

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

(7) 繁殖性および催奇形性

1) ラットを用いた繁殖毒性試験

(資料 No.T22)

検体純度：

供試動物：SD 系ラット、一群雌雄各 30 匹（但し最高投与群のみ雌雄各 40 匹）、開始時 6 週齢

投与期間：P 世代；投与開始から F₁ 児離乳までの約 10 週間

F₁ 世代；離乳から F₂ 児離乳までの約 11 週間、

F₂ 世代；離乳から約 11 週間

(1982 年 7 月 22 日～1983 年 7 月 6 日)

投与方法：検体を 0、4、40 および 400 ppm の濃度で直接飼料に混入し、自由摂取させた。検体を混入した飼料は毎週 1 回調製した。対照群には無処理の飼料のみを摂取させた。

用量設定根拠；

交配・調整・選抜および観察・検査項目：概要を表 1 にまとめた。

一般状態および死亡率；全動物の全検査期間に一般状態および生死を毎日観察した。

交配および妊娠の確認；交配は兄弟交配を避け、雌 1 匹に雄 1 匹を配して 20 日間行った。陰垢は毎日採取し、交尾の確証となる精子の有無を顕微鏡下で検査した。精子確認日は交尾後 (P.C) 1 日目とした。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

繁殖性に関する指標；

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{交尾した総雌数}}{\text{交配した総雌数}} \times 100$$

$$\text{妊娠率 (\%)} = \frac{\text{妊娠した総雌数}}{\text{交尾した総雌数}} \times 100$$

妊娠期間は、妊娠 0 日から分娩までの期間とした（膣垢中の精子確認日を妊娠 0 日とした）。

同腹児に関する所見；分娩状態を可能な限り観察し、同腹児数、性別および外表奇形を検査した。生存児の体重は、出生後 1、4、10、14 および 21 日目に測定し、生存児数を記録した。児動物の発育状態は、各同腹児につき、(i) 耳介展開 (ii) 歯芽萌出 (iii) 開眼を指標にその開始日と完了日を記録した。

病理組織学的検査；p 世代では、1 群雄 17 匹および雌 10 匹を、F₁ および F₂ 世代では 1 群雌雄各 10 匹を選抜して、臓器重量を測定し、肉眼的および組織学的検査を実施した。児動物については F₁A および F₂A の 1 群雌雄各 10 匹を無作為抽出し、肉眼的病理検査を実施し、臓器重量を測定した。5 匹については組織学的検査を行い、残りの動物については臓器を固定・保存した。

F₁B および F₂B については生後 21 日に全例屠殺し、肉眼的病理検査を実施した。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

表 1. 試験方法および試験項目：試験の概要を下表に示す。

世代	期間(週間)	交配・調整・選抜	観察・検査項目
P	生育(10 週)		一般状態を毎日 2 回、体重、餌を毎週 1 回測定し、食餌効率および検体摂取量を測定
	第 1 回交配 (3 週) 妊娠(3 週) 出産	雌雄 1 : 1 で交配。交尾は膣垢・ 中精子の有無で確認。 (妊娠 0 日)	交配状況の観察 交尾後、雄は継続して毎週、雌は妊娠 0、 3、13 および 20 日に体重を測定し、交尾 率、妊娠率、および妊娠期間を記録した。 出産状況の観察(F ₁ A)
	哺育(3 週) 離乳	F ₁ 世代継代用として各腹から 平均体重に近い児動物を選抜 し、1 群雌雄各 25 匹とした。	1 群雌雄各 10 匹の児動物を無作為抽出 し、解剖後肉眼的に検査し、臓器重量を 測定した。 うち 5 匹については病理組織学的検査を 行い、残り 5 匹については臓器を固定・ 保存した。 これらを除いた残りの児動物はすべて屠 殺し、肉眼的に検査した。
F ₁	第 2 回交配 生育(2 週)	}	第 1 回目交配と同様処理した。
	第 2 回交配 (3 週) 妊娠(3 週) 出産		
	哺育(3 週) 離乳		

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

試験方法および試験項目（続き）：試験の概要を下表に示す。

世代	期間(週間)	交配・調整・選抜	観察・検査項目
F ₁	生育(11週)] p 世代に準ずる] p 世代に準ずる
	第1回交配(3週)		
	妊娠(3週)		
	出産		出産状況の観察(F ₂ A)
	哺育(3週)		p 世代と同様に検査した。
	離乳	F ₂ 世代継代用として各腹から平均体重に近い児動物を選抜し、1群雌雄各20匹とした。	
	第2回交配前飼育(2週)		
	第2回交配(3週)]]	第1回目交配と同様処理した。
	妊娠(3週)		
	出産		
哺育(3週)			
離乳			
F ₂	生育(11週)		F ₁ 世代の親動物と同様に処理した。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

結 果：概要を次頁の表に示す。

一般状態および死亡率；P、F₁ および F₂ 世代いずれの世代においても、行動、症状および死亡について、投与群と対照群間で差は認められなかった。なお、P 世代で雄 1 匹（40 ppm 投与群） および雌 2 匹（0 および 400 ppm 投与群）、F₁ 世代で雌雄各 4 匹（雄 4 および 400 ppm 投与群、雌 40 ppm 投与群）が死亡したが、F₂ 世代では死亡は認められなかった。

体重変化；P 世代の生育期間では、雌雄ともに投与群と対照群との間に差は認められなかった。妊娠および哺育期間には対照群との間に一部有意差が認められたが、傾向は一定せず投与による影響は認められなかった。F₁ 世代の生育期間では、雌雄とも全体として体重変化の推移に投与による影響は認められなかった。4 および 40 ppm 投与群雌では第 1 回目の交配後および分娩後の体重において投与による影響は認められなかった。F₂A の妊娠期における 400 ppm 投与群雌の体重は、その期間を通じ対照群の値よりも 5～10%低下したが、有意差は認められなかった。また、分娩後も同様な傾向が認められ、特に分娩 10 および 14 日後の体重は有意に減少したが、全体を通じてみると、F₁ 雌の体重変化は各投与群で投与による影響はなかった。

F₂ 世代では、雌雄、全投与群ともに、差は認められなかった。

摂餌量および飼料効率；P、F₁ および F₂ 世代とも、摂餌量および食餌効率それぞれの対照群に比較していずれの投与群においても、有意差は認められなかった。

繁殖性に関する成績；交尾率、妊娠率および妊娠期間は各投与群で有意差は認められなかった。

同腹児に関する成績；F₂B の 400 ppm 投与群で生存児数が有意に少なく、また離乳時の体重も低かった。

病理組織学的検査；全投与群において投与に関連した病理組織学的変化は認められなかった。

臓器重量について統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

P 世代では、400ppm 投与群の雌で腎臓および心臓重量の有意な増加が認められたが、この変化は（

）検体投与の影響とは考えられなかった。また、40 ppm 投与群の F1A 雄離乳児の心臓重量対体重比が有意に上昇したが（

）、この変化も検体投与の影響とは考えられなかった。

F1 世代では、400ppm 投与群の雄で肝臓重量対体重比の有意な上昇が認められた。400 および 40ppm 投与群の雌で肝臓重量にわずかな減少が認められたが（

）、この変化は検体投与に関連するとは考えられなかった。

F2 世代では、400ppm 投与群の雄で肝臓重量対体重比の上昇が認められた以外に検体投与に関連した影響は認められなかった。なお、肝臓重量対体重比のごく軽度な上昇が 40ppm 投与群の雄で認められた（

）。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

試験結果：

世代		親：p				児：F ₁				親 F ₁				児：F ₂				F ₂			
投与群(ppm)		0	4	40	400	0	4	40	400	0	4	40	400	0	4	40	400	0	4	40	400
動物数	雄	30	30	30	40	25	25	25	25	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	雌	30	30	30	40	25	25	25	25	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
一般状態		著変なし				著変なし				著変なし											
死亡率 (%)	雄	0	0	3	0	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	雌	3	0	0	2.5	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
体重変化*	P:1-4日/ F ₁ :1日																				
	P:4-7日/ F ₁ :4日																				
	P:7-14/ F ₁ :10日			↑180								↓90									
	P:14-21/ F ₁ :14日			↑↑ 200								↓94									
	F ₁ :21日																				
親動物 検体 摂取量 (mg/kg/day)	雄		0.28	2.79	27.8		0.35	3.57	36.1		0.36	3.55	36.1		0.38	3.85	39.3				
	雌		0.33	3.22	31.7		0.39	3.85	38.5		0.38	3.85	39.3								
肉眼的 病理検査		著変なし				著変なし				著変なし											
病理組織学的 検査		著変なし				著変なし				著変なし											
交尾率 (%)	A	100	100	100	97.5	100	100	96	91.7												
	B	100	100	100	100	100	91.7	95.7	91.7												
妊娠率 (%)	A	93	100	100	100	100	100	100	95.5												
	B	100	100	100	100	100	95.5	100	100												
妊娠 期間	A	全群ともにほとんど 22~23日				全群ともにほとんど 22~23日															
	B	全群ともにほとんど 22~23日				全群ともにほとんど 22~23日															

*親動物の体重変化の項：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。

統計学的解析（両側検定） ↑↓：p<0.05、↑↑↓↓：p<0.01

]

A：第1回交配、B：第2回交配

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

試験結果（続き）：

世代		親：p 児：F ₁				親：F ₁ 児：F ₂					
投与群(ppm)		0	4	40	400	0	4	40	400		
動物数		雄	30	30	30	40	25	25	25	25	
		雌	30	30	30	40	25	25	25	25	
新生児数 および 生存児数	分娩時 (出生)	A	12.2	12.0	12.1	12.5	11.6	11.5	↑↑13.1	11.9	
		B	13.0	13.2	13.8	12.7	11.9	11.8	13.1	↓10.5	
	分娩後 4日	A	10.6	10.9	11.5	11.7	10.2	10.1	↑11.7	9.9	
		B	11.0	10.4	11.9	11.4	10.5	10.7	↑11.1	↓8.5	
	分娩後 21日	A	10.6	10.8	11.3	11.7	10.4	10.0	↑11.6	10.3	
		B	10.7	10.8	11.6	11.1	10.7	10.4	11.1	↓↓8.8	
同腹児死亡数(率)		A	5/28 (18)	1/30 (3)	3/30 (10)	6/39 (15)	2/25 (8)	4/25 (16)	1/22 (5)	4/21 (19)	
		B	6/29 (21)	4/30 (13)	6/29 (21)	11/40 (28)	6/25 (24)	4/21 (19)	3/22 (14)	4/22 (18)	
児動物	性比 (雄/雌)	分娩時	A	0.99	0.93	1.02	0.99	1.06	0.84	0.89	0.73
			B	0.97	0.82	0.91	0.97	0.96	1.00	1.01	1.03
		分娩後1日	A	1.05	0.93	1.00	1.00	1.08	0.83	1.05	0.76
			B	1.06	0.80	0.89	0.96	0.96	0.99	1.05	0.93
	21日	A	0.95	0.94	1.03	1.10	1.08	0.83	0.98	0.71	
		B	1.06	0.82	0.90	0.93	0.91	1.06	1.10	1.04	
	同腹生存 児重量(g)	分娩後1日	A	63	65	67	67	61	60	66	59
			B	59	64	65	58	59	57	64	52
4日		A	83	83	88	88	76	73	84	69	
		B	77	84	86	83	83	74	81	↓68	
21日	A	345	341	364	359	338	312	345	290		
	B	312	335	345	332	316	312	329	↓264		
児体重(g)	分娩後1日	A	5.7	5.8	5.7	5.6	5.5	5.5	5.4	5.4	
		B	5.2	5.3	5.1	5.2	5.2	5.2	5.1	5.6	
	4日	A	8.0	7.8	7.8	7.5	7.4	7.3	7.2	6.9	
		B	7.0	↑7.6	7.2	7.2	7.3	7.0	7.1	7.9	
	21日	A	33.4	32.6	33.0	31.0	34.0	32.0	↓30.2	↓↓28.1	
		B	29.8	31.7	30.2	29.8	30.9	31.0	30.3	32.3	
肉眼的病理検査		著変なし				著変なし					
病理組織学的検査		著変なし				著変なし					

A：第1産児、B：第2産児

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。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

2) ラットにおける催奇形性試験

(資料 No.T23)

検体純度 :

供試動物 : SD 系ラット、一群雌 37 匹 (但し対照群 38 匹)、平均体重 雌 221 g

投与期間 : 14 日間 (1981 年 9 月 28 日~1981 年 11 月 8 日)、(妊娠 6 日後から 19 日後まで)

投与方法 : 検体を 0.5% CMC-Na 水溶液に懸濁し、0、320、1280 および 3200 mg/kg の投与量で、妊娠 6 日後から 19 日後まで 14 日間、毎日 1 回強制経口投与した。膣垢中精子確認日を妊娠 0 日とした。対照群には溶媒のみを投与した。

用量設定根拠 :

観察・検査項目 :

親動物 ; 一般状態および生死を毎日観察し、妊娠 0 および 3 日目、6~19 日目まで毎日、および剖検時 (妊娠 20 日目) に体重を測定した。

妊娠 20 日目に帝王切開し、次の項目について肉眼的病理検査を実施した。

- (i) 黄体数
- (ii) 着床数
- (iii) 初期および後期死亡胎児数
- (iv) 妊娠子宮重量
- (v) 生存胎児数
- (vi) 胎盤重量
- (vii) 子宮重量

なお、肝臓重量を測定した後、病理標本を作成し、鏡検した。

生存胎児 ; 性別、体重、外表異常の観察を行った。1/2 の胎児については内臓異常を、残りの半数について骨格異常の有無を検査した。

以下の項目については次式により算出した。

$$\text{妊 娠 率 (\%)} = \text{妊娠雌数} / \text{交尾雌数} \times 100$$

$$\text{着床前死亡率 (\%)} = (\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数} \times 100$$

$$\text{着床後死亡率 (\%)} = (\text{着床数} - \text{生存胎児数}) / \text{着床数} \times 100$$

$$\text{性 比} = \text{雄胎児数} \times \text{雌胎児数}$$

結 果 : 概要を次頁の表に示す。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

試験結果：

親動物	投与群(mg/kg/day)	0	320	1280	3200	
	一群当り動物数	38	37	37	37	
	一般状態	著変なし			投与開始後 2 日から終了時まで深紅色を呈する糞便を排泄	
	投与後死亡数	0	0	3	1	
	妊娠数(率)	35/38(92)	34/37(92)	33/37(89)	34/37(92)	
	不妊動物数	3	3	4	3	
	有効動物数	35	34	30	33	
	体重変化	正常に推移			交尾後 7 日から終了時まで体重増加抑制	
	肝臓重量	重量(g)	12.7	13.2	↑13.5	13.2
		対体重比*(%)	4.38 (3.59)	4.61 (3.81↑↑)	↑↑4.68 (↑↑3.83)	↑↑4.82 (↑↑↑3.89)
病理組織学的所見		著変なし			肝臓の軽度な異染性、肝小葉中心性肥大が、一部に認められた。	
着床所見(一腹当り)	黄体数	14.6	13.8	14.7	14.3	
	着床数	13.6	13.3	13.8	13.5	
	生存胎児数	12.9	12.3	12.9	12.9	
	雄	6.7	6.5	6.7	6.5	
	雌	6.2	5.8	6.2	6.4	
	死亡胎児数 前期	0.66	0.90	0.90	0.60	
	後期	0.03	0	0.03	0.03	
	着床前死亡率(%)	6.7	3.8	5.6	5.7	
着床後死亡率(%)	3.7	↑9.8	↑6.8	4.4		
胎盤重量(g)	0.44	0.44	0.45	0.44		

Student's t 検定および Mann Whitney の U 検定 ↑↓ : P<0.05、↑↑↓ : P<0.01、↑↑↑↓ : P<0.001

* 肝重量の子宮内容物重量で補正をした体重に対する比 (括弧内は、肝重量の交尾後 21 日目の体重に対する比)

試験結果（続き）：

投与群(mg/kg/day)		0	320	1280	3200			
総胎児数		453	418	386	425			
平均同腹児重量(g)		44.7	43.9	45.1	45.8			
平均胎児重量(g)		3.47	3.46	3.51	3.55			
性比		1.1	1.1	1.1	1.0			
胎児動物	二分脊椎	手足、頭等に出血、血腫が認められたが投与との関連はなかった。			1			
	外脳症				1			
	無眼瞼症				1			
	下顎変形				1			
	および胸部浮腫				1			
	頭部肥大				2			
	短尾				1			
	臍帯ヘルニアおよび胎盤癒着				1			
	検査胎児数				223	207	193	213
	骨格異常				舌骨の化骨遅延または欠損(%)	2.69	5.80	7.25
第13肋骨の減少(%)		1.79	0.48	1.04	5.63			
胸骨不完全化骨数(%)		≤1個	40.81	46.38	37.31	↑↑ 57.28		
		2個	53.81	46.86	53.37	↓ 41.32		
		≥3個	5.38	6.76	9.33	↓ 1.41		
尾椎の化骨数(%)		<2個	47.53	↓ 20.77	↓ 17.62	↓ 21.13		
	≥2個	52.47	↑ 79.23	↑ 82.38	↑ 78.87			
内臓異常	検査胎児数	228	211	193	212			
	一側性腎盂拡張(%)	13.16	10.90	15.54	19.81			
	一側性水腎症(%)	3.95	2.84	5.18	2.36			

カイ二乗検定 ↑↓ : P<0.05、↑↑↓↓ : P<0.01、↑↑↑↓↓↓ : P<0.001

クロフェンテジンは、親動物の一般状態および死亡について投与に起因する影響を示さなかったが、3200 mg/kg 投与群で交尾7日後から21日後までの間、有意な体重増加抑制が認められた。320 mg/kg 以上の投与群で、肝臓の対体重比が投与量に依存して上昇したが、重量には投与との関連性は認められなかった。肝臓の病理組織学的検査では3200 mg/kg 投与群に、軽度の異染性および小葉中心性肝細胞肥大が散見された。着床所見においては、いずれの項目も投与に関連する影響は認められなかった。胎児に関しては、外表異常が3200 mg/kg 投与群で数匹認められたが、発生頻度も低く、投与に関連した影響とは考えられなかった。

骨格所見では、舌骨の化骨遅延を示す胎児数の出現頻度が3200 mg/kg 投与群で有意に上昇した。胸骨化骨において不完全化骨を示す胸骨を1個あるいは全く持たない胎児数は有意に増加し (P<0.01)、これに対応して2個以上を有する胎児数は有意に減少した (P<0.05)。また、全投与群において尾椎化骨を2個以上有する胎児数は有意に

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

増加した ($P < 0.01$)。しかしながら、同腹児出現頻度では対照群との差は認められず、本試験における評価の基本単位は同腹児と考えられることから、本剤投与は化骨に影響を及ぼすものではないと考えられる。内臓所見では、一側性の腎盂拡張および水腎症の発生が認められたが、投与との関連性は明らかではなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに投与した時の母動物に対する無毒性量は320 mg/kg/dayであり、胎児動物における無毒性量は3200 mg/kg/dayであった。
また、最高投与量の 3200 mg/kg 投与群においても催奇形性を及ぼさないと判断される。

[

]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

3) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 No.T24)

検体純度：

供試動物：ニュージーランド・ホワイトウサギ、体重 2.6～4.1 kg、一群雌 16 匹

投与期間：22 日間（1982 年 4 月 27 日～1982 年 6 月 4 日）、妊娠 6 日目から妊娠 27 日目まで

投与方法：検体を 0.5% CMC-Na 水溶液に懸濁し、0、250、1000 および 3000 mg/kg の投与量で、妊娠 6 日目から 27 日目までの 22 日間、1 日 1 回強制経口投与した。交配日の翌日を妊娠 0 日とした。対照群には溶媒のみを投与した。

用量設定根拠：

観察・検査項目：

親動物；一般状態を毎日観察し、妊娠 0、6、9、13、17、21、25 および 28 日目に、体重を測定した。また体重測定日から次の体重測定日まで摂餌量測定を行った。妊娠 28 日目に頸椎脱臼により屠殺し、剖検した。子宮重量測定後、次の項目について検査した。

- (i) 黄体数、(ii) 着床数、(iii) 初期および後期死亡胎児数、(iv) 生存胎児数、(v) 子宮重量

生存胎児；外表検査後ペントバルビタールナトリウムの胸腔内注射により屠殺し体重測定後、解剖して内臓異常および性別を検査した。脳の肉眼的異常を調べ、次に Dawson 法の変法により骨格検査を行った。

以下の項目については次式により算出した。

$$\text{妊 娠 率 (\%)} = \text{妊娠雌数} / \text{交尾雌数} \times 100$$

$$\text{着 床 率 (\%)} = \text{着床数} / \text{黄体数} \times 100$$

$$\text{着床前死亡率 (\%)} = (\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数} \times 100$$

$$\text{着床後死亡率 (\%)} = (\text{着床数} - \text{生存胎児数}) / \text{着床数} \times 100$$

$$\text{性 比} = \text{雄胎児数} / \text{雌胎児数}$$

結 果：概要を次頁の表に示す。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

結果の概要

親動物	投与群(mg/kg/day)		0	250	1000	3000	
	1群当り動物数		17	18	16	18	
	投与後死亡数		1/16	0/16	1/16	1/16	
	検査対象動物数		15	15	14	14	
	妊娠数(率) ^{a)}		15/15(100)	15/16(93)	14/15(93)	14/15(93)	
	不妊動物数		0	1	1	1	
	一般状態	着床尿		0	16	15	15
		淡紅色の糞便		0	1	15	15
		糞便排泄量の減少		4 ^{b)}	6 ^{b)}	6 ^{b)}	9 ^{b)}
		脱毛		2	1	4	2
	体重増加量(g)		799	758	726	667	
	摂餌量(g/匹/day)		190.7	179.6	189.2	156.1	
	肉眼的病理検査		異常なし			胃腸管内容物の淡紅色化	
	着床所見 (1腹当り)	黄体数		11.2	12.2	10.4	10.2
着床数		9.3	10.1	9.1	9.1		
着床後死亡率		前期(%)	0.3	0.6	0.5	0.2	
		後期(%)	0.7	0.7	0.3	0.4	
生存胎児数		8.3	8.9	8.4	8.6		
子宮重量(g)		518.0	514.3	481.3	457.0		
胎児動物	総胎児数		125	133	117	120	
	胎児重量(g)		44.8	41.8	42.7	↓39.1	
	性比		0.66	0.73	1.44	1.00	
	奇形(%)		1.6	3.6	4.1	2.8	
	内臓異常 ^{c)} (%)		2.7	5.6	4.9	9.3	
	骨格異常 ^{c)} (%)		23.9	22.0	20.6	23.9	
	骨格変異 ^{c)} (%)		20.6	22.5	15.1	12.1	

a) : 妊娠率は死亡動物を除外して計算した。 LSD法 ↓: P<0.05

b) : 不妊動物を含む。

c) : 奇形を有する胎児を除外して計算した。

親動物では、3000 mg/kg 投与群で、体重増加量の抑制および摂餌量の減少ならびに淡紅色の糞便および尿が認められた。これらの症状は250 および 1000 mg/kg 投与群でも認められたが、顕著なものではなかった。投与開始後0、1000 および 3000 mg/kg 投与群の各1例が摂餌不良、体重減少等を示したので屠殺した。

胎児では3000 mg/kg 投与群で胎児重量の有意な減少が認められた。また胎児の形態学的検査では、投与に直接関連した影響は認められなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与した時の親動物および胎児に対する無毒性量は1000 mg/kg/dayであった。また、最高投与量の3000 mg/kg/投与群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。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

(8) 変異原性

1) 細菌を用いる復帰変異性試験

(資料 No.T25)

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537 および TA1538) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在および非存在下において Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO を用いて懸濁した。10、33、100、330、1000 および 3300 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の 6 濃度で実施した。なお、S-9mix 存在下および非存在下における陽性対照には 2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は 330 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の濃度では沈澱が生じたが、S-9mix の有無に関わらずいずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-AA は、S-9mix の存在下で顕著に復帰変異コロニー数を増加させた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有さ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アダマ・ジャパン株式会社にある。

(表中の数値は3反復の平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型		フレームシフト型		
			TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
溶媒対照 (DMSO)	0	-	9	71	13	13	17
検体	10	-	11	76	6	16	17
	33	-	7	71	13	16	16
	100	-	8	78	10	12	18
	330 ^{a)}	-	6	86	8	12	116
	1000 ^{a)}	-	7	91	10	10	17
	3300 ^{a)}	-	- ^{b)}	97	7	6	17
溶媒対照 (DMSO)	0	+	12	78	12	23	33
検体	10	+	10	91	17	31	34
	33	+	9	91	16	18	30
	100	+	12	81	13	16	24
	330 ^{a)}	+	12	87	12	20	31
	1000 ^{a)}	+	7	93	12	17	25
	3300 ^{a)}	+	13	102	14	20	21
陽性対照 (2-AA)	0.5	-	16	82	14	12	23
		+	138	589	27	316	354

^{a)}: 沈澱を生じた

^{b)}: 操作上の誤りにより測定不能

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

2) 細菌を用いる復帰変異性試験

(資料 No.T26)

検体純度：

試験方法：トリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下および非存在下において Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は 1%CMC-Na 水溶液を用いて懸濁し、156、313、625、1250、2500 および 5000 μg /プレートの範囲の 6 濃度で実施した。なお、陽性対照として S-9mix 非存在下では 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) を、存在下では 2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、S-9mix の有無にかかわらず大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) の復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた AF-2 および 2-AA は、それぞれ S-9mix の非存在下および存在下で顕著な復帰変異コロニー数を増加させた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において、大腸菌に対し復帰変異誘発性を有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アダマ・ジャパン株式会社にある。

(表中の数値は3反復の平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート
			塩基置換型
			WP2 <i>uvrA</i>
溶媒対照 (1%CMC-Na)		-	30
検体	156	-	31
	313	-	30
	625	-	32
	1250	-	31
	2500	-	25
	5000	-	26
溶媒対照 (1%CMC-Na)		+	27
検体	156	+	30
	313	+	30
	625	+	30
	1250	+	26
	2500	+	24
	5000	+	27
陽性対照 (AF-2)	0.01	-	136
(2-AA)	20	+	608

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

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アダマ・ジャパン株式会社にある。

3) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No.T27)

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA102、TA1535 および TA1537 株) を用い、ラット肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルホルムアミドに懸濁し、50~5000 μg /プレートの範囲の 5 濃度で実施した。陰性対照群には無処理および溶媒のみを添加したものを用いた。試験は 3 反復とし、2 回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁以降の表に示した。

2 回の試験において検体は、S-9mix の有無にかかわらず、菌株の生育阻害を起こさない最高用量 (5000 μg /プレート) においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、9-アミノアクリジン、マイトマイシン C、4-ニトロキノリン-1-オキシド、2-アミノアントラセン、1,8-ジヒドロキシアントラキノンおよびベンゾ (a) ピレンでは、すべての検定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、検体は代謝活性化系を含む本試験条件下において、復帰変異誘発性を有さ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アダマ・ジャパン株式会社にある。

1 回目試験

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	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		
			TA 100	TA 1535	TA102	TA 98	TA 1537	
無処理	0	—	111	17	214	20	9	
溶媒対照	0	—	99	28	239	31	13	
検体	50	—	93	33	225	26	9	
	150	—	126	32	250	21	8	
	500	—	106 P	27 P	216 P	26 P	10	
	1500	—	110 P	31 P	226 P	17 P	7	
	5000	—	94 P	20 P	223 P	19 P	9	
溶媒対照	0	+	98	10	326	26	11	
検体	50	+	89	10	308	20	11	
	150	+	97	12	319	19	8	
	500	+	97 P	11 P	311 P	19 P	5 P	
	1500	+	86 P	15 P	292 P	19 P	7 P	
	5000	+	99 P	11 P	217 P	20 P	6 P	
陽性対照	ENNG	3	—	640	-	-	-	-
		5	—	-	353	-	-	-
	MMC	0.5	—	-	-	1281	-	-
	4NQO	0.2	—	-	-	-	206	-
	9AA	80	—	-	-	-	-	402
	2AA	1	+	1163	-	-	-	-
		2	+	-	123	-	-	236
	DAN	10	+	-	-	896	-	-
BP	5	+	-	-	-	182	-	

溶媒対照 ジメチルホルムアミド

陽性対照 ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、MMC : マイトマイシン C、
4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド、9AA : 9-アミノアクリジン、
2AA : 2-アミノアントラセン、DAN : 1,8-ジヒドロキシアントラキノン、
BP : ベンゾ (a) ピレン

P : 析出

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

2 回目試験

(表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	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		
			TA 100	TA 1535	TA102	TA 98	TA 1537	
無処理	0	—	106	18	320	18	13	
溶媒対照	0	—	119	15	330	15	15	
検体	50	—	95	14	324	14	12	
	150	—	106	18	317	18	15	
	500	—	90	16	319	14	13	
	1500	—	100	17	336	20	14	
	5000	—	104	16	324	16	11	
溶媒対照	0	+	97	16	366	22	22	
検体	50	+	83	9	344	22	18	
	150	+	93	7	355	27	16	
	500	+	78 P	10 P	326 P	24 P	20 P	
	1500	+	94 P	15 P	300 P	28 P	15 P	
	5000	+	100 P	10 P	322 P	22 P	17 P	
陽性 対照	ENNG	3	—	440	-	-	-	-
		5	—	-	286	-	-	-
	MMC	0.5	—	-	-	2007	-	-
	4NQO	0.2	—	-	-	-	196	-
	9AA	80	—	-	-	-	-	609
	2AA	1	+	620	-	-	-	-
		2	+	-	206	-	-	259
	DAN	10	+	-	-	823	-	-
BP	5	+	-	-	-	192	-	

溶媒対照 ジメチルホルムアミド

陽性対照 ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、MMC : マイトマイシン C、
4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド、9AA : 9-アミノアクリジン、
2AA : 2-アミノアントラセン、DAN : 1,8-ジヒドロキシアントラキノン、
BP : ベンゾ (a) ピレン

P : 析出

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

4) チャイニーズハムスターの培養細胞を用いた染色体異常試験 (資料 No.T28)

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの継代培養した肺線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を用い代謝活性化および非活性化によって染色体異常誘発性を検定した。検体は 0.5%CMC-Na 水溶液を用いて懸濁した。

なお、非活性化法で得られた結果を確認するために、6000、4500 および 3000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で追加試験を行った。

異常細胞の出現頻度は 5%未満を陰性、5~10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

代謝非活性化条件において、6000 $\mu\text{g/ml}$ で染色体構造異常出現頻度が処理時間 24 時間ではわずかに上昇し、48 時間では陽性判定基準の 10%をわずかに超えた。倍数性細胞の出現頻度の上昇は認められなかった。確認のために行った追加試験においても、6000 $\mu\text{g/ml}$ で構造異常出現頻度が 10%をわずかに超えた。

一方、代謝活性化条件においては、これらの発生頻度に変化は認められなかった。

以上の結果より、検体は本試験条件下において *in vitro* 試験系の CHL/IU 細胞に対し、微弱ではあるが染色体構造異常誘発性を有するものと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

試験の結果

薬剤	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	処理 時間	S-9 mix	染色体異常を有する細胞数						出現 頻度 (%)	倍数 細胞(%)
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth		
溶媒対照 (0.5%CMC-Na)	0	24	-	1	1	0	0	0	0	1.0	0.0
検体	750	24	-	0	3	1	0	0	0	1.5	0.0
	1500	24	-	1	1	0	1	0	0	1.5	1.0
	3000	24	-	0	1	1	0	0	0	1.0	0.5
	6000	24	-	2	3	2	3	0	0	4.0	2.0
溶媒対照 (0.5%CMC-Na)	0	48	-	1	1	0	0	0	0	1.0	0.0
検体	750	48	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.5
	1500	48	-	1	2	0	0	0	0	1.5	0.0
	3000	48	-	2	1	0	0	0	0	1.5	1.0
	6000	48	-	8	10	0	11	1	0	12.5	1.5
陽性対照 (MNNG)	2	48	-	7	27	5	51	4	1	37.0	1.0
溶媒対照 (0.5%CMC-Na)	0	18	+	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0
検体	688	18	+	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
	1375	18	+	2	0	0	0	0	0	1.0	0.5
	2750	18	+	1	1	0	0	0	0	1.0	1.0
	5500	118	+	1	1	0	1	0	0	1.0	0.5
陽性対照 [B(α)P]	30	18	+	8	16	2	72	1	0	39.0	0.0

追加試験の結果

薬剤	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	処理 時間	S-9 mix	染色体異常を有する細胞数						出現 頻度 (%)	倍数 細胞(%)
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth		
溶媒対照 (0.5%CMC-Na)	0	48	-	1	0	0	0	0	0	0.5	0.5
検体	3000	48	-	2	1	0	1	1	0	2.5	0.0
	4500	48	-	1	2	2	1	2	1	3.5	2.0
	6000	48	-	4	6	2	7	3	2	11.0	1.5

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

5) チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 No.T29)

検体純度 :

試験方法 : チャイニーズハムスターの継代培養した卵巣 (CHO) 細胞を用い、代謝活性化系の存在下および非存在下において染色体異常誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解して用いた。S-9mix 非存在下では検体を加えて 20 時間培養した。

S-9mix 存在下では検体を加えて 2 時間培養後、新鮮な培地に交換してさらに 18 時間培養した。いずれも培養終了の約 3 時間前にコルヒチン処理により有糸分裂を停止させ、細胞を回収、固定、ギムザ染色法によりスライドを作製した。

陽性対照には滅菌蒸留水に溶解したマイトマイシン C (0.4 $\mu\text{g/ml}$) およびシクロホスファミド (25 $\mu\text{g/ml}$) を用いた。

処理群、滅菌蒸留水および陽性対照群は各 2 反復、DMSO 群は 4 反復の培養を用いた。

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 : 結果を次頁以降の表に示した。

S-9mix の非存在下において、4 $\mu\text{g/ml}$ で溶媒対照に比し染色体異常の出現頻度にわずかな上昇 (2%) が認められたが、この上昇は、滅菌蒸留水対照群の値 (3%) よりも低く、DMSO に関する背景データ [] の範囲内であった。S-9mix

の存在下において、0.4 $\mu\text{g/ml}$ で溶媒対照に比し染色体異常の出現頻度 (ギャップを含む値) にわずかな上昇が認められたが、高用量投与群では影響が認められなかったことから、いずれの所見も染色体異常誘発性を示すものではないと考えられた。

一方、陽性対照群では染色体異常を有する分裂中期細胞数の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化系を含む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る。

染色体異常試験 (S-9mix 非存在下)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	処理時間	標本作製時間	観察細胞数	染色体異常を有する細胞数										合計		出現頻度(%) ^a		分裂 ^a 指数 (%)		
					IBF	BWF	BF	I	C	SM	R	D	A	GT	CHR	ギャップ ^o 除く	ギャップ ^o 含む	ギャップ ^o 除く		ギャップ ^o 含む	
DMSO	10 ($\mu\text{l/ml}$)	20	20	100													0	0	0.25	0.25	5.35
				100													0	0			
				100													0	0			
				100													1	1			
検体	0.4	20	20	100													2	2	1.5	1.5	4.5
				100													1	1			
				100													0	0			
検体	2	20	20	100													1	1	0.5	0.5	5.55
				100													1	1			
検体	4	20	20	100													1	1	2.0*	2.0*	3.9
				100													1	1			
滅菌蒸留水	10 ($\mu\text{l/ml}$)	20	20	100													5	5	3.0	3.0	
				100													1	1			
MMC	0.4	20	20	100		4		11	1	7		1	24	1	1	22	22	26.5 ***	27.0 ***		
				100		4	2	10		16	3	2	24		5	31	21				

溶媒対照：DMSO：ジメチルスルホキシド

滅菌蒸留水

陽性対照：MMC：マイトマイシンC

Fisher の検定：* p<0.05、***p<0.001

^a：各群の平均値

IBF 断片を伴う同位染色分体切断

BWF 断片を伴う染色分体切断

BF 断片を伴わない染色分体切断

I 交換

C 複雑な再配列

R 環状染色体

D 二動原体染色体

SM 1個の微小断片

A 無動原体断片

GT 10個以上の異常

CHR 染色分体ギャップ

染色体異常試験 (S-9mix 存在下)

薬物	濃度 (μg/ml)	処理時間	標本作製時間	観察細胞数	染色体異常を有する細胞数										合計		出現頻度(%) ^a		分裂 ^a 指数 (%)	
					IBF	BWF	BF	I	C	SM	R	D	A	GT	CHR	ギャップ ^o 除く	ギャップ ^o 含む	ギャップ ^o 除く		ギャップ ^o 含む
DMSO	10 (μl/ml)	2	20	100				2		3					1	5	6	2.0	2.25	3.78
				100			1							1	1					
				100										0	0					
				100		1								2	2					
検体	0.4	2	20	100		1		2				1	3	1	3	7	8	4.5	5.5*	4.25
				100								4	2	2	3					
				100			1					1		4	3	5				
検体	2	2	20	100			1	1							4	3	5	3.0	4.5	2.35
				100		1		1		1				4	3	4				
検体	4	2	20	100												0	0	0.5	0.5	4.35
				100	2									1	1					
滅菌蒸留水	10 (μl/ml)	2	20	100						1			3		1	1	1.0	1.0		
CPA	25	2	20	100	1	1		7		8			26		2	19	21	23.0	24.0	
				100			7	1	11	2		33	2	1	27	27	***	***		

溶媒対照：DMSO：ジメチルスルホキシド

滅菌蒸留水

陽性対照：CPA：シクロホスファミド

Fisher の検定：* p<0.05、***p<0.001

^a：各群の平均値

IBF 断片を伴う同位染色分体切断

BWF 断片を伴う染色分体切断

BF 断片を伴わない染色分体切断

I 交換

C 複雑な再配列

R 環状染色体

D 二動原体染色体

SM 1個の微小断片

A 無動原体断片

GT 10個以上の異常

CHR 染色分体ギャップ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

6) マウスを用いた小核試験

(資料 No.T30)

検体純度：

供試動物：Charles River CD-1 系マウス、4 週齢、体重；20～27 g、
一群雄 5 匹（溶媒対照群は 10 匹）

試験方法：検体を 0.5%トラガカントガム水溶液に懸濁し、800、1600 および 3200 mg/kg の投与用量を 24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。なお、陽性対照群には生理食塩水に溶解したシクロホスファミドを投与した。

2 回目投与の 6 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髄を採取してスライドグラス上にメタノールで固定後、修正メチレンブルー法で染色し骨髄標本を作製した。

各標本について、1000 個の多染性赤血球を鑑別するのに十分な数の細胞を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。同時に正染性赤血球数についても記録し、多染性/正染性比を算出した。

用量設定根拠：

結 果：骨髄標本の観察結果を次頁の表に示した。

いずれの濃度においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な上昇は認められなかった。

陽性対照のシクロホスファミドでは、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な上昇が認められた。

以上の結果より本試験条件下において、検体は骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

観察結果

数値は平均値 (SD)

薬物	投与量 (mg/kg)	観察動物数	NCE 数	PCE 数	小核を有する NCE	小核を有する PCE	小核を有する PCE の割合 (%)	PCE/NEC 比 1 :
陰性対照	-	10	1320(281)	999(1)	0(1)	1(1)	0.11(0.10)	1.32(0.28)
検体	800	5	1318(352)	1000(0)	0(0)	0(0)	0.02(0.04)	1.32(0.35)
	1600	5	1709(433)	1000(0)	0(1)	0(0)	0.02(0.04)	1.71(0.44)
	3200	5	1473(410)	999(1)	0(0)	1(1)	0.06(0.09)	1.47(0.41)
陽性対照	50	5	997*(296)	993*(3)	0(0)	7*(3)	0.66*(0.26)	1.01*(0.30)

Mann Whitney U 検定 : * : p<0.05

陰性対照 : 0.5%トラガカントゴム水溶液

陽性対照 : シクロホスファミド

NCE : 正染性赤血球、 PCE : 多染性赤血球

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

7) マウスを用いた小核試験

(資料 No.T31)

検体純度：

供試動物：CD-1 異系交配マウス、約 35 日齢、体重 22～24 g、
一群雌雄各 15 匹（陽性対照群は 5 匹）

試験方法：検体を 0.5%CMC-Na 溶液 w/v に懸濁し、8000 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与した。
なお、陽性対照群にはマイトマイシン C (8 mg/kg) を、溶媒対照群には 0.5%CMC-Na 溶液を投与した。投与 24、48 および 72 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髄を採取してスライドガラス上に塗沫・風乾させ、メタノールで固定後ギムザ染色し骨髄標本を作成した。各標本について、細胞毒性を調べるために 1000 個の赤血球を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した後、引き続き 1000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。

用量設定根拠：

試験結果：下表に示す。

採取時間 (時間)	薬物	多染性赤血球数/ 正染性赤血球の比 p/n(平均)	赤血球 1000 個当たりの	
			小核を有する 多染性赤血球(平均)	小核を有する 正染性赤血球(合計)
24	溶媒対照	0.684	0.8	0.3
	検体	0.708	0.5	0.2
	マイトマイシン C	0.44**	39.9***	0.8
48	溶媒対照	0.792	0.9	0
	検体	0.759	0.8	0.2
72	溶媒対照	0.879	0.4	0
	検体	0.813	0.4	0

Wilcoxon の順位和検定 ** : P<0.01 *** : P<0.001

以上の結果から、本試験条件下において検体は骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

8) 酵母を用いた遺伝子転換および有糸分裂組換えの誘導

(資料 No.T32)

検体純度：

試験方法：酵母 *Saccharomyces cerevisiae* D7 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素 (S-9mix) の非存在下および存在下において検体の遺伝子転換並びに有糸分裂組換えの誘導能を検討した。

検体はジメチルホルムアミド (DMF) 溶解後、エタノールを用いて希釈し、12.5、25、50、100 および 200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度として以下の2つの試験に用いた。

D7 株を完全培地に懸濁し、検体、S-9mix あるいはリン酸緩衝液 (S-9mix 非存在下) を添加して 28 $^{\circ}\text{C}$ 、18 時間インキュベートした。5%チオ硫酸ナトリウム水溶液を添加することにより細胞の増殖を停止し、約 1×10^7 細胞/ml になるように細胞数を調整した。遺伝子転換に関する試験では、上記の培養液をアデニン含有 L-トリプトファン欠乏合成選択培地に添加し 28 $^{\circ}\text{C}$ 、6 日間インキュベート後、遺伝子転換により生じた L-トリプトファン非要求株のコロニー数を計数した。

一方、有糸分裂組換えに関する試験では、培養液を 0.05M リン酸緩衝液で希釈後 (約 1×10^3 細胞/ml)、完全合成培地に添加し、28 $^{\circ}\text{C}$ 、6 日間インキュベートした。1 濃度あたり 100 枚の培地を用いて有糸分裂組換えにより生じたコロニーを色調により分類計数した。

溶媒対照として DMF およびエタノールを用いた。陽性対照として遺伝子転換に関する試験および有糸分裂組換えに関する試験の S-9mix 非存在下では EMS (エチルメタンサルフォネート) を用い、有糸分裂組換えに関する試験の S-9mix 存在下ではシクロホスファミドを用いた。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁以降の表に示す。

酵母に対する遺伝子転換および有糸分裂組換え試験において、検体は S-9mix 非存在下および存在下で、溶媒として用いた DMF に対する溶解限界によって決定した 200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においても溶媒対照との間に有意差は認められなかった。一方、陽性対照においては、転換および組換えが高頻度に認められた。

以上の結果より、検体は酵母に対して S-9mix 非存在下および存在下のいずれにおいても、遺伝子転換および有糸分裂組換え誘導性を有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アダマ・ジャパン株式会社にある。

遺伝子転換

処理時間	薬剤	濃度	S-9mix 非存在下			S-9mix 存在下		
			遺伝子転換したコロニー数 (コロニー数/ml)	生存数 ^{a)} (細胞/ml)	遺伝子転換頻度 ^{b)}	遺伝子転換したコロニー数 (コロニー数/ml)	生存数 ^{a)} (細胞/ml)	遺伝子転換頻度 ^{b)}
2.5 時間	溶媒対照 (イタノール)	50μl/ml	260	6.0×10^6	4.3×10^{-5}	12	2.8×10^5	4.3×10^{-5}
	陽性対照 (EMS)	20μl/ml	3422	5.0×10^6	67.1×10^{-5}	171	1.6×10^6	106.6×10^{-5}
18 時間	溶媒対照 イタノール : DMF 9 : 1	50μl/ml	305	1.2×10^7	2.5×10^{-5}	97	3.7×10^7	2.6×10^{-5}
	検体	12.5μg/ml	321	8.9×10^6	3.6×10^{-5}	149	4.2×10^6	3.5×10^{-5}
		25.0μg/ml	305	8.0×10^6	3.8×10^{-5}	127	4.0×10^6	3.2×10^{-5}
		50.0μg/ml	323	7.0×10^6	4.6×10^{-5}	141	5.3×10^6	2.7×10^{-5}
		100μg/ml	289	8.7×10^6	3.3×10^{-5}	119	4.3×10^6	2.8×10^{-5}
	200μg/ml ^{c)}	357	8.6×10^6	4.2×10^{-5}	156	6.1×10^6	2.6×10^{-5}	

a) : 完全培地で薬剤添加後 2.5 および 18 時間インキュベートした時の生存細胞数

b) : 遺伝子転換頻度 = $\frac{\text{遺伝子転換したコロニー数}}{\text{生存数}}$

c) : 沈澱成分

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

有糸分裂組換え

S-9mix の有無	処理 時間	薬剤	濃度 ($\mu\text{l/ml}$)	コロニー総数 (培地数)	生存数 ^{a)} (細胞数 /ml)	異常コロニー生存率 ^{b)}					
						ピンク-赤	ピンク- 白赤	その他 の色調	有糸 組換え 頻度 ^{c)}	異常 コロニーの 総頻度 ^{d)}	
S-9mix 非存在下	2.5 時間	溶媒対照 (イタール)	50 ($\mu\text{l/ml}$)	797 (10)	6.0×10^7	-	-	-	-	-	
		陽性対照 (EMS)	20	9846 (97)	5.1×10^7	64.0	27.4	210.2	91.4	301.6	
	18 時間	溶媒対照 イタール : DMF 9 : 1	50 ($\mu\text{l/ml}$)	15783 (100)	1.2×10^7	0	0.6	3.1	0.6	3.8	
		検体	12.5	11822 (100)	8.9×10^7	0	0	2.5	0	2.5	
			25	12810 (100)	8.0×10^7	0	0.8	3.1	0.8	3.9	
			50	10303 (100)	7.0×10^7	0	0	5.9	0	5.8	
			100	13930 (100)	8.7×10^7	0	0.7	5.0	0.7	5.7	
	200 ^{e)}		11406 (100)	8.6×10^7	0	0	6.2	0	6.1		
	S-9mix 存在下	18 時間	陽性対照 イタール : DMF 9 : 1	50 ($\mu\text{l/ml}$)	9385 (100)	3.7×10^7	1.0	0	10.2	1.0	11.2
			陽性対照 (シホスファミド)	20	9589 (100)	4.8×10^7	4.2	3.1	18.8	7.3	26.1
検体			12.5	11271 (100)	4.2×10^7	0	0	8.0	0	8.0	
			25.0	9589 (100)	4.0×10^7	0	0.9	9.3	0.9	10.2	
			50	11271 (100)	5.3×10^7	0	0	10.1	0	10.1	
			100	11414 (100)	4.3×10^7	0.9	0	1.8	0.9	2.6	
			200 ^{e)}	12148 (100)	6.1×10^7	0.8	0	6.6	0.8	7.4	

a) : 完全培養で薬剤添加後 2.5 および 18 時間インキュベートした時の生存細胞数

b) : 異常コロニー生存率 = $\frac{\text{各々の異常コロニー数}}{\text{コロニー総数}}$ (10⁴ 個生存あたりで表示)

c) : 有糸分裂組換え頻度 = $\frac{\text{ピンク-赤+ピンク-赤-白のコロニー数}}{\text{コロニー総数}}$ (10⁴ 個生存あたりで表示)

d) : 異常コロニーの総頻度 = $\frac{\text{すべての異常コロニー数}}{\text{コロニー総数}}$ (10⁴ 個生存あたりで表示)

e) : 沈澱生成

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

9)細菌を用いたDNA修復試験

(資料No.T33)

検体純度：

試験方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換え修復機構保持株 (H17) および欠損菌株 (M45) を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下および非存在下で DNA 損傷の誘発性を検定した。

検体は DMSO を用いて懸濁した。S-9mix の非存在下の場合には、156、313、625、1250 および 2500 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ とし、S-9mix の存在下の場合には、上記濃度の各々 1/2 とした。なお、S-9mix 非存在下の場合には、溶媒対照として DMSO、陰性対照としてカナマイシンおよび陽性対照としてマイトマイシン C を用い、S-9mix 存在下の場合には、陽性対照として 3-アミノ-1-メチル-5H-ピリド-[4,3-d] インドール (Trp-P-1) を用いた。

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アダマ・ジャパン株式会社にある。

試験結果：結果は次の通りであった。

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	S-9mix	阻止帯の径(mm)		差(mm)
			M45(Rec-)	H17(Rec+)	(M45-H17)
溶媒対照 (DMSO)	0	-	0.0	0.0	0.0
検体	156	-	0.0	0.0	0.0
	313	-	0.0	0.0	0.0
	625	-	0.0	0.0	0.0
	1250	-	0.0	0.0	0.0
	2500	-	0.0	0.0	0.0
陰性対照 (カマイシン)	0.3	-	5.8	6.0	<0.0
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.02	-	8.2	0.0	8.2
溶媒対照 (DMSO)	0	+	0.0	0.0	0.0
検体	78.1	+	0.0	0.0	0.0
	156	+	0.0	0.0	0.0
	313	+	0.0	0.0	0.0
	625	+	0.0	0.0	0.0
	1250	+	0.0	0.0	0.0
陽性対照 (Trp-P-1)	20	+	11.2	2.3	8.8

数値は2連の平均値

検体では最高濃度においてS-9mix非存在下および存在下のいずれにおいても阻止帯の径の差は認められなかった。各陽性対照群においては、いずれも著しい差が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下で、DNA損傷を誘発しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

10) TK^{+/+}マウスリンパ腫細胞を用いた変異原性試験

(資料 No.T34)

検体純度：

試験方法：チミジンキナーゼ遺伝子座位がヘテロ結合である L5178Y マウスリンパ腫細胞 (TK^{+/+}細胞) を、検体を含む液体培地に浮遊させ、肝薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下および非存在下で、4 時間インキュベートした。なお、検体はアセトンに最高濃度 128 μg/ml となるように溶解し液体培地に添加した。その後、検体を含まない培地に交換し、3 日間インキュベートした。なお、溶媒対照にはアセトン、陽性対照にはエチルメタンスルフォネート (EMS、S-9mi 非存在下) あるいはジメチルベンズアセトラセン (DMBA、S-9mix 存在下) を用いた。

その後、各培地の細胞数を調整し、その一定量にトリフルオロチミジン (TFT) を加えて TK^{+/+}細胞を死滅させ、寒天培地に播種した。2~3 週間インキュベート後、寒天プレート上に形成した TK^{+/+}細胞のコロニー数を計数することにより、TK 座位における変異頻度を検討した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を下表に示す。

(表中の数値は 2 反復の平均値)

薬剤		濃度 (μg/ml)	S-9mix	TK ^{+/+} 細胞コロニー数 (個/10 ⁵ 細胞)	濃度 (μg/ml)	S-9mix	TK ^{+/+} 細胞コロニー数 (個/10 ⁵ 細胞)
溶媒対照 (アセトン)		0	-	6.6	0	+	6.6
検体		15	-	8.3	2	+	7.4
		30	-	7.6	10	+	7.6
		70	-	7.2	30	+	8.3
		100	-	10.5	80	+	10.4
		128	-	11.1	128	+	10.6
陽性対照	(EMS)	300	-	45.2	300	+	26.2
	(DMBA)	5	-	8.5	5	+	40.6

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

100 µg/ml 以上の濃度において、S-9mix 非存在下および存在下のいずれの場合も、TK⁺細胞のコロニー数がやや増加する傾向を示した。しかし溶媒として用いたアセトンに対する溶解限界によって決定した最高用量である 128 µg/ml においても、バックグラウンドデータの範囲内（4.4～15.3 個/10⁵細胞）の値であり、生物学的有意性はないと判断された。

一方、陽性対照として用いた EMS および DMBA では、TK⁺細胞のコロニー数の増加が認められ変異原性が確認された。

以上の結果より、検体はマウスリンパ腫細胞の TK 座位に対して変異誘発性を有さ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アダマ・ジャパン株式会社にある。

11) ラットを用いた優性致死試験

(資料 No.T35)

検体純度：

試験動物：SD 系ラット、一群雄 30 匹、雌 60 匹

供試期間：104 日間

試験方法：検体を 0、4、40 および 400 ppm の濃度で飼料に直接混合し、雄に 104 日間摂取させた。

対照群および雌には基礎飼料を与えた。投与 74 日後に、雄 1 匹に対し雌 2 匹を同居・交配させた。妊娠 15 日目に屠殺して卵巣および子宮内容を検査した。

試験項目：

雄；一般状態および精子は毎日 1 回観察し、体重・摂餌量は毎週 1 回測定した。投与終了時には眼底血管から採血し、血漿を用いて、総コレステロールおよびトリグリセリドを測定した。また、剖検後肝臓重量を測定した。

雌；剖検後、卵巣および子宮を摘出し、妊娠数、黄体数、着床数、胎児数を調べた。

次式によって以下の項目を算出した。

$$\text{妊孕率} = \text{妊孕数} / \text{交尾雄数} \times 100$$

$$\text{妊娠率} = \text{妊娠数} / \text{交尾雌数} \times 100$$

$$\text{着床前死亡率} = (\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数} \times 100$$

$$\text{着床後死亡率} = (\text{着床数} - \text{生存胎児数}) / \text{着床数} \times 100$$

試験結果：下表の通りであった。

投与量(ppm)		0	4	40	400	
雄	交尾数(%)	29(97)	30(100)	30(100)	30(100)	
	妊孕数(%)	29(100)	30(100)	30(100)	30(100)	
	体重増加量(%)	273	280	280	272	
	摂餌量(g/ラット/週)	174	178	177	174	
	検体摂取量(mg/kg/day)	0	0.28	2.81	27.8	
雌	交尾数(%)	52(87)	56(93)	59(98)	59(98)	
	妊娠数(%)	49(94)	52(93)	57(97)	55(93)	
	着床所見 (1 親動物 当り)	黄体数	14.6	14.5	15.7	15.2
		着床数	12.8	12.8	14.6*	13.6
		着床前死亡率(%)	13	12	7	11
		前期	8.6	9.5	8.1	6.4
		後期	0.6	1.8	0.4	0.5
生存胎児数	11.4	11.4	13.3*	12.6		

Mann Whitney U 検定 カイ 2 乗検定 * : P<0.05

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

雄；妊娠率はいずれの投与群においても100%であった。また死亡、一般状態、体重増加量、摂餌量および剖検所見に検体投与による影響は認められなかった。一方、総コレステロールおよび肝重量は、400 ppm 投与群で対照群に比較して有意に増加した。

雌；妊娠率、黄体数および着床数に関しては、40ppm 投与群の着床数が有意に増加したのを除いて各群ともほぼ同等の値であった。さらに着床前死亡数、着床後死亡数および生存胎児数についても対照群と投与群の間に差異は認められなかった。

以上の結果より、検体を雄に飼料混入投与することにより、400 ppm 投与群で総コレステロールおよび肝重量の増加が認められたが、雌の着床所見に対しては、影響が認められず、検体には優性致死作用がないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

(9) 生体の機能に及ぼす影響

クロフェンテジンにおける薬理試験

(資料 No.T36)

検体純度：

1. 中枢神経系に及ぼす影響

供試動物：ddY 系マウス、雄、体重 23.0~27.0g、各群 10 匹

Wistar 系ラット、雄、体重 113~138g、各群 10 匹

試験方法：検体を 0.5%CMC-Na 水溶液で懸濁調製し、強制経口投与した。投与 3 時間後までは継続して、その後は 24 時間目に観察した。投与量は 100、300 および 1000 mg/kg を両動物に投与した。

試験結果：マウスの 1000 mg/kg 投与群 (1/10 例) に投与後 90~120 分でやや腹臥歩行が認められた。これ以外に中枢神経系、自律神経系、体性神経系に対する異常および中毒症状を示唆する徴候は認められなかった。ラットの場合には全動物で異常は全く認められなかった。

2. 呼吸、循環器系に及ぼす作用

供試動物：ネコ、雄、体重 2.40~3.65 kg、各群 3 匹

試験方法：検体を 0.5%CMC-Na 水溶液で懸濁調製し、100、300 および 1000 mg/kg を測定前に強制経口投与した。麻酔下で背位に固定し、気管および右大腿動脈にカニューレを挿入した。呼吸はサーミスター型呼吸ピックアップを用い、血圧は標準型圧カトランスデューサーおよび歪圧力アンプを用い、心電図は第Ⅱ誘導法で心電図アンプを介してインク書きオシログラフに同時記録した。測定は投与前から投与 3 時間後まで実施した。

試験結果：100、300 および 1000 mg/kg の投与量では、呼吸、血圧、心拍数および心電図に善明な変化は認められなかった。

3. 自律神経系に対する作用

(1) 自発運動に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ、雄、体重 2.14~2.30 kg、各群 3 匹

試験方法：検体を 0.5%CMC-Na 水溶液で懸濁調製し、最高最終濃度を 1×10^{-7} g/ml とした (これ以上の濃度では検体が析出する)。脱血屠殺後回腸を摘出し、空気を通じた Tyrode 液 (液温 37℃) 中に懸垂し、アイソトニックトランスデューサーを介し、筋の収縮を検体添加後 10 分間インク書きオシログラフに記録した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

試験結果：検体 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} および 1×10^{-7} g/ml で自発運動に対する作用は認められなかった。

(2) 各アゴニストに対する作用

供試動物：Hartley 系モルモット、雄、体重 300~430 g、各群 5 匹

試験方法：検体を 0.5%CMC-Na 水溶液で懸濁調製し、最高最終濃度を 1×10^{-7} g/ml とした（これ以上の濃度では検体が析出する）。脱血屠殺後回腸を摘出し、空気を通じた Tyrode 液（液温 32℃）中に懸垂し、アイソトニックトランスデューサーを介して筋の収縮をインク書きオシログラフに記録した。測定は 0.5%CMC-Na 水溶液を添加 3 分後に各アゴニスト（アセチルコリン 1×10^{-6} g/ml、ヒスタミン 1×10^{-6} g/ml、 BaCl_2 1×10^{-4} g/ml）を添加した際の筋収縮を対照とし、検体処理 3 分後にアゴニストを添加し収縮度を測定し比較した。

試験結果：回腸の収縮度変化を下表に示す。アセチルコリンの収縮に対し、溶媒（最終濃度 2.5×10^{-3} g/ml）添加すると 1/5 例に 13%の収縮高の亢進傾向が認められた。検体添加濃度 1×10^{-9} および 1×10^{-8} g/ml で 2/5 例に 13%、 1×10^{-7} g/ml で 3/5 例に 12~20%の収縮高の亢進傾向が認められたが、有意な作用ではなかった。ヒスタミンおよび BaCl_2 収縮に対しては検体 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} および 1×10^{-7} g/ml で作用は認められなかった。

	濃度(g/ml)	動物数	回腸の収縮度変化(%)		
			Ach	His	BaCl_2
対照群		5	104	102	98
検体投与群	1×10^{-9}	5	107	102	101
	1×10^{-8}	5	107	103	100
	1×10^{-7}	5	108	103	99

4. 消化器に対する作用（炭末輸送能）

供試動物：ddY 系マウス、雄、体重 23.0~25.7 g、各群 10 匹

試験方法：検体を 100、300 および 1000 mg/kg を各々経口投与 1 時間後に炭末（10%アラビアゴム および 5%炭末の懸濁）0.111/匹の量で経口投与し、炭末投与 30 分後に各動物を頸椎脱臼にて屠殺、開腹し、小腸全長に対する炭末推進部の移行率を測定した。

試験結果：検体の 100、300 および 1000 mg/kg の投与量では、炭末輸送能に対する作用は認められなかった。

5. 骨格筋に対する作用（横隔膜神経筋標本）

供試動物：Wistar 系ラット、雄、体重 220~240 g、各群 5 匹

試験方法：Blubring の方法に従い、横隔膜神経筋標本を作製し標本を 95% O_2 +5% CO_2 のガスを通じた Krebs-Ringer-bicarbonate 液（液温 37℃）中に懸濁し、神経刺激には電子管刺激装置を用いて 0.2Hz、1msec、5V の刺激を与え、筋収縮を FD-ピックアップおよび歪圧アンプを介してインク書きオシログラフに記録した。測定は添加前より検体を 10

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

分間隔で溶媒から順に累積的に添加して行った。

試験結果：検体の 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} および 1×10^{-7} g/ml では筋収縮に対する作用は認められなかった。

6. 血液に及ぼす作用

(1) 出血時間に及ぼす作用

試験動物：ddY系マウス、雄、体重 22.5~25.8 g、各群 10 匹

試験方法：検体 100、300 および 1000 mg/kg を強制経口投与 1 時間後に試験動物を固定し、無麻酔下で尾の先端から約 3cm の部位の右側静脈に皮下針を一定の深さに刺入し、5 秒間隔で濾紙を傷口にあて、血液が濾紙に付着しなくなるまでの時間を出血時間とした。

試験結果：検体 100、300 および 1000 mg/kg では、出血時間に及ぼす影響は認められなかった。

(2) 血液凝固

試験動物：Wistar系ラット、雄、体重 118~134 g、各群 6 匹

試験方法：検体 100、300 および 1000 mg/kg を強制経口投与し、1 時間後にエーテル麻酔下で腹部大静脈より採血し、クエン酸加血漿を作成した。これを用いて、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をフィプロメーターで測定した。

試験結果：検体 100、300 および 1000 mg/kg では、血液凝固時間に影響を及ぼさなかった。

(3) 溶血試験

試験動物：日本白色種ウサギ、雄、体重 2.45~2.60 kg、各群 3 匹

試験方法：耳介静脈より採血し、クエン酸加血漿とした後、2%赤血球浮遊液を調製した。検体の溶液 5 ml (濃度 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} g/ml) に 2%赤血球浮遊液 0.25 ml を加えた後、37℃で 2 時間インキュベートした。20℃で 5 分間遠沈 (600 g) 後、上清を採取し、540 nm における吸光度を測定した。

試験結果：検体 1×10^{-9} ~ 1×10^{-7} g/ml では、溶血は認められなかった。以上、各種生体の機能に及ぼす影響を検討したが、クロフェンテジンには特記すべき薬理作用はないものと判断された。

クロフェンテジンの「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 一般症状	ラット マウス	経口 (0.5%CMC- Na 水溶液)	100、300、 1000	ラット： 雄 10 マウス： 雄 10	マウス： 1000	ラット： 1000 マウス： 300	マウス： 300 mg/kg； 影響なし 1000 mg/kg；マウ ス(1/10 例)に投与 後 90～120 分でや や腹臥歩行が認め られた ラット：全動物で 異常なし
呼吸・循環器系 呼吸数・血圧・ 心拍数・心電 図・	ネコ (麻醉下)	経口 (0.5%CMC- Na 水溶液)	100、300、 1000	雄 3	—	1000	影響なし
自律神経系 (自発運動に対 する作用)	ウサギ	(0.5%CMC- Na 水溶液)	1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 1×10^{-7} g/ml)	雄 3	—	1×10^{-7}	影響なし
(各アゴニスト に対する作用)	モルモット	(0.5%CMC- Na 水溶液)	検体： 1×10^{-9} 1×10^{-8} 1×10^{-7} Ach： 1×10^{-6} His： 1×10^{-6} BaCl ₂ ： 1×10^{-4} (g/ml)	雄 5	Ach： 1×10^{-9} (g/ml)	His： 1×10^{-7} BaCl ₂ ： 1×10^{-7} (g/ml)	抗 Ach 作用：全群 で収縮高の亢進傾 向が認められたが 有意ではない 抗 His 作用：作用 なし 抗 BaCl ₂ 作用：作 用なし
消化器系 腸管輸送能	マウス	経口 (炭末)	100、300、 1000	雄 10	—	1000	100 mg/kg： 影響なし 300 mg/kg： 影響なし 1000 mg/kg： 影響なし
骨格筋 横隔膜神経筋	ラット	(0.5%CMC- Na 水溶液)	1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 1×10^{-7} (g/ml)	雄 5	—	1×10^{-7} (g/ml)	1×10^{-9} ：影響なし 1×10^{-8} ：影響なし 1×10^{-7} ：影響なし
血液 出血時間	マウス (無麻醉下)	経口 (0.5%CMC- Na 水溶液)	100、300、 1000	雄 10	—	1000	100 mg/kg： 影響なし 300 mg/kg： 影響なし 1000 mg/kg： 影響なし
血液凝固	ラット (麻醉下)	経口 (0.5%CMC- Na 水溶液)	100、300、 1000	雄 6	—	1000	100 mg/kg： 影響なし 300 mg/kg： 影響なし 1000 mg/kg： 影響なし
溶血試験	ウサギ	(0.5%CMC- Na 水溶液)	1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 1×10^{-7} (g/ml)	雄 3	—	1×10^{-7} (g/ml)	1×10^{-9} ：影響なし 1×10^{-8} ：影響なし 1×10^{-7} ：影響なし

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

(10) その他

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

--	--

--	--

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

3)

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

5)

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

6)

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

2. 原体中混在物および代謝物

1) の細菌を用いた復帰変異性試験 (資料 No.T43)

検体純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ (*Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA1538, TA98 および TA100) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、10、33、100、333、1000 および 3300 µg/プレート の濃度で試験を実施した。

試験結果 :

薬剤	濃度 (µg/プレート)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			TA1535	TA1537	TA1538	TA98	TA100	
溶媒対照(DMSO)	-	-	11	14	12	26	107	
	10	-	12	10	11	23	111	
	33	-	10	13	12	24	106	
	100	-	11	13	10	21	113	
	333	-	12	10	14	30	122	
	1000	-	11	15	11	23	122	
	3300	-	16	11	10	24	104	
対陽性	7% 化ナトリウム	1.0	-	267				384
	9-アミノアクリジン	20	-		725			
	2-ニトロフルオレン	1.0	-			253	181	
溶媒対照(DMSO)	-	+	12	13	23	29	109	
	10	+	8	14	19	28	101	
	33	+	10	15	18	23	127	
	100	+	9	11	20	23	124	
	333	+	10	13	19	26	130	
	1000	+	12	9	13	28	132	
	3300	+	15	12	14	22	131	
陽性対照(2-アミノアントラセン)	0.5	+	37	36	134	206	382	

代謝物および不純物の一つである の復帰変異性を検討した結果、S-9mix の有無にかかわらず各濃度で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、陽性対照に用いた各薬剤では復帰変異コロニー数の著大な増加が認められ、復帰変異誘発性を示した。

以上の結果、 は本試験条件下において復帰変異誘発性を示さなかった。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

2) に関する復帰変異性試験

(資料 No.T44)

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ (*Salmonella typhimurium* TA1535, TA98 および TA100) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて復帰変異性を検定した。
 検体は DMSO に溶解し、10、25、50、100 および 250 µg/プレートの濃度で実施した。

試験結果：結果を下表に示す。

薬剤	濃度 (µg/プレート)	S-9mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート		
			TA1535	TA98	TA100
溶媒対照(DMSO)	-	-	17	25	108
	10	-	12	20	99
	25	-	13	34	112
	50	-	11	24	102
	100	-	11	22	106
	250	-	8	10	102
溶媒対照(DMSO)	-	+	21	35	143
	10	+	22	37	125
	25	+	23	33	140
	50	+	17	45	144
	100	+	16	37	158
	250	+	6	28	123

はいずれの濃度においても、また S-9mix の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数を増加させなかった。

以上の結果より、 は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有さ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アダマ・ジャパン株式会社にある。

3) および の細菌を用いた復帰変異性試験
(資料 No.T45)

検体純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ (*Salmonella typhimurium* TA98) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下で Ames らの方法を用いて準じて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、 の場合には 400 および 2000 µg/プレート、
また の場合には 2000 µg/プレートの濃度で試験を実施した。
なお、結果は溶媒対照 (DMSO) 群の変異コロニー出現頻度に対する相対頻度で変異原性を表わした。

試験結果 :

薬剤	濃度 (µg/プレート)	復帰変異コロニー数/プレート
		TA98
溶媒対照(DMSO)	-	1.0
	400	0.9
	2000	0.6
	2000	1.4

および はいずれの濃度においても相対変異原性値の有意な上昇は認められなかった。

以上の結果、 および は本試験条件下で復帰変異誘発性を有さ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アダマ・ジャパン株式会社にある。

4)

の細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 No.T46)

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ (*Salmonella typhimurium* TA1535、1537、1538、98 および 100) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はエタノールに溶解して、15、50、150、500 および 1500 µg/プレート の用量で実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を下表に示す。

薬剤	濃度 (µg/プレート)	S-9mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			TA1535	TA1537	TA1538	TA98	TA100
溶媒対照(エタノール)	-	-	12	11	9	31	82
	15	-	8	13	8	32	79
	50	-	8	11	9	34	84
	150	-	14	9	10	28	92
	500	-	8	13	8	25	67
	1500	-	3	2	*	9	31
溶媒対照(エタノール)	-	+	13	10	8	19	83
	15	+	11	11	6	17	80
	50	+	12	12	9	15	82
	150	+	11	9	8	17	78
	500	+	9	6	7	12	64
	1500	+	9	3	3	8	48

*：抗菌性（毒性）認められたため、測定不能

検体は、S-9mix の有無にかかわらず、各濃度においていずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

したがって、

は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有さ

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アダマ・ジャパン株式会社にある。

3. 製剤

1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No.T47)

検体純度：50%水和剤

供試動物：SD系ラット、雄8週齢、雌6週齢、平均体重：雄227g 雌202g、一群雌雄各6匹

観察期間：14日間

試験方法：検体を希釈せずに経口投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を14日間観察した。試験終了後、全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

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

死亡および投与に関連した中毒症状は認められなかった。

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アダマ・ジャパン株式会社にある。

2) マウスにおける急性経口毒性試験

(資料 No.T48)

検体純度：50% クロフェンテジン水和剤

供試動物：ddY 系マウス、5 週齢、平均体重：雄 22.4 g 雌 20.0 g、一群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

試験方法：検体を希釈せずに経口投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。また、試験終了後、全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	0、5950
LD ₅₀ (mg/kg)	雄>5950 雌>5950
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	症状なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	5950

中毒症状としては、雌雄ともに投与 6 時間後から淡紅色の糞便が認められた。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アダマ・ジャパン株式会社にある。

3) ウサギにおける製剤の急性経皮毒性試験

(資料 No.T49)

検体純度：50% クロフェンテジン フロアブル製剤

供試動物：ニュージーランド・ホワイトウサギ、平均体重：雄 2.66 g 雌 2.60 g、一群雌雄各 5 匹
(対照群は雌雄各 3 匹)

観察期間：14 日間

投与方法：検体を希釈せずに 2400 mg/kg (2 ml/kg) の量をガーゼに塗布し、脱毛後、擦過した皮膚 (体表面積の 10%) に 24 時間貼付した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間観察した。試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。投与部位の皮膚については病理組織学的検査を実施した。

試験結果：

投与方法	経皮
投与量(mg/kg)	0、 2400
LD ₅₀ (mg/kg)	雄>2400 雌>2400
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	症状なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	2400

死亡および中毒症状は認められなかった。

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アダマ・ジャパン株式会社にある。

4) ラットにおける急性吸入毒性試験

(資料 No.T50)

検体純度：80%水和剤

供試動物：SD系ラット、約8~9週齢、平均体重：雄269g 雌212g、一群雌雄各5匹

観察期間：14日間

暴露方法：試験動物を鼻部暴露型チャンバーに固定し、6時間暴露した。暴露後、中毒症状および死亡について14日間観察した。なお、対照群には検体を含まない空気を24時間暴露した。

暴露条件：

通気量(1/分)	28.4~31.5
温度(℃)	18~19
湿度(%)	22~51

観察・検査項目：毎日体重を測定した。試験終了後、生存動物はすべて屠殺後剖検し、肝臓、腎臓および肺（気管を含む）の重量を測定した。また、肺、気管、喉頭、鼻腔、肝臓および腎臓は常法に従って標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

試験結果：

投与方法	吸入
設定暴露濃度(mg/l)	0、11、35
分析暴露濃度(mg/l)	0、1.89
空気力学的平均粒径(μm)	2.7
LC ₅₀ (mg/L)	雄>1.89 雌>1.89
症状発現および消失時間	暴露後6時間から発現 暴露後24時間に消失
死亡例の認められなかった 最高暴露濃度(mg/l)	1.89

中毒症状としては雌雄とも体表冷感および眼球蒼白が認められたが、翌日には回復し

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

た。顔面、耳および前肢に着色が認められた。全動物に死亡は認められなかった。対照群および処理群における体重増加に有意差は認められず、暴露に関連すると思われる剖検所見、臓器重量および病理組織学的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アダマ・ジャパン株式会社にある。

5) ウサギを用いた製剤の皮膚刺激性試験

(資料 No.T51)

検体純度：クロフェンテジン 50%水和剤

供試動物：ニュージーランド・ホワイトウサギ、体重 2.5～3.0 kg、雌雄各 3 匹

観察期間：48 時間

投与方法：検体を希釈せずに、剃毛した動物の背中の皮膚（2.5 cm×2.5 cm）の擦過部位および非擦過部位に適用した。24 時間暴露後、皮膚に残った検体は湿したティッシュペーパーを用いて除去した。

観察項目：検体除去直後および 48 時間後に塗布部位の刺激性変化（紅斑、痂皮、浮腫）の有無等を観察し EPA の方法に従って採点した。

試験結果：観察した刺激性変化は次頁の表のとおりである。

検体除去直後では、塗布部位が検体により鮮紅色に着色しており、紅斑についての評価は不可能であった。また浮腫については触診で評価した。1 例のウサギの検体塗布部位（擦過および非擦過部位）に軽度な浮腫が、また陽性対照塗布部位では、全例に軽度ないし中等度の紅斑および浮腫が認められた。48 時間においても検体による着色が認められ、紅斑の評価はできなかった。検体塗布部位に浮腫は認められなかったが、陽性対照塗布部位では、皮膚刺激反応が継続していた。

以上の結果からクロフェンテジン 50%水和剤はウサギの皮膚に対し、軽微な刺激性を有すると思われる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

(採点はEPAの方法によった)

	動物 番号	項目	最高 評点	暴露時間		
				除去直後	48時間	
非擦過	1	紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0	0	
	2	紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0	0	
	3	紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	1	0	
	4	紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0	0	
	5	紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0	0	
	6	紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0	0	
	合計	紅斑・痂皮*	24	0	0	
		浮腫	48	1	0	
	平均	紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0.17	0	
	擦過	1	紅斑・痂皮*	4	0	0
			浮腫	8	0	0
2		紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0	0	
3		紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	1	0	
4		紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0	0	
5		紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0	0	
6		紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0	0	
合計		紅斑・痂皮*	24	0	0	
		浮腫	48	1	0	
平均		紅斑・痂皮*	4	0	0	
		浮腫	8	0.17	0	

*: 皮膚が鮮紅色に着色しているため、判定は不可能であった。

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

6) ウサギを用いた製剤の眼刺激性試験

(資料 No.T52)

検体純度：50%クロフェンテジン水和剤

供試動物：ニュージーランド・ホワイトウサギ、体重 2.5～3.0 kg、洗眼群 3 匹（雄 2 匹、雌 1 匹）、
非洗眼群 6 匹（雄 4 匹、雌 2 匹）

観察期間：7 日間

投与方法：検体 0.1 ml を右眼に適用し、3 匹は 20～30 秒後に洗眼した。6 匹については洗眼しな
かった。

観察項目：適用 24、48 および 72 時間後、4 および 7 日後に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観
察し、Draize の方法に従って採点した。

試験結果：観察した刺激性変化の採点は次頁の表のとおりである。

角膜および虹彩では洗眼、非洗眼群ともに刺激性変化は認められなかった。結膜の刺
激性変化は、非洗眼群で軽度の発赤および浮腫が、また洗眼群で軽度の発赤がそれぞ
れ処理 24 時間後に認められたが、これらの変化はいずれも 48 時間後には消失した。

以上の結果から、クロフェンテジン 50%水和剤は、ウサギの眼粘膜に対して刺激性がないもの
と思われる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はアダマ・ジャパン株式会社にある。

項目		最高 評点	適用後時間						
			24 時間	48 時間	72 時間	4 日	7 日		
非洗 顔群	動物 番号 10	角膜	程度	4	0	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	0	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0	0
			分泌物	3	0	0	0	0	0
	動物 番号 11	角膜	程度	4	0	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0	0
			分泌物	3	0	0	0	0	0
	動物 番号 12	角膜	程度	4	0	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
結膜		発赤	3	0	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	
		分泌物	3	0	0	0	0	0	
動物 番号 13	角膜	程度	4	0	0	0	0	0	
		面積	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	
		分泌物	3	0	0	0	0	0	
動物 番号 14	角膜	程度	4	0	0	0	0	0	
		面積	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	0	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	
		分泌物	3	0	0	0	0	0	
動物 番号 15	角膜	程度	4	0	0	0	0	0	
		面積	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	0	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	
		分泌物	3	0	0	0	0	0	
合計			660	8	0	0	0	0	
平均			110	1.3	0	0	0	0	
洗眼群 (3 匹 平均)	角膜	程度	4	0	0	0	0	0	
		面積	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	0.7	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	
		分泌物	3	0	0	0	0	0	
合計				0.7	0	0	0	0	

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

7) モルモットを用いた製剤の皮膚感作性試験

(資料 No.T53)

検体純度：クロフェンテジン 40%水和剤

供試動物：Hartley 系モルモット、5 週齢、一群雄 20 匹、体重 302~364 g

観察期間：48 時間

試験操作：(Landsteiner-Draize 法)

感 作；背部から左腹側部を刈毛し、皮膚反応が識別できる間隔で、週 3 回 (2~3 日毎)、計 10 回の皮内注射を行った。投与群には、検体を希釈せずに感作 1 回目は 1 匹あたり 0.05 ml、感作 2 回目から 10 回目までは 0.1 ml を皮内注射した。陽性対照群には 0.2%ジニトロクロロベンゼン (DNCB) 落花生油を用い、同様に 1 回目は 0.05 ml、2 回目から 10 回目までは 0.1 ml で感作処置した。

惹 起；最終感作 2 週間後、左腹側部の腹部寄りの新しい部位を刈毛し、感作時に用いたものと同じ各検体を、各々 0.05 ml の量で皮内注射し、惹起させた。

皮膚刺激性：別の動物を用いて、検体および陽性対照を、上記感作性試験の場合と同様の部位に各々 0.05 ml/動物の容量で 1 回皮内注射した。

観察項目：各感作後および惹起後、紅斑 (痂皮形成を含む) および浮腫を 24 時間および 48 時間後に観察した。

試験結果：評価結果を次表に示す。

(採点は Draize の方法によった)

検体	皮膚反応					
	感 作			惹 起		
	24 時間後 ^a	48 時間後 ^a	平均 ^b	24 時間後	48 時間後	平均 ^c
クロフェンテジン 7077 [®] ル	20	4	0.06	10	5	0.38**
陽性対照(DNCB)	107	74	0.45	19	14	0.83***

a：10 回の感作の累積値

b：24 時間後の評点+48 時間後の評点/20 匹×10 回×2

c：24 時間後の評点+48 時間後の評点/20 匹×2

t 検定 **：P<0.01、*** P<0.001

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ダマ・ジャパン株式会社にある。

検体は皮膚刺激性を示さなかった。感作および惹起では、皮膚感作性を疑わせる軽度の紅斑が認められた。陽性対照では皮膚刺激性は認められなかったが、感作の進行に伴い次第に紅斑および浮腫が認められ、惹起後にはさらに明瞭な感作性が認められた。

以上の結果から、クロフェンテジン 40%水和剤はモルモットに対して軽度の感作性を有するものと考えられる。