生存胎児; 体重を測定し、外表異常の有無を観察した。全ての生存胎児について性別及び内臓異常の有無を検査した後、アリザリンレッド S で染色して骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。

結 果: 概要を次表に示した。

母動物; 検体投与による死亡及び流産は認められなかった。100 mg/kg/日投与群で 1 例が妊娠第 17 日に死亡し、25 mg/kg/日投与群で 1 例が妊娠第 22 日に流産したが、いずれもこれら 1 例のみの発生であり用量相関性も認められないことから、いずれも自然発生性のものと判断された。

100 mg/kg/日以上投与群で乾燥便排泄が高頻度で認められ、300 mg/kg/日ではケージの

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

受け皿に赤色物質が高頻度で見られた。これらの所見は摂餌量の長期低下と体重増加抑制に関係し、ケージ受け皿の赤色物質は直腸の炎症と出血によると考えられた。

100 mg/kg/日以上 of 投与群において、投与期間中の体重増加が有意に抑制され、300 mg/kg/日投与群では、妊娠第 20 日以降にリバウンド現象が認められた。また、摂餌量については 100 mg/kg/日以上 of 投与群で低下傾向あるいは有意な低下が認められた。

肉眼的病理所見については、検体投与による影響は認められなかった。

黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数、早期及び後期吸収胚数、妊娠子宮重量にも、検体投与による影響は認められなかった。

生存胎児；体重及び性比には検体投与による影響は認められなかった。また、外表検査及び内臓検査では検体投与にも、投与に関連した異常は認められなかった。骨格検査では、舌骨翼屈曲の発生率が対照群に比べ 300 mg/kg/日投与群で高かったが、いずれもわずかな増加であり、用量相関性（Cochran - Armitage 分析を申請者が実施）がないことから、検体投与に関連したものではないと判断された。また、300 mg/kg/日投与群で鼻骨の異常骨化の発現がわずかに増加したが、頭蓋骨全体の骨化異常については投与各群と対照群との間に統計学的に有意な差がなく、むしろ 100 mg/kg/日投与群の発生率が高かったことから、検体投与の影響というより自然発生性の異常と考えられた。観察されたその他の異常も用量相関性がなく、検体投与に起因するものではなかった^{申請者注 1}。

骨化数の解析でも、顕著な骨化促進や遅延は認められなかった。

以上の結果より、検体を妊娠ウサギに投与したときの母動物に対する無毒性量は 25 mg/kg/日、胎児動物に対する無毒性量は 300 mg/kg/日であった。また、最高投与量の 300 mg/kg/日でも胎児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

申請者注 1：

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照	25	100	300	
1 群当りの動物数		20	20	20	20	
母動物	妊娠動物数 ^B	19	18	17	17	
	死亡数 ^B	0	0	1 ^{a)}	0	
	流早産数 ^B	0	1	0	0	
	一般状態 ^{b)} ; 乾燥便 ^B	2/2	1/1	3/18	↑5/49	
	受け皿内赤色物質 ^B	0/0	0/0	0/0	↑2/3	
	軟便/液状便 ^B	2/11	↓2/3	6/15	3/13	
	脱毛 ^B	14/179	↓11/96	11/150	↓10/112	
	体重 (g) ^D 妊娠 20 日 ^C	3.93	3.73	3.84	↓3.60	
	体重増加量 (g) ^D	妊娠 13-16 日	0.09	0.05	0.02	↓-0.05
		妊娠 20-29 日	0.09	0.11	0.06	↑0.24
		妊娠 7-20 日 ^C	0.18	0.13	↓0.05	↓-0.10
	摂餌量 (g/日) ^D	妊娠 10-13 日	163.7	152.9	141.6	↓127.6
		妊娠 13-16 日	161.1	147.5	126.0	↓96.8
		妊娠 16-20 日	156.4	145.8	129.3	↓98.3
		妊娠 7-20 日 ^C	161.8	151.8	137.8	↓116.9
摂餌効率 (g/kg/日) ^D	妊娠 7-10 日 ^C	44.8	45.1	41.2	↓41.0	
	妊娠 10-13 日	43.2	42.0	↓37.3	↓34.2	
	妊娠 13-16 日	41.7	40.1	32.6	↓25.6	
	妊娠 16-20 日	40.0	39.2	33.1	↓25.9	
	妊娠 24-29 日	26.5	28.3	22.8	↑36.4	
	妊娠 7-20 日 ^C	42.2	41.4	35.9	↓31.4	
肉眼的病理所見		検体投与に起因する異常なし				
妊娠子宮重量 (g) ^K		440.88	404.34	443.91	395.48	
着床所見	検査母動物数	19	17	16	17	
	平均黄体数 ^K	9.6	8.8	10.6	11.4	
	平均着床数 ^K	8.3	6.9	7.8	7.1	
	平均生存胎児数 ^D	7.3	6.7	7.3	6.5	
	死亡胎児数 ^D	1	1	0	0	
	平均早期吸収胚数 ^B	0.8	0.2	0.3	0.4	
	平均後期吸収胚数 ^B	0.1	0.0	0.1	0.2	

太枠は検体投与による影響であることを示す。

a) 妊娠 17 日に胃潰瘍のために死亡した。

b) 表中の数値は所見がみられた動物数/所見がみられた日数を示す。

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

B 比率の同等性評価のための検定 (二項分布)、

D Bartlett's 検定+Dunnnett 検定又は Kruskal-Wallis 検定+Dunn 検定、C 共分散分析

K Kruskal-Wallis 検定又は Fisher 直接確率検定

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		対照	25	100	300	
性比 (雄%) ^D		42.0	54.9	51.9	44.0	
生存胎児体重 (g) ^D		雄	45.85	44.96	44.53	43.58
		雌	44.01	43.54	43.38	44.86
外表検査 ^B	検査胎児 (腹) 数	140 (19)	115 (17)	117 (16)	111 (17)	
	臍帯ヘルニア	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	前肢 下方への外反	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	
	左前肢橈骨の皮膚貫通突出と第 1 及び第 2 指無形成	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	右前肢 第 1 指無形成	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
内臓検査 ^B	検査胎児 (腹) 数	140 (19)	115 (17)	117 (16)	111 (17)	
	肺 中葉無形成	0 (0)	1 (1)	3 (3)	0 (0)	
	右腎臓 位置異常	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
胎児動物	検査胎児 (腹) 数	140 (19)	115 (17)	117 (16)	111 (17)	
	頭蓋骨の異常骨化	12 (7)	14 (9)	23 (11)	17 (9)	
	鼻骨の異常骨化	3 (2)	1 (1)	5 (3)	↑7 (5)	
	鼻骨間異常骨化	2 (1)	0 (0)	2 (2)	4 (4)	
	鼻骨内異常骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	3 (2)	
	鼻骨不整縫合	1 (1)	1 (1)	3 (3)	0 (0)	
	左側鼻骨の左前頭骨貫入	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	鼻骨前頭骨の異常骨化	0 (0)	2 (2)	2 (2)	4 (4)	
	鼻骨前頭骨縫合異常配列	0 (0)	2 (2)	2 (2)	4 (4)	
	前頭骨の異常骨化	8 (5)	9 (7)	14 (8)	7 (4)	
	前頭骨間異常骨化	2 (1)	3 (2)	5 (4)	2 (2)	
	前頭骨内異常骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	前頭骨形状異常	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	前頭骨不整縫合	6 (5)	5 (5)	8 (4)	4 (4)	
	前頭骨癒合	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	
	泉門の異常骨化	1 (1)	4 (1)	↑8 (3)	2 (2)	
	泉門形状異常状	1 (1)	4 (1)	↑8 (3)	2 (2)	
	頭頂骨の異常骨化	1 (1)	1 (1)	3 (3)	1 (1)	
	頭頂骨間異常骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	頭頂骨内異常骨化	0 (0)	1 (1)	3 (3)	1 (1)	
	頭頂骨孔	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	泉門拡大	1 (1)	2 (2)	0 (0)	1 (1)	

表中の数値は所見がみられた胎児数 (腹数) を示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: P<0.01, ↑↓: P<0.05)

B 比率の同等性評価のための検定 (二項分布)、

D Bartlett's 検定+Dunnnett 検定又は Kruskal-Wallis 検定+Dunn 検定

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		対照	25	100	300	
胎児動物 骨格検査 ^B	舌骨翼屈曲	2 (2)	↑6 (4)	0 (0)	↑7 (↑6)	
	椎骨/肋骨奇形	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	頸椎体非対称	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	頸椎弓癒合	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	胸椎半椎肋骨付着	2 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	胸椎半椎	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	胸椎体/椎弓癒合	2 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	胸椎体非対称	2 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	胸椎体二分	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	腰椎半椎	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	腰椎体片側骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	腰椎弓癒合	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	小腰椎弓	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	肋骨骨化肥厚部	2 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	肋骨癒合	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	肋骨分離	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	肋骨基部で交叉	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	胸骨柄異常骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	胸骨柄重複	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	胸骨分節非対称	2 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	胸骨分節癒合	5 (2)	3 (3)	1 (1)	1 (1)	
	胸骨分節重複	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	剣状骨重複	0 (0)	0 (0)	1 (1)	2 (1)	
	肩甲骨波状翼	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	前肢右橈骨未骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	右第1、左第1/第2中手骨未骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	前肢右第1、左第1/第2指骨未骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	左前肢指骨と橈骨の接触	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	恥骨未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	骨化数 (骨化進行度) ^D	後肢足根骨	2.00	2.00	1.99	1.99
		後肢指骨	12.00	12.00	11.99	11.99

表中の数値は所見がみられた胎児数 (腹数) を示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: $P < 0.01$ 、↑↓: $P < 0.05$)

B 比率の同等性評価のための Z 検定 (二項分布)、

D Bartlett's 検定+Dunnnett 検定又は Kruskal-Wallis 検定+Dunn 検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(7) 変異原性

1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No. T-26)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1986 年

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 株) 及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) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検討した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、100~10000 µg/プレートの範囲の 5 用量で実施した。試験は 3 連制とし、プレート法を用いて 2 回行った。

用量設定根拠：

試験結果： 結果を次表に示した。

検体は、S9 mix 存在下、TA100 株の 10000 µg/プレートで軽度の毒性を示した。2 回目試験において、S9 mix 非存在下の TA98 株の 10000 µg/プレートで、2 倍の復帰変異コロニー数の増加が認められたが、1 回目試験においては同様の結果はみられず、生物学的有意性が明らかでないため、陰性とみなした^{申請者注}。TA100、TA1535、TA1537 株及び WP2 *uvrA* 株においては、S9 mix の有無にかかわらず、最高用量 10000 µg/プレートまで、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、1-エチル-2-ニトロ-3-ニトロソグアニジン、2-ニトロフルオレン及び 9-アミノアクリジン^{申請者注}は S9 mix 非存在下において、又、2-アミノアントラセンは S9 mix 存在下において、各試験菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検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ものと判断された。

申請者注：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

1 回目試験

(表中の数値は3反復の平均±標準偏差)

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>	TA100	TA1535	TA1537	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	28±7	164±16	22±3	9±3	20±3	
検体	100	-	35±5	150±1	23±5	8±3	19±6	
	333	-	33±3	135±21	29±9	9±3	29±6	
	1000	-	38±5	151±12	32±7	10±4	24±7	
	3333	-	31±4	172±19	31±5	6±3	26±9	
	10000	-	41±6	106±18	26±5	10±4	38±5	
対照 (DMSO)	0	+	25±3	108±6	9±3	6±2	27±4	
検体	100	+	24±7	122±16	14±3	6±1	30±4	
	333	+	31±6	142±12	13±4	10±2	33±9	
	1000	+	36±8	161±3	17±5	7±2	34±7	
	3333	+	29±3	124±8 ^{a)}	16±2	7±3	27±4	
	10000	+	31±7	113±9	16±2	4±5	50±2	
陽性 対照	アジ化ナトリウム	1	-	/	738±42	569±12	/	/
	1-エチル-2-ニトロ-3- ニトロソグアニジン	2	-	553±37	/	/	/	/
	2-ニトロフルオレン	10	-	/	/	/	/	2461±114
	9-アミノアクリジン	50	-	/	/	/	202±92	/
	2-アミノアントラセン	2	+	/	2843±124	226±9	357±56	2759±501
	80	+	1158±119	/	/	/	/	

a: 2 プレートのみの値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2 回目試験

(表中の数値は 3 反復の平均±標準偏差)

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>	TA100	TA1535	TA1537	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	30±6	156±23	25±5	10±2	22±6	
検体	100	-	27±3	133±14	28±13	12±4	24±3	
	333	-	30±4	157±16	28±7	11±4	22±7	
	1000	-	27±7	145±7	34±11	12±3	20±4	
	3333	-	28±6	140±19	34±9	9±4	27±3	
	10000	-	33±6	72±36	35±4	8±4	46±8	
対照 (DMSO)	0	+	30±4	108±21	12±2	10±2	28±4	
検体	100	+	23±3	108±19	12±4	12±2	22±5	
	333	+	30±10	128±13	15±2	7±3	36±8	
	1000	+	29±6	110±6	16±2	9±2	29±3	
	3333	+	26±6	68±21	19±4	8±4	33±5	
	10000	+	33±5	61±15*	15±3	6±2	49±9	
陽性 対照	アジ化ナトリウム	1	-	/	858±17	653±24	/	/
	1-エチル-2-ニトロ-3- ニトログアニジン	2	-	894±35	/	/	/	/
	2-ニトロフルオレン	10	-	/	/	/	/	3273±90
	9-アミノアクリジン	50	-	/	/	/	403±204	/
	2-アミノアントラセン	2	+	/	5211±183	301±65	434±13	4722±65
	80	+	1149±160	/	/	/	/	

*: 細胞毒性が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No. T-27)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1986 年

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 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) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検討した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、100~10000 µg/プレートの範囲の 5 用量で実施した。試験は 3 連制とし、プレート法を用いて行った。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次表に示した。

検体は、TA100 及び TA1537 株に対し、S9 mix 存在下の 3300 µg/プレートならびに S9 mix 非存在下の 10000 µg/プレートで軽度の毒性を示した。S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても、最高用量 10000 µg/プレートまで復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、2-ニトロフルオレン及び 9-アミノアクリジンは S9 mix 非存在下において、又、2-アミノアントラセンは S9 mix 存在下において、各試験菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検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ものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

試験結果

(表中の数値は3反復の平均値)

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		
			TA1535	TA100	TA1537	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	19 \pm 7	128 \pm 7	17 \pm 3	28 \pm 9	
検体	100	-	25 \pm 3	113 \pm 13	18 \pm 2	24 \pm 4	
	300	-	23 \pm 7	124 \pm 16	15 \pm 2	23 \pm 4	
	1000	-	29 \pm 8	138 \pm 15	18 \pm 3	26 \pm 3	
	3300	-	28 \pm 3	116 \pm 18	14 \pm 4	22 \pm 3	
	10000	-	28 \pm 10*	67 \pm 5*	8 \pm 3	24 \pm 5	
対照 (DMSO)	0	+	14 \pm 8	144 \pm 14	18 \pm 2	33 \pm 4	
検体	100	+	12 \pm 4	134 \pm 21	18 \pm 6	37 \pm 10	
	300	+	19 \pm 3	160 \pm 11	14 \pm 4	40 \pm 4	
	1000	+	16 \pm 6	107 \pm 6	11 \pm 3	34 \pm 6	
	3300	+	19 \pm 6*	70 \pm 7*	13 \pm 6	39 \pm 13	
	10000	+	24 \pm 3	88 \pm 25 ^{a)}	11 \pm 3	47 \pm 8	
陽 性 対 照	アジ化ナトリウム	1	-	357 \pm 45	505 \pm 43		
	2-ニトロフルオレン	10	-				1310 \pm 107
	9-アミノアクリジン	50	-			297 \pm 31	
	2-アミノアントラセン	2	+	247 \pm 28	3618 \pm 140	770 \pm 52	4039 \pm 530

*: 細胞毒性が認められた。

a: 2 プレートのみの値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3) クレトジム原体の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 T-28)

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ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) 及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) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検討した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、100~10000 µg/プレートの範囲の 5 用量で実施した。試験は 3 連制とし、プレート法を用いて 2 回行った。

用量設定根拠：

試験結果： 結果を次表に示した。

検体は、第 1 回目試験で TA98 株の S9 mix 非存在下、10000 µg/プレートで、第 2 回目試験で S9 mix 存在下、1000 µg/プレート以上で軽度の細胞毒性を示した。

第 1 回目試験で S9 mix 存在下、TA100 株の 3330 µg/プレートにおいて統計学的に有意な復帰変異コロニー数の増加が認められた。第 2 回目試験では、S9 mix 非存在下、TA1535 株の 10000 µg/プレート、TA1537 株の 100 及び 10000 µg/プレートにおいて、S9 mix 存在下、TA98 株の 10000 µg/プレートにおいて統計学的に有意な復帰変異コロニー数の増加が認められたが、これらの復帰変異コロニー数の増加はいずれも再現性が認められなかったことから、生物学的有意性はないと考えられた^{申請者注 1}。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウム、2-ニトロフルオレン及び ICR-191 は S9 mix 非存在下において、又、2-アミノアントラセンは S9 mix 存在下において、各試験菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検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ものと判断された。

申請者注 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アリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

1 回目試験

(表中の数値は3プレートの平均±標準偏差)

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>	TA100	TA1535	TA1537	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	33±4	108±6	10±6	10±2	24±6	
検体	100	-	35±8	107±6	15±2	8±2	26±3	
	330	-	40±4	109±6	15±5	13±3	26±3	
	1000	-	31±3	95±10	14±3	5±1	26±5	
	3330	-	35±5	99±8	17±5	11±7	30±3	
	10000	-	31±6	84±15	16±2	11±5	41±16	
対照 (DMSO)	0	+	32±6	145±8	13±3	12±3	42±4	
検体	100	+	38±10	160±20	16±3	11±2	40±10	
	330	+	36±3	135±18	14±3	12±3	39±4	
	1000	+	33±7	140±10	10±2	11±4	40±9 ^a	
	3330	+	35±4	167±13*	16±2	9±3	25±5 ^a	
	10000	+	24±3	142±11	19±6	15±2	56±10 ^a	
陽性 対照	アジ化ナトリウム	1	-	/	557±40	435±24	/	/
	2-ニトロフルオレン	10	-	/	/	/	/	1727±88
	ICR-191	2	-	/	/	/	652±93	/
		50	-	328±63	/	/	/	/
	2-アミノアントラセン	2	+	/	4892±494	111±37	547±130	4046±241
		80	+	1377±138	/	/	/	/

a: 細胞毒性が認められた。

*: 統計学的に有意な増加 ($p < 0.05$)

処置プレート平均値から標準偏差最高値を引いた値が、溶媒対照プレート平均値に標準偏差最高値を加えた値より大きい場合を有意な反応とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2 回目試験

(表中の数値は3プレートの平均±標準偏差)

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>	TA100	TA1535	TA1537	TA98	
対照 (DMSO)	0	-	32±8	110±6	13±4	7±2	25±4	
検体	100	-	32±4	107±9	13±4	13±3*	20±3	
	330	-	26±4	113±6	14±2	9±3	23±7	
	1000	-	21±6	102±9	17±2	9±3	24±7	
	3330	-	20±5	103±6	16±2	9±4	27±4	
	10000	-	21±3	92±7	25±5*	14±4*	28±3 ^a	
対照 (DMSO)	0	+	35±3	123±6	14±5	8±2	29±3	
検体	100	+	43±7	132±7	12±2	8±2	27±7	
	330	+	27±4	121±20	18±4	10±3	30±3	
	1000	+	26±5	119±10	12±9	10±2	33±5	
	3330	+	18±3	132±23	16±2	12±3	34±6	
	10000	+	35±8	121±6	15±4	9±2	53±9*	
陽性 対照	アジ化ナトリウム	1	-	/	527±26	416±25	/	/
	2-ニトロフルオレン	10	-	/	/	/	/	1745±90
	ICR-191	2	-	/	/	/	1354±176	/
		50	-	262±9	/	/	/	/
	2-アミノアントラセン	2	+	/	3972±204	239±13	696±216	3175±526
		80	+	1300±68	/	/	/	/

a: 細胞毒性が認められた。

*: 統計学的に有意な増加 ($p < 0.05$)

処置プレート平均値から標準偏差最高値を引いた値が、溶媒対照プレート平均値に標準偏差最高値を加えた値より大きい場合を有意な反応とした。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

4) チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-K₁-BH₄) を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 No.T-29)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1990 年

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスターの卵巣由来の培養細胞 (CHO-K₁-BH₄) 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、6-チオグアニン耐性突然変異体のコロニー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 (HPRT) 遺伝子座の突然変異誘発性を検討した。

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。試験は各 2 連制とし、S9 mix 存在下で 2 回、非存在下で 3 回実施した。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次表に示した。

S9 mix 非存在下では、1 及び 2 回目試験において、相対生存率と相対細胞増殖率に高濃度において用量相関性のある減少がみられ、広範囲の細胞毒性が確認された。S9 mix 存在下では、弱い細胞毒性が認められたのみであった。

S9 mix 非存在下において、1 回目試験の 100、200、500 µg/mL の培養細胞で溶媒対照と比較して統計学的に有意な突然変異頻度の増加が認められたが、これは溶媒対照の非常に低い突然変異頻度に起因しており、2 及び 3 回目試験で用量相関性及び再現性は認められなかった。陰性対照の 2 連のうち的一方でも有意な増加がみられたが、用量相関性はみられず、背景値の正常な範囲内 (25×10^{-6} 細胞未満) であった。

S9 mix 存在下において、1 回目試験の 100、450 µg/mL 及び 2 回目試験の 500 µg/mL でそれぞれ 2 連のうち的一方で溶媒対照と比較して統計学的に有意な突然変異頻度の増加が認められたが、2 回目の試験において用量相関性及び再現性は認められなかった。

一方、陽性対照物質であるエチルメタンサルホン酸及びジメチルベンズアントラセンでは明らかな変異原性作用が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

以上の結果から、検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、突然変異誘発性を有さないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

S9 mix 非存在下

	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対生存率 ^{a)} (%)	絶対コロニー形成率 ^{b)} (%)	突然変異頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
1 回目 試験	陰性対照 (培養液)	0	—	92.1	58.8 56.2	15.9* 1.1
	溶媒対照 (DMSO)	0	—	100.0	58.7 51.3	1.1 1.4
	検体	100	—	106.3	55.0	10.2*
					54.2	8.1*
					57.0	8.8*
					79.3	7.1*
					65.8	3.8
	300	—	91.8	68.2	1.8	
				65.7	4.8	
	400	—	64.0	44.0	1.4	
—N				—N		
500 P	—	1.2	17.5 20.3	21.4* 3.1		
陽性対照 (EMS)	900	—	34.4	28.7 41.5	82.8* 63.3*	
2 回目 試験	陰性対照 (培養液)	0	—	93.9	62.8 58.5	18.9* 13.9
	溶媒対照 (DMSO)	0	—	100.0	75.7 63.7	4.1 7.8
	検体	100	—	101.0	74.0	5.9
					76.0	3.3
					63.8	4.9
					73.8	5.9
					58.8	14.9*
					49.5	7.6
	300	—	59.7	68.3	7.3	
				55.5	5.6	
400	—	42.6	68.3	1.8		
			62.5	5.0		
450	—	43.5	—N	—N		
500 P	—	1.6	—N	—N		
陽性対照 (EMS)	900	—	14.2	20.0 18.5	93.8* 96.5*	

EMS：エチルメタンサルホン酸

*：ポアソンの異質性検定 ($p < 0.05$)

P：検体の析出が認められた。

N：細胞毒性による損失のためクローニングしなかった。

a)：相対生存率 = (処理群シャーレ当たりの平均コロニー数 / 溶媒対照群シャーレ当たりの平均コロニー数) $\times 100$ 、3枚の平均値

b)：絶対コロニー形成率 = (発現期間後のシャーレ当たりの平均生存コロニー数 / 接種細胞数 200) $\times 100$ 、3枚の平均値

c)：突然変異頻度 = 突然変異コロニー総数 / (評価シャーレ数 $\times 0.002 \times$ 絶対コロニー形成率)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

S9 mix 非存在下

	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対生存率 ^{a)} (%)	絶対コロニー形成率 ^{b)} (%)	突然変異頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
3 回 目 試 験	陰性対照 (培養液)	0	—	138.5	74.2 72.2	5.9 0.0
	溶媒対照 (DMSO)	0	—	100.0	73.5 63.5	3.9 2.0
	検 体	100	—	92.0	66.5 63.5	7.5 3.0
			—	92.3	58.0 51.0	3.2 3.7
			—	70.6	64.2 64.8	1.0 2.9
			—	59.8	71.2 64.7	0.9 1.0
			—	— ^c	74.2 57.5	5.1 4.3
			—	83.6	48.2 53.0	1.3 5.9
	陽性対照 (EMS)	900	—	15.0	24.0 33.5	325.5* 337.7*

EMS：エチルメタンスルホン酸

*：ポアソンの異質性検定 ($p < 0.05$)

P：検体の析出が認められた。

C：1つのシャーレが汚染により測定できなかつたため算出できなかつた。

a)：相対生存率 = (処理群シャーレ当たりの平均コロニー数 / 溶媒対照群シャーレ当たりの平均コロニー数) $\times 100$ 、3枚の平均値

b)：絶対コロニー形成率 = (発現期間後のシャーレ当たりの平均生存コロニー数 / 接種細胞数 200) $\times 100$ 、3枚の平均値

c)：突然変異頻度 = 突然変異コロニー総数 / (評価シャーレ数 $8 \times 0.002 \times$ 絶対コロニー形成率)

S9 mix 存在下

	薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対生存率 ^{a)} (%)	絶対コロニー形成率 ^{b)} (%)	突然変異頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)																				
1 回目 試験	陰性対照 (培養液)	0	+	134.2	57.8 61.7	4.3 8.1																				
	溶媒対照 (DMSO)	0	+	100.0	53.0 62.3	2.4 6.0																				
	検体	100	+	100.7	67.5 44.7	13.9* 9.8																				
							200	+	— ^c	57.7 57.7	5.4 4.3															
												300	+	90.5	75.0 70.7	3.3 3.0										
																	400	+	111.8	72.0 52.8	9.5 4.7					
																						450	+	75.0	61.2 45.0	17.4* 9.5
	陽性対照 (DMBA)	20	+	38.8	40.5 38.2	95.7* 37.4*																				
	2 回目 試験	陰性対照 (培養液)	0	+	133.0	69.2 60.8	1.0 3.5																			
溶媒対照 (DMSO)		0	+	100.0	67.8 63.8	3.7 4.9																				
検体		100	+	113.9	66.8 71.0	4.7 4.4																				
							200	+	90.1	69.0 46.8	5.4 2.7															
												300	+	130.7	63.2 68.2	5.7 5.5										
																	400	+	140.3	74.5 69.0	3.4 2.7					
																						450	+	74.3	82.7 61.0	2.3 9.2
陽性対照 (DMBA)		20	+	53.0	44.8 47.5	43.2* 65.8*																				

DMBA：ジメチルベンズアントラセン

*：ポアソンの異質性検定 ($p < 0.05$)

P：検体の析出が認められた。

C：1つのシャーレが汚染により測定できなかつたため算出できなかつた。

a)：相対生存率 = (処理群シャーレ当たりの平均コロニー数 / 溶媒対照群シャーレ当たりの平均コロニー数) $\times 100$ 、3枚の平均値

b)：絶対コロニー形成率 = (発現期間後のシャーレ当たりの平均生存コロニー数 / 接種細胞数 200) $\times 100$ 、3枚の平均値

c)：突然変異頻度 = 突然変異コロニー総数 / (評価シャーレ数 $8 \times 0.002 \times$ 絶対コロニー形成率)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

5) チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-K₁) を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No.T-30)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1986 年

検体純度:

試験方法: チャイニーズハムスターの卵巣由来の培養細胞 (CHO-K₁) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で染色体異常誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、S9 mix 存在下では 2 時間、非存在下では 8 時間細胞を処理した。観察は 1 濃度あたり 100 個の分裂中期像について行った。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次表に示した。

1 回目の試験の S9 mix 非存在下では、1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ において構造異常細胞の出現頻度が溶媒対照値を有意に上回った。数的異常細胞の出現頻度に有意差はなかった。S9 mix 存在下では、構造異常細胞及び数的異常細胞とも溶媒対照に比べ出現頻度に有意な差は認められなかった。

2 回目の試験は、1 回目の試験結果に基づき、S9 mix 非存在下、S9 mix 存在下ともに 0.6、0.8、1.0 及び 1.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の用量で試験を実施した。その結果、検体は処理培地中に一部析出した。S9 mix 非存在下において、1.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ では軽度の細胞毒性が認められた。1.0 及び 1.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ では、構造異常細胞の出現頻度が溶媒対照値を有意に上回った。数的異常細胞の出現頻度には有意差はなかった。S9 mix 存在下では、細胞毒性は認められず、構造異常細胞及び数的異常細胞ともに溶媒対照に比べ出現頻度に有意差はなかった。

一方、陽性対照であるトリエチレンメラミン (S9 mix 非存在下) 及びシクロホスファミド (S9 mix 存在下) 処理群においてはいずれも染色体異常の出現頻度の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、検体は本試験条件下で、代謝活性化の非存在下においてチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-K₁) に対して染色体異常を誘発すると判断された。代謝活性化の存在下では染色体異常を誘発しなかった。

1 回目試験

薬物	濃度 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	処理時間 (h)	標本作製時間 (h)	観察細胞数	S9 mix の有無	構造異常を有する細胞数						構造異常細胞 (%) ^{b)}	数的異常細胞 (%) ^{c)}	細胞あたりの構造異常 ^{b, d)}		
						染色分体型			染色体型						その他 ^{a)}	
						ギャップ	切断	交換	ギャップ	切断	交換					
未処理	-	8	2	100	-	0	2	0	0	0	0	0	2.0	4.0	0.02	
溶媒対照 (DMSO)	-			100	-	3	2	0	0	0	0	0	2.0	6.0	0.02	
検体	0.03			100	-	2	1	0	0	0	0	0	1.0	6.0	0.01	
	0.1			100	-	3	1	0	2	0	0	0	1.0	4.0	0.01	
	0.3			100	-	1	1	0	0	0	0	0	1.0	3.0	0.01	
	1.0			100	-	15	9	0	1	0	2	2	11.0#	7.0	0.30*	
陽性対照 (トリフェン メリン)	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$			97	-	6	26	5	1	5	1	3	31.0##	5.0	0.69**	
未処理	-	2	8		+	2	0	0	0	0	1	0	1.0	2.0	0.01	
溶媒対照 (DMSO)	-			100	+	2	0	0	0	0	0	0	0	0.0	2.0	0.00
検体	0.03			100	+	1	0	0	0	0	1	0	1.0	3.0	0.01	
	0.1			100	+	0	1	1	0	0	0	0	2.0	3.0	0.02	
	0.3			100	+	2	0	0	1	0	0	0	0.0	2.0	0.00	
	1.0			100	+	1	0	0	0	0	0	0	0.0	2.0	0.00	
陽性対照 (シクロホス ファミド)	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$			100	+	6	37	15	0	0	0	10	40.0##	3.0	1.52**	

a) 細粉化及び10個以上の異常を持つ細胞

b) ギャップを除く

c) 核内倍加及び倍数体細胞を含む

d) 10個以上の異常を持つ細胞及び細粉化細胞は10個の異常として計算した。

* ; $p \leq 0.05$

** ; $p \leq 0.01$ (Student の t 検定)

; $p \leq 0.05$

; $p \leq 0.01$ (カイ 2 乗検定、申請者が検定を行った)

2 回目試験

薬物	濃度 ($\mu\text{L/mL}$)	処理時間 (h)	標本作製時間 (h)	観察細胞数	S9 mix の有無	構造異常を有する細胞数						構造異常細胞 (%) ^{b)}	数的異常細胞 (%) ^{c)}	細胞あたりの構造異常 ^{b, d)}	
						染色分体型			染色体型						その他 ^{a)}
						ギャップ	切断	交換	ギャップ	切断	交換				
未処理	-	8	2	100	-	3	1	0	0	0	0	0	1.0	4.0	0.01
溶媒対照 (DMSO)	-			100	-	3	2	0	0	0	0	0	1.0	6.0	0.02
検体	0.6			100	-	9	0	0	0	0	0	0	0.0	3.0	0.00
	0.8			100	-	14	5	0	0	0	0	1	6.0	5.0	0.15
	1.0			100	-	14	5	0	0	0	0	4	8.0#	5.0	0.45*
	1.2			100	-	19	8	1	0	0	0	0	9.0#	5.0	0.09*
陽性対照 (トリフェン メラニ)	1 $\mu\text{g/mL}$	100	-	12	25	8	0	0	0	0	21.0##	5.0	0.32**		
未処理	-	2	8		+	1	2	0	0	0	0	2.0	10.0	0.02	
溶媒対照 (DMSO)	-			100	+	1	2	0	1	0	0	0	2.0	10.0	0.02
検体	0.6			100	+	0	2	0	0	0	0	0	2.0	9.0	0.02
	0.8			100	+	3	2	0	0	1	0	0	3.0	7.0	0.03
	1.0			100	+	5	6	2	0	1	0	1	5.0	8.0	0.19
	1.2			100	+	6	2	0	3	0	1	0	3.0	5.0	0.03
陽性対照 (トリフェン メラニ)	1 $\mu\text{g/mL}$	100	+	10	10	10	3	6	1	6	27.0##	9.0	0.87**		

a) 細粉化及び10個以上の異常を持つ細胞

b) ギャップを除く

c) 核内倍加及び倍数体細胞を含む

d) 10個以上の異常を持つ細胞及び細粉化細胞は10個の異常として計算した。

* ; $p \leq 0.05$

** ; $p \leq 0.01$ (Student の t 検定)

; $p \leq 0.05$

; $p \leq 0.01$ (カイ 2 乗検定、申請者が検定を行った)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-30-1)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

6) ラットを用いた経口投与による骨髄細胞の染色体異常試験

(資料 No.T-31)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1987 年

検体純度：

供試動物： SD 系ラット、体重：雄 297～364 g、雌 210～266 g、1 群雄雌各 5 匹

試験方法： 検体を 0.7%カルボキシメチルセルロース/1% Tween-80 に懸濁させ、150、500 及び 1500 mg/kg の割合でラットに単回経口投与した。投与後 12、24 及び 48 時間に屠殺して骨髄細胞を採取し、染色体標本を作製して顕微鏡下で各動物から最低 50 個（一群 250 個）の中期細胞を観察した。本試験は 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果： 試験結果を次表に示した。

臨床症状としては、150 mg/kg 以上で嗜眠、500 mg/kg 以上で過度の流涎、1500 mg/kg ではそれらに加え虚脱、円背、振戦、流涙、眼痙攣及び鼻痙攣が認められた。染色体の構造及び数的異常数については、検体のいずれの投与量においても有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照であるトリエチレンメラミン投与群では染色体異常数の有意な増加が認められた。

以上の結果から、検体は本試験条件下において染色体異常誘発性を有しないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

性別	薬物	濃度	時間 (h)	観察 細胞数	異常細胞 (%) ¹⁾	構造異常			細胞あたりの 異常 ¹⁾
						ギャップ [°]	切断 ²⁾	交換	
雄	溶媒対照 ³⁾	10 mL/kg	12	250	0.0	0	0	0	0.000
			24	250	0.0	0	0	0	0.000
			48	250	0.0	0	0	0	0.000
	検体	0.15 g/kg	12	250	0.4	1	1	0	0.004
			24	250	0.4	0	1	0	0.004
			48	250	0.0	0	0	0	0.000
		0.50 g/kg	12	250	0.8	1	2	0	0.008
			24	250	0.4	0	1	0	0.004
			48	250	0.0	1	0	0	0.000
		1.5 g/kg	12	250	0.0	0	0	0	0.000
			24	250	0.4	1	1	0	0.004
			48	250	0.0	0	0	0	0.000
	陽性対照 ⁴⁾	0.5 mg/kg	24	250	32.4	1	116	32	2.312*
	雌	溶媒対照 ³⁾	10 mL/kg	12	250	0.0	0	0	0
24				250	0.0	0	0	0	0.000
48				250	0.0	0	0	0	0.000
検体		0.15 g/kg	12	250	0.0	0	0	0	0.000
			24	250	0.0	0	0	0	0.000
			48	250	0.0	0	0	0	0.000
		0.50 g/kg	12	250	0.8	0	2	0	0.008
			24	250	0.4	0	1	0	0.004
			48	250	0.0	0	0	0	0.000
		1.5 g/kg	12	250	0.0	3	0	0	0.000
			24	250	0.4	0	1	0	0.004
			48	250	0.0	0	0	0	0.000
陽性対照 ⁴⁾		0.5 mg/kg	24	250	31.2	4	122	22	1.896**

1) ギャップを除く

2) 染色分体及び染色体切断及び断片を含む

3) 0.7%カルボキシメチルセルロース/1% Tween 80

4) トリエチレンメラミン

Student の t 検定 * : $p \leq 0.05$ ** : $p \leq 0.01$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

7) 細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 No.T-32)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1995 年

検体純度:

試験方法: 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) M45 株 (DNA 修復能欠損変異株) 及び H17 株 (野生株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で、孢子法により DNA 損傷誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次表に示す。

S9 mix 非存在下及び存在下のいずれにおいても、M45 株及び H17 株に対し検体処理による生育阻害作用が認められた。しかし、両株での生育阻止帯径の差はいずれの用量とも 2 mm 未満であった。一方、S9 mix 非存在下及び存在下の陽性対照であるマイトマイシン C 及び Trp-P-1 処理では、M45 株と H17 株に対する生育阻止帯の差が 4 mm 以上となり、DNA 損傷性が認められた。また、陰性対照であるカナマイシン処理では、両菌株に同程度の生育阻止作用が認められた。

以上の結果から、検体は代謝活性化の有無に関わらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性は陰性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アリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

薬物	処理濃度 μg/ディスク	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
		生育阻止帯径 (mm)		差 (mm)	生育阻止帯径 (mm)		差 (mm)
		M45	H17		M45	H17	
DMSO ^{a)}	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
検体	156	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	313*	0.1	0.2	<0.0	0.3	0.1	0.1
	625	2.1	1.8	0.3	4.1	4.1	0.0
	1250	4.4	4.1	0.3	4.6	5.2	<0.0
	2500	5.2	5.7	<0.0	5.5	5.1	0.3
	5000	7.8	7.6	0.2	4.8	5.5	<0.0
	10000	6.7	6.7	0.0	1.9	3.1	<0.0
	20000	6.4	6.6	<0.0	-	-	-
カナマイシン ^{b)}	0.3	9.1	8.5	0.6	-	-	-
マイトマイシン C ^{c)}	0.02	12.9	1.0	12.0	-	-	-
Trp-P-1 ^{c)}	20	-	-	-	11.6	0.0	11.6

a) : 溶媒対照

b) : 陰性対照

c) : 陽性対照

- : 未実施

* 313 μg/ディスク以上の濃度で両株に生育阻害作用が認められたが阻止帯径の差はいずれの濃度においても2mm未満であった

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

8) マウス肝細胞を用いた *in vivo/in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (資料 No.T-33)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1986 年

検体純度:

供試動物: B6C3FI 雄マウス、体重 21.6~26.2 g

試験方法: 検体を 0、100、1000、5000 mg/kg の用量で単回経口投与したマウスの肝細胞を用いて UDS 誘発性を検討した。検体は 0.7% CMC/0.5%又は 1% Tween 80 に懸濁して用いた。マウスに検体を投与し、2 及び 16 時間後に屠殺した。肝臓を摘出し初代培養肝細胞を得た。培養細胞を ^3H -チミジン 10 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ を添加したウィリアムス E 培地 (WE、10% 牛胎児血清を含む) 中で 4 時間培養した後、0.25 mM 非標識チミジン含有 WE 中で 14~18 時間培養した。培養後、細胞を洗浄し、1%クエン酸ナトリウム中で膨潤させ、固定液 (エタノール: 氷酢酸 = 3:1) で固定した。得られた細胞標本を写真用乳剤に浸し、7 日間露出 (-20°C) させた後現像した。細胞は 1%メチルグリーン Pyronin Y で染色した。

UDS (^3H -チミジン取込み量) の測定は標本あたり細胞を 30 個ずつ計数した。観察は顕微鏡下で行い、銀粒子の測定にはコロニーカウンターを用いた。核に隣接する最も強く標識された細胞質領域の核 2 個分の面積における最高計測値を核の計数值から差し引いた数を、核 1 個当たりの正味の粒子数 (NG) とした。NG が 5 以上の細胞を修復中細胞とし、その比率を求めた。

UDS が溶媒対照を著明に上回った場合、用量依存性、細胞応答の頻度分布の変化、修復中細胞の比率の増加及びデータの再現性を考慮に入れて、陽性と判定した。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次表に示した。

5000 mg/kg 投与 16 時間後屠殺群では 5 例中 3 例が 16 時間の屠殺時まで死亡した。検体投与群及び溶媒対照の NG 値は -4.1~7.4 個、修復中細胞の比率は 2%以下であり、UDS の増加は誘発されなかった。

一方、陽性対照のジメチルニトロソアミンは NG 値及び修復中細胞比率の両方を顕著に増加させた。

以上の結果から、検体は本試験条件下でマウス肝細胞に対して不定期 DNA 合成を誘発しないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

観察結果

薬物	投与量 (mg/kg)	処理時間 (hr)	投与 動物数	NG ³⁾	修復中細胞 (%) ⁴⁾
溶媒対照 ¹⁾	-	16	2	-6.7	0
検体	100	2	3	-6.2	0
		16	3	-7.4	0
	1000	2	3	-5.1	0
		16	3	-4.7	0
	5000	2	3	-7.2	0
		16	2	-4.1	1
陽性対照 ²⁾	10	16	3	11.2	56

1) 0.7% CMC/0.5% Tween 80

2) ジメチルニトロソアミン

3) 核1個当たりの正味の粒子数

4) NGを5個以上もつ細胞数の比率

(8) 生体の機能への影響に関する試験

クレトジムにおける薬理試験

(資料 No. T-34)

試験機関:

報告書作成年: 1995 年

検体純度:

マウスの中樞神経系に対する作用

①マウスにおける一般状態

供試動物; ICR 系マウス、体重 20.6~29.8 g、一群雌雄各 3 匹

投与方法; 検体を 0.7%カルボキシメチルセルロース (CMC) + 1% Tween 80 の混合液に懸濁し、0、200、600 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与し、投与前及び投与後 15 分、30 分、1、2、4 及び 24 時間に行動観察を行った。

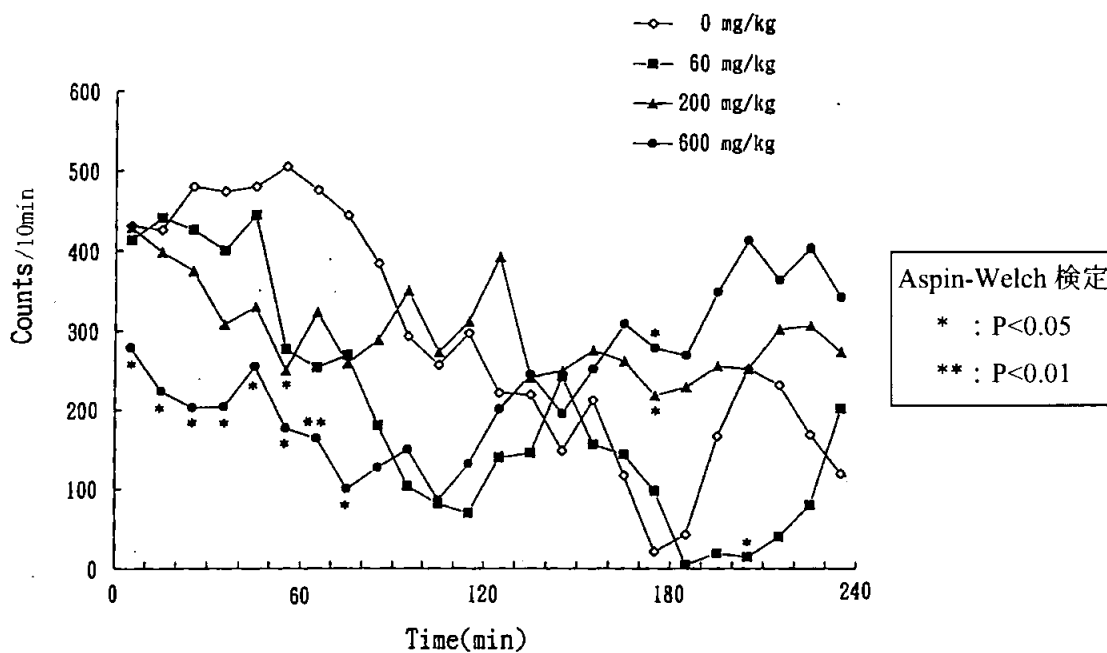
結果; 600 mg/kg 以上の投与群で運動性の低下、鎮静及び閉眼などが認められ、その発現例数及び変化の強さに用量相関性が認められた。さらに、2000 mg/kg 投与群では認知力の低下、姿勢の異常、異常歩行、筋緊張の低下、流涎などが認められ、投与後 2 時間に雌 1 例が死亡した。

②マウスにおける自発運動量

供試動物; ICR 系マウス、体重 25.5~34.1 g、一群雄 3 匹

投与方法; 検体を 0.7% CMC + 1% Tween 80 の混合液に懸濁し、0、60、200 及び 600 mg/kg の用量で経口投与し、投与直後より 10 分ごとに 4 時間までの運動量を自発運動量測定装置を用いて測定した。

結果; 結果を下図に示す。



600 mg/kg 投与群で投与直後から投与後 80 分まで、200 mg/kg 投与群でも投与後 50 分～60 分に自発運動量の有意な減少が認められた。

また、200 及び 600 mg/kg 投与群の投与後 170～180 分には溶媒対照群と比較して一過性の増加が認められたが、これらは検体の中枢抑制により運動量が減少した、反動的に増加したものと考えられた。また、60 mg/kg 投与群では投与後 200～210 分に減少が認められたが、他の群ではみられない変化であるため、検体の作用とは考えられなかった。

③マウスにおける睡眠延長作用

供試動物；ICR 系マウス、体重 23.5～31.7 g、一群雄 10 匹

投与方法；検体を 0.7% CMC + 1% Tween 80 の混合液に懸濁し、0、60、200 及び 600 mg/kg の用量で経口投与し、その 60 分後にペントバルビタールナトリウム 45 mg/kg を腹腔内投与して、睡眠時間を測定した。

結果；結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	溶媒対照	60	200	600
睡眠時間 (分)	42±20.8	60±26.6	70±26.9 *	>157 **a)

表中の数値は平均値±SD を示す。

a) 境界値を超えるデータが認められたため見なし値を用いて平均値を算出した。

溶媒対照群との有意差検定は、Willcoxon の両側検定を用いて行った (*: p < 0.05, **: p < 0.01)。

200 及び 600 mg/kg 投与群では溶媒対照群と比較して睡眠時間の有意な延長作用が認められた。60 mg/kg 投与群では影響は認められなかった。

④マウスにおける痙攣作用

供試動物；ICR 系マウス、体重 25.7～31.6 g、一群雄 10 匹

投与方法；検体を 0.7% CMC + 1% Tween 80 の混合液に懸濁し、0、200、600 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与し、その 60 分後にペンチレンテトラゾール 100 mg/kg を腹腔内投与して、間代性痙攣及び死亡発現の有無を 30 分間観察した。

結果；いずれの投与群においても間代性痙攣、死亡の発現ともに溶媒対照群と比較して有意な差は認められなかった。

⑤マウスにおける痙攣誘発作用

供試動物；ICR 系マウス、体重 27.2～32.5 g、一群雄 10 匹

投与方法；検体を 0.7% CMC + 1% Tween 80 の混合液に懸濁し、0、200、600 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与し、その 60 分後にペンチレンテトラゾール 52 mg/kg を腹腔内投与し、間代性痙攣及び死亡発現の有無を 30 分間観察した。

結果；いずれの投与群においても間代性痙攣、死亡の発現ともに溶媒対照群と比較して有意な差は認められなかった。

⑥マウスにおける鎮痛作用

供試動物；ICR 系マウス、体重 24.8～30.4 g、一群雄 10 匹

投与方法；検体を 0.7% CMC + 1% Tween 80 の混合液に懸濁し、0、200、600 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与し、その 60 分後に 0.7% 酢酸溶液 10 mL/kg を腹腔内投与して、5 分後から 10 分間に発現する writhing（苦悶反応）の回数を測定した。

結果；結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	溶媒対照	200	600	2000
苦悶反応発現回数（/10 分）	27±10.8	32±7.1	20±11.2	0±0.7**

表中の数値は平均値±SD を示す。

溶媒対照群との有意差検定は、Student の t-検定あるいは Aspin-Welch の t-検定を用いて行った (**: p < 0.01)。

2000 mg/kg 投与群では鎮痛作用が認められ、酢酸投与による苦悶反応の発現が有意に減少し、ほとんど認められなかった。200 及び 600 mg/kg 投与群では溶媒対照群との間に有意な差は認められなかった。

⑦ウサギの体温に対する作用

供試動物；New Zealand White 種ウサギ、体重 2.34～2.65 kg、一群雄 3 匹

投与方法；検体を 0.7% CMC + 1% Tween 80 の混合液に懸濁し、0、200、600 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与し、投与 2 時間前より 1 時間間隔で投与前に 3 回、投与後 1、2、3、4 時間にサーミスタ温度集録装置を用いて直腸体温を測定した。

結果；結果を次表に示す。

項目	投与後経過時間 (hr)	投与量 (mg/kg)			
		溶媒対照	200	600	2000 ^{a)}
体温 (°C)	1	39.05±0.229	39.35±0.090	39.20±0.060	38.90±0.050
	2	39.13±0.157	39.43±0.095*	39.37±0.096	38.64±0.000
	3	39.28±0.101	39.37±0.096	39.34±0.067	38.74±0.127*
	4	39.42±0.111	39.36±0.136	39.39±0.072	39.02±0.219

表中の数値は平均値±SD を示す。

a) 1 例が検体投与直後に死亡したため n = 2。

溶媒対照群との有意差検定は、Student の t-検定あるいは Aspin-Welch の t-検定を用いて行った (**: p < 0.01)。

2000 mg/kg 投与群では投与 3 時間後に低下が認められたが、4 時間後には回復した。200 mg/kg 投与群で 2 時間後に有意な上昇が認められたが、他の群ではみられない変化であることから、検体の作用とは考えられなかった。

⑧ウサギの脳波に対する作用

供試動物；New Zealand White 種ウサギ、体重 2.24～2.37 kg、一群雄 3 匹

投与方法；ガラミンで不動化し、人工呼吸下で大脳皮質運動領及び海馬より単極誘導にてアンプを介して脳波を記録した。検体をグリセロールフォルマルに溶解して、30、100、及び 300 mg/kg の用量で静脈内投与し、投与前、投与後 5、15、30 及び 60 分の脳波を測

定した。

結 果；300 mg/kg 投与において徐波あるいは痙攣波の出現があり、その後平坦化が認められた。

イヌの呼吸、循環器系に対する作用

⑨イヌにおける呼吸・血圧・心拍数・心電図・血流量に対する作用

供試動物；ビーグル犬、体重 7.4~11.4 kg、雌雄計 3 匹

投与方法；動物をペントバルビタールで麻酔後、背位固定した。呼吸は気管チューブを装着したピックアップよりアンプを介して、血圧は圧トランデューサー及び圧力アンプを介して、心電図は第 II 誘導によりアンプあるいは動物用自動心電計を介して、心拍数は瞬時心拍数ユニットを介して、血流量は大腿動脈に接続した血流プローブより血流計を介して、それぞれ記録した。検体をグリセロールフォルマルに溶解して、3、10、30 及び 100 mg/kg を静脈内に漸増投与し、投与直後、投与後 5、15、30 及び 60 分に呼吸、血圧、心拍数、心電図及び血流量を測定し、投与後 90 分まで観察した。

結 果；呼吸については、10 mg/kg 以上の投与により促進が認められ、その程度及び接続持間は投与量に依存していた。30 mg/kg 以上の投与で血圧低下及び心拍数低下が認められ、血流量は一過性に減少した後、投与後 5 分まで増加した。心電図に対して影響は認められなかった。

⑩モルモット摘出心房

供試動物；Hartley 系雄モルモット、体重 308~433 g、各濃度 3 標本

方 法；摘出心房標本を混合ガス(95% O₂, 5% CO₂)を通気したクレブスーヘンゼライト液(32℃)が満たされたマグナス槽中に約 1 g の負荷を加えて懸垂し、収縮は FD ピックアップを介して、拍動数は瞬時心拍計ユニットを介してそれぞれ記録した。検体をグリセロールフォルマルに溶解して、最終濃度が 10⁻⁸~10⁻⁵ g/mL になるように添加し、直接作用を添加後 5 分間調べた。

結 果；最高濃度の 10⁻⁵ g/mL においてもモルモット摘出心房に対する影響は認められなかった。

自律神経系及び平滑筋に及ぼす作用

⑪ウサギ摘出回腸

供試動物；New Zealand White 種雄ウサギ、体重 2.25~2.63 kg、各濃度 3 標本

方 法；摘出回腸標本を混合ガス(95% O₂, 5% CO₂)を通気したタイロッド液(37℃)が満たされたマグナス槽中に懸垂し、収縮をアイソトニックトランスデューサーを介して記録した。検体をグリセロールフォルマルに溶解して、最終濃度が 10⁻⁸~10⁻⁵ g/mL になるように添加し、自動収縮に対する作用を添加後 5 分間調べた。

結 果；最高濃度の 10⁻⁵ g/mL においてもウサギ摘出回腸の自動収縮に対す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アリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

⑫モルモット摘出回腸

供試動物；Hartley 系雄モルモット、体重 256～486 g、各濃度 3 標本

方 法；摘出回腸標本を混合ガス（95% O₂、5% CO₂）を通気したタイロード液（30℃）が満たされたマグナス槽中に約 0.5 g の負荷を加えて懸垂し、収縮をアイソトニックトランスデューサーを介して記録した。検体をグリセロールフォルマルに溶解して、最終濃度が 10⁻⁸～10⁻⁵ g/mL になるように添加し、直接作用を添加後 5 分間調べた。また、検体添加の 3 分後にアゴニスト溶液（アセチルコリン 10⁻⁸～10⁻⁷ g/mL、ヒスタミン 10⁻⁷、2 × 10⁻⁷ g/mL、セロトニン 10⁻⁶～10⁻⁵ g/mL、バリウム 3 × 10⁻⁴、5 × 10⁻⁴ g/mL を添加し、アゴニスト収縮反応に対する検体の影響も検討した。

結 果；アセチルコリン収縮に対する抑制作用及びセロトニン収縮作用に対する増強作用がそれぞれ 10⁻⁵ g/mL で軽度に認められたが、他のアゴニストによる収縮反応に対する作用や直接作用は認められなかった。

⑬モルモット摘出輸精管

供試動物；Hartley 系雄モルモット、体重 267～352 g、各濃度 3 標本

方 法；摘出輸精管標本を混合ガス（95% O₂、5% CO₂）を通気したタイロード液（30℃）が満たされたマグナス槽中に約 0.5 g の負荷を加えて懸垂し、収縮をアイソトニックトランスデューサーを介して記録した。検体をグリセロールフォルマルに溶解して、最終濃度が 10⁻⁸～10⁻⁵ g/mL になるように添加し、直接作用を添加後 5 分間調べた。また、検体添加の 3 分後にエピネフリン 10⁻⁶～10⁻⁵ g/mL を添加し、アゴニスト収縮反応に対する検体の影響も検討した。

結 果；最高濃度の 10⁻⁵ g/mL においてもモルモット摘出輸精管の筋緊張度に対する直接作用及びアゴニスト収縮に対する作用は認められなかった。

マウスの消化器系及ぼす影響

⑭マウスの腸管輸送能に対する作用

供試動物；ICR 系マウス、体重 26.0～31.8 g、一群雄 10 匹

投与方法；検体を 0.7% CMC + 1% Tween 80 の混合液に懸濁し、0、60、200、600 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与し、その 60 分後に 10% 骨炭末懸濁液（20% アラビアゴム添加）10 mL/kg を経口投与した。その 25 分後に全腸管を摘出して全長及び炭末移動距離を測定して輸送率を求めた。

結 果；結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	溶媒対照	60	200	600	2000
炭末輸送率 (%)	69.0 ± 10.70	64.3 ± 7.42	64.8 ± 12.10	63.2 ± 10.58	51.3 ± 10.56**

表中の数値は平均値 ± SD を示す。

溶媒対照群との有意差検定は、Student の t-検定あるいは Aspin-Welch の t-検定を用いて行った (**: p < 0.01)。

2000 mg/kg 投与群では溶媒対照と比較して有意な腸管輸送能の抑制作用が認められた。

体性神経系に及ぼす作用

⑮ラット摘出横隔膜神経筋

供試動物；SD系雄ラット、体重225～341g、各濃度3標本

方 法；摘出横隔膜神経筋標本を混合ガス（95% O₂ 5% CO₂）を通気したクレブスーヘンゼライト液（37℃）が満たされたマグヌス槽中に懸垂した。神経及び筋に10秒間隔で交互に電気刺激を加え、FDピックアップを介して筋収縮を記録した。検体をグリセロールフォルマルに溶解して、最終濃度が10⁻⁸～10⁻⁵g/mLになるように添加し、神経及び筋の電気刺激による筋収縮反応に対する作用を添加後5分間調べた。

結 果；横隔膜神経筋に対して間接（神経）及び直接（筋肉）刺激ともに検体による影響は認められなかった。

⑯ウサギにおける局所麻酔作用

供試動物；New Zealand White種ウサギ、体重2.04～2.45kg、一群雄3匹

投与方法；動物を頸部固定器に固定し、グリセロールフォルマルに溶解した検体（1、10%）及び陽性対照物質（塩酸オキシブプロカイン）を0.1mL点眼し、投与前、投与後10、30、60及び120分に角膜刺激を5回行い、瞬目反応の回数を測定した。

結 果；陽性対照の塩酸オキシブプロカインが適用10分後に角膜反射を消失させたのに対し、検体では1、10%の各濃度ともに影響は認められなかった。

ラットの水及び電解質代謝に及ぼす影響

⑰ラットの尿量及び尿中電解質

供試動物；SD系ラット、体重209～230g、一群雄10匹

投与方法；検体を0.7%CMC+1%Tween80の混合液に懸濁し、0、40、200及び1000mg/kgの用量で経口投与し、その30分後に生理食塩液30mL/kgを経口投与した。その後ラットを1匹ずつ採尿ケージに入れ、生理食塩液投与後5時間までの尿を採取し、尿量及び尿中電解質（Na⁺、K⁺、Cl⁻）濃度の測定を行った。

結 果；結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	溶媒対照	40	200	1000
尿中 Cl ⁻ (mmol/mL)	156±19.8	181±26.6*	225±31.2**	359±78.6**
尿中 Na ⁺ (mmol/mL)	133±22.5	149±15.3	141±17.5	272±49.5**
尿量 (mL)	3.0±0.63	3.7±0.93	3.2±1.50	2.0±0.71**

表中の数値は平均値±SDを示す。

溶媒対照群との有意差検定は、Studentのt-検定あるいはAspin-Welchのt-検定を用いて行った（*：p<0.05、**：p<0.01）。

尿中電解質に対しては、溶媒対照群と比較して40mg/kg以上の投与群で用量依存的なCl⁻の有意な上昇及び1000mg/kg投与群でNa⁺の有意な上昇が認められた。尿量では、溶媒対照群と比較して1000mg/kg投与群で有意な減少が認められたが、200mg/kg以下の投与群では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アリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

ラットの血液に対する作用

⑮血液凝固

供試動物；SD系ラット、体重 201～227 g、一群雄 5 匹

投与方法；検体を 0.7% CMC + 1% Tween 80 の混合液に懸濁し、0、200 及び 1000 mg/kg の用量で経口投与した。その 4 時間後に採血し、3.8%クエン酸ナトリウムを加えて血漿を採取し、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及びフィブリノーゲン量の測定を行った。

結 果；結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	溶媒対照	200	1000
プロトロンビン時間 (秒)	16.5±0.79	17.6±1.41	17.7±0.53*
フィブリノーゲン量 (mg/dL)	205.1±5.51	204.8±8.81	193.5±7.91*

表中の数値は平均値±SDを示す。

溶媒対照群との有意差検定は、Student の t-検定あるいは Aspin-Welch の t-検定を用いて行った (*:p<0.05)。

1000 mg/kg 投与群で、溶媒対照群と比較してプロトロンビン時間の有意な延長及びフィブリノーゲン量の有意な減少が認められたが、活性化部分トロンボプラスチンに対しては影響は認められなかった。200 mg/kg 投与群では影響は認められなかった。

⑯溶血作用

供試動物；SD系ラット、体重 201～227 g、一群雄 5 匹

投与方法；検体を 0.7% CMC + 1% Tween 80 の混合液に懸濁し、0、200 及び 1000 mg/kg の用量で経口投与した。その 4 時間後に採血し、ヘパリンを加えて血漿を採取し、シアンメトヘモグロビン法により血漿中のヘモグロビン濃度を求めた。

結 果；1000 mg/kg においても溶血作用は認められなかった。

以上の結果より、検体は哺乳動物に対して、鎮静、自発運動の抑制、睡眠時間延長作用、鎮痛作用、体温降下作用及び脳波検査で徐波の発現等を示し、中枢抑制作用を有することが示唆された。また、自律神経系及び平滑筋、呼吸・循環器系、腸管輸送能、水及び電解質、血液凝固能に対しては軽度な作用が認められたが、体性神経系には作用を示さず、また溶血作用もないものと考えられた。

クレトジムの「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要	
中枢神経系	①一般状態	マウス	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、200、 600、2000	雌雄各 3	600	200	600 mg/kg 以上で運動性低下、鎮静、閉眼、2000 mg/kg で認知力低下、姿勢異常、異常歩行、筋緊張低下、流涎などが認められ、雌 1 例死亡。
	②自発運動量	マウス	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、60、200、 600	雄 3	200	60	200 mg/kg 以上で有意な減少。
	③睡眠延長作用 (ペントバルビ タール腹腔内投 与)	マウス	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、60、200、 600	雄 10	200	60	200 mg/kg 以上で睡眠時間の有意な延長。
	④抗痙攣作用 (ペンチレンテ トラゾール 100 mg/kg 腹腔内投 与)	マウス	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、200、 600、2000	雄 10	-	2000	検体投与による影響なし。
	⑤痙攣誘発作用 (ペンチレンテ トラゾール 52 mg/kg 腹腔内投 与)	マウス	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、200、 600、2000	雄 10	-	2000	検体投与による影響なし。
	⑥鎮痛作用 (酢酸溶液腹腔 内投与)	マウス	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、200、 600、2000	雄 10	2000	600	2000 mg/kg で苦悶反応の有意な抑制
	⑦体温 (直腸温)	ウサギ	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、200、 600、2000	雄 3	2000	600	2000 mg/kg で低下
	⑧脳波	ウサギ (不動化)	静注 (GF)	0、30、100、 300	雄 3	300	100	300 mg/kg で徐波あるいは痙攣波が出現し、その後平坦化
呼吸・循環器系	⑨呼吸数、血圧、 心拍数、心電図、 血流量	イヌ (麻醉下)	静注 (GF)	3、10、30、 100 (漸増法)	雌雄計 3	10	3	10 mg/kg 以上で呼吸促進、30 mg/kg 以上で血圧低下、心拍数低下、血流量一過性低下。心電図には影響なし。
	⑩摘出心房 (直接作用)	モル モット	<i>in vitro</i> (GF)	$10^{-8} \sim 10^{-5}$ (g/mL)	3 標本	-	10^{-5} (g/mL)	検体の影響なし。

CMC：カルボキシメチルセルロース

GF：グリセロールフォルマル

(続く)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

クレトジムの「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表（続き）

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要	
自律神経系	⑪摘出回腸 (直接作用)	ウサギ	<i>in vitro</i> (GF)	10 ⁻⁸ ~10 ⁻⁵ (g/mL)	3 標本	-	10 ⁻⁵ (g/mL)	検体の影響なし。
	⑫摘出回腸 (直接作用)	モルモ ット	<i>in vitro</i> (GF)	10 ⁻⁸ ~10 ⁻⁵ (g/mL)	3 標本	-	10 ⁻⁵ (g/mL)	検体の影響なし。
	⑫摘出回腸 (Ach、5-HT、 His、Ba ²⁺ 収縮に 対する作用)	モルモ ット	<i>in vitro</i> (GF)	10 ⁻⁸ ~10 ⁻⁵ (g/mL)	3 標本	10 ⁻⁵ (g/mL)	10 ⁻⁶ (g/mL)	10 ⁻⁵ g/mL で Ach 収縮を 抑制、5-HT 収縮を増 強。 His、Ba ²⁺ による収縮に 対する影響なし。
	⑬摘出輸精管 (直接作用)	モルモ ット	<i>in vitro</i> (GF)	10 ⁻⁸ ~10 ⁻⁵ (g/mL)	3 標本	-	10 ⁻⁵ (g/mL)	検体の影響なし。
	⑬摘出輸精管 (Ep 収縮に 対する作用)	モルモ ット	<i>in vitro</i> (GF)	10 ⁻⁸ ~10 ⁻⁵ (g/mL)	3 標本	-	10 ⁻⁵ (g/mL)	検体の影響なし。
消化器系	⑭腸管輸送能 (炭末移動)	マウス	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、60、200、 600、2000	雄 10	2000	600	2000 mg/kg で有意な抑 制。
体性神経系	⑮横隔膜神経 筋 (電気刺激)	ラット	<i>in vitro</i> (GF)	10 ⁻⁸ ~10 ⁻⁵ (g/mL)	3 標本	-	10 ⁻⁵ (g/mL)	検体の影響なし。
	⑯局所麻酔作 用 (角膜刺激)	ウサギ	点眼 (GF)	1、10 (%)	雄 3	-	10 (%)	検体の影響なし。
水・電解質	⑰尿検査 (尿量、尿 Na ⁺ 、 K ⁺ 、Cl ⁻ 濃度)	ラット	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、40、200、 1000	雄 10	40	-	40 mg/kg 以上で Cl ⁻ の 有意な上昇、1000 mg/kg で Na ⁺ の有意な 上昇及び尿量の有意な 減少。
血液	⑱凝固作用 (プロトロンピ ン時間、APTT、 フィブリノーゲ ン量)	ラット	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、200、1000	雄 5	1000	200	1000 mg/kg でプロトロ ンピン時間の有意な延 長、フィブリノーゲン 量の有意な減少。
	⑲溶血作用 (血漿中ヘモグ ロビン濃度)	ラット	経口 (0.7% CMC + 1% Tween 80)	0、200、1000	雄 5	-	1000	検体の影響なし。

CMC：カルボキシメチルセルロース

GF：グリセロールフォルマル

Ach：アセチルコリン

5-HT：セロトニン

His：ヒスタミン

Ba²⁺：バリウム

Ep：エピネフリン

(9) その他

1) ラットを用いた 21 日間反復強制経口投与によるチトクローム P-450 誘導試験 (資料 No. T-35)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1989 年

試験目的:

検体純度:

供試動物: SD 系ラット (CrI: CD)、一群雄 8 匹、試験開始時 51 日齢、体重: 253~321 g

投与期間: 21 日間 (1988 年 4 月 20 日~1988 年 5 月 17 日)

投与方法: 検体を 0.7%カルボキシメチルセルロース (CMC) + 0.5% Tween 80 水溶液に懸濁し、250 mg/kg の用量で 1 日 1 回 21 日間強制経口投与した。なお、対照群には 0.7% CMC + 0.5% Tween 80 水溶液を同様に投与した。

観察・検査項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態及び生死を毎日観察した。

死亡は認められず、検体投与に起因すると考えられる中毒症状も観察されなかった。

体重変化; 投与開始前、その後週 2 回全動物の体重を測定した。また、屠殺前に最終体重を測定した。

対照群と比較して有意差は認められなかった。

肝臓重量; 各動物の肝臓重量を測定し、対体重比を算出した。

結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)		250
肝臓	重量	↑121
	体重比	↑123

対照群との有意差検定は、Student t 検定を用いて行った (↑↓: $p < 0.05$)。表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの。

対照群と比較し、検体投与群で肝臓の重量及び対体重比が有意に高値を示した。

肉眼的病理検査; 試験終了時に全動物について剖検を行った。

検体投与群の 2 例に肝臓の大型化が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

肝臓チトクローム P-450 含量；試験終了時に全動物を対象として、肝臓左葉から得られたミクロソームの懸濁液を用い、肝臓のチトクローム P-450 含量及びタンパク含量を測定した。結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)		250
チトクローム P-450	タンパク量当たり	93
	肝臓重量当たり	115
	肝臓当たり	↑136
タンパク含量	肝臓重量当たり	↑124

対照群との有意差検定は、Student t 検定を用いて行った (↑↓: $p < 0.05$)。
表中の数値は変動の日安として対照群を 100 とした場合の値を表したものの。

タンパク重量当たりのチトクローム P-450 含量に、検体投与群と対照群の間で有意な差は認められなかった。肝重量当たりのタンパク含量及び肝臓当たりのチトクローム P-450 含量は、対照群と比較すると有意に増加していたが、これらの増加は、投与群の肝臓重量の増加によるものであり、肝臓チトクローム P-450 の誘導を示唆するものではないと考えられる。

以上の結果から、検体を 250 mg/kg/日の用量で雄ラットに 21 日間連続経口投与した結果、対照群に比べて肝臓重量が増加したが、肝臓のタンパク重量当たりのチトクローム P-450 含量の有意な増加は認められず、本試験条件では検体は肝臓チトクローム P-450 を誘導しないと判断される。

申請者注：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

- 2) 4種のヒト核内レセプター（エストロゲンレセプター、アンドロゲンレセプター、グルココルチコイドレセプター及び甲状腺ホルモンレセプター）に対する影響 (資料 No. T-36)

試験機関：

報告書作成年：1997年

試験目的：

検体純度：

試験方法：ヒト由来培養細胞 HeLa 細胞に以下の核内レセプターに対応するヒト遺伝子を含む発現プラスミドとこれらのホルモンレセプター応答配列を上流に持つルシフェラーゼ遺伝子を有するレポータープラスミドを同時に導入した。

女性ホルモン（エストロゲン）レセプター

男性ホルモン（アンドロゲン）レセプター

副腎皮質ホルモン（グルココルチコイド）レセプター

甲状腺ホルモンレセプター

検体はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、これらのプラスミドを導入した HeLa 細胞に最終濃度が 1、10 及び 100 μM となるように添加した。36 時間暴露後に HeLa 細胞を溶解し、ルシフェラーゼ酵素活性を測定した。

検体がアゴニスト作用を有する場合、この系に検体を処理すると核内レセプターと結合し、ルシフェラーゼ遺伝子の転写が活性化され、ルシフェラーゼ酵素活性が増加する。一方、検体がアンタゴニスト作用を有する場合、この系にレセプターに結合するホルモンリガンドと検体を同時に処理すると、検体がホルモンの転写活性を阻害して、ルシフェラーゼ酵素活性が低下する。

用量設定根拠：

検査項目及び結果：

ホルモン用量依存的転写活性；4種の核内レセプターについて、ホルモン依存的に応答があるかを確認し、アンタゴニスト作用を検出するためのホルモン濃度を決定するため、各レセ

プターのホルモン用量依存的転写活性を検討した。

各レセプターアッセイ系にホルモンリガンド（エストラジオール、ジヒドロテストステロン、デキサメサゾン、トリヨードサイロニン）を各種濃度で添加した結果、リガンド用量依存的転写活性の増大が認められた。アンタゴニスト作用を検出するのに適切なホルモンリガンド濃度は次のとおりであった。

女性ホルモン：エストラジオール (E₂) ; 100 pM

男性ホルモン：デハイドロテストステロン (DHT) ; 100 pM

副腎皮質ホルモン：デキサメサゾン (Dex) ; 100 nM

甲状腺ホルモン：トリヨードサイロニン (T₃) ; 100 nM

アゴニスト作用；検体を3濃度（1 μM、10 μM、100 μM）で上述のプラスミドを導入した HeLa 細胞に処理したが、いずれのレセプターに関しても溶媒（DMSO）処理対照群に対して有意差は認められず、アゴニスト活性はないと考えられた。結果を次表に示す。

薬剤		検体		
処理濃度		1 μM	10 μM	100 μM
エストロゲン レセプター	平均値 ^{a)}	106.6	95.1	97.0
	標準偏差	15.5	14.9	14.7
	実験回数	20	20	20
アンドロゲン レセプター	平均値 ^{a)}	103.3	103.9	96.8
	標準偏差	15.2	8.33	8.56
	実験回数	20	20	20
グルココルチコイド レセプター	平均値 ^{a)}	96.9	97.1	96.1
	標準偏差	11.4	8.90	9.97
	実験回数	20	20	20
甲状腺ホルモン レセプター	平均値 ^{a)}	99.9	100.3	106.0
	標準偏差	14.1	13.8	20.5
	実験回数	16	16	16

対照群との有意差検定は、Student t 検定を用いて行った。

a) 溶媒（DMSO）を添加した群（対照群）の平均値を100としたときの相対値を示す。

アンタゴニスト作用；上述のプラスミドを HeLa 細胞に導入した後、各種ホルモン（E₂、DHT、Dex、T₃）と同時に検体を3濃度（1 μM、10 μM、100 μM）で処理したが、いずれのレセプターに関してもホルモンリガンド添加対照群に対してほぼ100%の活性を示し、アンタゴニスト作用はないと考えられた。

一方、アンタゴニストの陽性対照化合物である4-ヒドロキシタモキシフェン（対エストロゲンレセプター）は1 μMで約96%を、ヒドロキシフルタミド（対アンドロゲンレセプター）は1 μMで約85%を阻害した。なお、グルココルチコイドレセプター及び甲状

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

腺ホルモンレセプターに対しては適切な陽性対照アンタゴニストが既知でないので用い
なかつた。

結果を次表に示す。

薬剤		検体			陽性対照 ^{b)}
処理濃度		1 μM	10 μM	100 μM	1 μM
エストロゲン レセプター	平均値 ^{a)}	101.8	108.1	95.0	4.39**
	標準偏差	14.9	16.8	21.5	0.64
	実験回数	16	20	24	4
アンドロゲン レセプター	平均値 ^{a)}	111.3	90.7	109.9	14.5**
	標準偏差	53.3	36.5	35.4	2.7
	実験回数	32	32	56	12
グルココルチコイド レセプター	平均値 ^{a)}	103.0	90.8	105.1	—
	標準偏差	23.2	23.7	31.7	—
	実験回数	20	20	24	—
甲状腺ホルモン レセプター	平均値 ^{a)}	102.6	100.4	96.3	—
	標準偏差	35.1	22.1	14.2	—
	実験回数	16	16	26	—

対照群との有意差検定は、Student t 検定を用いて行った (** : p < 0.01)。

a) ホルモンリガンドのみを添加した群 (対照群) の平均値を 100 としたときの相対値を示す。

b) エストロゲンレセプターの陽性対照化合物は 4-ヒドロキシタモキシフェン、アンドロゲンレセプターの陽性対照化合物はヒドロキシフルタミド

以上の結果から、本試験条件下では、検体は核内レセプター (エストロゲンレセプター、アンドロゲンレセプター、グルココルチコイドレセプター及び甲状腺ホルモンレセプター) との結合性はなく、アゴニスト作用/アンタゴニスト作用は有さないと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3) マウスを用いた飼料混入投与による 28 日間反復経口投与免疫毒性試験 (資料 No. T-51)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2012 年

検体純度：

供試動物：B6C3F1 マウス、AFC (Splenic Antibody-Forming Assay) 試験群のみ設定。

1 群雌 10 匹、投与開始時 8 週齢、体重 18.7~23.2 g

投与期間：28 日間 (2011 年 8 月 1 日~2011 年 8 月 29 日)

投与方法：検体を 0、400、2000 及び 4000 ppm の濃度で飼料に混入し、28 日間にわたって随時摂食させた。検体の媒体としてアセトンを用い、週 1 回飼料調製を行った。

陽性対照群には基礎飼料を給餌し、投与 24~27 日に 1 日 1 回 4 日間にわたり陽性対照物質 (CPS, シクロホスファミド) 50 mg/kg/日を 10mL/kg 容量にて腹腔内投与した。

用量設定根拠：

感作：投与 24 日に、0.2 mL の HEPES 含有 Earle's Balanced Salt Solution 中に懸濁した 7.5×10^7 個のヒツジ赤血球 (sheep red blood cell, sRBC) を尾静脈内投与した。

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態は詳細な状態の観察日を除き 1 日 1 回、生死及び瀕死状態は毎日午前と午後に各 1 回観察した。詳細な状態の観察は週 1 回行った。

いずれの用量でも、検体投与に関連した死亡又は症状はなかった。

体重変化；全動物の体重を投与開始前 1 週より毎週 1 回測定し、各期間の体重増加量を算出した。対照群と比較して統計学的有意差の認められた検査時期を下表に示す。

体重増加量 (g)

検査時期	400 ppm	2000 ppm	4000 ppm	陽性対照群
14-21 日	-14 \downarrow	29 \downarrow	(43)	(100)
21-28 日	260 \uparrow	280 \uparrow	240 \uparrow	(20)

Dunnett 検定： \uparrow $p < 0.05$ 、 $\uparrow\uparrow$ $p < 0.01$ 、

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの。

括弧内の数値は参考値。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリス タライフサイエンス株式会社にある。

400 及び 2000 ppm 投与群において投与 14-21 日の体重増加量は有意に低く、400、2000 及び 4000 ppm 投与群において投与 21-28 日の値は有意に高かった。これらの変動には用量相関性がなく、反応方向に一貫性が見られないことから検体投与とは関係のない生理的変動と考えられた。

摂餌量；全動物の摂餌量を投与開始 1 週前より毎週測定した。

対照群と比較して統計学的有意差の認められた検査時期を下表に示す。

摂餌量 (g)

検査時期*	400 ppm	2000 ppm	4000 ppm	陽性対照群
-10- -4 日		78↓	(86)	
0-7 日		80↓	81↓	
14-21 日				88 s↓

Dunnett 検定：↑↓ p<0.05、↑↓ p<0.01

Student の t 検定：s↑s↓ p<0.05、s↑s↓ p<0.01

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したものの。

* 投与開始日を 0 日。

() 内は参考値。

2000 及び 4000 ppm 投与群において投与 0-7 日の摂餌量が有意に低かった。これらの値は投与開始前の値と同様であったことから、検体投与とは関係のない生理的変動と考えられた。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量 (ppm)	400	2000	4000
検体摂取量 (mg/kg/日)	136	603	1312

剖検；投与終了後の全動物を二酸化炭素吸入により麻酔し、IgM 抗体価を調べるため後大静脈より採血した後、剖検した（後述する脾臓抗体産生細胞活性の測定により、信頼のおける抗体産生能測定結果が得られたため、実際には IgM 抗体検査は実施しなかった）。また脾臓、胸腺、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節及びパイエル板を採取し、脾臓は HEPES 含有 Earle's Balanced Salt Solution 中に入れ、その他は 10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

検体投与に関連した肉眼的変化はなかった。

臓器重量；肝臓、脾臓及び胸腺重量を測定し、比体重値を算出した。

対照群と比較して統計学的有意差の認められた臓器を次表に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

臓器	投与量 (ppm)			
	400	2000	4000	陽性対照群
脾臓 (絶対重量)				46 s↓
脾臓 (比体重値)				49 s↓
胸腺 (絶対重量)				39 s↓
胸腺 (比体重値)				41 s↓
肝臓 (絶対重量)		117↑	144↑	
肝臓 (比体重値)		113↑	142↑	

Dunnett 検定: ↑↓ p<0.05, ↑↑ p<0.01

Student の t 検定: s↓s↓ p<0.05, s↑s↓ p<0.01

表中の数値は変動の日安として対照群を 100 とした場合の値を示したものの。

2000 及び 4000 ppm 投与群において、肝臓重量が絶対及び比体重値ともに有意に増加した。

陽性対照群においては、免疫抑制作用により脾臓及び胸腺重量が有意に減少した。

脾臓抗体産生細胞活性の測定；全動物から採血後、脾臓を採取し、Jerne プラーク法¹⁾の変法により sRBC 特異的 IgM 抗体産生細胞 (antibody-forming cell, AFC) 数を測定した。測定結果は脾臓細胞数、特異活性 (IgM AFC 数/脾臓細胞 10⁶ 個) 及び総脾臓活性 (IgM AFC 数/脾臓) として求めた。

対照群と比較して統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

IgM AFC 数

投与量 (ppm)	400 ppm	1000 ppm	4000 ppm	陽性対照群
脾臓細胞数				32 s↓
IgM AFC 数 (/10 ⁶ 個)				0 s↓
IgM AFC 数 (/脾臓)				0 s↓

Student の t 検定: s↓s↓ p<0.05, s↑s↓ p<0.01

表中の数値は変動の日安として対照群を 100 とした場合の値を示したものの。

T 細胞依存性抗原の sRBC に対する IgM AFC 反応について、脾臓細胞数、特異活性又は総脾臓活性のいずれについても、検体投与による影響は認められなかった。

陽性対照群で脾臓細胞数、特異活性及び総脾臓活性が有意に低下した。

これらは免疫抑制剤投与に際して惹起される想定どおりの結果であった。

以上の結果から、検体のマウスを用いた飼料混入投与による 28 日間反復投与免疫毒性試験においては、いずれの投与群でも免疫毒性影響が認められなかったことから、免疫機能に関する無影響量 (NOEL) は 4000 ppm (1312 mg/kg/日) と判断された。一般毒性影響として 2000 ppm 以上の投与群において、肝臓重量増加が観察された (申請者註：

)。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

参考文献

- 1) Jerne, N.K.; Nordin, A.A.; Henry, C. The agar Plaque Technique for Recognizing Antibody-Producing Cell. In *Cell Bound Antibodies*, Amos, B., Koprowski, H., Eds.; Wistar Institute Press: Philadelphia, PA, 1963.

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2. 原体混在物及び代謝物を用いた試験成績

以下の通り、原体混在物及び代謝物について試験を実施した。

		資料 No.
		T-37
		T-44
		T-38
		T-45
		T-39
		T-46
		T-40
		T-47
		T-41
		T-48
		T-42
		T-49
		T-43
		T-50

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-37)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-38)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-39)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-40)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-41)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-42)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-43)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-44)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-45)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-46)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-47)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T-48)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T -49)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

(資料 No.T -50)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

3. 製剤を用いた試験成績

(1) 急性毒性

1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No.FT-1)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1987 年

検体純度: 24%乳剤

[組成] クレトジム原体 24.0%
有機溶剤、界面活性剤等 76.0%

供試動物: SD 系ラット、10~16 週齢、体重; 雄 294~384 g、雌 170~257 g、
1 群雌雄各 5 匹 (対照群の雄のみ 10 匹)

観察期間: 14 日間

投与方法: 未希釈の検体を単回強制経口投与した。投与前は一晚絶食させた。

観察・検査項目: 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。体重は投与直前ならびに投与後 3、7 及び 14 日に測定した。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。脳、脊髄及び肉眼的病変部位について病理組織学的検査を行った。

結果:

投与方法 性別	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 1340, 2080, 3230, 4000, 5000, 6000	0, 1340, 2080, 3230, 5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	3610 (2350~5530)	2920 (1420~6000)
死亡開始時間 及び終了時間	投与後 1 日から開始 投与後 3 日に終了	投与後 1 日以内に開始 投与後 3 日に終了
症状発現時間 及び消失時間	投与後 1 分から発現 投与後 13 日に消失	投与後 9 分から発現 投与後 6 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	—	—
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	3230	2080

中毒症状として、死亡動物に尿による汚れ、運動失調、振戦、痙攣、虚脱、指趾及び尾のピンチング反応の消失、正向反射及び正常姿勢反射の消失、驚愕反応の消失、後肢の開脚及び瀕死状態が観察された。また、死亡及び生存動物に流涎、自発運動の低下、肛門生殖器、眼及び鼻の分泌物、摂餌量の減少、体温の低下、流涙、衰弱、呼吸困難、下痢、円背位、瞳孔反射の鈍化又は消失、鼻/口部の着色及び外観の乱れが観

察された。その他、生存動物において肛門生殖器の着色、尿の橙色化、糞の黒変、排便量の低下、旋回行動、異常呼吸音及び歩行異常が観察された。

体重に異常は認められなかった。

肉眼的病理検査では、検体投与に関連する病変として胃粘膜の菲薄化又は脱落ならびに胃及び腸管内容物の変色が認められた。

病理組織学的検査では、検体投与に関連する病変が腺胃及び前胃に認められた。主な病変は、上皮の脱落を伴う糜爛又は壊死ならびに基底組織の慢性胃炎であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

2) マウスにおける急性経口毒性試験

(資料 No. FT-2)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1995 年

検体純度： 24%乳剤

[組成] クレトジム原体 24.0%
有機溶剤、界面活性剤等 76.0%

供試動物： ICR 系マウス、7 週齢、体重；雄 25.5～33.0 g、雌 18.9～23.7 g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間： 14 日間

投与方法： 検体を注射用水で希釈し、単回強制経口投与した。なお、投与液量は 20 mL/kg とした。
対照群には注射用水のみを 20 mL/kg の容量で投与した。投与前 16 時間は絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。体重は投与直前、投与後 1、2、3、7、10 及び 14 日ならびに死亡発見時に測定した。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	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0、2700、3300、4000、 4800、5700、6800	0、2700、3000、3300、 4000、4800、5700、6800
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	3490 (2800～4090)	3090 (2870～3430)
死亡開始時間 及び終了時間	投与後 1 時間から開始 投与後 4 日に終了	投与後 1 時間から開始 投与後 3 日に終了
症状発現時間 及び消失時間	投与後 5 分から発現 投与後 4 日に消失	投与後 5 分から発現 投与後 3 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	—	—
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2700	2700

中毒症状として、雌雄ともに自発運動の低下、よろめき歩行、腹臥又は横臥、閉眼、呼吸深大、体温の低下、立毛及びチアノーゼが観察された。さらに雄では振戦及び呼吸困難、雌では間代性痙攣が観察された。

体重では、雄の 3300 mg/kg 以下の投与群及び雌の 2700 mg/kg 投与群において投与後 1 日に有意な減少が認められたが、その後順調に回復した。雄の 4000 及び 4800 mg/kg、雌の 3300 mg/kg 投与群では試験期間を通して増加抑制傾向がみられた。

死亡動物の肉眼的病理検査では、肺の赤色調変化、胃の赤色物付着ならびに胃及び小

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

腸の被験物質様物質の貯留及び暗赤色物貯留が認められた。生存動物においては何ら異常は認められなかった。

3) ウサギにおける急性経皮毒性試験

(資料 No.FT-3)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1986 年

検体純度: 24%乳剤

[組成] クレトジム原体 24.0%
有機溶剤、界面活性剤等 76.0%

供試動物: New Zealand White 種ウサギ、16~18 週齢、体重; 雄 2.84~3.71 kg、雌 3.06~3.69 kg、
1 群雌雄各 5 匹

観察期間: 14 日間

投与方法: 検体を剪毛した胴部に塗布し、プラスチックシート及びペーパータオルで被覆した。
塗布 24 時間後に被覆物を除去し、適用部位を蒸留水を含ませたガーゼで拭き取った。
対照群は塗布を除き同様に処置した。

観察・検査項目: 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。体重は投与前ならびに投与後 2、7 及び 14
日に測定した。試験終了時の全生存動物について適用部位を含む組織の肉眼的病理検査
を行った。皮膚及び肉眼的病変部位について病理組織学的検査を行った。

結 果:

投与方法	経 皮	
	雄	雌
性 別	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0、5000	
LD ₅₀ (mg/kg)	> 5000	> 5000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現時間 及び消失時間	投与後 1 日から発現 投与後 10 日に消失	投与後 1 日から発現 投与後 9 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	—	—
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

中毒症状として、摂取量の減少、結膜の発赤、削瘦及び排便量の減少が観察された。
また、適用部位の刺激性変化として肥厚、乾燥、鱗片化、発赤、浮腫、痂皮形成、裂
傷及び暗褐色化が観察された。

体重では、雌において投与後 2、7 及び 14 日に対照群と比較して統計学的に有意な低
値が認められた。

肉眼的病理検査では、検体投与に関連する病変として適用部位の皮膚に乾燥、鱗片化、
肥厚、痂皮形成、浮腫、発赤及び裂傷が認められた。これらの皮膚について病理組織

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

学的検査を行った結果、棘細胞症、角化症、慢性皮膚炎及び結痂性滲出液及び潰瘍が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

4) ラットにおける急性吸入毒性試験

(資料 No.FT-4)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1986 年

検体純度: 24%乳剤

[組成] クレトジム原体 24.0%
有機溶剤、界面活性剤等 76.0%

供試動物: SD 系ラット、7 週齢、体重; 雄 264~278 g、雌 174~195 g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間: 14 日間

暴露方法: 蒸留水で 1.8% v/v に希釈した検体を Ohio High Output 圧搾空気式ネブライザーを用いてミストを発生させ、4 時間全身暴露させた。対照群は空気のみを暴露させた。暴露開始後 90 及び 180 分に暴露空気をマルチジェットカスケードインパクターを用いて採取し、粒子径分布を求めた。カスケードインパクターで捕集した粒子ならびに暴露開始後 20 分から 30 分毎に 25 mm GF/A フィルターを用いて採取した粒子をアセトニトリルで溶解し、化学分析法により実際濃度を求めた。

暴露条件:

設定濃度 (mg/L)	5
総エアロゾル濃度 (mg/L)	5.4
クレトジム実測濃度 (mg/L)	0.033
粒子径分布 (%) *	
> 11.30 (µm)	13.7
11.30~7.11	16.6
7.11~4.47	10.90
4.47~2.81	17.90
2.81~1.77	5.45
1.77~1.11	10.75
1.11~0.70	24.70
空気力学的質量中位径 (µm) *	3.43
呼吸可能な粒子 (< 4.47 µm) の割合 (%) *	58.8
チャンバー容積 (L)	約420
チャンバー内通気量 (L/分)	84
曝露条件	ミスト 4時間 全身暴露

* カスケードインパクターを用いて暴露開始後 90 及び 180 分の 2 回測定した平均 (申請者による計算)

観察・検査項目: 暴露中及び暴露後 14 日間、中毒症状及び生死を観察した。体重を暴露前ならびに暴露後 7 及び 14 日に測定した。観察期間終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。肺及び気管について病理組織学的検査を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアリスタ ライフサイエンス株式会社にある。

結 果：

投与方法	吸 入	
	雄	雌
総エアロゾル濃度 (mg/L)	0、5.4	
LC ₅₀ (mg/L)	> 5.4	> 5.4
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現時間 及び消失時間*	暴露中から発現 暴露後 1 日に消失	
毒性徴候の認められなかった 最高暴露濃度 (mg/m ³)	—	—
死亡例の認められなかった 最高暴露濃度 (mg/L)	5.4	5.4

* 申請者註：症状について、報告書中に性別の記載がなかった。

中毒症状として、雌雄に関係なく暴露中は斜視又は閉眼が、暴露後は流涎及び被験物質の沈着による被毛の湿潤が認められた。

体重に異常は認められなかった。

肉眼的病理検査及び病理組織学的検査では、特記すべき変化は認められなかった。