

(17) クロチアニジンのラットにおける催奇形性試験

(資料 1-17)

試験機関 : Argus Research Laboratories

(米国) [GLP 対応]

報告書作成年 : 1998 年

検体の純度 :

試験動物 : CrI:CD[®]BR VAF/Plus[®]SD 系ラット (約 9 週齢)、1 群雌 25 匹

試験期間 : 1997 年 5 月 26 日 ~ 1997 年 6 月 19 日

(交配開始より帝王切開終了時まで)

投与方法 : 検体を 0.5%メチルセルロース水溶液に溶解し、10、40 及び 125mg/kg/day の投与レベルで妊娠 6 日から 19 日までの 14 日間、毎日 1 回経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液のみを同様に投与した。

試験項目 :

母動物 ; 一般状態及び生死を 1 日 2 回観察し、妊娠 0 日、投与期間中 (妊娠 6 ~ 19 日) までは毎日及び帝王切開時について個体別体重を測定した。飼料摂取量については妊娠 0、6、9、12、15、18 及び 20 日に測定した。

妊娠 20 日に帝王切開し、剖検、妊娠の有無、生存及び死亡胎児数、黄体数、着床部位及び数、早期及び後期吸収胚数及び妊娠子宮重量の測定を行った。

生存胎児 ; 全生存胎児について体重を測定し、性別及び外表異常を検査した。1 腹毎の胎児の約半数について内臓異常を、残りの半数については骨格異常を検査した。

結果 : 結果の概要を次頁に示した。

結 果：

		0	10	40	125	
投与量 (mg/kg/day)		0	10	40	125	
1 群 当 り の 動 物 数		25	25	25	25	
一 般 状 態		検体投与に関連した異常所見なし				
死 亡 数		死亡例なし				
母	増体重 (g)					
	妊娠 0~6 日	25.5	26.7	27.7	26.1	
	妊娠 6~9 日	11.8	10.2	6.8**	-6.1**	
	妊娠 9~12 日	17.1	18.1	16.6	17.6	
	妊娠 12~15 日	17.6	18.0	16.9	16.8	
	妊娠 15~18 日	37.8	38.3	38.8	34.0	
	妊娠 18~20 日	36.6	38.0	38.0	38.6	
	妊娠 6~20 日	120.9	122.6	117.0	100.8**	
妊娠 0~20 日		146.4	149.3	144.7	127.0**	
妊娠 20 日補正体重 (g)		286.5	286.5	279.4	267.1**	
妊娠 子宮重量 (g)		74.2	76.2	79.3	75.1	
妊 娠 数 (%)		23 (92.0)	22 (88.0)	24 (96.0)	25 (100)	
動 物	肉 眼 的 病 理 検 査		検体投与に関連した異常所見なし			
	着 床 所 見	黄 体 数	15.9	15.8	15.9	16.0
		着 床 数	13.6	14.3	14.2	14.3
		生 存 胎 児 数	13.0	13.4	13.8	13.6
		死 亡 胎 児 数	0.0	0.0	0.0	0.0
		早 期 吸 収 胚 数	0.6	0.9	0.4	0.6
		後 期 吸 収 胚 数	0.0	0.0	0.0	0.1
		吸 収 胚 数	0.6	0.9	0.4	0.7
		吸 収 胚 を 有 す る 母 動 物 の 割 合 (%)	39.1	59.1	37.5	52.0
		全 受 胎 産 物 吸 収 を 有 す る 母 動 物 の 割 合 (%)	0.0	0.0	0.0	0.0
		生 存 胎 児 を 有 す る 母 動 物 の 割 合 (%)	100	100	100	100
		1 腹 当 た り の 吸 収 胚 率 (%)	4.8	6.3	2.7	4.7

Dunnnett's testあるいはFisher's exact test、* : p<0.05、** : p<0.01

注) 妊娠 20 日補正体重 : 妊娠 20 日時の体重値から妊娠子宮重量を引いた値

		投与量 (mg/kg/day)	0	10	40	125	
胎 児 変 異			胎 児 数	299	294	330	340
			体 重 (g)	3.52	3.50	3.55	3.34
			性 比 (雄/雌)	0.97	0.96	1.08	0.92
	奇 形	外 表	臍ヘルニア	0.3 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			眼部隆起陥凹	0 (0)	0.3 (1)	0.3 (1)	0 (0)
			浮腫	0.3 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	骨 格	内 臓	小眼球症	0 (0)	0 (0)	0.6 (1)	0 (0)
			小眼窩 (右)	0 (0)	0.6 (1)	0 (0)	0 (0)
			肋骨癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.6 (1)
			後肢: 腓骨及び脛骨の短小	0.6 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	骨 格	内 臓	左臍帯動脈遺残	1.4 (2)	0.7 (1)	0 (0)	0 (0)
			無名動脈欠損	0 (0)	0 (0)	0.6 (1)	0.6 (1)
			大動脈弓の気管・食道 背面走行	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.6 (1)
			左頸動脈の右鎖骨下動脈 右側起始	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.6 (1)
		骨 格	頸肋	0 (0)	0.6 (1)	0.6 (1)	1.1 (2)
			胸椎椎体二分骨化	0.6 (1)	0 (0)	0.6 (1)	1.1 (2)
			波状肋骨	1.9 (2)	0 (0) **	0 (0) **	0 (0) **
			肋骨の不完全骨化	0.6 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			第一胸骨の不完全骨化	4.5 (5)	2.6 (4)	2.4 (3)	5.1 (5)
第一胸骨の未骨化			0 (0)	0 (0)	1.8 (3)	1.1 (1)	
第二胸骨の不完全骨化			0 (0)	0 (0)	0.6 (1)	1.1 (1)	
第二胸骨の未骨化			0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.6 (1)	
恥骨の未骨化	0 (0)	0.6 (1)	0 (0)	0.6 (1)			
坐骨の不完全骨化	0 (0)	1.3 (2)	1.2 (1)	0 (0)			
恥骨の不完全骨化	0.6 (1)	0.6 (1)	2.4 (3)	0.6 (1)			

Dunnett's testあるいはFisher's exact test、* : p<0.05、** : p<0.01

注) 胎児動物の試験結果中に記載した数値は胎児異常の発生率 (%) を表し、() に記載した数値は異常胎児親数を示す。

		投与量 (mg/kg/day)	0	10	40	125	
胎 児 の 骨 化 進 行 度	検査胎児数		156	152	170	176	
	舌骨		0.89	0.90	0.80	0.84	
	椎骨	頸椎		7.00	7.00	7.00	7.00
		胸椎		13.00	13.00	13.03	13.03
		腰椎		5.99	6.00	5.94	5.96
		仙椎		3.00	3.00	3.00	3.00
		尾椎		4.52	4.66	4.66	4.58
	肋骨		13.00	13.00	13.03	13.02	
	胸骨	胸骨柄		1.00	1.00	1.00	0.99
		胸骨分節		3.28	3.41	3.38	3.26
		剣状突起		0.99	0.97	0.97	0.96
	前肢	手根骨		0.00	0.00	0.00	0.00
		中手骨		3.30	3.29	3.20	3.20
		指 (本数)		5.00	5.00	5.00	5.00
		指節骨		0.65	0.82	0.59	0.65
	後肢	足根骨		0.00	0.00	0.00	0.00
		中足骨		3.98	4.00	4.00	3.97
		趾 (本数)		5.00	5.00	5.00	5.00
		趾節骨		0.05	0.06	0.30	0.31

Dunnett's test, *: p<0.05, **: p<0.01

注) 表中の記載した数値は1腹胎児当たりの平均骨数を表す。

<母動物> 全ての母動物が試験終了時まで生存し、流産及び早産は認められなかった。また一般症状及び肉眼的病理検査において検体投与に関連した影響は何ら認められなかった。

125mg/kg/day 投与群では、妊娠6~9日間において対照群と比較して有意な体重低下が、また妊娠期間(妊娠0~20日)中及び投与期間(妊娠6~20日)中を通じ、対照群と比較して有意な体重増加抑制が認められた。また妊娠20日補正体重(妊娠20日時の体重値から妊娠子宮重量を引いた値)においても有意な低下が認められた。

40mg/kg/day 投与群では、妊娠6~9日間において有意な体重増加抑制が認められた。

これらの体重増加抑制は飼料摂取量の低下と相関していることから、検体投与に起因したものと考えられた。10mg/kg/day 投与群については対照群と同等と考えられた。

<発生毒性> 母動物に対する帝王切開時の検査において、検体投与に起因した変化は全投与群で認められず、また胎児に対する発生毒性についても何ら認められなかった。

以上の結果より、クロチアニジンを妊娠ラットに投与した場合の無毒性量は、母動物に関しては40mg/kg/day 投与群での妊娠 6～9 日間における体重増加抑制及び飼料摂取量の低下及び125mg/kg/day 投与群における妊娠期間を通じての体重増加抑制及び飼料摂取量の低下に基づき、10mg/kg/day と考えられた。また、胎児に対する発生毒性に関しては何ら検体投与による影響が認められなかったことより無毒性量は125mg/kg/day と考えられた。また125mg/kg/day 投与群でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

(18) クロチアニジンのウサギにおける催奇形性試験

(資料 1-18)

試験機関 : Argus Research Laboratories

(米国) [GLP対応]

報告書作成年 : 1998年

検体の純度 :

試験動物 : ニュージーランド白色種ウサギ (約6~8か月齢)、1群雌23匹

試験期間 : 1997年5月18日~1997年6月20日

(妊娠0日より帝王切開終了時まで)

投与方法 : 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に溶解し、10、25、75及び100mg/kg/dayの投与レベルで妊娠6日から28日までの23日間、毎日1回経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース水溶液のみを同様に投与した。

試験項目 :

母動物 : 一般状態及び生死を1日2回観察し、体重は妊娠0日、投与期間中(6~28日)及び帝王切開時に測定した。飼料摂取量については毎日記録した。

全ての動物は妊娠29日に屠殺し、剖検、妊娠の有無、生存及び死亡胎児数、黄体数、着床部位及び数、早期及び後期吸収胚数及び妊娠子宮重量を測定した。また胎盤のサイズ、形及び色も評価した。

生存胎児 : 全生存胎児について体重を測定し、性別、外表異常、内臓異常及び骨格異常を検査した。また頭部の検査も実施した。

結果 : 結果の概要を次頁に示した。

結果：

母 動 物	投与量 (mg/kg/day)	0	10	25	75	100	
	1 群当りの動物数	23	23	23	23	23	
	一般状態 [排便減少]	1	3	4	10**	16**	
	一般状態 [着色尿 (オレンジ色)]	0	0	2	9**	9**	
	死亡あるいは瀕死状態のため屠殺した数	0	0	0	2	3	
	流産	3	0*	0*	1	6*	
	早産	0	0	0	2	2	
	増 体 重 (k g)	妊娠 0~6 日	0.05	0.07	0.08	0.08	0.06
		妊娠 6~9 日	0.01	0.01	0.05	0.02	-0.04
		妊娠 9~12 日	0.03	0.05	0.02	0.02	-0.08**
		妊娠 12~15 日	0.06	0.07	0.07	0.01	-0.08**
		妊娠 15~18 日	0.03	0.05	0.03	0.00	0.00
		妊娠 18~21 日	0.06	0.06	0.06	0.03	0.06
		妊娠 21~24 日	0.06	0.06	0.05	0.02	0.00
		妊娠 24~27 日	-0.01	0.01	-0.01	0.00	-0.07
		妊娠 27~29 日	0.00	0.02	0.02	0.01	0.00
		妊娠 6~29 日	0.32	0.32	0.30	0.17	-0.02**
	妊娠 0~29 日	0.39	0.39	0.38	0.26	0.05**	
	妊娠 20 日補正体重 (kg)	3.84	3.88	3.86	3.83	3.67	
	妊娠子宮重量 (g)	518	525	517	462	420	
	妊娠数 (%)	21 (91.3)	23 (100)	22 (95.6)	22 (95.6)	23 (100)	
	肉眼的病理検査	検体投与に関連した異常所見なし					
	着 床 所 見	黄体数	9.4	9.6	9.9	8.7	9.8
		着床数	8.6	8.9	9.2	8.0	8.8
		生存胎児数	8.3	8.7	8.8	7.8	7.4
死亡胎児数		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
早期吸収胚数		0.1	0.0	0.1	0.0	0.9	
後期吸収胚数		0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	
吸収胚数		0.3	0.1	0.4	0.2	1.4	
吸収胚を有する母動物の割合 (%)		27.8	13.0	15.0	23.5	36.4	
全受胎産物吸収を有する母動物の割合 (%)		0.0	0.0	0.0	0.0	9.1	
生存胎児を有する母動物の割合 (%)	100	100	100	100	90.9		
1 腹当たりの吸収胚率 (%)	3.1	1.4	3.6	3.4	12.7		

Dunnett's test あるいは Fisher's exact test、* : p<0.05、** : p<0.01

注) 妊娠 20 日補正体重 : 妊娠 20 日時の体重値から妊娠子宮重量を引いた値

投与量 (mg/kg/day)		0	10	25	75	100
胎 児 数		150	201	179	133	85
体 重 (g)		43.9	42.9	40.4	40.6	36.7**
性 比 (雄/雌)		1.07	0.89	1.01	0.95	0.66
外 表	短 鼻	0(0)	0(0)	0(0)	0.8(1)	0(0)
	眼部隆起陥凹	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	髄 膜 瘤	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)
	浮 腫	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	膺ヘルニア	0(0)	0.5(1)	0(0)	0(0)	0(0)
	前後肢指趾欠損	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	後肢爪欠損	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	短 尾	0(0)	0(0)	1.1(1)	0(0)	1.2(1)
	曲 尾	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	内 臓	第三脳室及び側脳室の 重度拡張	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)
側脳室の重度拡張		0(0)	0(0)	0(0)	0.8(1)	0(0)
小 鼻 道		0(0)	0(0)	0(0)	0.8(1)	0(0)
小 眼 球		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
動脈幹道残		0(0)	0(0)	0(0)	0.8(1)	0(0)
肺左右前葉、右中葉、 中間葉欠損		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
腎臓の低形成		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3.5(1)**
骨 格	小 眼 窩	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	胸椎半椎	0(0)	0.5(1)	0(0)	0(0)	0(0)
	胸椎椎体の癒合	0(0)	0.5(1)	0(0)	0(0)	0(0)
	仙椎椎弓開裂	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)
	尾椎椎体の配列異常	0(0)	1.0(2)	0(0)	0(0)	0(0)
	尾椎椎体の癒合	0(0)	0(0)	1.1(1)	0(0)	2.4(2)**
	尾椎椎体の小型	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	尾椎椎弓開裂	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)
	尾椎椎体 16	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)
	尾椎椎体 15	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)
	肋骨分離	0(0)	0.5(1)	0(0)	0(0)	0(0)
	肋骨の過剰骨化	0(0)	0.5(1)	0(0)	0(0)	0(0)
	肋骨癒合	0(0)	0.5(1)	0(0)	0.8(1)	1.2(1)
	中手骨 4	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	前肢：指 4	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	前肢指節骨の欠損	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	中足骨 2	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
後肢：趾 2	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)	
後肢趾節骨の欠損	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2.4(2)**	

Dunnett's testあるいはFisher's exact test、*：p<0.05、**：p<0.01

注) 胎児動物の試験結果中に記載した数値は胎児異常発生率(%)を表し、()に記載した数値は異常胎児保有親数を示す。

		投与量 (mg/kg/day)	0	10	25	75	100
胎 児 異 変	外表	内反足	0(0)	0(0)	1.7(1)**	0(0)	0(0)
		足屈曲	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)
	内 臓	側脳室の中等度拡張	0(0)	0.5(1)	0(0)	0(0)	0(0)
		網膜離壁	0(0)	1.0(2)	0(0)	0(0)	0(0)
		肺中葉欠損	0(0)	0(0)	0(0)	2.2(3)**	8.2(4)**
		肺左右前葉、右中葉、 右後葉の発達不全	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
	骨 格	鼻骨、正中線縫合の 位置異常	1.3(2)	0(0)	1.7(3)	2.2(2)	2.4(2)
		鼻骨及び前頭骨の 縫合不整	0(0)	0.5(1)	0.6(1)	0.8(1)	0(0)
		鼻骨分離	0(0)	0.5(1)	1.7(3)	0.8(1)	0(0)
		鼻骨の癒合	0.7(1)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)
		鼻骨及び前頭骨の癒合	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)
		前頭骨の小孔	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)
		前頭骨の癒合	0(0)	0(0)	0.6(1)	0.8(1)	0(0)
		頭頂骨の小孔	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)
		舌骨翼の屈曲	0.7(1)	0.5(1)	0.6(1)	0(0)	2.4(1)
		小舌骨翼	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
		頸椎椎体の非対称	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1.2(1)
		頸椎椎体の片側性骨化核	0(0)	0(0)	0(0)	0.8(1)	0(0)
		肋骨肥厚	0(0)	0.5(1)	0(0)	0(0)	0(0)
		胸骨分節の非対称	0(0)	0.5(1)	0(0)	0.8(1)	1.2(1)
		胸骨分節の癒合	0.7(1)	1.0(2)	2.2(2)	0(0)	0(0)
		胸骨分節、第一胸骨の 不完全骨化	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2.4(2)**
	肩甲骨の形態異常	0(0)	0(0)	0(0)	0.8(1)	0(0)	
	恥骨の未骨化	0(0)	0(0)	0.6(1)	0(0)	0(0)	

Fisher's exact test, *: p<0.05, **: p<0.01

注) 胎児動物の試験結果中に記載した数値は胎児異常発生率(%)を表し、()に記載した数値は異常胎児保有親数を示す。

		投与量 (mg/kg/day)	0	10	25	75	100	
胎 児 の 骨 化 進 行 度	検査胎児数		150	201	176	133	82	
	舌骨		0.99	1.00	0.98	1.00	1.00	
	椎骨	頸椎		7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
		胸椎		12.52	12.58	12.57	12.60	12.83
		腰椎		6.47	6.42	6.42	6.39	6.17
		仙椎		3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
		尾椎		16.96	17.02	17.01	16.95	17.00
	肋骨		12.44	12.53	12.49	12.51	12.76	
	胸骨	胸骨柄		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		胸骨分節		3.99	3.91	3.94	3.83**	3.76**
		剣状突起		0.98	0.96	0.96	0.96	1.00
	前肢	手根骨		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		中手骨		4.99	4.99	4.98	4.96	4.86
		指 (本数)		5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
		指節骨		13.96	13.94	13.96	13.85	13.70
	後肢	足根骨		2.00	2.00	1.98	2.00	1.99
		中足骨		4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
		趾 (本数)		4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
		趾節骨		12.00	12.00	12.00	12.00	11.78*

Dunnett's test, *: p<0.05, **: p<0.01

注) 表中に記載した数値は1腹胎児当たりの平均骨数を表す。

< 母動物 > 75及び100mg/kg/day投与群の母動物においてそれぞれ2及び3例の死亡及び/あるいは瀕死状態動物が認められた。また100mg/kg/day投与群において有意な流産数の増加が認められ、75及び100mg/kg/day投与群では早産がそれぞれ2例に認められた(全て妊娠29日)。これらは体重増加抑制及び飼料摂取量の低下に伴う健康状態の悪化によるものと考えられた。75及び100mg/kg/day投与群の母動物において、対照群と比較して排便減少数の有意な増加が認められた。25mg/kg/day投与群の母動物においては有意な差が認められなかったものの、2日以上にわたり継続して排便減少が認められたことから検体投与に起因したものと考えられた。一方、10mg/kg/day投与群においては、本試験施設における背景データ(0-3匹)の範囲内であ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。

75 及び 100mg/kg/day 投与群の母動物において、対照群と比較して着色尿（オレンジ色）所見数の有意な増加が認められた。25mg/kg/day 投与群でも有意な差は認められなかったものの対照群（0 匹）と比較して増加傾向にあったことから、検体投与に起因したものと考えられた。

妊娠期間（妊娠 0～29 日）及び投与期間（妊娠 6～29 日）を通じた体重増加量について比較した場合、100mg/kg/day 投与群において対照群と比較して有意な体重増加抑制/低下が認められ、75mg/kg/day 投与群でも有意な差は認められなかったものの体重増加抑制が認められた。これらの投与群では飼料摂取量の低下も認められたことから、検体投与に起因したものと考えられた。またこれらの投与群では、対照群と比較して有意な差は認められなかったものの妊娠子宮重量の減少も認められ、体重増加抑制に関連したものと考えられた。肉眼的病理検査においては検体投与に関連した影響は認められなかった。

<発 生 毒 性> 100mg/kg/day 投与群において胚の吸収、流産数の増加が認められ、妊娠 29 日に全胎児の死亡を認めた腹が存在したこと及び妊娠子宮重量の減少が認められたことから判断して、着床後の胚死亡が増加する傾向にあり、また胎児体重の有意な減少が認められた。これらは検体投与に起因したものと考えられた。

75 及び 100mg/kg/day 投与群の胎児において肺の中葉欠損がそれぞれ 3 及び 7 例（発生率はそれぞれ 2.2 及び 8.2%）認められた。しかしこれは本試験施設の背景データ（0-7 例）の範囲内であったことから、検体投与に起因したものとは考えられなかった。

また 100mg/kg/day 投与群の胎児において第一胸骨分節の不完全骨化が 2 例（発生率 2.4%）認められた。しかしこれも本試験施設の背景データ（0-2 例）の範囲内であったことから、検体投与に起因したものとは考えられなかった。

100mg/kg/day 投与群の胎児において腎臓の低形成が 3 例（発生率 3.5%）認められた。この 3 例は同腹児であり、この所見が認められた腹数について対照群と比較した場合に有意な差が認められなかったことから、検体投与に起因したものとは考えられなかった。

100mg/kg/day 投与群の胎児において尾椎椎体の癒合が 2 例（発生率 2.4%）認められた。しかし本試験施設の背景データ（0-3 例）の範囲内であったことから、検体投与に起因したものとは考えられなかった。

また同投与群の胎児において後肢趾節骨の欠損が 2 例（発生率 2.4%）認められた。しかしこの 2 例の欠損部位はそれぞれ異なっており、また死亡、流産及び早産した母動物において認められたものではなかった。この所見は 100mg/kg/day 投与群の母動物において死亡、流産及び早産が認められたため、この群の検査胎児数自体が少なくなり、その結果有意な差として検出されたものと考えられた。

胎児の骨化進行度では75及び100mg/kg/day投与群における胸骨の胸骨分節の骨化数平均値が対照群(3.99)に対してそれぞれ有意に減少した(75mg/kg/day投与群では3.83及び100mg/kg/day投与群では3.76)。しかし本所見に関する本試験施設の背景データ(3.81-3.97)から判断して、100mg/kg/day投与群については検体投与に起因したものと考えられ、75mg/kg/day投与群については検体投与に起因したものは考えられなかった。この100mg/kg/day投与群における胸骨分節の骨化遅延は、胎児体重の減少に関連したものであり、可逆的な変異と考えられた。

100mg/kg/day投与群の胎児において後肢趾節骨の骨化遅延が対照群と比較して有意に認められたが、これはこの投与群で認められた胎児体重の減少に関連したものと考えられた。なお指の本数自体には変化が認められなかった。

以上の結果より、クロチアニジンを妊娠ウサギに投与した場合の無毒性量は、母動物に関しては25mg/kg/day以上の投与群において排便減少及び着色尿が、75及び100mg/kg/day投与群において死亡、流産(100mg/kg/day投与群のみ)、早産、体重増加抑制、飼料摂取量の低下及び妊娠子宮重量の減少が認められたことより、10mg/kg/dayと考えられた。また胎児に対する発生毒性に関しては100mg/kg/day投与群において着床後の胚死亡増加、胎児体重の減少及びこの胎児体重の減少に関連した胸骨分節及び後肢趾節骨の骨化遅延が認められたことより、75mg/kg/dayと考えられた。また100mg/kg/day投与群でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

申請者註) 胎児に対する発生毒性は、75及び100mg/kg/day投与群において統計学的に有意な肺の中葉欠損が認められ、また胎児の骨化進行度において胸骨の胸骨分節の骨化数平均値も有意な減少が認められたことから25mg/kg/dayと判断する。

申請者註) 25mg/kg/day投与群の母動物で認められた排便減少及び着色尿については、対照群と比較して統計学的に有意な差が認められなかったことから、検体投与に起因した影響ではないものと判断される。以上のことから、母動物に対する無毒性量は25mg/kg/dayと判断される。

(7) 変異原性

(19) クロチアニジンの細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 1-19)

試験機関 : Bayer AG (独国)

[GLP対応]

報告書作成年 : 1999年

検体の純度 :

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, TA102) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 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定した。

試験濃度は 16~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で 6 用量とした。試験は 3 連制とし、2 回行った。実験 1 ではプレート法、実験 2 ではプレインキュベーション法にて実施した。

試験結果 : 結果を次表に示した。

2 回の実験において検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、最高用量 (5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$) 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。

なお、実験 2 で TA102 株の S-9 Mix 存在下、50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ において復帰変異コロニー数が溶媒対照と比較して約 100 コロニー数が増加したため、この菌株についてのみ確認試験を実施した。その結果、問題となるような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 (NaN_3)、ニトロフラントイン (NF)、2-アミノアントラセン (2-AA)、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン (4-NPDA) 及びクメンヒドロペルオキシド (Cumene) 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、クロチアニジンは代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

本試験結果表 - 1

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	60	9	215	27	7	
クロチアニジン	16	-	65	8	195	24	8	
	50	-	70	8	217	22	6	
	158	-	67	6	204	23	7	
	500	-	70	6	169	28	6	
	1581	-	57	9	200	29	4	
	5000	-	81	12	193	26	8	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	101	11	254	25	7	
クロチアニジン	16	+	92	9	271	19	7	
	50	+	94	9	266	29	7	
	158	+	95	6	224	23	6	
	500	+	90	10	179	22	7	
	1581	+	104	8	172	25	6	
	5000	+	110	11	163	21	7	
陽性対照	NF	0.2	-	203	-	-	358	-
	NaN_3	10	-	424	820	-	-	-
	4-NPDA	0.5	-	-	-	-	155	-
		10	-	-	-	-	-	85
	Cumene	50	-	-	-	371	-	-
	2-AA	3	+	1267	80	411	1146	235

DMSO : ジメチルスルホキシド

NF : ニトロフラントイン

NaN_3 : アジ化ナトリウム

4-NPDA : 4-ニトロ-1, 2-フェニレンジアミン

Cumene : クメンヒドロペルオキシド

2-AA : 2-アミノアントラセン

本試験結果表 - 2

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	102	6	126	16	6	
クロチアニジン	16	-	89	5	135	16	4	
	50	-	88	5	113	17	4	
	158	-	91	5	115	28	3	
	500	-	91	9	140	19	2	
	1581	-	80	9	137	20	2	
	5000	-	#	8	120	23	3#	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	100	10	148	22	6	
クロチアニジン	16	+	107	11	186	19	4	
	50	+	101	8	251	25	3	
	158	+	101	7	228	27	3	
	500	+	127	7	146	24	4#	
	1581	+	102	11	155	22	2#	
	5000	+	128	16	168	28	4#	
陽性対照	NF	0.2	-	237	-	-	-	-
	NaN ₃	10	-	-	912	-	-	-
	4-NPDA	0.5	-	-	-	-	151	-
		10	-	-	-	-	-	63
	Cumene	50	-	-	-	494	-	-
	2-AA	3	+	1211	137	474	1755	28

: 細胞毒性が認められた。

DMSO : ジメチルスルホキシド

NF : ニトロフラントイン

NaN₃ : アジ化ナトリウム

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

Cumene : クメンハイドロペルオキシド

2-AA : 2-アミノアントラセン

S-9 Mix 存在下、TA102 株の確認試験結果

濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	溶媒対照 (DMSO)	16	32	48	64	80	96	112	陽性対照 (2-AA)
復帰変異 コロニー数	195	203	226	233	187	178	197	201	467

(20) クロチアニジンの細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 1-20)

試験機関 : Safeparm Laboratories Limited

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2000 年

検 体 : クロチアニジン

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) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、50~5000 µg/プレートの範囲の 5 濃度で実施した。試験は 3 連制とし、プレート法により本試験を 2 回行った。

試験結果 : 結果を次表に示した。

検体は S9 mix 存在下 TA1535 株の 5000 µg/プレートの濃度において、溶媒対照群の 2 倍をわずかに超える、再現性のある復帰変異コロニー数の増加を示した。S9 mix 非存在下 TA1535 株では、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、溶媒対照群の 2 倍を超えることはなかった。その他の菌株では、S9 mix の存在の有無にかかわらず、5000 µg/プレートの濃度まで、復帰変異コロニー数を溶媒対照群の 2 倍以上にかつ用量依存的に増加させることはなかった。

なお、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、4-ニトロキノリン-1-オキシドおよび 2-アミノアントラセンでは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、クロチアニジンは、TA1535 株に対して薬物代謝酵素系の存在下で弱い復帰変異誘発性を有すると判断された。

申請者注)

本試験では S9 mix 存在下 TA1535 株の 5000 μg /プレート の濃度において、溶媒対照群の 2 倍をわずかに超える、再現性のある復帰変異コロニー数の増加を示したが、追加試験では菌の生育阻害および検体の析出が認められた 8000 μg /プレートの用量まで実施したが、S9 mix の有無にかかわらず TA1535 株で復帰変異コロニー数の増加は再現されなかった(資料 1-21)ことから、クロチアニジン原体は復帰突然変異能を有しないと判断される。

本試験 (1回目) 結果

(表中の数値は3反復の平均値±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		
			WP2uvrA	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	24±6.7	91±15.8	20±5.0	18±3.6	12±2.1	
クロチア ニジン	50	-	19±2.5	83±8.0	27±1.2	16±4.5	11±4.0	
	150	-	18±5.6	94±3.2	21±2.1	16±4.9	13±3.6	
	500	-	22±1.7	83±9.5	26±1.2	20±4.7	12±1.7	
	1500	-	12±2.5	97±10.3	30±9.0*	18±6.1	11±4.4	
	5000	-	11±1.5	104±5.2	32±5.5*	20±2.0	10±2.5	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	18±1.5	119±12.7	11±3.1	30±4.7	10±1.5	
クロチア ニジン	50	+	21±4.2	116±5.5	12±4.2	32±3.2	13±0.6	
	150	+	18±1.7	96±6.8	15±2.9	30±2.1	11±1.2	
	500	+	19±3.8	107±16.2	13±5.0	26±0.6	9±0.6	
	1500	+	17±2.3	115±13.9	20±4.0*	26±4.2	11±2.1	
	5000	+	14±1.7	123±10.8	28±1.0***	28±4.4	8±2.3	
陽 性 対 照	ENNG	2	-	587±13.9				
		3	-		384±11.2			
		5	-			190±8.0		
	4NQO	0.2	-				175±6.6	
	9AA	80	-					605±10.8
	2AA	0.5	+				407±30.3	
		1	+		771±39.0			
		2	+			189±8.6		279±5.6
10		+	861±45.4					

* : $p \leq 0.05$, *** : $p \leq 0.005$ (ダネット検定, 片側)

陽性対照物質

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン

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

本試験 (2回目) 結果

(表中の数値は3反復の平均値±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		
			WP2uvrA	TA100	TA1535	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	19±3.6	111±0.6	19±7.6	24±4.6	9±3.2	
クロチア ニジン	50	-	15±4.0	105±11.1	19±2.6	20±4.6	8±2.3	
	150	-	14±4.6	109±0.6	25±2.9	20±2.6	8±1.0	
	500	-	14±2.3	104±8.0	24±4.4	21±3.6	6±2.5	
	1500	-	16±4.6	114±3.5	29±7.4	15±3.1	6±2.0	
	5000	-	12±1.2	115±1.7	37±3.2***	23±4.2	6±0.6	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	18±2.5	111±10.1	12±3.5	27±5.3	10±2.9	
クロチア ニジン	50	+	20±2.1	114±5.1	13±2.1	22±0.0	9±2.6	
	150	+	21±1.5	99±7.8	15±2.1	25±6.4	7±1.0	
	500	+	19±3.0	97±9.3	12±1.5	20±3.8	8±3.5	
	1500	+	15±3.1	97±7.0	12±1.0	22±4.7	8±2.1	
	5000	+	17±5.5	121±8.9	26±2.1***	27±1.2	7±3.1	
陽性 対照	ENNG	2	-	1046±48.0				
		3	-		608±12.1			
		5	-			385±29.4		
	4NQO	0.2	-				162±5.1	
	9AA	80	-					879±30.4
	2AA	0.5	+				462±16.1	
		1	+		838±38.0			
		2	+			221±10.5		269±16.3
10		+	739±57.4					

*** : $p \leq 0.005$ (ダネット検定, 片側)

陽性対照物質

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン

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

(21) クロチアニジンの細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 1-21)

試験機関：BAYER AG

報告書作成年：1999年

検体：クロチアニジン

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* TA1535 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

試験は2バッチの検体を用いて、3連制で2回行った。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。1回目試験は、バッチ1については1000~5000 µg/プレート範囲の5用量、バッチ2については3000~7000 µg/プレート範囲の3用量で、プレート法を用いて実施した。2回目試験は、バッチ1およびバッチ2ともに1000~8000 µg/プレートの5用量でプレインキュベーション法を用いて実施した。また、生育阻害の一つの指標として検体処理後の菌をプレートに播種して生菌数を調べた。

試験結果：結果を次表に示した。

2回の試験において、S9 mixの有無にかかわらず、いずれのバッチの検体も、生菌数の減少の認められた用量を含む8000 µg/プレートまで復帰変異コロニー数を増加させることはなかった。

一方、陽性対照として用いたアジ化ナトリウムおよび2-アミノアントラセンでは試験菌株 TA1535 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、クロチアニジンは、TA1535 株に対して代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないと判断された。

1 回目試験

バ ツ チ	薬 物	濃 度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の 有無	復帰変異コロニー数 /プレート	生菌数 ($\times 10^8/\text{mL}$)	
				塩基対置換型		
				TA1535		
バ ツ チ 1	溶媒対照 (DMSO)	0	-	13 \pm 2	/	
	クロチアニジン	1000	-	9 \pm 2	/	
		2000	-	11 \pm 3	/	
		3000	-	12 \pm 2	/	
		4000	-	11 \pm 3	/	
		5000	-	11 \pm 5	/	
	溶媒対照 (DMSO)	0	+	11 \pm 2	14.3	
	クロチアニジン	1000	+	10 \pm 1	13.0	
		2000	+	13 \pm 3	13.5	
		3000	+	9 \pm 1	13.4	
		4000	+	12 \pm 2	13.0	
5000		+	13 \pm 5	11.6*		
陽 性 対 照	Na-azide	10	-	652 \pm 34	12.8	
	2-AA	3	+	209 \pm 37	9.7*	
バ ツ チ 2	溶媒対照 (DMSO)	0	-	13 \pm 2	/	
	クロチアニジン	3000	-	13 \pm 5	/	
		5000	-	11 \pm 3	/	
		7000	-	16 \pm 6	/	
	溶媒対照 (DMSO)	0	+	11 \pm 2	14.3	
	クロチアニジン	3000	+	17 \pm 3	13.2	
		5000	+	14 \pm 3	11.4*	
		7000	+	18 \pm 2	9.4*	
	陽 性 対 照	Na-azide	10	-	652 \pm 34	12.8
		2-AA	3	+	209 \pm 37	9.7*

表中の復帰変異コロニー数/プレートの値は3反復の平均値 \pm 標準偏差、生菌数の値は2反復の平均値

バッチ1: NLL 6100-3 バッチ2: 30034708

/: 試験実施せず *: 生菌数の減少が認められた

陽性対照物質

Na-azide: アジ化ナトリウム 2-AA: 2-アミノアントラセン

2 回目試験

バッチ	薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9 mix の 有無	復帰変異コロニー数 /プレート	生菌数 ($\times 10^8/\text{mL}$)
				塩基対置換型	
				TA1535	
バッチ 1	溶媒対照 (DMSO)	0	-	9 \pm 3	/
	クロチアニジン	1000	-	9 \pm 2	/
		2000	-	12 \pm 1	/
		4000	-	10 \pm 5	/
		6000	-	8 \pm 4	/
		8000	-	9 \pm 3	/
	溶媒対照 (DMSO)	0	+	10 \pm 2	15.6
	クロチアニジン	1000	+	10 \pm 1	16.7
		2000	+	11 \pm 1	17.6
		4000	+	14 \pm 2	15.5
		6000	+	9 \pm 2	10.1*
8000 #		+	7 \pm 1	6.5*	
陽性対照	Na-azide	10	-	626 \pm 62	18.0
陽性対照	2-AA	3	+	302 \pm 16	16.0
バッチ 2	溶媒対照 (DMSO)	0	-	11 \pm 4	/
	クロチアニジン	1000	-	11 \pm 2	/
		2000	-	8 \pm 3	/
		4000	-	9 \pm 2	/
		6000	-	8 \pm 1	/
		8000	-	9 \pm 4	/
	溶媒対照 (DMSO)	0	+	10 \pm 2	15.8
	クロチアニジン	1000	+	12 \pm 1	15.5
		2000	+	13 \pm 4	16.1
		4000	+	10 \pm 4	15.2
		6000	+	11 \pm 1	6.6*
8000 #		+	12 \pm 4	5.4*	
陽性対照	Na-azide	10	-	672 \pm 63	17.1
陽性対照	2-AA	3	+	296 \pm 18	14.3

表中の復帰変異コロニー数/プレートの値は 3 反復の平均値 \pm 標準偏差、生菌数の値は 2 反復の平均値

バッチ 1: NLL 6100-3、バッチ 2: 30034708

/: 試験実施せず * : 生菌数の減少が認められた # : 検体の析出が認められた
陽性対照物質

Na-azide : アジ化ナトリウム 2-AA : 2-アミノアントラセン

(22) クロチアニジンのチャイニーズハムスター肺由来細胞(V79)を用いた
H P R T 遺伝子座突然変異試験 (V79-HPRT 試験) (資料 1-22)

試験機関 : Bayer AG (独国)

[G L P 対応]

報告書作成年 : 1999 年

検体の純度 :

試験方法 : チャイニーズハムスター肺由来の V79 細胞を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性系(S-9 Mix)の存在下及び非存在下で、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)遺伝子座における突然変異を検定した。

試験は2連制とし、2回行った。

試験結果 : 結果を次表に示した。

実験2のS-9 Mix 存在下、2500 μ g/mL 濃度において軽度な突然変異頻度の増加が認められたが、一方、実験1ではその頻度が増加しなかったこと(再現性なし)、また用量相関性も認められなかったことより突然変異の誘発性はないものと考えられた。

以上より、2回の実験において検体はS-9 Mixの有無にかかわらず、最高用量(5000 μ g/mL)においても、突然変異頻度の増加は見られなかった。

一方、S-9 Mix 存在下での陽性対照として用いたジメチルベンズアントラセン(DMBA)及びS-9 Mix 非存在下の陽性対照として用いたエチルメタンサルフォネート(EMS)では明らかな突然変異頻度の増加を示した。

以上の結果より、クロチアニジンは代謝活性化を含む本試験条件下で突然変異誘発性を有しないものと判断される。

本試験結果表-1

(表中の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S-9 Mix の有無	総突然変異 コロニー数	コロニー効率 (%)
溶媒対照 (DMSO)	-	-	2.0	66.5
クロチアニジン	156	-	6.0	69.9
	313	-	2.5	58.2
	625	-	3.0	63.9
	1250	-	4.0	72.3
	2500	-	1.5 ^{P)}	79.0
	5000	-	1.5 ^{P)}	67.4
溶媒対照 (DMSO)	-	+	6.5	83.9
クロチアニジン	156	+	3.0	90.7
	313	+	2.5	90.0
	625	+	4.5	87.5
	1250	+	5.5	88.7
	2500	+	7.5 ^{P)}	89.0
	5000	+	1.5 ^{P)}	70.6
陽性対照	EMS (900)	-	471.5*	59.4
	DMBA (20)	+	88.0*	74.1

Dunnett's test、* : $p < 0.05$ 、^{P)} : 沈殿が認められた

DMSO : ジメチルスルホキシド

EMS : エチルメタンサルホネート

DMBA : ジメチルベンズアントラセン

本試験結果表-2

(表中の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S-9 Mix の有無	総突然変異 コロニー数	コロニー効率 (%)
溶媒対照 (DMSO)	-	-	8.0	102.7
クロチアニジン	156	-	14.5	94.8
	313	-	7.0	91.9
	625	-	8.0	93.1
	1250	-	3.0	98.6
	2500	-	10.5 ^{p)}	81.3
	5000	-	14.5 ^{p)}	86.6
溶媒対照 (DMSO)	-	+	2.5	91.7
クロチアニジン	156	+	3.5	84.9
	313	+	2.5	81.3
	625	+	1.0	81.5
	1250	+	2.5	70.3
	2500	+	11.0 ^{p)}	77.8
	5000	+	3.0 ^{p)}	103.3
陽性対照	EMS (900)	-	982.0*	49.6
	DMBA (20)	+	78.5*	78.3

Dunnett's test、* : $p < 0.05$ 、^{p)} : 沈殿が認められた

DMSO : ジメチルスルホキシド

EMS : エチルメタンサルホネート

DMBA : ジメチルベンズアントラセン

(23) クロチアニジンのチャイニーズハムスター細胞 (V79) を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 1-23)

試験機関：RCC-Cytotest Cell Research GmbH

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

検 体：クロチアニジン

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター細胞 (V79) 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-チオグアニン存在下で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。試験は 2 連制とし、試験 1 では S9 mix 存在下および非存在下ともに細胞を検体で 4 時間処理した。試験 2 では S9 mix 非存在下において細胞を検体で 24 時間処理した。

結 果：結果を次表に示した。

いずれの濃度においても検体処理と関連する突然変異率の増加は認められなかった。なお、試験 1 の S9 mix 非存在下の 1250.0 µg/mL および 2500.0 µg/mL、および試験 2 の S9 mix 非存在下の 1000.0 µg/mL において、2 連中 1 枚のシャーレで溶媒対照値の 3 倍を超える突然変異率が認められた。しかしながら、もう 1 枚のシャーレにおいて同様の影響はみられず、いずれもシャーレ間の再現性は認められなかった。1250.0 µg/mL (試験 1) および 1000.0 µg/mL (試験 2) における増加に濃度依存性は認められず、1250.0 µg/mL および 2500.0 µg/mL (試験 1) においては、溶媒対照値の低値 (2.6 および 2.8/10⁶ 細胞) に起因するものと考えられた。従って、これらの突然変異率の増加に生物学的意義はないと考えられた。

一方、陽性対照物質であるエチルメタンサルホン酸および 7, 12-ジメチルベンズアントラセンでは明らかな突然変異率の増加が認められた。

以上の結果から、クロチアニジンは代謝活性化を含む本試験条件下において、突然変異誘発性を有しないものと判断された。

試験1 (上段:シャーレ1, 下段シャーレ2)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理時間 (h)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	相対コロニー 形成率 ^{b)} (%)	突然 変異率 ^{c)} ($/10^6$ 細胞)
陰性対照 (培養液)	0	4	-	100.0 100.0	100.0 100.0	3.3 2.9
溶媒対照 (DMSO)	0	4	-	100.0 100.0	100.0 100.0	2.8 2.6
クロチアニジン	156.3	4	-	102.6 95.9	76.0 103.3	7.2 3.6
	312.5	4	-	99.5 92.3	83.7 89.8	0.9 6.1
	625.0	4	-	90.3 87.5	86.7 105.5	7.3 1.5
	1250.0 ^P	4	-	0.9 4.8	87.3 98.7	6.7 9.2
	2500.0 ^P	4	-	13.2 7.0	93.1 111.1	9.6 3.3
陽性対照 (EMS)	150.0	4	-	53.2 68.2	58.9 55.8	209.2 173.3
陰性対照 (培養液)	0	4	+	100.0 100.0	100.0 100.0	3.5 5.1
溶媒対照 (DMSO)	0	4	+	100.0 100.0	100.0 100.0	7.7 4.0
クロチアニジン	156.3	4	+	98.7 98.4	103.3 105.7	7.1 4.7
	312.5	4	+	96.8 93.6	105.0 100.2	1.7 4.4
	625.0	4	+	100.2 94.3	120.4 112.0	7.9 3.7
	1250.0	4	+	84.1 89.7	115.3 115.7	2.2 2.2
	2500.0 ^P	4	+	90.4 92.4	103.9 109.3	2.9 3.7
陽性対照 (DMBA)	2.7	4	+	50.7 52.6	80.3 79.1	833.9 770.5

EMS : エチルメタンサルホン酸 DMBA : 7,12-ジメチルベンズアントラセン

P : 検体の析出が認められた。

- a) : 相対細胞生存率 = (処理直後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の処理直後の生存コロニー数) $\times 100$ 、2 反復の平均値
 b) : 相対コロニー形成率 = (発現期間後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の発現期間後の生存コロニー数) $\times 100$ 、2 反復の平均値
 c) : 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 $\times 10^6$ / (接種細胞数 \times コロニー形成率))、5 反復の平均値 (ただし、コロニー形成率 : (コロニー数 / 接種細胞数))

試験 2 (上段:シャーレ 1, 下段シャーレ 2)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理時間 (h)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	相対コロニー 形成率 ^{b)} (%)	突然 変異率 ^{c)} ($/10^6$ 細胞)
陰性対照 (培養液)	0	24	—	100.0 100.0	100.0 100.0	12.0 8.2
溶媒対照 (DMSO)	0	24	—	100.0 100.0	100.0 100.0	18.8 8.8
クロチアニジン	125.0	24	—	87.0 103.3	92.1 104.9	14.7 10.2
	250.0	24	—	77.3 96.2	94.3 101.1	18.0 14.0
	500.0	24	—	26.2 25.6	87.3 102.8	13.7 6.6
	750.0	24	—	1.6 1.3	89.4 102.2	19.3 15.2
	1000.0	24	—	0.0 0.0	78.0 58.2	19.8 28.1
	1500.0 ^P	24	—	0.0 0.0	60.3 45.1	24.8 23.4
陽性対照 (EMS)	150.0	24	—	74.3 59.2	40.9 49.9	838.9 689.4

EMS : エチルメタンサルホン酸

P : 検体の析出が認められた。

a) : 相対細胞生存率 = (処理直後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の処理直後の生存コロニー数) $\times 100$ 、2 反復の平均値

b) : 相対コロニー形成率 = (発現期間後の生存コロニー数 / 溶媒対照群の発現期間後の生存コロニー数) $\times 100$ 、2 反復の平均値

c) : 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 $\times 10^6$ / (接種細胞数 \times コロニー形成率))、5 反復の平均値 (ただし、コロニー形成率 : (コロニー数 / 接種細胞数))

(24) クロチアニジンのマウスリンパ腫 L5178Y 細胞を用いた遺伝子突然変異試験

(資料 1-24)

試験機関 : Safeparm Laboratories Limited

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2000 年

検 体 : クロチアニジン

検体純度 :

試験方法 : マウスリンパ腫 L5178Y 細胞を用い、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、5-トリフルオロチミジン (TFT) 存在下でのコロニー増殖を指標とするチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子座の突然変異誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、S9 mix 存在下および非存在下ともに、検体で 3 時間処理した。試験は 2 連制とし、2 回行った。

試験結果 : 結果を次表に示した。

試験 1、2 とも、用量相関性のある細胞毒性が認められた。試験 1 では、S9 mix 存在下あるいは非存在下のいずれにおいても、検体は突然変異頻度の統計学的に有意な増加を誘発せず、用量相関性も認められなかった。しかしながら、S9 mix 存在下および非存在下の 1667 µg/mL の濃度において、溶媒対照群の背景値の上限 (125×10^{-6} / 生存細胞) を上回る突然変異頻度の増加が認められた。

試験 2 では、S9 mix 存在下の 2000、2400 µg/mL、S9 mix 非存在下の 1600 µg/mL において、検体は突然変異頻度の統計学的に有意な増加を誘発し、用量相関性も認められた。S9 mix 存在下および非存在下ともに変異体の小コロニーの誘発頻度が顕著に増加していた。

なお、陽性対照として用いたエチルメタンサルホン酸 (S9 mix 非存在下) およびシクロホスファミド (S9 mix 存在下) では、突然変異頻度の顕著な増加が認められた。

以上の結果より、クロチアニジンは、代謝活性化を含む本試験条件下において遺伝子突然変異誘発性を有すると判断された。いずれも変異体の小コロニーの誘発頻度が顕著に増加していたことから、染色体異常誘発性によるものと示唆された。

試験 1

(表中の値は2反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 (%)	相対総 増殖率	突然変異 頻度 ^{a)}	変異体中の 小コロニーの 割合
溶媒対照 (DMSO)	0	-	100.00	1.00	108.76	0.61
クロチア ニジン	312.5	-	97.72	1.09	133.17	0.61
	625	-	94.42	1.12	72.70	0.68
	1250	-	72.88	0.82	137.44	0.74
	1667	-	22.46	0.14	179.65	0.86
	2500	-	1.43	0.01	123.42	1.00
用量相関性	NS					
陽性対照 (EMS)	800	-	52.28	0.44	1172.55	0.37
溶媒対照 (DMSO)	0	+	100.00	1.00	85.14	0.51
クロチア ニジン	312.5	+	89.56	0.89	75.79	0.50
	625	+	99.34	1.26	68.56	0.39
	1250	+	91.97	1.13	49.87	0.41
	1667	+	56.78	0.87	133.77	0.71
	2500 \$\$	+	8.77	0.05	(493.31)	0.74
用量相関性	NS					
陽性対照 (CP)	7.5	+	53.86	0.51	573.74	0.72

a) : TFT (5-トリフルオロチミジン) 耐性変異体/ 10^6 生存細胞

\$\$: 2反復間で過度に不均一であったため統計解析から除外

DMSO : ジメチルスルホキシド

EMS : エチルメタンサルホン酸

CP : シクロホスファミド

検体の統計解析には UKEMS (英国環境変異原性学会) 推奨の方法を用いた。

突然変異頻度 : Dunnett の検定 (片側)、用量相関性 : X^2 検定 (片側)

NS : 有意性なし

試験 2

(表中の値は 2 反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 (%)	相対総 増殖率	突然変異 頻度 ^{a)}	変異体中の 小コロニーの 割合
溶媒対照 (DMSO)	0	-	100.00	1.00	93.50	0.31
クロチア ニジン	300	-	126.91	1.13	87.08	0.37
	600	-	101.84	0.95	109.21	0.34
	1200	-	79.01	0.95	117.66	0.56
	1600	-	31.28	0.30	272.04*	0.52
	2000	-	3.42	0.02	179.62	0.69
用量相関性	**					
陽性対照 (EMS)	800	-	80.89	0.45	1091.35	0.29
溶媒対照 (DMSO)	0	+	100.00	1.00	94.09	0.29
クロチア ニジン	600	+	83.22	0.96	108.22	0.33
	1200	+	88.25	1.00	115.86	0.31
	1600	+	79.24	0.93	94.72	0.33
	2000	+	57.81	0.67	217.03*	0.55
	2400	+	19.03	0.26	307.28*	0.57
用量相関性	**					
陽性対照 (CP)	7.5	+	58.65	0.59	387.18	0.47

a) : TFT (5-トリフルオロチミジン) 耐性変異体/ 10^6 生存細胞

DMSO : ジメチルスルホキシド

EMS : エチルメタンサルホン酸

CP : シクロホスファミド

検体の統計解析には UKEMS (英国環境変異原性学会) 推奨の方法を用いた。

突然変異頻度 : Dunnett の検定 (片側)、用量相関性 : X^2 検定 (片側)

* : $P < 0.05$

** : $P < 0.01$

(25) クロチアニジンのチャイニーズハムスター肺CHL細胞を用いた
in vitro 染色体異常試験

(資料 1-25)

試験機関：Safeparm Laboratories (英国)
[GLP対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの継代培養した肺CHL細胞を用い、代謝活性化及び非代謝活性化によっ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。

1 濃度あたり 200 個の分裂中期像について観察し、下記の通り実験を行った。

実験 1：①直接法 12 時間処理、②代謝活性化法 4 時間処理 (4 時間の検体処理後、検体を含まない培地で 8 時間培養)

実験 2-1：①直接法 24 時間処理、②直接法 48 時間処理

実験 2-2：①代謝活性化法 6 時間処理 (6 時間の検体処理後、検体を含まない培地で 18 時間培養) およびその S-9 Mix の比較対照群 (検体を 6 時間処理後、検体を含まない培地で 18 時間培養。ただし S-9 Mix を含めずに検体処理)

実験 2-3：①直接法 12 時間処理及び②代謝活性化法 4 時間処理 (4 時間の検体処理後、検体を含まない培地で 8 時間培養)
(実験 2-3 は EU ガイドラインに基づいた実験 1 の繰り返し試験)

染色体または染色分体にみられる構造的異常 (ギャップ、切断、交換型異常など) 及び数的異常 (倍数体) などを計数した。

陽性対照については直接法ではマイトマイシン C (MMC) を、また代謝活性化法についてはシクロホスファミド (CP) を使用した。

試験結果：結果を次表に示した。

実験 1 では直接法及び代謝活性化法ともにいずれの処理時間においても

何ら染色体異常の誘発は認められなかった。

実験 2 では直接法 48 時間処理及び代謝活性化法 6 時間処理(その後 18 時間培養)の高用量群において有意な染色体の構造的異常数の増加が認められた。一方、クロチアニジンはいずれの処理条件下においても CHL 細胞に対して急な濃度反応曲線を示しながら毒性を示した。

以上の結果より、クロチアニジンはチャイニーズハムスター肺 CHL 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験において染色体異常の誘発が示唆された。

結果：実験1：直接法12時間処理[12]及び代謝活性化法4時間(その後検体を含まない培地で8時間培養)処理[4(8)]

薬物	S-9Mix の有無 [時間]	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	倍数体 細胞数 (%)	判定	構造的異常数(%)								判定	
						gap	ctb	cte	csb	cse	other	total(-g)	total(+g)		
溶媒対照 (DMSO)	-	0	100	2	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-	
			100	0		0	0	0	0	0	0				
			200	2(1.0)		1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)			
	+	0	100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-	
			100	2		1	0	0	0	0	1				
			200	2(1.0)		1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	2(1.0)		
クロチアゾリン	-	156.25	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0		0	0	1	0	0	1				
			200	1(0.5)		0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		
		312.5	100	2	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0		0	0	0	0	0	0	0			
			200	2(1.0)		0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		625	100	1	-	1	0	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	1		0	0	0	0	0	0	0			
			200	2(1.0)		1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)			
	937.5	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	0	1	-	
		100	0		0	0	0	0	0	0	0				
		200	0(0.0)		1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)			
	+	937.5	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0		1	0	0	0	0	1				
			200	0(0.0)		1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)			
		1250	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	3		0	0	0	0	0	0				
			200	3(1.5)		0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
1875		100	0	-	0	3	0	0	0	0	3	3	-		
		100	1		0	0	0	0	0	0	0				
		200	1(0.5)		0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	3(1.5)			
陽性対照 (MMC)	-	0.075	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-	
			100	3		0	0	1	0	0	1	1			
			200	3(1.5)		1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	2(1.0)		
陽性対照 (CP)	+	10	100	0	-	0	1	3	0	1	0	4	4	-	
			100	0		1	0	0	0	0	0	1			
			200	0(0.0)		1(0.5)	1(0.5)	3(1.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	4(2.0)	5(2.5)		

結果：実験 2-1：直接法 24 時間処理[24]及び直接法 48 時間処理[48]

薬物	S-9Mix なし [時間]	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	倍数体 細胞数 (%)	判定	構造的異常数(%)								判定
						gap	ctb	cte	csb	cse	other	total(-g)	total(+g)	
溶媒対照 (DMSO)	[24]	0	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0		1	1	0	0	0	1	2		
			200	0(0.0)		1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	2(1.0)		
	[48]	0	100	0		2	0	0	0	1	0	1	3	
			100	4		0	0	0	0	0	0			
			200	4(2.0)		2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	3(1.5)	
コチアニン	[24]	312.5	100	1	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	3		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	4(2.0)		1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	
		625	100	0	-	0	2	1	0	0	0	3	3	+
			100	0		2	3	2	0	0	5	7		
			200	0(0.0)		2(1.0)	5(2.5)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8*(4.0)	10*(5.0)	
	937.5	100	1	-	4	2	0	0	0	0	2	5	-	
		100	0		1	1	0	0	1	0	2	3		
		200	1(0.5)		5(2.5)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	4(2.0)	8(4.0)		
	[48]	156.25	100	0	-	2	0	0	0	0	0	0	2	-
			100	3		0	0	0	0	1	0	1	1	
			200	3(1.5)		2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	3(1.5)	
		312.5	100	0	-	0	1	1	0	0	0	2	2	-
			100	0		1	0	1	0	0	1	2		
			200	0(0.0)		1(0.5)	1(0.5)	2(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	4(2.0)	
	625	100	3	-	13	9	2	0	0	0	11	24	+	
		100	4		17	7	3	0	0	8	23			
		200	7(3.4)		30(15.0)	16(8.0)	5(2.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	19*** (9.5)	47*** (23.5)		
陽性対照 (MMC)	[24]	0.05	50	1	-	8	10	12	0	1	0	19	23	+
			100	2		9	19	12	0	0	25	32		
			150	3(2.0)		17(11.3)	29(19.3)	24(16.0)	0(0.0)	1(0.7)	0(0.0)	44*** (29.3)	55*** (36.7)	
	[48]	0.025	100	1	-	2	5	16	0	0	0	19	21	+
			50	0		5	6	12	0	0	17	20		
			150	1(0.7)		7(4.7)	11(7.3)	28(18.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	36*** (24.0)	41*** (27.3)	

* : p<0.05、*** : p<0.001

結果：実験 2-2：代謝活性化法 6 時間（その後検体を含まない培地で 18 時間培養）処理[6(18)]及び比較対照

薬物	S-9Mix の有無 [時間]	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	倍数体 細胞数 (%)	判定	構造的異常数(%)								判定
						gap	ctb	ctc	csb	cse	other	total(-g)	total(+g)	
溶媒対照 (DMSO)	-	0	100	5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0		0	0	0	0	0	0	0		
			200	5(2.4)		0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
	+	0	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-
			100	0		2	2	0	0	0	2	4		
			200	0(0.0)		3(1.5)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	6(3.0)		
クロチアジン	-	312.5	100	2	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-
			100	3		0	0	0	0	0	0	0		
			200	5(2.4)		0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		
		625	100	2	-	2	0	0	0	0	0	0	2	-
			100	6		4	2	0	0	0	2	6		
			200	8(3.8)		6(3.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	8(4.0)		
	1250	100	1	-	1	2	1	0	1	0	4	5	±	
		100	2		2	1	2	0	1	4	6			
		200	3(1.5)		3(1.5)	3(1.5)	0(0.0)	2(1.0)	1(0.5)	8**(4.0)	11*** (5.5)			
	+	625	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	5		0	0	1	0	1	1	1		
			200	6(2.9)		0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	
		1250	100	2	-	0	0	2	0	0	0	2	2	-
			100	2		0	0	0	0	0	0	0		
			200	4(2.0)		0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	
	1875	100	2	-	11	13	16	0	0	3	23	28	+	
		66	4		7	4	10	0	0	3	15	15		
		166	6(3.5)		18(10.8)	18(10.2)	26(15.7)	0(0.0)	0(0.0)	6(3.6)	38*** (22.9)	43*** (25.9)		
陽性対照 (CP)	-	10	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	1		2	0	1	0	0	1	3		
			200	1(0.5)		2(1.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)		3(1.5)
	+	10	50	0	-	7	21	29	2	0	7	43	43	+
			50	0		9	22	21	3	0	11	41	44	
			100	0(0.0)		16(16.0)	43(43.0)	50(50.0)	5(5.0)	0(0.0)	18(18.0)	84*** (84.0)	87*** (87.0)	

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$

結果：実験 2-3：直接法 12 時間処理[12]及び代謝活性化法 4 時間(その後検体含まない培地で 8 時間培養)処理[4(8)]

薬物	S-9Mix の有無 [時間]	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	倍数体 細胞数 (%)	判定	構造的異常数(%)								判定
						gap	ctb	cte	csb	cse	other	total(-g)	total(+g)	
溶媒対照 (DMSO)	-	0	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	1		0	0	0	0	0	0	0		
			200	1(0.5)		0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
	+	0	100	0		1	0	2	0	0	0	2	2	
			100	0		0	0	0	0	0	0			
			200	0(0.0)		1(0.5)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	
クロチニジン	-	312.5	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	1		0	0	0	0	0	0	0		
			200	2(1.0)		0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		625	100	2	-	0	0	1	0	0	0	1	1	-
			100	0		1	0	0	0	0	0	1		
			200	2(1.0)		1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	2(1.0)	
	937.5	100	0	-	2	1	2	0	0	0	3	4	-	
		100	1		0	0	1	0	0	1	1			
		200	1(0.5)		2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	5*(2.5)		
	+	937.5	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	0		0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)		1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)		
		1250	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0		0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
	1562.5	100	2	-	0	1	7	0	0	0	7	7	+	
		100	1		1	1	2	0	0	3	4			
		200	3(1.5)		1(0.5)	2(1.0)	9(4.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	10*(5.0)	11*(5.5)		
陽性対照 (MMC)	-	0.075	100	0	-	1	0	1	0	0	1	2	-	
			100	0		2	2	2	0	0	4	6		
			200	0(0.0)		3(1.5)	2(1.0)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5*(2.5)		8**(4.0)
陽性対照 (CP)	+	10	100	1	-	4	22	15	0	0	0	34	34	+
			100	1		3	12	7	0	0	16	17		
			200	2(1.0)		7(3.5)	34(17.0)	22(11.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	50*** (25.0)	51*** (25.5)	

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

total(-g) : ギャップを除いた構造的異常を有する細胞の出現率、total(+g) : ギャップを含めた構造的異常を有する細胞の出現率

ctb : 染色体型切断、cte : 染色体型交換、csb : 染色体型切断、cse : 染色体型交換、other : その他 (断片化等) MMC : マイトマイシンC、CP : シクロホスファミド

(26) クロチアニジンのチャイニーズハムスター細胞(V79)を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 1-26)

試験機関：RCC-Cytotest Cell Research GmbH

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

検 体：クロチアニジン

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター細胞(V79)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)に溶解して用いた。

観察は1濃度あたり200個(但し、S9 mix存在下における500 µg/mLの濃度のみ400個)の分裂中期像について行い、試験は1回行った。

試験結果：結果を次表に示した。

S9 mix 存在下では、500 µg/mLの濃度において、構造異常を示す細胞の出現頻度(3.8%)に統計学的に有意な増加が認められたが、この値は溶媒対照群の背景値の範囲内(0.0~4.0%)であり、生物学的意義はないと考えられた。

S9 mix 非存在下では、1500 および 2000 µg/mLの濃度において、構造異常を有する細胞の出現頻度(8.0%および 24.0%)に統計学的に有意な増加が認められた。これらの値は溶媒対照群の背景値の範囲(0.0~4.0%)を超え、増加には用量相関性が認められた。S9 mix 存在下および非存在下のいずれにおいても倍数体細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

なお、陽性対照として用いたエチルメタンサルホン酸(EMS)およびシクロホスファミド(CP)では、構造異常を示す分裂中期細胞の明らかな増加が認められた。

以上の結果より、クロチアニジンは *in vitro* でチャイニーズハムスター細胞(V79)に対して、S9 mixの非存在下において染色体異常誘発性を有すると判断された。

薬物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理時間 (h)	標本作製時間 (h)	S9 mix の有無	増殖率 (%)	観察細胞数	構造異常													a) 数的異常 (%)				
							異常数											異常細胞(%)						
							ギャップ		染色分体型				染色体型				その他		+G		-G			
							染色分体	染色分体	切断	断片化	欠失	交換	切断	断片化	欠失	交換	多重異常	粉砕						
溶媒 対照 (DMSO)	0.5%				100	200	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.5	1.3
クロチニ ジン	750	4	18	-	71	200	4	0	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2.0	1.5	2.6	
	1000				51	200	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2.0	1.0	2.5	
	1500 ^P				52	200	5	0	1	4	0	12	0	1	1	0	0	0	0	0	0	9.5	8.0*	2.3
	2000 ^P				45	200	7	2	18	10	0	24	13	3	0	0	0	0	0	0	0	25.5	24.0*	1.1
陽性 対照 (EMS)	200				NT	200	0	0	7	6	0	6	1	1	0	0	1	0	10.5	10.5*	2.4			
溶媒 対照 (DMSO)	0.5%				100	200	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.5	1.3		
クロチニ ジン	500	4	18	+	91	400 ^{b)}	2	1	5	2	0	10	0	1	0	0	1	0	4.5	3.8*	1.1			
	750 ^P				103	200	2	0	1	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3.0	2.0	1.0		
	1000 ^P				105	200	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1.5	1.5	3.9	
陽性 対照 (CP)	0.7				NT	200	6	0	11	1	0	12	3	0	0	0	1	0	15.5	13.0*	1.7			

対照群との有意差検定は Fisher の直接確率検定を用いて行った。

* : $P < 0.05$

EMS : エチルメタンサルホン酸 CP : シクロホスファミド

+G : ギャップを含む異常 -G : ギャップを除く異常

a) : 各群 1000 個の細胞について調べた。

b) : 不均一な結果であったため、400 個の細胞 (各プレート 200 個) を観察した。

P : 処理終了時に検体の析出が認められた。

NT : 測定せず

(27) 小核試験

クロチアニジンのマウスを用いた *in vivo* 染色体異常試験

(資料 1-27)

試験機関 : Safeparm Laboratories (英国)
[G L P 対応]

報告書作成年 : 2000 年

検体の純度 :

試験動物 : アルビノ CD-1 系マウス (約 5~7 週齢、体重 雄 21~26g、雌 20~25g)
1 群雌雄各 5 匹

試験方法 : 検体を落花生油に溶解し、25、50 及び 100mg/kg の投与レベルで、強制的に 1 回経口投与した。なお対照群には落花生油を同様に投与した。

投与 24、48 及び 72 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髓を採取してスライドガラス上にメタノールで固定後、メイグリュワード/ギムザ染色し骨髓標本作製した。

陽性対照群は 24 時間後に動物を屠殺し、検体投与群と同様に検査した。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。

試験結果 : 骨髓標本の観察結果を次表に示した。

100mg/kg 投与群の雌 3 例に死亡が認められた。25、50 及び 100mg/kg 投与群雌雄において円背位、呼吸低下及び困難、眼瞼下垂及び嗜眠が認められた。

雌雄いずれの標本採取時間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増加は認められなかった。なお、陽性対照である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増加が認められた。

表：観察結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察動物数	MNPCE (‰) (平均値+S. D.)	PCE/NCE (平均値+S. D.)
24	陰性対照 (落花生油)	-	雌雄各 5 匹	0.7±1.5	1.74±0.59
	クロチアニジン	25	雌雄各 5 匹	0.7±1.1	2.05±0.70
		50		0.2±0.4	1.56±0.45
		100		0.2±0.4	1.66±0.58
陽性対照 (シクロホスファミド)	50	雌雄各 5 匹	35.4±9.3***	1.27±0.31*	
48	陰性対照 (落花生油)	-	雌雄各 5 匹	0.2±0.4	1.49±0.51
	クロチアニジン	25	雌雄各 5 匹	0.5±0.8	1.31±0.62
		50		0.3±0.5	1.43±0.59
		100		0.3±0.5	1.46±0.38
72	陰性対照 (落花生油)	-	雌雄各 5 匹	0.7±1.2	1.31±0.26
	クロチアニジン	25	雌雄各 5 匹	0.3±0.5	1.13±0.37
		50		0.6±0.7	1.44±0.34
		100		0.2±0.4	1.18±0.24

Student's t 検定：*：P<0.05、**：P<0.01、***：P<0.001、値は平均値

PCE：多染性赤血球、NCE：正染性赤血球、

MNPCE：多染性赤血球 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

以上の結果より、本試験条件下において、クロチアニジン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。

(28) クロチアニジンのマウスを用いた小核試験

(資料 1-28)

試験機関：RCC-Cytotest Cell Research GmbH

[GLP 対応]

報告書作成年：2003 年

検 体：クロチアニジン

検体純度：

供試動物：NMRI 系マウス（馴化開始時週齢；雄 5～7 週齢、雌 7～9 週齢（馴化期間最低 5 日間）、投与時体重（平均値±SD）；雄 39.4±2.8 g、雌 33.5±1.8 g）、1 群雌雄各 5 匹（投与動物数は雌雄各 6 匹、そのうち雌雄各 5 匹について標本の観察を行った）

試験方法：溶媒として 0.5%クレモフォルを用い、50、100 および 200 mg/kg の投与量で、単回腹腔内投与した。なお、溶媒対照群には 0.5%クレモフォルのみを同様に投与した。投与 24 時間後（50、100、200 mg/kg）および 48 時間後（200 mg/kg）に動物を安楽死させ、各動物から大腿骨の骨髓を採取して、スライドグラス上で風乾後、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色し骨髓標本を作製した。細胞毒性を調べるために各個体あたり 2000 個の赤血球（多染性赤血球および正染性赤血球）を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した。また、各個体あたり 2000 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。

試験結果：骨髓標本の観察結果を次表に示した。

雄の 200 mg/kg 群（24 時間群および 48 時間群）12 匹中において、投与 2-4 時間後の 1 匹に振戦が認められ、投与 6 時間後 2 匹に死亡が認められた。雌雄共に全ての検体投与群において毒性症状（自発運動減少、腹臥、閉眼、立毛）が認められた。

雌雄いずれの標本採取時間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増加は認められなかった。また、全赤血球中の多染性赤血球数の割合にも有意な変化はみられず、検体は骨髓細胞に毒性を示さないと考えられた。

一方、陽性対照である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増加が認められた。

以上の結果から本試験条件下において、クロチアニジンはマウス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た。

観察結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE ^{a)} % (平均値±SD*)	PCE/(PCE+NCE) ^{b)} % (平均値±SD**)
24	溶媒対照 (0.5%クロモフォル)	0 ^{c)}	雌雄各 5 匹	0.040±0.066	53.5±4.70
	クロチアニジン	50	雌雄各 5 匹	0.040±0.057	51.8±4.26
		100	雌雄各 5 匹	0.040±0.039	50.8±3.27
		200	雌雄各 5 匹	0.060±0.066	50.9±5.14
	陽性対照 (シクロホスファミド*)	40	雌雄各 5 匹	1.490±0.523#	52.9±2.49
48	クロチアニジン	200	雌雄各 5 匹	0.030±0.026	51.7±4.72

統計学的解析：小核を有する多染性赤血球の出現頻度について、Mann-Whitney の検定を用いて溶媒対照群との有意差検定を行った (# : P < 0.05)。

PCE : 多染性赤血球、 NCE : 正染性赤血球、

MNPCE : 小核を有する多染性赤血球

- a) 1 個体につき 2000 個の多染性赤血球を観察した。
- b) 1 個体につき 2000 個の赤血球を観察した。
- c) 10 mL/kg

* [申請者注] MNPCE の SD 値は報告書には記載されていないが、動物毎の個別データより算出して記載した。

** [申請者注] PCE/(PCE+NCE) の平均値および SD 値は報告書には記載されていないが、動物毎の個別データより算出して記載した。

(29) クロチアニジンのラット肝細胞を用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

(資料 1-29)

試験機関 : Bayer AG (独国)

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1999 年

検体の純度 :

試験動物 : Cr1 : (WI)BR(SPF)系ラット (10~14 週齢、体重 120~140g)、
1 群雄各 4~6 匹

試験方法 : 検体を 0.5%クレモフォル(コーンオイル)溶液に懸濁し、2500 及び 5000mg/kg
の投与レベルで 1 回強制経口投与した。なお対照群には 0.5%クレモフォル
溶液を同様に投与した。

投与後 4 及び 16 時間後、それぞれの動物の肝臓を *in situ* 灌流し、遊離した
肝細胞を ³H-チミジン (15.3~15.6Ci/mmole) を含んだ培地で 37°C、90 分
間培養した。放射能標識した肝細胞のオートラジオグラムを作製し、ヘマ
トキシリン・エオジンで染色されたネットグレイ数測定した。1 動物当
たり 3 枚の標本作製し、1 標本につき 50 個の細胞を観察した。

陽性対照として 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) 及び N,N'-ジメチルヒ
ドラジン (DMH) を使用した。

試験結果 : 結果を次表に示した。

5000mg/kg 投与群において粗毛、痙攣、振戦、過呼吸などの症状が認められ
た。細胞毒性についてはいずれの投与群においても認められなかった。

検体を 4 及び 16 時間暴露後、核内ネットグレイ数の増加は対照群と比較
して認められなかった。

陽性対照である 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) 及び N,N'-ジメチル
ヒドラジン (DMH) では核内ネットグレイ数の有意な増加が認められ、本
試験系の感受性が高いことが確認された。

以上の結果より、クロチアニジンはラット肝細胞を用いた *in vivo* での UDS 試験において DNA
の損傷は誘発しないと判断される。

結果：

(表中の数値は各群の平均値)

1. 群あたりの平均グレイン数 (検体 4 時間暴露)

群	濃度 (mg/kg)	検体 4 時間暴露		
		核内ネット グレイン数	核内 グレイン数	細胞質内 グレイン数
溶媒対照	-	-0.96	1.58	2.85
クロチアニジン	2500	-0.78	2.92	2.95
	5000	-0.99	2.63	3.62
陽性対照	DMH(40)	2.78	6.26	3.51

2. 群あたりの平均グレイン数 (検体 16 時間暴露)

群	濃度 (mg/kg)	検体 16 時間暴露		
		核内ネット グレイン数	核内 グレイン数	細胞質内 グレイン数
溶媒対照	-	-1.06	1.94	3.00
クロチアニジン	2500	-0.62	3.92	4.55
	5000	-0.94	3.54	4.48
陽性対照	2-AAF(100)	5.27	8.12	2.86

申請者註) 各動物 (3 標本) の平均値について統計処理 (Chi2 test) を実施した結果、クロチアニジン投与群では溶媒対照群と比較して有意な差は認められず、陽性対照群については有意な増加 ($p < 0.05$) が認められた。

DMH : N, N'-ジメチルヒドラジン

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

(30) クロチアニジンのラット肝細胞を用いた *in vivo*/*in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS)
試験

(資料 1-30)

試験機関 : RCC-Cytotest Cell Research GmbH

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2003 年

検 体 : クロチアニジン

検体純度 :

供試動物 : Wistar 系雄ラット (Wistar Hanlbm:WIST)、6~10 週齢

体重 (平均値±SD) : 173.0±12.4 g

1 群 3 匹 (1 群 4 匹に投与し、そのうち 3 匹を評価に用いた。)

試験方法 : 溶媒として 0.5%クレモフォールを用い、1000 および 2000 mg/kg の投与量で、強制的に単回経口投与した。なお、溶媒対照群には 0.5%クレモフォールのみを同様に投与した。投与 2 時間および 16 時間後に肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流した後に摘出して肝細胞を分離した。10%牛胎児血清を含むウイリアムズ E 培地 (WME) 中で培養した肝細胞を、メチル-³H-チミジン添加培地中で 4 時間培養し、さらに非標識チミジンを含む WME 培地中で一晩培養した。その後、細胞をメタノール : 酢酸=3 : 1 で固定し、オートラジオグラム用標本を作製した。各群 3 匹の動物について、それぞれ 100 個 (各群 300 個) の肝細胞を観察した。核内総粒子数を計数し、核と同じ面積の細胞質粒子数を差し引いて正味の核内粒子数を求めた。正味の核内粒子数の平均値が 5 個以上の場合に陽性とした。

試験結果 : 結果を次表に示した。

投与 2 時間後および 16 時間後のいずれの検体投与群においても、正味の核内粒子数は溶媒対照群と比較して差は認められなかった。一方、陽性対照であるジメチルヒドラジンおよび 2-アセチルアミノフルオレンは、正味の核内粒子数を明らかに増加させた。

以上の結果から、本試験条件下において、クロチアニジンはラット肝細胞に不定期 DNA 合成を誘発せず、DNA 損傷性を示さないと判断された。

試験結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	核内総粒子数 (平均値±SD)	細胞質粒子数 (平均値±SD)	正味の核内粒子数 ^{a)} (平均値±SD)	判定
2	溶媒対照 (0.5%クレモフォル)	0 ^{b)}	3	16.32± 1.63	28.23± 3.49	-11.91± 1.91	-
	クロチアゼン	1000	3	12.75± 3.62	20.57± 5.10	-7.82± 1.56	-
		2000	3	10.30± 3.49	16.81± 5.47	-6.50± 2.01	-
	陽性対照 (DMH)	40	3	39.86± 5.98	26.26± 2.33	13.59± 3.89	+
16	溶媒対照 (0.5%クレモフォル)	0 ^{b)}	3	23.18± 6.67	39.43± 11.40	-16.25± 4.81	-
	クロチアゼン	1000	3	19.39± 2.80	31.07± 3.42	-11.68± 0.68	-
		2000	3	23.30± 2.52	33.82± 4.27	-10.52± 1.94	-
	陽性対照 (2-AAF)	100	3	48.00± 20.84	31.61± 9.17	16.39± 12.17	+

DMH : ジメチルヒドラジン

2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

a) : 正味の核内粒子数 = 核内総粒子数 (平均値) - 細胞質粒子数 (平均値)

b) : 10 mL/kg

(8) 生体の機能に及ぼす影響

(31) クロチアニジンにおける薬理試験

(資料 1-31)

試験機関：(株)三菱化学安全科学研究所
[GLP対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：

1) 中枢神経系に対する作用

① マウスにおける一般身体状態及び行動に対する作用

試験動物：Crj：CD-1(ICR)系マウス、雄5週齢、体重26.2～32.1g、1群3匹

方法：検体を5%アラビアゴム液に懸濁し、0(溶媒)、12.5、25、50、100、200及び400mg/kgをマウスに経口投与した。経口投与前及び投与0.5、1、3、6時間後と1日後にIrwinの多次元観察法に準じて一般身体状態及び行動を観察した。

結果：結果は次の通りであった。

投与量	結果
0mg/kg (5%アラビアゴム液)	影響なし
12.5mg/kg	影響なし
25mg/kg	影響なし
50mg/kg	自発運動低下、振戦、呼吸深大
100mg/kg	自発運動低下、振戦、呼吸深大、体幹緊張度低下、体温低下、腹臥、散瞳など
200mg/kg	自発運動低下、振戦、呼吸深大、体幹緊張度低下、体温低下、腹臥、散瞳、接触刺激反応低下、握力低下など
400mg/kg	3匹中1匹死亡。自発運動低下、振戦、呼吸深大、体幹緊張度低下、体温低下、腹臥、散瞳、接触刺激反応低下、握力低下、角膜反射抑制、挙尾、チアノーゼなど

② マウスの睡眠時間に対する作用

試験動物：Crj：CD-1(ICR)系マウス、雄5週齢、体重26.2～34.2g、1群8匹

方法：検体を5%アラビアゴム液に懸濁し、0(溶媒)、25、75及び225mg/kgをマウスに経口投与した。経口投与1時間後にヘキソバルビタール80mg/kgを腹腔内投与し、正向反射の消失から回復までの時間を睡眠時間として測定した。

結果：225mg/kg投与で有意な睡眠時間の延長がみられたが、25及び75mg/kg投与では影響は認められなかった。なお、225mg/kg投与で8匹中2匹に死亡が認められた。

③ マウスにおける痙攣誘発作用（電撃痙攣）

試験動物：Crj：CD-1(ICR)系マウス、雄5週齢、体重27.0～32.4g、1群10匹
方法：検体を5%アラビアゴム液に懸濁し、0（溶媒）、6.25、12.5、25、75及び225mg/kgをマウスに経口投与した。経口投与1時間後に閾値下最大電流（8.0mA）を両眼に通電し、強直性屈曲及び強直性伸展痙攣の発現の有無を観察した。
結果：25、75及び225mg/kg投与で強直性屈曲及び強直性伸展痙攣の有意な誘発がみられたが、6.25及び12.5mg/kg投与では影響はみられなかった。

④ マウスにおける痙攣誘発作用（pentylentetrazol 痙攣）

試験動物：Crj：CD-1(ICR)系マウス、雄5週齢、体重24.9～32.4g、1群10匹
方法：検体を5%アラビアゴム液に懸濁し、0（溶媒）、25、75及び225mg/kgをマウスに経口投与した。経口投与1時間後に閾値下最高用量のpentylentetrazol（55mg/kg）を皮下内投与し、間代性及び強直性伸展痙攣の発現の有無を観察した。
結果：225mg/kgまで影響は認められなかった。

⑤ ラットの正常体温に対する作用

試験動物：Crj：CD(SD)IGS系ラット、雄5週齢、体重136.5～192.1g、1群6匹
方法：検体を5%アラビアゴム液に懸濁し、0（溶媒）、30、100、300、1000及び3000mg/kgをラットに経口投与した。経口投与前及び投与0.5、1、3、6時間後に、デジタル電子体温計のセンサーを直腸内へ挿入し、体温を測定した。
結果：対照群と比較して300mg/kg投与では1時間後に0.8℃、1000及び3000mg/kg投与では時間経過に伴って最大6.4℃の体温低下がみられた。30及び100mg/kg投与では体温に影響はみられなかった。

2) ラットの循環器系（血圧及び心拍数）に対する作用

試験動物：Crj：CD(SD)IGS系ラット、雄7週齢、体重244.9～318.5g、1群4匹
方法：検体を5%アラビアゴム液に懸濁し、0（溶媒）、100、300、1000及び3000mg/kgをラットに経口投与した。経口投与前及び投与0.5、1、3、6時間後に無麻酔ラットの収縮期血圧、平均血圧及び心拍数を非観血式自動血圧測定装置により測定した。
結果：次表の通りであった。

投与量	収縮期血圧及び平均血圧	心拍数
0 mg/kg (5%アラビア ゴム液)	影響なし	影響なし
100 mg/kg	影響なし	影響なし
300 mg/kg	影響なし	対照群と比較して投与 0.5 時間後に有意に増加
1000 mg/kg	対照群と比較して投与 1 時 間後に収縮期血圧の低下と 投与 1 及び 6 時間後に平均 血圧の低下	影響なし
3000 mg/kg	対照群と比較して投与 6 時 間後に平均血圧の低下	対照群と比較して投与 0.5 時間後に増加

3) 摘出モルモット回腸のアゴニスト収縮に対する作用

試験動物 : Hartley系モルモット、雄 6~8 週齢、体重 422~448 g、1 群 4 標本
 方法 : モルモットから回腸を摘出し、酸素化した Krebs 液 (約 32℃) の入ったマグナス槽内で等張性トランスジューサーに懸垂した。検体を DMSO に溶解し、0 (溶媒)、 10^{-6} 、 10^{-5} 及び 10^{-4} mol/L (最終濃度) をマグナス槽内に添加した。添加前及び添加 5 分後にアセチルコリン、ヒスタミンまたはバリウムを添加して回腸の収縮反応を等張性トランスジューサーを介してレコーダーに記録した。
 結果 : 対照群と比較して 10^{-4} mol/L 群でバリウムによる回腸の収縮反応が 12% 抑制された。アセチルコリン及びヒスタミンによる回腸の収縮反応は 10^{-4} mol/L でも影響を認めなかった。

4) マウスの消化器系 (腸管輸送能) に対する作用

試験動物 : Crj : CD-1 (ICR) 系マウス、雄 5 週齢、体重 22.7~26.2 g、1 群 8 匹
 方法 : 検体を 5% アラビアゴム液に懸濁し、0 (溶媒)、25、75 及び 225mg/kg を約 19 時間絶食させたマウスに経口投与した。経口投与 1 時間後に 5% アラビアゴム液に懸濁した 5% 炭末液 0.2 mL/匹を経口投与し、その 30 分後に胃腸管を摘出して炭末の小腸内移動率 (%) を測定した。
 結果 : 75 及び 225mg/kg 投与で腸管輸送能の抑制がみられたが、25mg/kg 投与では影響を認めなかった。

5) マウスの骨格筋に対する作用 (懸垂動作試験)

試験動物 : Crj : CD-1 (ICR) 系マウス、雄 5 週齢、体重 27.3~33.1 g、1 群 8 匹
 方法 : 検体を 5% アラビアゴム液に懸濁し、0 (溶媒)、25、75 及び 225mg/kg をマウスに経口投与した。経口投与 1、3 及び 6 時間後に水平に張り渡した針金にマウスの前肢を掛けさせ、10 秒以内に後肢を掛けられるかどうかを観察した。
 結果 : 225mg/kg 投与で 3 時間後まで筋力の抑制傾向がみられたが、25 及び 75mg/kg 投与では影響はみられなかった。

6) ラットの血液凝固系に対する作用

試験動物 : Crj : CD (SD) IGS系ラット、雄 5 週齢、体重 158.6~174.1 g、1群 6 匹

方法 : 検体を 5%アラビアゴム液に懸濁し、0 (溶媒)、300、1000 及び 3000mg/kg をラットに経口投与した。経口投与 1 時間後に後大静脈より採血し、血液 9 容に 3.2% クエン酸三ナトリウム 1 容を添加したのち、プロトロンビン時間 (PT) 及び活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を全自動血液凝固測定装置を用いて測定した。

結果 : 3000mg/kg まで PT 及び APTT に影響はみられなかった。

以上の試験結果より、クロチアニジンは無麻酔動物の生体機能に対して、マウスでは 25mg/kg 以上、ラットでは 300mg/kg 以上で作用を認めた。また、摘出回腸のアゴニスト収縮に対して、 10^{-4} mol/L で作用を認めた。

主にクロチアニジンは中枢神経系及び消化器系に対して抑制的な影響を及ぼし、骨格筋に対しても軽度ではあるが抑制的な影響を及ぼすものと考えられた。

「クロチアニ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 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数/群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
一般状態及び行動 に及ぼす影響 (Irwin法) (マウス)	経口 (5%77 ビ77'Δ液)	12.5、25、50、 100、200、400	♂3	50	25	50 mg/kg: 自発運動低下、振戦、 呼吸深大 100 mg/kg: 自発運動低下、振戦、 呼吸深大、体幹緊張度低下、 体温低下、腹臥、散瞳など 200 mg/kg: 自発運動低下、振戦、 呼吸深大、体幹緊張度低下、 体温低下、腹臥、散瞳、接触 刺激反応低下、握力低下など 400 mg/kg: 3匹中1匹死亡、自 発運動低下、振戦、呼吸深大、 体幹緊張度低下、体温低下、 腹臥、散瞳、接触刺激反応低 下、握力低下、角膜反射抑制、 拳尾、チアノーゼなど
麻酔作用 (hexo-barbital 誘発 睡眠時間) (マウス)	経口 (5%77 ビ77'Δ液)	25、75、225	♂8	225	75	対照群と比較し、225 mg/kg 群で 約1.6倍の延長 225 mg/kg: 8匹中2匹死亡
痙攣誘発作用 (電撃 痙攣) (マウス)	経口 (5%77 ビ77'Δ液)	6.25、12.5、25、 75、225	♂10	25	12.5	25 mg/kg 以上の用量で閾値下電 撃による強直性屈曲痙攣及び強 直性伸展痙攣を誘発
痙攣誘発作用 (pentylene-tetrazol 痙 攣) (マウス)	経口 (5%77 ビ77'Δ液)	25、75、225	♂10	>225	225	225 mg/kg まで閾値下 pentylene-tetrazol による痙攣を 誘発せず
□□□□□□□□ 影響 (ラット)	経口 (5%77 ビ77'Δ液)	30、100、300、 1000、3000	♂6	300	100	対照群と比較し、300 mg/kg 群で 1時間後に 0.8℃低下、1000 mg/kg 以上では0.5時間後から時 間経過に伴って最大 6.4℃低下
血圧及び心拍数に 及ぼす影響 (無麻酔ラット)	経口 (5%77 ビ77'Δ液)	100、300、 1000、3000	♂4	300	100	対照群と比較し、300 mg/kg 群で 0.5時間後に心拍数増加。1000 mg/kg 群で1時間後に収縮期血 圧の低下と1及び6時間後に平 均血圧低下。3000 mg/kg 群で0.5 時間後に心拍数増加と6時間後 に平均血圧低下
摘出回腸の77'ニスト 収縮に及ぼす影響 (モルモット)	<i>in vitro</i> (dimethyl sulfoxide)	0、10 ⁻⁶ 、10 ⁻⁵ 、 10 ⁻⁴ mol/L	4 標本/群	10 ⁻⁴ mol/L	10 ⁻⁵ mol/L	対照群と比較し、10 ⁻⁴ mol/L 群で 回腸の barium による収縮反応を 12%抑制。acetylcholine、histamine による回腸の収縮反応には影響 なし
腸管輸送能に及ぼ す影響 (マウス)	経口 (5%77 ビ77'Δ液)	25、75、225	♂8	75	25	対照群の腸管内炭末移動率と比 較し、75 mg/kg 群で 40.2%、225 mg/kg 群で 52.0%抑制
□□□□□□□□ (マウス)	経口 (5%77 ビ77'Δ液)	25、75、225	♂8	225	75	対照群と比較し、225mg/kg 群で 3時間後まで筋力の抑制傾向
血液凝固系に及ぼ す影響 (ラット)	経口 (5%77 ビ77'Δ液)	300、1000、 3000	♂6	>3000	3000	3000 mg/kg まで PT 及び APTT に影響なし

(9) 補足試験

(32) クロチアニジン原体のラットにおける発達神経毒性試験 (資料 1-32)

試験機関: Argus Research Laboratories, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年: 2000 年

試験目的: 子宮内および新生児期に検体に暴露された児動物における神経毒性学的影響を検索する目的で実施した。

検体: クロチアニジン

検体純度:

供試動物: Cr1:CD(SD)IGS BR VAF/Plus 系妊娠ラット (試験開始時約 11 週齢、体重 207~254 g)、1 群 25 匹

投与期間: 妊娠 0 日^{*}から分娩後 22 日 (1999 年 4 月 20 日~1999 年 6 月 4 日)

^{*} 膈垢中に精子が確認されるか膈栓が認められた日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目:

母動物: 全動物について自律神経機能異常、異常姿勢、異常運動または異常行動、ならびに一般状態の変化を毎日観察した。また、母動物の妊娠期間、分娩児数、分娩時生存児数および哺育行動を観察した。体重および摂餌量は投与期間中毎日測定した。

児動物: 分娩時に生存率を調べ、その後は少なくとも毎日 2 回生死を確認した。臨床観察を離乳前期間は毎日、離乳後期間は週 1 回の頻度で実施した。

全児動物について離乳前期間に以下の項目を観察した。

平面立ち直り反射、耳介開展、眼瞼開裂、聴覚性驚愕反応、縮瞳

生後5日に同腹児数を10匹に調整し、生後12日に各群20腹を選択した。選抜された児動物を各腹雌雄各1匹からなる4サブセットに割り付け、以下の項目について検査した。

サブセット1; 生後12日に脳重量測定および神経組織学的検査

サブセット2; 生後23、24日とその1週間後に受動的回避試験、生後62、63日とその1週間後に水迷路試験

サブセット3; 生後14、18、22および62日に自発運動量測定、生後23および63日に聴覚性驚愕馴化試験

サブセット4; 生後83~87日に脳重量測定および神経組織学的検査

サブセット5; 生後22日に剖検

サブセット4の各腹雌雄各1匹を対象に生後12日および離乳後週1回の頻度で詳細な臨床観察を行った。他のサブセット2と3の離乳児については体重測定または行動検査の際に毒性徴候を観察した。体重は生後1、5、8、12、14、18および22日、離乳後週1回、および剖検時に測定した。摂餌量は離乳後に週1回の頻度で測定した。また、雌は生後28日から膈開口日齢、雄は生後39日から包皮分離日齢を観察した。全児動物は解剖時あるいは全ての行動検査後に剖検した。

結 果:

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)		150	500	1750
検体摂取量 (mg/kg/日)	妊娠期間中	12.9	42.9	142.0
	哺育期間中	27.3	90.0	299.0

母動物; すべての母動物が計画屠殺時まで生存した。妊娠および哺育期間中にみられた臨床所見は、いずれも検体投与に関連するものではないと考えられた。

1750 ppm 群では、妊娠中(妊娠0~20日)の総体重増加量が対照群の91%に減少し、妊娠0~3日の体重増加量に有意な低値が認められた。1750 ppm 群では妊娠7、13、16、17および19日の平均体重に有意な低値が認められた。また、1750 ppm 群では妊娠中の体重増加量の減少が反映し、授乳期間中(授乳1、2、3、6、7、13~15および19日)の母体重は有意に減少した。1750 ppm 群の母体重増加量は哺育4~7日では有意に減少し、哺育14~22日では有意に増加したが、哺育期間を通じて総体重増加量は対照群と差がなく、有意差は認められなかった。その他の体重変化は一過性であるか用量依存性がないことから、検体投与に関連しないと考えられた。

1750 ppm 群において、妊娠中（妊娠 0～20 日）、哺育期間中（哺育 1～22 日）ならびにこれらの期間のいくつかの区間で摂餌量の有意な低値が認められた。母動物の剖検において、検体投与に起因すると考えられる所見は認められなかった。

児動物；1750 ppm 群において、生後 14、18 および 22 日の児動物体重に有意な低値が認められた。その他、すべての自然分娩観察および生後 22 日までの児動物の臨床観察において、検体投与に関連すると考えられる所見は認められなかった。反射および身体の発達に関する測定値（平面立ち直り、耳介開展、眼瞼開裂、聴覚性驚愕反応または縮瞳）に群間で生物学的意義のある差は認められなかった。150、500 および 1750 ppm 群では、生後 3 日に平面立ち直り反射が認められた児動物の割合が統計学的に有意に減少したが、児の 50%以上で平面立ち直り反射が認められた平均日齢には影響が認められなかったことから、検体投与に関連しないと考えられた。

F₁ 世代動物；1750 ppm 群の雄 2 例が、それぞれ生後 26 および 27 日に死亡した。150 および 1750 ppm 群の雌それぞれ 1 および 3 例が、生後 44、26、25 および 26 日に死亡した。1750 ppm 群における死亡は、体重の変動パターンから、離乳後の発育不全に関連するものであり、検体投与に関連すると考えられた。150 ppm 群における死亡は、用量依存性がないことから、検体投与に関連しないと考えられた。その他のすべての F₁ 世代動物は計画屠殺時まで生存した。臨床観察および剖検において、検体投与に関連すると考えられる所見は認められなかった。

1750 ppm 群の雌雄において、離乳前期間（生後 5～22 日）の総体重増加量および一部の区間の体重増加量に有意な低値が認められた。500 ppm 群の雌の体重増加量にも同様に有意な低値が認められた。その他の体重変化は一過性であるか用量依存性がないことから、検体投与に関連しないと考えられた。

雌雄とも摂餌量に検体投与の影響は認められなかった。1750 ppm 群の雄では、生後 51～58 日および 65～72 日の摂餌量が有意に減少したが、一過性であったことから、検体投与に関連しないと考えられた。

膈開口および包皮分離の日齢に検体投与の影響は認められなかった。

生後 12 日に屠殺した F₁ 世代雌雄ラットの最終体重と脳重量ならびに最終体重比脳重量に群間で有意差は認められなかった。生後 12 日に屠殺した対照群および高用量群の雌雄各 10 例の脳切片について、形態計測において有意差が認められた項目を下表に示す。雄ではいずれの項目においても有意な差は認められなかったが、雌では 1750 ppm 群において海馬歯状回および小脳の厚みが有意に増加し、一方、小脳外顆粒層の厚みは有意に低下した。これらは神経毒性を示すものではなく、むしろ対照群と比較して 1750 ppm 群でわずかに成長が亢進したも

のと考えられた。雌の 500 ppm 群では有意な差は認められなかった。

形態計測

性別	雄		雌		
	0	1750	0	500	1750
投与群 (ppm)					
海馬歯状回					↑109
小脳					↑110
小脳外顆粒層					↓89

対照群との有意差検定は、Dunnett の多重比較検定を用いて行った (↑↓: P < 0.05)。

表中の数値は対照群 (100) に対する変動率 (%) を示す。

また、詳細な病理組織学的検査において認められた所見を下表に示す。1750 ppm 群の雄 1 例に大脳皮質で、雄 2 例および雌 2 例に小脳核にアポトーシスが認められたが、これらは正常な脳発達期には認められる程度のもと考えられ、検体投与の影響を示唆する所見は認められなかった。

病理組織学的検査

性別		雄		雌	
投与群 (ppm)		0	1750	0	1750
臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10
大脳皮質	アポトーシス巣/嚢胞性変性	0	1	0	0
視床	上衣下細胞アポトーシス	0	0	1	0
	上衣下小胞形成	7	8	9	10
中脳	上衣下間隙	1	2	1	1
小脳皮質	白色小胞巣	1	1	0	0
小脳核	限局性アポトーシス巣	0	2	0	2
橋	上衣下細胞アポトーシス	3	0	2	2
	上衣下小胞形成	1	0	2	0

対照群との有意差検定は、Fisher の正確検定 (片側) を用いて行った。いずれの所見においても有意差は認められなかった。

受動回避試験または水迷路試験により評価した学習、短期記憶、長期記憶または反応抑制に生物学的意義のある差は認められなかった。

生後 22 日の自発運動量測定の結果、1750 ppm 群の雌雄では 1 ないし複数のブロック (1 ブロック: 5 分間) で運動回数および運動時間が有意に減少したため、1.5 時間 (5 分 × 18) の測定時間中の総運動回数および総運動時間の低値が認められた。生後 14、18 および 62 日の運動回数または運動時間に検体投与の影響は認められなかった。生後 62 日で統計学的に有意な差が認められたが、これ

らの変化は一過性であり、および/あるいは用量相関がないことから検体投与に関連しないと考えられた。

対照群と比べて有意差が認められたブロックを下表に示す。

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		150	500	1750	150	500	1750
生後 22日	運動回数	ブロック 1			↓83		
		ブロック 2			↓71		
		ブロック 3			↓69		
		ブロック 4			↓68		↓73
	運動時間	ブロック 1			↓70		
		ブロック 3			↓57		
ブロック 4					↓64	↓56	
生後 62日	運動回数	ブロック 1		↓88			
		ブロック 4		↓87		↓89	
	運動時間	ブロック 5		↑132			
		ブロック 6				↓72	

対照群との有意差検定は、Dunnett の多重比較検定を用いて行った
(↓: P < 0.05, ↑: P < 0.01)。

表中の数値は対照群 (100) に対する変動率 (%) を示す。

1750 ppm 群の雌ラットにおいて、生後 23 日の聴覚性驚愕反応の程度に有意な低下が認められた。生後 23 日の 500 ppm 群の雌ラットにおいて認められた有意な低下は一過性であり検体投与による影響とは考えられなかった。生後 23 および 63 日の雄ラットならびに生後 63 日の雌ラットの聴覚性驚愕反応の程度に検体投与の影響は認められなかった。対照群と比べて有意差が認められたブロックを下表に示す。

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		150	500	1750	150	500	1750
生後 23 日	ブロック 1						↓55
	ブロック 2					↓64	↓49
	ブロック 3						↓51
	ブロック 4						↓55
	ブロック 5						↓50

対照群との有意差検定は、Dunnett の多重比較検定を用いて行った
(↓: P < 0.05, ↓: P < 0.01)。

表中の数値は対照群 (100) に対する変動率 (%) を示す。

生後 83 から 87 日に剖検した雌雄ラットの最終体重と脳重量ならびに最終体重

比脳重量に群間で有意差は認められなかった。対照群および高用量群の雌雄各 10 例から採取した脳の形態計測において有意差が認められた項目を下表に示す。1750 ppm 群の雌で海馬歯状回および尾状核被殻において有意な低下が認められたが、雄では認められていない変化であり、かつ対照群と比較して 5%程度の変動であることから生物学的な意味はないと考えられた。

形態計測

性別	雄		雌	
	0	1750	0	1750
投与群 (ppm)	0	1750	0	1750
海馬歯状回				↓ 95
尾状核被殻				↓ 95

対照群との有意差検定は、Dunnett の多重比較検定を用いて行った (↓ : P < 0.05)。

表中の数値は対照群 (100) に対する変動率 (%) を示す。

また、中枢および末梢神経切片の詳細な顕微鏡検査において認められた所見を下表に示す。検体投与に関連した神経病理学的変化は認められなかった。

性別		雄		雌	
投与群 (ppm)		0	1750	0	1750
臓器	所見\検査動物数	10	10	10	10
脳	水頭症	3	2	0	0
脊髄神経根	髄鞘腫脹	0	0	1	0
三叉神経節	神経線維変性	1	0	0	0
	神経細胞空胞化	0	0	1	0
坐骨神経	神経線維変性	0	1	0	0
脛骨神経	神経線維変性	2	0	0	0
	軸索腫脹	0	0	1	0
腓骨神経	神経線維変性	1	0	0	0

対照群との有意差検定は、Fisher の正確検定 (片側) を用いて行った。いずれの所見においても有意差は認められなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに児動物離乳まで飼料に混入して投与した場合、1750 ppm 群で体重および摂餌量の低値がみられたことから、母動物に対する無毒性量 (NOEL) は 500 ppm (妊娠中 ; 42.9 mg/kg/日、哺育期間 ; 90.0 mg/kg/日) と判断された。また、母動物に 1750 ppm を曝露したところ、離乳前の F₁ 世代雌雄ラットに体重増加抑制が認められ、500 ppm の曝露では、離乳前の F₁ 世代雌ラットに体重増加抑制が認められたことから、発達に対する NOEL は、雄で 500 ppm (母動物に対する投与量は妊娠中 ; 42.9 mg/kg/日、哺育期間 ; 90.0 mg/kg/日)、雌で 150 ppm (母動物に対する投与量は妊娠中 ; 12.9 mg/kg/日) と判断された。

日、哺育期間；27.3 mg/kg/日）と判断された。神経毒性については、生後 22 日に F₁ 世代雌雄ラットで自発運動量の減少が、生後 23 日に F₁ 世代雌ラットで聴覚性驚愕反応の抑制が認められたが、これらの神経毒性学的変化は、体重増加抑制で示される発達毒性がみられる用量範囲でのみ発現しており、成熟後の動物ではみられなかった。したがって、検体は選択的な神経毒性物質ではないと考えられた。

申請者注：

報告書では無影響量について記載されており、母動物の無影響量は 500 ppm、発達に対する無影響量は雄で 500 ppm、雌で 150 ppm と判断されている。しかしながら、母動物の体重および抑制摂餌量の低下ならびに F₁ 世代の雌雄ラットにおける体重増加抑制はいずれも毒性変化であることから、本抄録では無影響量と無毒性量は同一と考えられ、母動物の無毒性量は 500 ppm、発達に対する無毒性量は雄で 500 ppm、雌で 150 ppm と表記した。

結果の概要

投与群 (ppm)		対照	150	500	1750
1群あたり動物数		25	25	25	25
妊娠動物数		25	25	23	23
途中死亡/切迫殺数		0	0	0	0
一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった			
体重変化	妊娠中	—	有意差なし	有意差なし	↓ : 0-3日
	哺育期間	—	↓ : 4-7日	↑ : 14-22日	↓ : 4-7日 ↑ : 14-22日
摂餌量	妊娠中	—	有意差なし	有意差なし	↓ : 0-3、3-6、6-9、 0-20日 ↓ : 15-18、18-20日
	哺育期間	—	有意差なし	有意差なし	↓ : 7-14、14-22、 1-22日
検体摂取量 (mg/kg/日)	妊娠中	—	12.9	42.9	142.0
	哺育期間	—	27.3	90.0	299.0
肉眼的病理所見		検体投与に起因する異常は認められなかった			
妊娠率 (%)		100.0	100.0	92.0	92.0
出産母動物数		25	25	23	23
妊娠期間		22.6	22.6	22.6	22.9
平均着床痕数		14.6	15.2	15.4	15.1
出産率 (%)		100.0	100.0	100.0	100.0
児動物	平均生存産児数	13.5	14.1	14.2	13.8
	平均死産児数	0.0	0.0	0.3	0.1
	性比 (%)	44.4	45.9	50.1	50.9

太枠内は検体投与の影響であることを示す。 — : 対照群

妊娠率 = (妊娠動物数 / 交尾確認動物数) × 100

出産率 = (生存児出産動物数 / 妊娠動物数) × 100

性比 = (雄生産児数 / 雌生産児数) × 100

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

Dunnettの多重比較検定; パラメトリックデータ

Dunnの多重比較検定; ノンパラメトリックデータで同値が75%以下の場合

Fisherの正確検定; ノンパラメトリックデータで同値が75%を上回る場合

2項分布の均一性の分散分析; 傾度データ

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (ppm)		対照	150	500	1750	
児 動 物	生後 5 日生存率	96.1	97.7	95.7	95.9	
	生後 12 日生存率	99.6	↓92.7	↓94.8	100.0	
	生後 22 日生存率	100.0	97.4	99.4	97.5	
	体重 (g)	生後 1 日	6.4	6.4	6.3	6.5
		生後 5 日 ^{a)}	8.8	8.8	8.5	8.7
		生後 8 日	12.4	12.6	12.2	12.1
		生後 12 日	18.0	17.5	17.6	17.1
		生後 14 日	22.3	22.4	21.2	↓19.6
		生後 18 日	31.2	31.4	29.4	↓26.2
		生後 22 日	40.9	42.0	39.1	↓35.0
一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった				
反 射 ・ 身 体 発 達	平面立 ち直り	生後 3 日 (%) ^{b)}	38.2	↓25.4	↓25.3	↓20.1
		平均日齢 ^{c)}	3.8	3.8	4.4	3.5
	耳介開展 ^{c)} (日齢)		3.4	3.4	3.6	3.5
	眼瞼開裂 ^{c)} (日齢)		15.1	15.3	15.4	15.4
	聴覚性驚愕 ^{c)} (日齢)		13.5	13.4	13.5	13.4
	生後 21 日縮瞳 ^{d)} (%)		100.0	100.0	100.0	100.0
肉眼的病理所見		検体投与に起因する異常は認められなかった				
F ₁ 動 物	1 群あたり動物数	雄	80	76	80	80
		雌	80	76	78	80
	死亡数	雄	0	0	0	2
		雌	0	1	0	3
一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった				

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

生後 5 日生存率 = (生後 5 日の同腹児数調整前生存児数 / 生後 1 日生産児数) × 100

生後 12 日生存率 = (生後 12 日生存児数 / 生後 5 日の同腹児数調整後生存児数) × 100

生後 22 日生存率 = (生後 22 日生存児数 / 生後 12 日生存児数) × 100

a) 同腹児数調整前

b) 表中の数値は 3 日齢時に平面立ち直り反射がみられた児動物の割合 (%) を示す。

c) 表中の数値は同腹児の 50%以上に所見あるいは反射が認められた日齢の平均値を示す。

d) 表中の数値は 21 日齢時に縮瞳反射がみられた児動物の割合 (%) を示す。

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

Dunnett の多重比較検定; パラメトリックデータ

Dunn の多重比較検定; ノンパラメトリックデータで同値が 75%以下の場合

Fisher の正確検定; ノンパラメトリックデータで同値が 75%を上回る場合

2 項分布の均一性の分散分析; 頻度データ

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (ppm)		対照	150	500	1750		
F ₁ 動物	体重変化	雄	—	↑: 生後 23-65、 5-65 日	↓: 生後 14-18 日	↓: 生後 12-14、 14-18、18-22、 5-22 日	
		雌	—	有意差なし	↓: 生後 12-14 日 ↓: 生後 14-18、 5-22 日	↓: 生後 12-14、 14-18、5-22 日 ↓: 生後 18-22、 65-72 日	
	摂餌量	雄	—	有意差なし	有意差なし	↓: 生後 51-58、 65-72 日	
		雌	—	↓: 生後 30-37 日	有意差なし	有意差なし	
	性成熟	包皮分離日齢	47.1	46.8	47.7	48.3	
		膣開口日齢	34.0	33.7	↑35.0	34.1	
	サブ セット 1	検査動物数	雄	20	20	20	20
			雌	20	20	18	20
		一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった				
		脳重量 (g)	雄	1.14	1.14	1.09	1.15
雌			1.08	1.08	1.06	1.11	
脳重量体重比 (%)		雄	6.108	6.110	6.164	6.573	
	雌	6.407	6.233	6.251	6.710		

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

—: 対照群

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

Dunnnett の多重比較検定; パラメトリックデータ

Dunn の多重比較検定; ノンパラメトリックデータで同値が 75% 以下の場合

Fisher の正確検定; ノンパラメトリックデータで同値が 75% を上回る場合

2 項分布の均一性の分散分析; 頻度データ

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (ppm)			対照	150	500	1750			
F ₁ 動物	サブセット1	病理検査・生後12日	大脳前後軸 (mm)	雄	12.14	-	-	12.35	
			雌	11.97	-	11.94	12.14		
			小脳前後軸 (mm)	雄	5.40	-	-	5.55	
			雌	5.28	-	5.32	5.49		
			前頭皮質 (μ)	雄	1356.0	-	-	1413.6	
			雌	1356.0	-	1377.0	1416.0		
			頭頂葉皮質 (μ)	雄	1408.8	-	-	1464.6	
			雌	1423.2	-	1431.0	1488.0		
			尾状核被殻 (μ)	雄	2548.8	-	-	2568.0	
			雌	2529.6	-	2442.0	2872.8		
			脳梁 (μ)	雄	282.1	-	-	293.9	
			雌	261.1	-	288.0	273.5		
			海馬歯状回 (μ)	雄	948.0	-	-	981.6	
			雌	919.2	-	942.0	↑1003.2		
			小脳 (μ)	雄	3004.8	-	-	3129.6	
			雌	2856.0	-	2946.0	↑3148.8		
			小脳外顆粒層 (μ)	雄	34.3	-	-	33.9	
			雌	37.2	-	38.1	↓33.2		
			肉眼的病理検査			検体投与に起因する異常は認められなかった			
			神経組織学的検査			検体投与に起因する異常は認められなかった			

- : 検査せず

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

Dunnnettの多重比較検定; パラメトリックデータ

Dunnの多重比較検定; ノンパラメトリックデータで同値が75%以下の場合

Fisherの正確検定; ノンパラメトリックデータで同値が75%を上回る場合

2項分布の均一性の分散分析; 頻度データ

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (ppm)			対照	150	500	1750		
F ₁ 動物	サブ セット 2	検査動物数	雄	20	19	20	20	
			雌	20	18	20	20	
		一般状態	検体投与に起因する異常は認められなかった					
	受動的回避試験	セッション1	試行回数	雄	3.6	3.8	4.0	3.7
			雌	3.6	4.0	3.6	3.6	
		1 試行目	雄	10.0	13.5	9.5	13.8	
		潜時(秒)	雌	12.8	12.3	15.5	14.8	
		2 試行目	雄	50.4	40.9	37.0	40.6	
		潜時(秒)	雌	40.8	35.2	39.9	44.2	
		セッション2	試行回数	雄	2.9	2.7	3.1	2.7
			雌	2.8	3.4	3.2	2.8	
	水迷路試験	セッション1	1 試行目	雄	33.2	29.0	30.6	35.4
			潜時(秒)	雌	35.6	35.0	28.8	39.2
		セッション2	試行回数	雄	9.1	9.1	7.9	7.3
			雌	7.7	8.6	8.2	7.7	
		エラー数	雄	0.43	0.43	0.35	0.31	
			雌	0.46	0.41	0.44	0.44	
		2 試行目	潜時(秒)	雄	13.4	15.0	14.2	12.3
			雌	19.5	13.9	17.7	13.8	
	セッション1	試行回数	雄	5.7	5.4	6.6	5.9	
		雌	6.4	7.9	7.2	6.6		
	エラー数	雄	0.04	0.10	0.11	0.09		
		雌	0.17	0.22	0.18	0.18		
	1 試行目	潜時(秒)	雄	7.5	10.5	11.0	8.9	
		雌	13.0	9.9	11.8	15.6		
		肉眼的病理検査	検体投与に起因する異常は認められなかった					

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

Dunnnettの多重比較検定; パラメトリックデータ

Dunnの多重比較検定; ノンパラメトリックデータで同値が75%以下の場合

Fisherの正確検定; ノンパラメトリックデータで同値が75%を上回る場合

2項分布の均一性の分散分析; 頻度データ

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (ppm)			対照	150	500	1750		
F ₁ 動物	検査動物数	雄	20	18	20	20		
		雌	20	19	20	20		
	一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった					
	自発運動量	生後14日	回数	雄	147.2	162.7	218.8	169.0
			雌	219.6	260.5	199.8	211.7	
		時間(秒)	雄	114.1	136.6	190.2	128.6	
			雌	162.9	229.9	151.0	141.5	
	生後18日	回数	雄	472.0	367.9	398.6	447.8	
			雌	475.1	470.5	476.3	474.6	
		時間(秒)	雄	578.6	513.3	548.2	548.1	
			雌	595.6	602.7	627.4	570.8	
	生後22日	回数	雄	558.5	490.4	542.5	422.2	
			雌	579.5	563.9	457.0	518.7	
		時間(秒)	雄	801.8	710.2	773.2	588.7	
			雌	790.2	800.9	597.9	639.6	
	生後62日	回数	雄	723.0	709.6	758.8	707.2	
			雌	749.4	663.4	708.2	651.3	
		時間(秒)	雄	1523.5	1586.3	1759.5	1637.0	
			雌	1545.2	1326.0	1497.5	1454.6	
	聴覚性驚愕反応(g)	生後23日	雄	15.6	12.6	18.3	11.0	
雌			21.3	17.5	15.5	↓11.1		
生後63日		雄	37.9	36.1	51.7	46.7		
		雌	30.0	26.0	21.1	30.2		
肉眼的病理検査		検体投与に起因する異常は認められなかった						

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

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

Dunnnettの多重比較検定; パラメトリックデータ

Dunnの多重比較検定; ノンパラメトリックデータで同値が75%以下の場合

Fisherの正確検定; ノンパラメトリックデータで同値が75%を上回る場合

2項分布の均一性の分散分析; 頻度データ

(つづく)

結果の概要 (つづき)

投与群 (ppm)		対照	150	500	1750
検査動物数	雄	20	19	20	20
	雌	20	20	20	20
一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった			
脳重量 (g)	雄	2.229	2.291	2.200	2.170
	雌	2.053	2.084	2.034	2.033
脳重量体重比 (%)	雄	0.522	0.539	0.519	0.537
	雌	0.791	0.830	0.799	0.818
大脳前後軸 (mm)	雄	15.83	-	-	15.66
	雌	15.59	-	-	15.53
小脳前後軸 (mm)	雄	7.09	-	-	7.18
	雌	7.25	-	-	7.15
前頭皮質 (μ)	雄	1848.4	-	-	1893.6
	雌	1711.2	-	-	1730.4
頭頂葉皮質 (μ)	雄	1956.0	-	-	1992.0
	雌	1800.0	-	-	1795.2
尾状核被殻 (μ)	雄	3542.4	-	-	3700.8
	雌	3379.2	-	-	↓ 3192.0
脳梁 (μ)	雄	281.4	-	-	272.6
	雌	266.9	-	-	253.5
海馬歯状回 (μ)	雄	1819.2	-	-	1735.2
	雌	1562.4	-	-	↓ 1483.2
小脳 (μ)	雄	5419.2	-	-	5424.0
	雌	4915.2	-	-	4771.2
肉眼的病理検査		検体投与に起因する異常は認められなかった			
神経組織学的検査		検体投与に起因する異常は認められなかった			

- : 検査せず

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

Dunnnett の多重比較検定 ; パラメトリックデータ

Dunn の多重比較検定 ; ノンパラメトリックデータで同値が 75% 以下の場合

Fisher の正確検定 ; ノンパラメトリックデータで同値が 75% を上回る場合

2 項分布の均一性の分散分析 ; 頻度データ

(33) クロチアニジン原体のラットを用いた飼料混入投与による 28 日間反復経口投与毒性/免疫毒性試験 (プラーク形成細胞アッセイ) (資料 1-33)

試験機関 : CR-DDS Argus Division
ImmunoTox, Inc.¹⁾

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2004 年

試験目的 : ラットに検体を 28 日間反復投与したときの毒性影響、特にヒツジ赤血球に対する反応測定により免疫毒性に関する情報を得る目的で実施した。

検 体 : クロチアニジン

検体純度 :

供試動物 : CD(SD)系ラット、1 群雌雄各 10 匹、投与開始時約 7 週齢、試験開始時体重 : 雄 161~216 g、雌 155~183 g

投与期間 : 28 日間 (雄 ; 2004 年 7 月 7 日~2004 年 8 月 3 日、雌 ; 2004 年 7 月 8 日~2004 年 8 月 4 日)

投与方法 : 検体をアセトンに溶解して、0、150、500 および 3000 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。屠殺 4 日前、ヒツジ赤血球 (2×10^8 個) 0.5 mL を全動物の尾静脈内に単回投与した。陽性対照群には陽性対照物質として、屠殺前 4 日間連続でリン酸緩衝生理食塩水に溶解したシクロホスファミド 50 mg/kg (10 mg/mL) を腹腔内投与した。シクロホスファミドの投与はヒツジ赤血球投与後に行った。なお、検体を混入した飼料は 2 週間に 1 回調製した。

観察・検査項目および結果 :

一般状態および死亡率 ; 一般状態および外観の観察を馴化期間中は週 1 回、投与開始日、2 日目および 3 日目は 1 日 2 回 (午前および午後)、その後は屠殺日も含めて 1 日 1 回行った。生死の確認は試験期間中 1 日 2 回以上行った。対照群と比べ統計学的有意差の認められた所見を下表に示す。

¹⁾ 免疫毒性検査のみ

性別	雄					雌				
	群	対照	検体			陽性 対照	対照	検体		
投与量 (ppm)	0	150	500	3000	0	0	150	500	3000	0
所見\検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
限局性脱毛：肢	0	3**	3**	0	0	1	1	3	0	4
尿による腹部被毛 の汚れ	0	0	0	0	6**	0	0	0	0	0

2項分布の等質性の分散分析 ** : $p \leq 0.01$

150 および 500 ppm 群の雄において、肢の脱毛の発生頻度の統計学的に有意な増加が認められたが、用量依存性が認められないことから検体投与に関連したものではないと考えられた。また、陽性対照群の雄においては、シクロホスファミド投与に起因する尿による腹部被毛の汚れの有意な増加が認められた。

その他、臨床症状として口周囲の赤色物質、わずかに過度の流涎、着色鼻漏、トレーの赤色物質、着色涙、歯並びの変形および/あるいは欠損あるいは破損した切歯、頸部、頭部あるいは鼻部の痂皮、指の腫脹、頸部擦過傷あるいは脱水症状などが認められたが、これらは発生頻度に用量依存性が認められないこと、また、いずれの群においても1~3匹に認められたのみであったことから、検体投与に関連したものではないと考えられた。

また、いずれの群においても死亡動物は認められなかった。

体重変化；馴化期間中および投与期間中週1回ならびに屠殺時に全ての生存動物の体重を測定した。

対照群と比較して、3000 ppm 群の雌雄において試験 8、15、22 および 29 日目に有意な体重の低値が認められた。体重増加量では、3000 ppm 群の雌雄において試験 1~8 日目および 1~29 日目、また、3000 ppm 群の雌においてのみ試験 15~22 日目に有意な低値が認められた。500 ppm 以下の群の雌雄の体重および体重増加量に、検体投与の影響は認められなかった。

陽性対照群の雌雄においては、試験 29 日目にシクロホスファミドの影響と考えられる有意な体重の低値が認められた。また、試験 22~29 日目および 1~29 日目の体重増加量において、シクロホスファミドの影響と考えられる有意な低値が認められた。

摂餌量；馴化期間中少なくとも1回、投与期間中週1回摂餌量を測定し、また、屠殺前の残餌量を測定した。絶対摂餌量 (g/日) および相対摂餌量 (g/kg/日) を算出した。

3000 ppm 群の雌雄において、全試験期間中（試験 1～8、8～15、15～22、22～29 日目および 1～29 日目）、絶対摂取量に有意な低値が認められた。また、3000 ppm 群の雌雄において、試験 1～8 日目および 1～29 日目の相対摂取量に有意な低値が認められた。500 ppm 以下の群の雌雄の絶対および相対摂取量には、検体投与による影響は認められなかった。

陽性対照群の雄では、シクロホスファミド投与に起因すると考えられる絶対および相対摂取量の有意な低値が試験 22～29 日目および 1～29 日目に認められた。また同群雄で、試験 8～15 日目に絶対摂取量の有意な低値が認められたが、この低下は持続せず、また、雌には認められなかったことから、生物学的に重要ではないと考えられた。

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)		150	500	3000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	13.8	45.8	252.8
	雌	14.0	46.2	253.0

脾臓重量；投与期間終了後、全動物を対象として、最終体重および脾臓重量を測定し、対体重比も算出した。
結果を下表に示す。

性別	雄				雌				
	検体			陽性 対照	検体			陽性 対照	
群	150	500	3000	0	150	500	3000	0	
投与量 (ppm)	150	500	3000	0	150	500	3000	0	
最終体重	101	98	↓87	↓85	98	100	↓87	↓90	
脾臓	重量	102	107	88	↓38	98	98	95	↓45
	対体重比	101	111	102	↓45	100	97	108	↓50

対照群との有意差検定 (↑ ↓ : $p \leq 0.01$)

Dunnett 検定；パラメトリックデータ

Dunn 検定；ノンパラメトリックデータで同値が 75%以下の場合

Fisher の正確検定；ノンパラメトリックデータで同値が 75%を上回る場合

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。

3000 ppm 群の雌雄において、対照群と比較して、最終体重の有意な低値が認められたが、脾臓の重量および対体重比に有意な変化は認められなかった。500 ppm 以下の群の雌雄では、最終体重、脾臓の重量および対体重比に検体投与による影響は認められなかった。

陽性対照群の雌雄では、対照群と比較して、最終体重、脾臓の重量および対

重比の全てにおいて有意な低値が認められた。これらの低値はシクロホスファミドによる影響と考えられた。

肉眼的病理検査；投与期間終了後、全動物について胸部、腹部および骨盤内臓の剖検を行った。剖検では *in situ* での臓器および組織の検査の他、外表、全ての開口部、さらに、頭蓋腔、胸腔および腹腔の検査も行った。

検体投与に関連した剖検所見は認められなかった。

陽性対照群の雄1匹において膀胱壁肥厚および肝臓の外側左葉に黄褐色部位が認められ、雌1匹の肝臓の外側左葉に腫瘤 (1.8×1.4×0.8 cm) が認められたが、これらの動物にその他の肉眼的病変は認められなかった。

免疫毒性検査；全動物から脾臓を採取した翌日、ブランク形成細胞アッセイを行い、T細胞依存性抗原であるヒツジ赤血球に対する脾臓IgM抗体産生細胞 (AFC) 反応を調べた。各脾臓から単細胞懸濁液を調製し、脾臓細胞数を調べた。脾臓細胞懸濁液にモルモット補体、ヒツジ赤血球および加温寒天を加えて混合し、ペトリ皿に蒔いてカバーガラスで覆い、約36~38℃で3時間培養した。ヒツジ赤血球が溶解して生じたブランクを計数して、抗体産生細胞 (AFC) 数を調べ、比活性 (AFC/脾臓細胞10⁶個) および総活性 (AFC/脾臓) を算出した。

なお、免疫毒性検査はImmunoTox, Inc.において実施した。また、最終体重および脾臓重量についてはCR-DDS Argus Divisionで得られたデータを用いて解析した。結果を次表に示す。

性別	雄						雌					
	検体			陽性 対照	H / NH	傾向 分析	検体			陽性 対照	H / NH	傾向 分析
投与量(ppm)	150	500	3000	0			150	500	3000	0		
体重	101	98	↓87	↓85	H	##	98	100	↓87	↓90	H	##
脾臓重量	102	107	87	↓38	H		99	98	95	↓45	H	
脾臓重量対体重比	101	111	102	↓46	NH		100	97	108	↓50	H	
脾臓細胞数	121	114	118	↓13	H		96	98	110	↓15	H	
IgM AFC/脾臓細胞 10 ⁶ 個	136	↑257	202	↓4	NH	#	97	125	99	↓1	H	
IgM AFC/脾臓	↑175	↑307	255	↓1	NH	##	93	121	105	↓0	H	

H: Bartlettの等分散検定で一様性あり、NH: Bartlettの等分散検定で一様性なし
 対照群との有意差検定 (↑ ↓: $p \leq 0.05$, ↑ ↓: $p \leq 0.01$)

Dunnettのt検定; Bartlettの等分散検定で一様性あり(H)でパラメトリックな
 分散分析で有意差が認められた場合

Wilcoxonの順位検定; Bartlettの等分散検定で一様性なし(NH)でノンパラメト
 リックな分散分析で有意差が認められた場合

陽性対照群と対照群との有意差検定はStudentのt検定を用いて行った。

Jonckheereの傾向検定 (#: $p \leq 0.05$, ##: $p \leq 0.01$)

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の。

雌雄ともに、検体投与群の脾臓細胞数に、対照群と比較して有意な差は認められなかった。一方、陽性対照群では、対照群と比較して雄では87%、雌では85%の脾臓細胞数の減少が認められた。

雄の検体投与群では、T細胞依存性抗原ヒツジ赤血球に対するIgM抗体反応の増加が認められた。反応の増加は全ての用量で観察されたが、統計学的有意差が認められたのは比活性(AFC/脾臓細胞10⁶個)では500 ppm群、総活性(AFC/脾臓)では150および500 ppm群のみであった。

雄において観察された反応の増加は、1) 対照群の雄における反応が低いこと(同研究所においてSD系ラットを用いて実施された最新の3試験の対照群のIgM AFC/脾臓細胞10⁶個の平均値は本試験の対照群の値が616であるのに対して1606(1295、1700および1824)、また、3試験の対照群のIgM AFC/脾臓の平均値は本試験の対照群の値が542であるのに対して1368(1177、1330および1598)であった)、およびおそらく、本試験で使用した非近交系ラットにおいて通常認められるばらつきに関連したものであること、2) 明らかな用量反応性が認められないこと、3) 雌で検体による影響が認められなかったことから、検体投与による影響ではないと考えられた。

一方、陽性対照であるシクロホスファミド投与群の雄では、対照群と比較して

比活性 (96%減少) および総活性 (99%減少) の統計学的に有意な減少が認められた。

雌の検体投与群では、比活性 (AFC/脾臓細胞 10^6 個) あるいは総活性 (AFC/脾臓) のいずれにおいても、検体投与群と対照群との間で差はなかった。一方、陽性対照群であるシクロホスファミド投与群の雌では、対照群と比較して比活性 (99%減少) および総活性 (100%減少) の統計学的に有意な減少が認められた。

以上の結果から、クロチアニジン原体のラットに対する飼料混入投与による28日間反復経口投与毒性/免疫毒性試験 (ブランク形成細胞アッセイ) における影響として、3000 ppm 群の雌雄に、体重、体重増加量および摂餌量の低値が認められたので、一般毒性に関する無影響量は雌雄とも500 ppm (雄: 45.8 mg/kg/日、雌: 46.2 mg/kg/日) であると判断された。ヒツジ赤血球に対する反応により調べた免疫毒性に関する無影響量は雌雄とも最高用量である3000 ppm (雄: 252.8 mg/kg/日、雌: 253.0 mg/kg/日) を上回るものと判断された。液性免疫機能に有害影響は認められなかった。