

(34) クロチアニジンのラットを用いた発達免疫毒性試験

(資料 1-34)

試験機関：Charles River Laboratories
ImmunoTox, Inc.¹⁾

[GLP 対応]

報告書作成年：2008 年

試験目的：子宮内および哺育期から約 7 週齢にかけて母乳および飼料を介して検体に暴露されたラット児動物における免疫毒性学的影響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)系妊娠ラット、1 群 25 匹、投与開始時約 11 週齢

投与期間：F0 世代；妊娠 6 日^{*)}から哺育 21 日（児離乳時）あるいは妊娠 6 日から妊娠 24 日（分娩が認められなかった動物）

F1 世代；離乳時（生後 21 日）から安楽殺時
（2007 年 11 月 4 日～2008 年 1 月 4 日）

*) 膈垢塗抹標本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。

投与方法：検体をアセトンに溶解して、0 (I 群)、150 (II 群)、500 (III 群) あるいは 2000 (IV 群) ppm の濃度で飼料に混入して自由に摂食させた。F1 世代動物については、生後 21 日の離乳後、免疫学的検査（アッセイ 1；ヒツジ赤血球に対する脾臓 IgM 抗体産生細胞（AFC）反応およびアッセイ 2；遅延型過敏（DTH）反応）用の動物を選抜して以下のように割り付け、検体を混入した飼料を与えた。なお、検体を混入した飼料は 2 週間間隔で調製した。

1) 免疫毒性検査のみ

群	投与量 (ppm)	動物数			
		アッセイ 1		アッセイ 2	
		雄	雌	雄	雌
I (飼料のみ)	0	20	20	20	20
II	150	20	20	20	20
III	500	20	20	20	20
IV	2000	20	20	20	20
V ^a (飼料およびCPS投与)	0	10	10	—	—
VI ^a (飼料および誘発処理のみ)	0	—	—	10	10
VII ^a (飼料およびCPS投与)	0	—	—	10 ^a	10

CPS : シクロホスファミド

a : V、VI および VII 群の動物は F0 世代の I 群 (0 ppm 群) による出産動物

* : F1 世代動物 4870 番を割り当てたが、実験上の問題 (感作及び CPS 投与) により除外した結果、VII 群雄は 1 群 9 匹で評価した (報告書 36 頁及び 378 頁参照)。

F1 世代動物のうちアッセイ 1 群の動物にはヒツジ赤血球 0.5 mL/匹を安楽殺 4 日前に 1 回静脈内投与した。アッセイ 1 の V 群 (陽性対照群) の動物にはシクロホスファミド 50 mg/kg (10 mg/mL) を安楽殺前 4 日間連続で腹腔内投与した。F1 世代動物のうちアッセイ 2 群の動物 (但し、誘発処置のみの VI 群は除く) には *Candida albicans* ホルマリン固定細胞を右腹側部に誘発の 8 日前に皮下注射 (0.2 mL/匹) した。VII 群 (陽性対照群) には誘発処置前 4 日間連続でシクロホスファミド 50 mg/kg (10 mg/mL) を腹腔内投与した。安楽殺前 3 日、アッセイ 2 群の全ての動物を対象として、右後肢足趾の厚さを測定した後、*Candida albicans* キトサン抗原 (1.1 mg/mL) 100 μ L を皮下注射して誘発した。

交配・調整・選抜および観察・検査項目：

F0 世代母動物：

一般状態、自律神経機能および死亡率；試験期間中、生死を毎日2回以上観察した。一般状態および外観を検体投与前は週1回および妊娠0日に観察し、投与開始後は一般状態の変化を1日1回記録した。自律神経機能（流涙、流涎、眼瞼閉鎖状態、眼球突出、立毛、呼吸、排尿および排便を含む）の異常、異常姿勢、異常運動あるいは異常行動パターンおよび外観の異常についてケージ外での検査を妊娠6日以降1日1回行った。

体重；検体投与前は週1回および妊娠0日、投与期間中は1日1回および安楽殺前に測定した。

摂餌量；妊娠0日および検体投与期間中に1日1回測定した。

交配および妊娠の確認；雌雄1対1で最大5日間同居させ、膣垢塗抹標本中に精子が確認されるか、あるいは膣栓が認められた日を妊娠0日とした。

繁殖性；分娩中の症状観察で認められた異常所見、妊娠期間（妊娠0日から最初の児動物が観察された日まで）、同腹児数（全産児数）、生存同腹児数（生存産児数のみ）および出産時生存率について調べた。母動物の育児行動を哺育0、4、7、13および21日、また、一部の動物については哺育12および18日にも調べた。

肉眼的病理検査；21日間の哺育期間終了後、生存雌動物について剖検を行い、着床痕の数および分布を記録した。分娩の認められなかった動物は妊娠25日に剖検した。

F1 世代児動物（離乳前）：

生死を1日2回以上観察し、一般状態を1日1回観察した。児動物の個体別体重を哺育0、4、7、11、13、17および21日に測定した。途中死亡、および生後3あるいは4日に選抜されず安楽殺した児動物について肉眼的病理検査を実施した。

F1 世代動物（離乳後）：

生死を1日2回以上観察し、一般状態および外観を週1回観察した。

体重；週1回および安楽殺前に体重を測定した。アッセイ1のV群およびアッセイ2のVII群のみ、シクロホスファミド投与日に毎日体重を測定した。

摂餌量；週1回測定した。

肉眼的病理検査；免疫学的検査に選抜されなかった動物は約7週齢で安楽殺して剖検した。

アッセイ1群についてはヒツジ赤血球で感作および/あるいはシクロホスファミド投与後、アッセイ2群については最後の足趾腫脹の測定後、安楽殺して剖検した。

胸腺および脾臓重量；剖検時、アッセイ1群の全動物を対象として、胸腺および脾臓の重量を測定し、対体重比も算出した。

免疫学的検査；[アッセイ1（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

体反応)]

アッセイ 1 群については、安楽殺日 (脾臓採取) の翌日に各脾臓から単細胞懸濁液を調製した。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た。脾臓細胞数を調べて、抗体産生細胞 (AFC) 比活性 (AFC/脾臓細胞 10^6 個) および総活性 (AFC/脾臓) を算出した。

[アッセイ 2 (遅延型過敏 (DTH) 反応)]

アッセイ 2 群については誘発処置の約 24 および 48 時間後、足趾腫脹を測定した。

以上の概要を次頁表にまとめた。

世代	期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目
F0	交配 (同居期間は最大5日間)	雌雄1対1で交配。妊娠は膣栓あるいは膣垢中の精子で確認 (妊娠0日)。	生死を試験期間中毎日2回以上確認。
	妊娠 (3週間)		一般状態を妊娠0日および妊娠6日以降1日1回観察。 自律神経機能の異常、異常姿勢、異常運動あるいは異常行動パターンを妊娠6日以降1日1回観察。 体重および摂餌量を妊娠0日および投与期間中1日1回測定。
	出産 哺育 (3週間)	生後3あるいは4日に各同腹児数を10匹に調整	出産状況の観察 妊娠期間、全産児数、生存産児数、出産時生存率を算出。 児動物;生死を1日2回以上、一般状態を1日1回観察。生後0、4、7、11、13、17および21日に体重測定。 途中死亡、生後3あるいは4日に安楽殺の児動物について肉眼的病理検査。
F1	離乳	生後21日に免疫学的検査用に雌雄各190匹 (0 ppm 群雌雄各70匹、その他の投与群雌雄各40匹)を選抜し、アッセイ1およびアッセイ2用に割り当てた (可能ならば、1匹/性/腹/アッセイ)。 アッセイ1およびアッセイ2の群構成については投与方法の表参照	母動物の肉眼的病理検査。 F1世代動物; 生死は1日2回以上、一般状態は週1回観察。体重は週1回および安楽殺前に測定。アッセイ1のV群およびアッセイ2のVII群のみシクロホスファミド投与日に毎日体重測定。摂餌量は週1回測定。 アッセイ1群;肉眼的病理検査、胸腺および脾臓重量測定。脾臓細胞数、ヒツジ赤血球に対する脾臓IgM抗体産生細胞 (AFC) 反応の検査 (比活性 (AFC/脾臓細胞 10^6 個) および総活性 (AFC/脾臓) の算出)。 アッセイ2群;遅延型過敏反応 (DTH) の検査、肉眼的病理検査。 免疫学的検査用以外の動物は約7週齢で安楽殺し、肉眼的病理検査。

結果：概要を表1および2（免疫学的検査）に示した。

F0世代母動物；

死亡率；2000 ppm群の雌1匹において哺育21日に死亡が認められたが、この個体のみ認められたことから、検体投与に関連したものではないと考えられた。その他の動物は全て、計画安楽殺時まで生存していた。

一般状態；妊娠および哺育期間中に、限局性脱毛、被毛粗剛、歯の異常、着色鼻漏、軟便あるいは水様便、腫瘤（舌、正中線下部）および潰瘍（口）が認められたが、これらの所見は全て、1) 発生頻度に用量依存性が認められないこと、2) 1匹あるいは2匹の動物においてのみ認められた所見であること、および/あるいは3) 同系統のラットにおいて通常認められる所見であることから、検体投与に関連したものではないと考えられた。

自律神経機能；2000 ppm群において、眼瞼下垂の認められる動物数に有意な増加が認められた。妊娠および哺育期間中、その他の自律神経機能に関して認められた所見は全て1) 発生頻度に用量依存性が認められないこと、あるいは2) 1匹あるいは2匹の動物においてのみ認められた所見であることから、検体投与に関連したものではないと考えられた。

体重；2000 ppm群において、妊娠6～9日および18～20日に体重増加量の有意な減少が認められた。これらの減少により、2000 ppm群では妊娠期間（妊娠0～20日）を通して体重増加量の有意な減少となった。平均体重においても、妊娠9、10、13～16、18～20日に有意な低値が認められた。500 ppm以下の群では、妊娠期間中の体重および体重増加量に有意な変化は認められず、検体投与による影響は認められなかった。

哺育期間中の2000 ppm群の平均体重は妊娠期間中の低体重を反映し、測定日全てにおいて有意な低値であった。

また、500および2000 ppm群の哺育0～3日に有意な体重減少、500 ppm群の哺育0～21日および2000 ppm群の哺育3～6日に有意な体重増加量の減少、2000 ppm群の哺育9～13および16～21日に有意な体重増加量の増加が認められたが、これらの変化は1) 用量依存性が認められないこと、2) 持続性がないこと、および/あるいは3) 授乳中の母動物において通常認められる範囲の正常な体重変化であることから、検体投与に関連したものではないと考えられた。

摂餌量；妊娠期間中では、2000 ppm群において妊娠6～20日および各測定期間中（但し、妊娠15～18日の相対摂餌量を除く）に、絶対および相対摂餌量の有意な減少が認められた。その結果、2000 ppm群では全妊娠期間中（妊娠0～20日）の絶対および相対摂餌量の有意な減少が認められた。150 ppm群の妊娠12～15日に絶対および相対摂餌量の有意な減少、150 ppm群の妊娠15～18日に相対摂餌量の有意な増加、500 ppm群の妊娠15～18日に絶対および相対摂餌量の有意な増加が認められたが、これらは用量依存性がないこと、および持続性がないこ

とから、検体投与に関連しないものと考えられた。

哺育期間中では、500 および 2000 ppm 群において、500 ppm 群の哺育 6~9 日の相対摂餌量を除く全ての測定期間で、絶対および相対摂餌量の有意な減少が認められた。150 ppm 群では、絶対および相対摂餌量に検体投与による影響は認められなかった。

繁殖性；妊娠動物数は 0、150、500 および 2000 ppm 群でそれぞれ 24 匹 (96.0%)、21 匹 (84.0%)、25 匹 (100%) および 25 匹 (100%) であった。150 ppm 群の妊娠動物数に有意な低値が認められたが、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影響とは考えられなかった。

分娩観察のその他の検査項目（妊娠期間、出産母動物数、出産母動物当たりの平均着床痕数、出産率（生存児出産母動物数/妊娠動物数）、死産児出産母動物数、生産児なしの母動物数）について、検体投与による影響は認められなかった。

肉眼的病理検査；検体投与に関連した変化は認められなかった。

F1 世代児動物；

同腹児の平均体重では、2000 ppm 群において生後 4 日（児数調整前）～生後 21 日まで有意な低値が認められた。その他の検査項目（同腹児数、死亡児数、生存率および哺育率、一腹当たりの生存児数、性比、体重測定時生存同腹児数）については、検体投与による影響は認められなかった。

150 ppm 群において哺育 4 日目調整後の体重に有意な高値、500 ppm 群において出産児数、生存産児数および哺育 0 日の生存児数の有意な減少が認められたが、用量依存性が認められないことから、検体投与に関連しないものと考えられた。一般状態および剖検観察では、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。

F1 世代動物；

死亡率および一般状態；雌雄全ての動物が計画安楽殺時まで生存していた。検体に関連した所見は認められなかった。

体重；離乳後 1 日（生後 22 日）の体重において、500 および 2000 ppm 群の雄、2000 ppm 群の雌で有意な低値が認められた。雄ではアッセイ 1 およびアッセイ 2 群の両方の 500 および 2000 ppm 群において、雌では 2000 ppm 群において、生後 36 日まで有意な低値が続いた。

アッセイ 2 群の 500 ppm 群の雌で生後 29 日に体重の有意な低値が認められたが、持続性が認められないこと、およびアッセイ 1 群の雌で同様の低値が認められなかったことから、検体投与に関連したものではないと考えられた。

最終体重では、2000 ppm 群の雌雄において、アッセイ 1 および 2 群の両方で有

意な低値が認められた。

体重増加量では 500 および 2000 ppm 群の雌雄において、生後 22～29 日に有意な減少が認められた。体重増加量の有意な減少は、雌においてアッセイ 1 および 2 群ともに生後 36 日～安楽殺時の期間中に有意な減少が認められなかったのを除き、2000 ppm 群雌雄においてのみアッセイ 1 および 2 群とも生後 22～36 日、生後 22 日～安楽殺時に認められた。

摂餌量；絶対摂餌量の有意な減少が、500 ppm 群の雌雄において生後 22～29 日に、アッセイ 2 群の雌において生後 29～36 日および 22～36 日に認められた。2000 ppm 群では、アッセイ 1 および 2 群の雌雄で全ての測定期間で認められた。

相対摂餌量では、2000 ppm 群の雄において生後 22～29 日に有意な減少、アッセイ 1 群の雌で生後 29～36 日および 22～36 日に有意な増加が認められた。

肉眼的病理検査；検体に関連した変化は認められなかった。

脾臓および胸腺重量；脾臓および胸腺の絶対重量では、2000 ppm 群の雌雄において有意な減少が認められたが、対体重比に有意な変化が認められなかったことから、この絶対重量の減少は体重減少に関連したものと考えられた。

免疫学的検査；アッセイ 1 群の結果を下表に示した。

申請者注：哺育期間中の F0 母動物において、絶対および相対摂餌量の有意な減少が 500 および 2000 ppm 群で認められたが、体重増加量との明らかな関連がみられなかったことから、検体投与による影響とは考えなかった。

また、F1 世代の体重増加量において、150 ppm 群の雄で生後 22 日～安楽殺時および生後 36 日～安楽殺時に有意な増加が認められているが、用量依存性が認められないこと、軽微な増加性の変化であることから、検体投与に関連しないものと考えられた。

性別	雄						雌					
	II	III	IV	v ^{a)}	H / NH	傾向	II	III	IV	v ^{a)}	H / NH	傾向
投与量 (ppm)	150	500	2000	0		分析	150	500	2000	0		分析
最終体重	↑110	98	↓74	↓88	NH	##	102	99	↓79	↓87	H	##
脾臓重量	105	98	↓76	↓36	H	##	92	96	↓78	↓40	H	##
脾臓重量対体重比	97	97	103	↓42	H		90	94	100	↓45	NH	
胸腺重量	108	106	↓80	↓16	H	##	105	106	↓80	↓19	H	##
胸腺重量対体重比	100	108	108	↓19	H		103	106	100	↓22	H	
脾臓細胞数	110	109	↓76	↓17	NH	##	92	95	↓78	↓16	NH	##
IgM AFC / 脾臓細胞 10 ⁶ 個	↑216	155	57	↓12	NH	#	76	74	↑243	↓8	NH	##
IgM AFC / 脾臓	↑205	155	39	↓2	NH	##	68	71	↑199	↓1	NH	##

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。

a) 陽性対照であるシクロホスファミド投与群

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

Gehan-Wilcoxon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 (# : $p \leq 0.05$, ## : $p \leq 0.01$)

2000 ppm 群雌雄において、対照群と比較して最終体重の有意な低値が認められた。2000 ppm 群雌雄の脾臓および胸腺の絶対重量において有意な減少が認められたが、対体重比で有意差は認められなかった。従って、絶対重量の減少は最終体重の低値に関連したものと考えられた。150 ppm 群雄では最終体重の有意な高値が認められた。

脾臓細胞数では、2000 ppm 群雌雄において統計学的に有意な減少(それぞれ22%および24%)が認められた。これは2000 ppm 群では体重および脾臓重量の低値と関連するものと考えられた。一方、陽性対照であるシクロホスファミド投与群では、雌雄ともに対照群と比較して脾臓および胸腺の絶対重量および対体重比、脾臓細胞数の有意な減少が認められた。

T細胞依存性抗原であるヒツジ赤血球に対する脾臓IgM抗体反応(アッセイ1)では、150 ppm 群雄において比活性(AFC/脾臓細胞10⁶個)および総活性(AFC/脾臓)の有意な増加(それぞれ116%および105%)が認められた。さらに、2000 ppm 群雌において比活性および総活性の有意な増加(それぞれ143%および99%)が認められた。150 ppm 群雄および2000 ppm 群雌においてはどちらの群におい

でも、大半の動物の値は対照群と差がなかったが、高値を示す動物がそれぞれ3匹あり、これらの動物により対照群と比較して統計学的に有意に高い平均値となっているようであった。これらの増加はCr1:CD(SD)系ラットで生じるばらつきに起因するものと考えられた。2000 ppm 群の雄では比活性および総活性ともに減少が認められたが、統計学的に有意なものではなかった。一方、陽性対照であるシクロホスファミド投与群では、雌雄ともに対照群と比較して比活性および総活性の統計学的に有意な減少が認められた。

アッセイ 2 群の結果を下表に示した。

性別	雄							雌						
	II	III	IV	VI ^{a)}	VII ^{b)}	H / NH	傾向	II	III	IV	VI ^{a)}	VII ^{b)}	H / NH	傾向
投与量 (ppm)	150	500	2000	0	0			150	500	2000	0	0		
足腫 腫脹	24時間後	116	134	100	↓21	↓29	H		139	150	104	↓14	↓7	H
	48時間後	123	153	128	55	33	H		89	119	119	30	52	H

a) 誘発処置のみ

b) 陽性対照であるシクロホスファミド投与群

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

Gehan-Wilcoxon 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

陽性対照群および誘発処置のみの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。

遅延型過敏反応 (DTH) アッセイでは、いずれの検体投与群の雌雄も 24 時間あるいは 48 時間において影響は認められなかった。一方、陽性対照であるシクロホスファミド投与群では、反応ピークである 24 時間に足腫浮腫抑制が認められた。

以上の結果より、2 世代にわたって検体を飼料に混入して投与した場合 (F0 世代; 妊娠 6 日から児動物離乳まで、F1 世代; 離乳時から安楽殺まで)、2000 ppm 群で体重、体重増加量および摂餌量の低値、また、眼瞼下垂の発生頻度の増加が認められたことから、母動物の一般毒性に関する無毒性量は 500 ppm (妊娠期 (6~20 日) 35.0 mg/kg/日、哺育期 (0~13 日) 68.3 mg/kg/日) であると判断された。F1 世代では、500 および 2000 ppm 群の雄および 2000 ppm 群の雌において離乳時 (生後 22 日) に体重低値が認められ、離乳後は、体重、体重増加量および摂餌量の低値が 2000 ppm 群で持続して認められた。従って、F1

世代の一般毒性に関する無毒性量は 150 ppm (F0 雌：妊娠期 (6~20 日) 10.4 mg/kg/日、
哺育期 (0~13 日) 22.3 mg/kg/日、F1：雄；アッセイ 1 群 27.5 mg/kg/日、アッセイ 2 群
28.2 mg/kg/日、雌；アッセイ 1 群 26.4 mg/kg/日、アッセイ 2 群 26.8 mg/kg/日) である
と判断された。

本試験の条件下でクロチアニジン原体を妊娠 6 日から生後約 7 週齢まで暴露させた結果、
F1 世代の液性免疫および細胞性免疫において検体投与の影響は認められなかった。

結果の概要表 1

群		I	II	III	IV	
投与量 (ppm)		0	150	500	2000	
1群あたり動物数		25	25	25	25	
妊娠動物数		24	↓21	25	25	
死亡数		0	0	0	1 ^{a)}	
一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった				
自律神経機能：検査例数		24	20	25	25	
眼瞼下垂		0	0	0	↑6	
平均体重	妊娠期	—	有意差なし	有意差なし	↓：9、10、15、16日 ↓：13、14、18-20日	
	哺育期	—	有意差なし	有意差なし	↓：0、21日 ↓：3、6、9、13、16日	
体重増加量	妊娠期	—	有意差なし	有意差なし	↓：6-9、18-20、6-20、0-20日	
	哺育期	—	有意差なし	↓：0-3、0-21日	↓：0-3、3-6日 ↑：9-13、16-21日	
摂餌量	妊娠期	絶対	—	↓：12-15日 ↑：15-18日	↓：6-9、9-12、12-15、18-20、6-20、0-20日 ↓：15-18日	
		相対	—	↓：12-15日 ↑：15-18日	↑：15-18日 ↓：6-9、9-12、12-15、18-20、6-20、0-20日	
	哺育期	絶対	—	有意差なし	↓：0-3、3-6、9-13、13-16、0-21日 ↓：6-9、16-21日	↓：0-3、3-6、6-9、9-13、13-16、16-21、0-21日
		相対	—	有意差なし	↓：0-3、3-6、9-13、13-16、0-21日 ↓：16-21日	↓：0-3、3-6、6-9、13-16、16-21、0-21日 ↓：9-13日
検体摂取量 (mg/kg/日)	妊娠 6-20日	—	10.4	35.0	120.6	
		—	22.3	68.3	249.7	
	哺育 13-16日	—	30.6	92.4	366.6	
		—	35.6	106.5	396.2	
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				

—：対照群

a) 哺育 21 日目死亡。

対照群との有意差の検定 (↓↑：p < 0.05、↓↑：p < 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

2 項分布の等質性の分散分析；頻度データ

(つづく)

結果の概要表 1 (つづき)

群		I	II	III	IV	
投与量 (ppm)		0	150	500	2000	
1群あたり動物数		25	25	25	25	
母動物	妊娠動物数 (%)	24 (96.0)	↓ 21 (84.0)	25 (100.0)	25 (100.0)	
	出産母動物数 (%)	24 (100.0)	20 (95.2)	25 (100.0)	25 (100.0)	
	妊娠期間 ^{a)} (日)	22.4	22.5	22.4	22.6	
	平均着床痕数/出産母	14.5	13.0	13.0	13.6	
	死産児出産母動物数 (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.0)	3 (12.0)	
	生産児なし母動物数 (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	出産率 ^{b)}	100.0	95.2	100.0	100.0	
	生後 0~3 日全児死亡母動物数 (%)	0 (0.0)	1 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	生後 4~21 日全児死亡母動物数 (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
F1 児動物	平均産児数		14.0	12.2	↓ 11.8	13.2
	平均生存産児数		13.9	12.2	↓ 11.8	13.0
	平均死産児数		0.0	0.0	0.0	0.1
	生存率 ^{c) d)} (%)		98.8	99.1	98.9	98.8
	哺育率 ^{e)} (%)		100.0	98.9	100.0	100.0
	生存児数	生後 0 日	13.9	12.2	↓ 11.8	13.0
		生後 4 日 ^{f)} (調整前)	13.7	11.8	11.0	12.9
		生後 4 日 (調整後)	10.0	9.4	9.2	9.9
		生後 7 日	10.0	9.4	9.2	9.9
		生後 11 日	10.0	9.4	9.2	9.9
		生後 13 日	10.0	9.4	9.2	9.9
		生後 17 日	10.0	9.4	9.2	9.9
	性比 (%)	生後 0 日	49.4	52.8	51.3	51.4
		生後 4 日 ^{f)} (調整前)	48.5	48.3	49.1	50.0
		生後 4 日 (調整後)	50.8	50.9	52.7	50.5
生後 21 日		50.8	51.0	52.7	50.5	

a) 妊娠期間 : 妊娠 0 日目から第一児出産日までの日数

b) 出産率 : (生存児出産動物数/妊娠動物数) × 100

c) 生存率 : (生後 4 日目調整前生存児数/生後 0 日目生産児数) × 100

d) 生後 3 日目に間引きされた児動物を除く

e) 哺育率 : (生後 21 日目 (離乳時) 生存児数/生後 4 日目生存児数 (調整後)) × 100

f) 生後 3 日目に児数調整した同腹児を除く

g) 性比 : (雄児動物数/雌雄児動物数) × 100

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

Dunnnett 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

2 項分布の等質性の分散分析 ; 頻度データ

(つづく)

結果の概要表 1 (つづき)

群		I	II	III	IV			
投与量 (ppm)		0	150	500	2000			
F1 児動物	同 腹 児 体 重 (g)	生後 0 日	6.4	6.5	6.5	6.4		
		生後 4 日 ^{a)} (調整前)	10.3	10.8	10.6	↓9.1		
		生後 4 日(調整後)	10.4	↑11.1	10.7	↓9.2		
		生後 7 日	16.1	16.5	15.8	↓12.7		
		生後 11 日	23.7	24.1	23.1	↓17.6		
		生後 13 日	26.8	27.3	25.8	↓20.2		
		生後 17 日	34.4	34.7	32.7	↓26.4		
		生後 21 日	45.4	46.4	42.8	↓33.8		
	一般状態		検体投与に起因する異常は認められなかった					
	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					
F1 動物	検査動物数 ^{b)}	雄	40	40	40	40		
		雌	40	40	40	40		
	死亡数	雄	0	0	0	0		
		雌	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 (g)	生後 22 日	雄	50.4	52.4	↓46.2	↓36.2	
			雌	48.0	49.8	45.9	↓34.5	
		ア ッ セ イ 1	生後 29 日	雄	91.7	97.0	↓84.8	↓67.6
				雌	85.2	87.8	81.2	↓60.2
			生後 36 日	雄	147.3	152.0	↓138.4	↓109.5
			雌	125.0	128.4	121.2	↓94.0	
最 終 体 重		雄	202.0	↑214.0	198.6	↓150.2		
		雌	161.2	164.2	159.9	↓128.0		
		ア ッ セ イ 2	生後 29 日	雄	96.0	96.8	↓85.8	↓67.8
				雌	86.2	88.2	↓81.2	↓65.6
生後 36 日		雄	151.0	153.4	↓138.8	↓111.1		
		雌	127.2	129.2	122.5	↓101.0		
最 終 体 重		雄	205.0	217.0	197.3	↓152.8		
		雌	157.6	163.2	155.5	↓128.4		

a) 生後 3 日目に児数調整した同腹児を除く

b) アッセイ 1 およびアッセイ 2 を合わせた数。アッセイ 1 およびアッセイ 2 の各検査動物数は各群雌雄各 20 匹。

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

Dunnnett 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

2 項分布の等質性の分散分析; 頻度データ

なお、F1 世代動物については I~IV 群についてのみ統計解析を行った。

(つづく)

結果の概要表 1 (つづき)

群			I	II	III	IV		
投与量 (ppm)			0	150	500	2000		
F1 動物	検査動物数 ^{a)}		雄	40	40	40	40	
			雌	40	40	40	40	
	体重増加量 (g)	生後 22~29 日	雄	43.5	44.6	↓39.1	↓31.4	
			雌	37.7	38.3	↓35.3	↓28.3	
		アッセイ 1	生後 29~36 日	雄	55.6	55.0	53.6	↓41.8
				雌	39.8	40.5	40.0	↓33.8
			生後 36 日~安楽殺	雄	54.6	↑62.0	60.3	↓40.7
				雌	36.2	35.9	38.7	34.1
		生後 22 日~安楽殺	雄	152.8	↑162.0	152.4	↓114.2	
			雌	113.4	114.8	114.0	↓94.0	
		アッセイ 2	生後 29~36 日	雄	55.0	56.6	53.0	↓43.4
				雌	41.0	40.9	41.4	↓35.4
			生後 36 日~安楽殺	雄	54.0	↑63.6	58.5	↓41.6
				雌	30.4	34.0	33.0	27.4
	生後 22 日~安楽殺	雄	153.4	↑164.3	151.2	↓116.2		
		雌	109.4	113.1	109.6	↓93.4		
	絶対摂餌量 (g/日)	生後 22~29 日	雄	12.6	12.6	↓10.9	↓8.5	
			雌	11.9	11.9	↓11.1	↓8.5	
		アッセイ 1	生後 29~36 日	雄	18.7	18.4	17.5	↓14.4
				雌	16.0	15.6	15.3	↓12.6
生後 22~36 日		雄	18.6	18.3	17.5	↓14.3		
		雌	16.0	15.6	15.3	↓12.5		
アッセイ 2		生後 29~36 日	雄	18.3	19.0	15.8	↓12.1	
			雌	16.5	15.9	↓15.3	↓13.3	
生後 22~36 日		雄	18.2	18.9	15.9	↓12.0		
		雌	16.5	15.9	↓15.3	↓13.3		

a) アッセイ 1 およびアッセイ 2 を合わせた数。アッセイ 1 およびアッセイ 2 の各検査動物数は各群雌雄各 20 匹。

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

Dunnnett 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

2 項分布の等質性の分散分析; 頻度データ

なお、F1 世代動物については I~IV 群についてのみ統計解析を行った。

(つづく)

結果の概要表 1 (つづき)

群			I	II	III	IV		
投与量 (ppm)			0	150	500	2000		
F1 動物	検査動物数 ^{a)}		雄	40	40	40	40	
			雌	40	40	40	40	
	相対摂餌量 (g/kg/日)	生後 22~29日	雄	174.4	169.6	166.2	↓163.2	
			雌	178.4	172.7	175.4	172.8	
		アッセイ1 生後 29~36日	雄	157.0	148.5	157.4	162.6	
			雌	152.5	144.0	151.7	↑165.4	
		アッセイ2 生後 22~36日	雄	194.5	183.3	195.8	201.8	
			雌	186.8	175.8	185.7	↑202.2	
	検体採取量 (mg/kg/日)	アッセイ1 生後 22~36日	雄	—	27.5	97.9	403.7	
			雌	—	26.4	92.9	404.4	
		アッセイ2 生後 22~36日	雄	—	28.2	88.9	337.7	
			雌	—	26.8	92.6	398.0	
		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			
		臓器重量	アッセイ1	脾臓重量 (g)	雄	0.71	0.73	0.70
雌	0.49				0.45	0.47	↓0.38	
脾臓重量 体重比 (%)	雄			0.355	0.341	0.351	0.365	
	雌			0.304	0.275	0.291	0.305	
胸腺重量 (g)	雄			0.72	0.77	0.77	↓0.57	
	雌			0.57	0.60	0.60	↓0.45	
胸腺重量 体重比 (%)	雄	0.356	0.358	0.386	0.386			
	雌	0.356	0.367	0.378	0.355			

a) アッセイ1およびアッセイ2を合わせた数。アッセイ1およびアッセイ2の各検査動物数は各群雌雄各20匹。

対照群との有意差の検定 (↓↑: p < 0.05, ↓↓↑↑: p < 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

2項分布の等質性の分散分析; 頻度データ

なお、F1世代動物についてはI~IV群についてのみ統計解析を行った。

結果の概要表 2 (免疫学的検査)

群			I	II	III	IV	V	VI	VII	H	傾向 検定
			対照	クロチアニジン			陽性 対照	誘発 のみ	陽性 対照	/ NH	
投与量 (ppm)			0	150	500	2000	0	0	0		
ア ッ セ イ 1	検査動物数	雄	20	20	20	20	10	—	—	—	—
		雌	20	20	20	20	10	—	—	—	—
	最終体重 (g)	雄	202.0	↑223.1	198.7	↓150.2	↓178.1	—	—	NH	##
		雌	161.2	164.3	159.9	↓128.1	↓140.6	—	—	H	##
	脾臓重量 (mg)	雄	714	753	699	↓546	↓258	—	—	H	##
		雌	490	453	469	↓383	↓195	—	—	H	##
	脾臓重量 体重比 (%)	雄	0.36	0.35	0.35	0.37	↓0.15	—	—	H	
		雌	0.31	0.28	0.29	0.31	↓0.14	—	—	NH	
	胸腺重量 (mg)	雄	722	777	768	↓574	↓118	—	—	H	##
		雌	572	601	605	↓455	↓107	—	—	H	##
	胸腺重量 体重比 (%)	雄	0.36	0.36	0.39	0.39	↓0.07	—	—	H	
		雌	0.36	0.37	0.38	0.36	↓0.08	—	—	H	
	脾臓細胞数 (×10 ⁷)	雄	77.91	85.79	84.97	↓59.53	↓12.98	—	—	NH	##
		雌	51.35	47.42	48.75	↓40.14	↓8.24	—	—	NH	##
	IgM AFC/脾臓 細胞 10 ⁶ 個	雄	129	↑278	200	73	↓16	—	—	NH	#
		雌	286	218	211	↑696	↓24	—	—	NH	##
IgM AFC/脾臓 (×10 ³)	雄	111	↑228	172	43	↓2	—	—	NH	##	
	雌	140	95	100	↑278	↓2	—	—	NH	##	
ア ッ セ イ 2	検査動物数	雄	20	20	20	20	—	10	9	—	—
		雌	20	20	20	20	—	10	10	—	—
足 腫 脹 眼	24 時間後 (mm×100)	雄	56	65	75	56	—	↓12	↓16	H	
		雌	28	39	42	29	—	↓4	↓2	H	
	48 時間後 (mm×100)	雄	40	49	61	51	—	22	13	H	
		雌	27	24	32	32	—	8	14	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 ≤ 0.05、↑ ↓ : p ≤ 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

Gehan-Wilcoxon 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

陽性対照群および誘発処置のみの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 ≤ 0.05、## : p ≤ 0.01)

2. 原体混在物及び代謝物を用いた試験成績

(1) TZNG のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 2-1)

試験機関：Covance Laboratories (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年：1999 年

供試検体：検体名；TZNG (原体混在物 C、代謝物 II)

由来；

純度；

化学名；

試験動物：CrI:CD. BR 系ラット

(8~11 週齢、体重：雄 302~340g、雌 198~224g) 1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

方法：検体を 5%アラビアゴム水溶液に懸濁させ、所定濃度に調製後、体重 100g 当たり 2mL をプラスチック製シリンジを用いて 1 回強制経口投与した。なお、動物を投与前夜から絶食させ、試験に供した。

まず雌へ 3 群投与して LD₅₀ 値を算出し、その LD₅₀ 値相当量を雄へ投与して感受性の確認を行った。

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

結果：

投与方法	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	1450	1125、1350、1620
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	1450 で死亡例なし	1481 (1257~1882)
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	投与後 3 日から開始 投与後 5 日に終了
症状発現時間 及び消失時期	投与後 2 時間から発現 投与後 3 日に消失	投与後 1 時間から発現 投与後 12 日に消失
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	1450	1125

試験期間中、死亡例は投与3日後より5日後までの間に認められた。また雌雄間で死亡例に感受性の差は認められなかった。中毒症状としては主に嗜眠及び眼瞼閉鎖がみられた。体重では投与前半に数例に体重低下が見られたが、その後回復した。剖検所見では雌の死亡例に肺の暗/赤色化、胃の赤/暗色化、蒼白化及び拡張が見られ、雄では精巣の矮小及び軟化が認められ、結腸の拡張も認められた。

(2) TZNG の細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 2-2)

試験機関 : Covance Laboratories (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1999 年

供試検体 : 検体名 ; TZNG (原体混在物 C、代謝物 II)

由来 ;

純度 ;

化学名 ;

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。

試験濃度は実験 1 では 8~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で 5 用量、実験 2 では 156.25~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で 6 用量とした。試験は 3 連制で 2 回行った。

実験 1 ではプレート法、実験 2 では用量間隔を狭くし、プレインキュベーション法 (S-9 Mix 存在下のみ) にて実施した。

試験結果 : 結果を次表に示した。

実験 1 において S-9 Mix 非存在下、TA1535 株の 1000 及び 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ において有意に復帰変異コロニー数が増加したが、これらは非常に軽微なものであり、また実験 2 においてその再現性が認められなかったことより復帰変異誘発性はないものと考えられた。

実験 2 では S-9 Mix 存在下、TA100 株の 312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ において有意な復帰変異コロニー数の増加が認められた。しかし、用量相関性は認められず、実験 1 では復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことより、復帰変異誘発性はないものと考えられた。

その他の菌株については、2 回の実験ともに 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。

一方、陽性対照として用いた 2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (NaN_3)、9-アミノアクリジン (AAC)、グルタルアルデヒド (GLU) (S-9 Mix 非存在下) 及び 2-アミノアントラセン (AAN) (S-9 Mix 存在下) 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。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

以上の結果より、TZNG 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)	-	-	95	15	328	34	13
TZNG	8	-	107	19	332	37	18
	40	-	102	20	331	30	13
	200	-	95	20	313	26	16
	1000	-	99	23*	326	41	16
	5000	-	113	28***	248	20#	13
溶媒対照 (DMSO)	-	+	120	21	316	34	14
TZNG	8	+	113	20	343	35	14
	40	+	125	20	319	35	12
	200	+	113	17	339	35	14
	1000	+	125	20	262	28	15
	5000	+	135	16	214	27	13
陽性 対照	2NF	5	-	-	-	1103	-
	NaN ₃	2	-	574	-	-	-
			-	-	463	-	-
	AAC	50	-	-	-	-	337
	GLU	25	-	-	-	658	-
AAN	5	+	1635	163	-	1912	-

Dunnett's test, * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.005$

: わずかな細胞毒性が認められた

DMSO : ジメチルスルホキシド

2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN₃ : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

GLU : グルタルアルデヒド

AAN : 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)	-	-	141	23	316	37	16
TZNG	156.25	-	144	21	308	42	19
	312.5	-	138	23	290	36	15
	625	-	145	22	282	39	12
	1250	-	138	21	268	26	14
	2500	-	145	24	274	33	14
	5000	-	153#	24	225#	35#	14#
溶媒対照 (DMSO)	-	+	157	29	354	46	18
TZNG	156.25	+	167	30	396	47	15
	312.5	+	182*	22	307	38	17
	625	+	165	26	339	35	16
	1250	+	158	34	283	38	19
	2500	+	163	18	267	32	15
	5000	+	145#	23	170#	27#	10#
陽性 対照	2NF	5	-	-	-	954	-
	NaN ₃	2	-	663	-	-	-
			-	-	450	-	-
	AAC	50	-	-	-	-	522
	GLU	25	-	-	-	795	-
AAN	5	+	1582	-	-	1466	-

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

: わずかな細胞毒性が認められた

DMSO : ジメチルスルホキシド

2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN₃ : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

GLU : グルタルアルデヒド

AAN : 2-アミノアントラセン

(3) TZMU のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 2-3)

試験機関：Covance Laboratories (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年：1999 年

供試検体：検体名；TZMU (原体混在物 A、代謝物 III)

由来；

純度；

化学名；

試験動物：Cr1:CD. BR 系ラット

(7~11 週齢、体重：雄 217~321g、雌 194~232g) 1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

方法：検体を 5%アラビアゴム水溶液に懸濁させ、所定濃度に調製後、体重 100g 当たり 2mL をプラスチック製シリンジを用いて 1 回強制経口投与した。なお、動物を投与前夜から絶食させ、試験に供した。

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

結果：

投 与 方 法	経 口	
	雄	雌
投 与 量 (mg/kg)	920、1152、1440、1800、2250	
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	1424 (1104~1824)	1282 (912~1613)
死 亡 開 始 時 間 及 び 終 了 時 間	投与後 5 時間から開始 投与後 2 日に終了	投与後 4.5 時間から開始 投与後 2 日に終了
症 状 発 現 時 間 及 び 消 失 時 期	投与後 15 分から発現 投与後 4 日に消失	
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	920	920

試験期間中、死亡例は雌雄で投与後 4.5 時間から 2 日までの間に認められた。中毒症状としては雌雄ともに嗜眠及び眼瞼閉鎖がみられた。体重に及ぼす検体の影響はみられなかった。剖検所見では死亡例に肺の拡張及び暗色化、胃粘膜の黄色化、盲腸の埋伏、肝臓の蒼白化及び斑紋が見られた。生存例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。

(4) TZMU の細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 2-4)

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

報告書作成年 : 1999 年

供試検体 : 検体名 ; TZMU (原体混在物 A、代謝物 III)

由来 ;

純度 ;

化学名 ;

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。

試験濃度は実験 1 では 8~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で 5 用量、実験 2 では 51.2~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で 6 用量とした。試験は 3 連制で 2 回行った。

実験 1 ではプレート法、実験 2 では用量間隔を狭くしプレインキュベーション法 (S-9 Mix 存在下) にて実施した。

試験結果 : 結果を次表に示した。

実験 2 において S-9 Mix 非存在下、TA102 株において復帰変異コロニー数の有意な増加が認められた (有意水準 1% において有意差が認められたのは、最高用量群のみであった)。しかしその増加は比較的軽微であり、また実験 1 では復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから再現性はなく、復帰変異誘発性はないものと考えられた。

その他の菌株については、2 回の実験ともに 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。

一方、陽性対照として用いた 2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (NaN_3)、9-アミノアクリジン (AAC)、グルタルアルデヒド (GLU) (S-9 Mix 非存在下) 及び 2-アミノアントラセン (AAN) (S-9 Mix 存在下) 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、TZMU は代謝活性化系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)	-	-	87	20	299	27	6
TZMU	8	-	101	14	267	29	9
	40	-	85	11	278	31	7
	200	-	82	20	289	23	7
	1000	-	108	19	289	25	7
	5000	-	120	11	205	21	12
溶媒対照 (DMSO)	-	+	102	21	328	34	10
TZMU	8	+	120	20	317	34	9
	40	+	100	20	295	31	12
	200	+	95	14	296	36	8
	1000	+	121	14	277	29	9
	5000	+	119	21	230	24	6
陽性 対照	2NF	5	-	-	-	619	-
	NaN ₃	2	-	357	-	-	-
			-	-	356	-	-
	AAC	50	-	-	-	-	432
	GLU	25	-	-	-	451	-
AAN	5	+	1287	251	-	938	-

Dunnett's test

DMSO : ジメチルスルホキシド

2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN₃ : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

GLU : グルタルアルデヒド

AAN : 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)	—	-	94	18	336	30	7
TZMU	51.2	-	109	14	398*	36	9
	128	-	104	13	386*	26	9
	320	-	108	14	393*	37	4
	800	-	106	24	390*	33	10
	2000	-	98	19	374	37	7
	5000	-	110	16	426***	25	6
溶媒対照 (DMSO)	—	+	152	22	499	48	9
TZMU	51.2	+	148	16	445	47	8
	128	+	149	18	411	43	10
	320	+	168	21	470	58	10
	800	+	172	18	449	54	13
	2000	+	147	15	473	50	12
	5000	+	148	18	485	48	14
陽性 対照	2NF	5	-	-	-	561	-
	NaN ₃	2	-	658	-	-	-
			-	-	429	-	-
	AAC	50	-	-	-	-	521
	GLU	25	-	-	-	784	-
AAN	5	+	1405	-	-	1422	-

Dunnett's test, *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$

DMSO: ジメチルスルホキシド

2NF: 2-ニトロフルオレン

NaN₃: アジ化ナトリウム

AAC: 9-アミノアクリジン

GLU: グルタルアルデヒド

AAN: 2-アミノアントラセン

(5) TMG のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 2-5)

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

報告書作成年 : 1999 年

供試検体 : 検体名 ; TMG (代謝物 No. VI)

由来 ;

純度 ;

化学名 ;

試験動物 : CrI:CD. BR 系ラット

(8~11 週齢、体重 : 雄 293~335g、雌 194~236g) 1 群雌雄各 5 匹

試験期間 : 14 日間観察

方法 : 検体を 5%アラビアゴム水溶液に懸濁させ、所定濃度に調製後、体重 100g 当たり 2mL をプラスチック製シリンジを用いて 1 回強制経口投与した。なお、動物を投与前夜から絶食させ、試験に供した。

まず雌へ 3 群投与して LD₅₀ 値を算出し、その LD₅₀ 値相当量を雄へ投与して感受性の確認を行った。

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

結果 :

投 与 方 法	経 口	
	雄	雌
投 与 量 (mg/kg)	550	225、650、1100
LD ₅₀ (mg/kg)	550 で 3 例死亡	567
死 亡 開 始 時 間 及 び 終 了 時 間	投与後 2 時間から開始 投与後 2 日に終了	投与後 1 時間から開始 投与後 2 日に終了
症 状 発 現 時 間 及 び 消 失 時 期	投与後 30 分から発現 投与後 3 日に消失	投与後 15 分から発現 投与後 3 日に消失
死亡例の認められ なかつた最高投与量 (mg/kg)	—	225

試験期間中、死亡例は投与後1時間以内から2日後までの間に認められた。また雌雄間で死亡例に感受性の差は認められなかった。

中毒症状として主に嗜眠及び眼瞼閉鎖が認められた。体重に及ぼす検体の影響はみられなかった。剖検所見では、死亡例に肺及び肝臓の暗色化、肺及び空腸の拡張がみられ、生存例では1例で腎臓に斑紋が認められたのみであり、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

(6) TMG の細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 2-6)

試験機関 : Covance Laboratories (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1999 年

供試検体 : 検体名 ; TMG (代謝物 No. VI)

由来 ;

純度 ;

化学名 ;

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。

試験濃度は実験 1 では 8~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で 5 用量、実験 2 では 156.25~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で 6 用量とした。試験は 3 連制で 2 回行った。

実験 1 ではプレート法、実験 2 では用量間隔を狭くしプレインキュベーション法 (S-9 Mix 存在下) 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。

一方、陽性対照として用いた 2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (NaN_3)、9-アミノアクリジン (AAC)、グルタルアルデヒド (GLU) (S-9 Mix 非存在下) 及び 2-アミノアントラセン (AAN) (S-9 Mix 存在下) 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、TMG は代謝活性化系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 (DMF)	—	-	101	16	317	33	13
TMG	8	-	93	17	334	28	15
	40	-	101	17	303	23	11
	200	-	96	17	295	40	14
	1000	-	99	16	326	30	19
	5000	-	96	20	297	40	18
溶媒対照 (DMF)	—	+	105	20	345	32	13
TMG	8	+	120	18	235	36	12
	40	+	106	16	239	33	11
	200	+	110	11	299	30	14
	1000	+	96	21	292	36	10
	5000	+	100	18	255	35	13
陽性 対照	2NF	5	-	-	-	995	-
	NaN ₃	2	-	583	-	-	-
			-	-	441	-	-
	AAC	50	-	-	-	-	379
	GLU	25	-	-	-	616	-
AAN	5	+	1742	163	-	1812	-

Dunnett's test

DMF : ジメチルホルムアミド

2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN₃ : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

GLU : グルタルアルデヒド

AAN : 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 (DMF)	-	-	133	24	304	40	13	
TMG	156.25	-	127	22	303	37	8	
	312.5	-	119	14	301	33	13	
	625	-	111	25	311	39	17	
	1250	-	117	13	300	34	17	
	2500	-	137	19	311	38	15	
	5000	-	117	21	270	34	14	
溶媒対照 (DMF)	-	+	149	26	395	48	20	
TMG	156.25	+	152	30	426	47	14	
	312.5	+	150	24	374	41	13	
	625	+	139	21	356	40	12	
	1250	+	155	19	364	41	10	
	2500	+	145	18	289	47	12	
	5000	+	144#	18	308	36#	15#	
陽性 対照	2NF	5	-	-	-	-	897	-
	NaN ₃	2	-	613	-	-	-	-
			-	-	566	-	-	-
	AAC	50	-	-	-	-	-	655
	GLU	25	-	-	-	799	-	-
AAN	5	+	1820	-	-	1615	-	

Dunnett's test

: わずかな細胞毒性が認められた

DMF : ジメチルホルムアミド

2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN₃ : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

GLU : グルタルアルデヒド

AAN : 2-アミノアントラセン

(7) MG のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 2-7)

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

報告書作成年 : 1999 年

供試検体 : 検体名 ; MG (代謝物 No. VII)

由来 ;

純度 ;

化学名 ;

試験動物 : Cr1:CD. BR 系ラット

(5~8 週齢、体重 : 雄 217~260g、雌 186~218g) 1 群雌雄各 5 匹

試験期間 : 14 日間観察

方法 : 検体を 5%アラビアゴム水溶液に懸濁させ、所定濃度に調製後、体重 100g 当たり 2mL をプラスチック製シリンジを用いて 1 回強制経口投与した。なお、動物を投与前夜から絶食させ、試験に供した。

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

結果 :

投 与 方 法	経 口	
	雄	雌
投 与 量 (mg/kg)	260、355、435、530、650	
LD ₅₀ (mg/kg) (95% 信頼限界)	550	446 (376~522)
死 亡 開 始 時 間 及 び 終 了 時 間	投与後 1 時間から開始 投与後 1 日に終了	投与後 1 時間から開始 投与後 2 日に終了
症 状 発 現 時 間 及 び 消 失 時 期	投与後 30 分から発現 投与後 5 日に消失	投与後 30 分から発現 投与後 5 日に消失
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	435	355

試験期間中、死亡例は雌雄で投与後 1 時間以内から 2 日までの間に認められた。中毒症状としては投与当日に主に鼻部の汚れ、流涎、弓背位、円背位が認められた。体重に及ぼす検体の影響はみられなかった。

剖検所見では死亡例に肺の暗赤色化及び膨張、胃の拡張及び蒼白化、小腸の肥大がみられたが、生存例では 1 例に腎盂拡張が見られたのみであり、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

(8) MG の細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 2-8)

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

報告書作成年 : 1999 年

供試検体 : 検体名 ; MG (代謝物 No. VII)

由来 ;

純度 ;

化学名 ;

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。

試験濃度は実験 1 では 8~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で 5 用量、実験 2 では 51.2~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で 6 用量とした。試験は 3 連制で 2 回行った。

実験 1 ではプレート法、実験 2 では用量間隔を狭くしプレインキュベーション法 (S-9 Mix 存在下) にて実施した。

試験結果 : 結果を次表に示した。

実験 1 において S-9 Mix 存在下、TA102 株の 1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ において有意な復帰変異コロニー数の増加 ($p < 0.05$) が認められた。しかし用量相関性は認められず、再現性も認められなかったことから復帰変異誘発性はないものと考えられた。

実験 2 において S-9 Mix 非存在下、TA1535 株の中間用量群において有意 ($p < 0.01$) な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また S-9 Mix 非存在下、TA98 株の 128 $\mu\text{g}/\text{plate}$ においても有意 ($p < 0.05$) な復帰変異コロニー数の増加が認められた。しかしいずれも軽微であり、用量相関性が認められなかったことから復帰変異誘発性はないものと考えられた。

その他の菌株については、2 回の実験ともに 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。

一方、陽性対照として用いた 2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (NaN_3)、9-アミノアクリジン (AAC)、グルタルアルデヒド (GLU) (S-9 Mix 非存在下) 及び 2-アミノアントラセン (AAN) (S-9 Mix 存在下) 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、MG 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(純水)	—	-	89	10	268	18	4
MG	8	-	97	9	266	18	6
	40	-	75	9	308	14	5
	200	-	78	11	271	21	5
	1000	-	96	14	282	19	6
	5000	-	88	9	270	21	8
溶媒対照(純水)	—	+	110	15	271	26	9
MG	8	+	110	14	275	27	5
	40	+	114	10	255	25	7
	200	+	102	16	249	29	8
	1000	+	113	14	300*	26	9
	5000	+	100	15	278	27	5
陽性 対照	2NF	5	-	-	-	358	-
	NaN ₃	2	-	424	-	-	-
			-	-	386	-	-
	AAC	50	-	-	-	-	349
	GLU	25	-	-	-	477	-
AAN	5	+	1070	155	-	950	-

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

2NF: 2-ニトロフルオレン

NaN₃: アジ化ナトリウム

AAC: 9-アミノアクリジン

GLU: グルタルアルデヒド

AAN: 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(純水)	100	-	98	13	347	26	7	
MG	51.2	-	104	14	349	25	5	
	128	-	90	13	369	33*	7	
	320	-	79	22**	344	23	6	
	800	-	83	16	326	30	7	
	2000	-	89	11	298	30	5	
	5000	-	88	17	298	27	6	
溶媒対照(純水)	100	+	147	20	475	42	9	
MG	51.2	+	151	17	461	43	9	
	128	+	154	18	472	41	8	
	320	+	148	15	455	32	7	
	800	+	121	15	471	46	8	
	2000	+	167	16	463	37	6	
	5000	+	151	20	485	40	11	
陽性 対照	2NF	5	-	-	-	-	491	-
	NaN ₃	2	-	533	-	-	-	-
			-	-	304	-	-	-
	AAC	50	-	-	-	-	-	366
	GLU	25	-	-	-	601	-	-
AAN	5	+	644	-	-	839	-	

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

2NF: 2-ニトロフルオレン

NaN₃: アジ化ナトリウム

AAC: 9-アミノアクリジン

GLU: グルタルアルデヒド

AAN: 2-アミノアントラセン

(9) MAI のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 2-9)

試験機関：Covance Laboratories (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年：1999年

供試検体：検体名；MAI (代謝物 No. VIII)

由来；

純度；

化学名；

試験動物：CrI:CD(SD) IGS. BR 系ラット (雄 6~8 週齢、雌 9~11 週齢、体重：雄 218~253g、雌 195~232g)、1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

方法：検体を 5%アラビアゴム水溶液に懸濁させ、所定濃度に調製後、体重 100g 当たり 2mL をプラスチック製シリンジを用いて 1 回強制経口投与した。なお、動物を投与前夜から絶食させ、試験に供した。

まず雌へ 3 群投与して LD₅₀ 値を算出し、その LD₅₀ 値相当量を雄へ投与して感受性の確認を行った。

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

結果：

投 与 方 法	経 口	
	雄	雌
投 与 量 (mg/kg)	650、760	500、650、750、850
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	650 で死亡例なし 760 で 2 例死亡	758 (629~1072)
死 亡 開 始 時 間 及 び 終 了 時 間	投与後 2 日から開始 投与後 3 日に終了	投与後 2 日から開始 投与後 5 日に終了
症 状 発 現 時 間 及 び 消 失 時 期	投与後 2 時間に発現 投与後 7 日に消失	投与後 1 時間に発現 投与後 8 日に消失
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	650	500

試験期間中、死亡例は雌雄で投与翌日から5日までの間に認められた。また雌雄間で死亡例に感受性の差は認められなかった。

中毒症状としては主に眼瞼閉鎖及び嗜眠がみられた。体重では数例低下が認められたが、その後回復した。剖検所見では死亡例に肺の暗赤色化及び拡張、胃の異常内容物、小腸表面の緑色化等がみられたが、生存例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。

(10) MAI の細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 2-10)

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

報告書作成年 : 1999 年

供試検体 : 検体名 ; MAI (代謝物 No. VIII)

由来 ;

純度 ;

化学名 ;

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。

試験濃度は実験 1 では 8~5000 μ g/plate の範囲で 5 用量、実験 2 では 51.2~5000 μ g/plate の範囲で 6 用量とした。試験は 3 連制で 2 回行った。

実験 1 ではプレート法、実験 2 では用量間隔を狭くしプレインキュベーション法 (S-9 Mix 存在下) にて実施した。

試験結果 : 結果を次表に示した。

実験 1 の S-9 Mix 存在下、TA102 株において 1000 及び 5000 μ g/plate に有意な復帰変異コロニー数の増加が認められた ($p < 0.05$)。また、実験 2 でも同条件下、TA102 株の 800 及び 2000 μ g/plate において有意な復帰変異コロニー数の増加が認められた ($p < 0.05$)。これらはいずれも非常に軽微な増加であり、特に実験 2 では用量相関性が認められなかったことから復帰変異誘発性はないものと考えられた。

その他の菌株については、2 回の実験ともに S-9 Mix の有無にかかわらず、最高用量 (5000 μ g/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。

一方、陽性対照として用いた 2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (NaN_3)、9-アミノアクリジン (AAC)、グルタルアルデヒド (GLU) (S-9 Mix 非存在下) 及び 2-アミノアントラセン (AAN) (S-9 Mix 存在下) 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、MAI 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 (μ g/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)	—	—	101	15	217	30	6
MAI	8	—	97	17	208	36	5
	40	—	91	14	183	28	3
	200	—	109	13	198	36	5
	1000	—	107	17	180	35	6
	5000	—	105	14	205	34#	6
溶媒対照 (DMSO)	—	+	97	15	297	35	5
MAI	8	+	111	13	305	37	7
	40	+	115	16	292	36	7
	200	+	112	15	324	37	7
	1000	+	113	17	359*	37	5
	5000	+	101	16	361*	31#	6
陽性 対照	2NF	5	—	—	—	608	—
	NaN ₃	2	—	580	—	—	—
			—	—	503	—	—
	AAC	50	—	—	—	—	119
	GLU	25	—	—	—	513	—
AAN	5	+	2280	202	—	656	—

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

: わずかな細胞毒性が認められた

DMSO : ジメチルスルホキシド

2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN₃ : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

GLU : グルタルアルデヒド

AAN : 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)	—	—	95	15	343	32	8
MAI	51.2	—	98	17	376	34	8
	128	—	92	14	371	37	5
	320	—	109	17	384	32	7
	800	—	105	20	370	27	9
	2000	—	111	15	363	23#	10
	5000	—	102	16	392	20#	11
溶媒対照 (DMSO)	—	+	128	18	464	48	13
MAI	51.2	+	114	18	472	44	9
	128	+	122	13	442	35	11
	320	+	112	20	414	49	13
	800	+	131	17	515*	43	12
	2000	+	116	19	524*	44	9
	5000	+	120	17	508	43#	11
陽性 対照	2NF	5	—	—	—	963	—
	NaN ₃	2	—	706	—	—	—
			—	—	631	—	—
	AAC	50	—	—	—	—	539
	GLU	25	—	—	—	728	—
AAN	5	+	1639	—	—	1735	—

Dunnett's test、* : $p < 0.05$

: わずかな細胞毒性が認められた

DMSO : ジメチルスルホキシド

2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN₃ : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

GLU : グルタルアルデヒド

AAN : 2-アミノアントラセン

(11) クロチアニジン代謝物ATMG-Pyrのラットにおける急性経口毒性試験

(資料2-11)

試験機関：Covance Laboratories Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年：2000年

検 体：クロチアニジン代謝物 ATMG-Pyr (コードNo. BN0335E2)

化学名：

検体純度：

供試動物：CD(SD)系ラット、週齢：雄 6～8週齢、雌：10～11週齢、体重：雄 257～264 g、
雌 228～255 g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：1濃度の検体投与群を設け、死亡率からLD₅₀値を求めた。

投与方法：検体を5%アラビアゴム溶液で所定濃度に懸濁調製し、胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。尚、投与は調製液を20 mL/kgの割合で行った。動物は投与前に1晩絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を、投与後30分以内に少なくとも1回および投与後4時間までに4回、投与後1～3日は1日2回、4日からは観察期間終了まで1日1回観察した。体重は投与前日、投与日、投与後7および14日に測定した。観察期間終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	2000
LD50(mg/kg)	雄雌共 >2000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし
症状発現および 消失時間	症状発現なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雄雌共 2000
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雄雌共 2000

雌雄とも中毒症状、死亡は観察されなかった。体重については、観察期間を通じて順調な増加を示し検体投与の影響はなかった。剖検では、特記すべき変化はなく検体投与の影響は認められなかった。

(12) クロチアニジン代謝物 ATMG-Pyr の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 2-12)

試験機関 : Covance Laboratories Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2000年

検 体 : クロチアニジン代謝物 ATMG-Pyr (コード No. BN0335E2)

化学名 :

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 および TA102 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、1.6~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の 6 濃度 (試験 1)、51.2~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の 6 濃度 (試験 2) で実施した。試験 1 の S9 mix 存在下および非存在下、および試験 2 の S9 mix 非存在下はプレート法、試験 2 の S9 mix 存在下はプレインキュベーション法で行った。試験は 3 連制 (溶媒対照群は 5 連) で 2 回行った。

処理群の復帰変異コロニー数が用量依存性を伴って有意に増加し (Dunnett の検定, $P \leq 0.01$)、かつ増加に再現性が認められる場合に陽性と判定した。

試験結果 : 結果を次表に示した。

2 回の試験において、検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を溶媒対照群と比較して統計学的に有意に増加させることはなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、グルタルアルデヒドおよび 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、ATMG-Pyr は本試験条件下で、薬物代謝酵素系の存在の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないと判断された。

試験 1 (表中の数値は 3 反復の平均値±標準偏差 (溶媒対照群は 5 反復))

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	110±13	18±3	387±39	27±6	6±1	
ATMG-Pyr	1.6	-	111±16	15±3	405±11	22±1	6±2	
	8	-	108±4	16±4	408±20	30±1	7±2	
	40	-	96±7	16±6	411±6	23±5	9±2	
	200	-	111±18	19±5	390±10	23±3	9±3	
	1000	-	106±22	17±2	365±9	29±4	7±2	
	5000	-	99±9	22±6	368±14	28±5	9±3	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	127±8	22±4	481±58	28±4	8±4	
ATMG-Pyr	1.6	+	122±6	21±1	507±83	20±8	12±5	
	8	+	126±6	21±2	429±37	24±2	9±2	
	40	+	131±6	21±5	419±19	25±4	8±3	
	200	+	136±14	26±3	501±35	26±5	8±2	
	1000	+	137±18	19±1	497±31	29±3	9±3	
	5000	+	141±8	21±1	427±44	25±7	7±3	
陽性対照	NaN ₃	-	724±28	515±13	/	/	/	
	GLU	-	/	/	667±26	/	/	
	2NF	-	/	/	/	575±120	/	
	AAC	-	/	/	/	/	461±176	
	AAN	5	+	1904±108	178±59	/	1349±36	308±21
		20	+	/	/	2045±112	/	/

陽性対照物質

- NaN₃ : アジ化ナトリウム
- GLU : グルタルアルデヒド
- 2NF : 2-ニトロフルオレン
- AAC : 9-アミノアクリジン
- AAN : 2-アミノアントラセン

試験2 (表中の数値は3反復の平均値±標準偏差(溶媒対照群は5反復))

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
溶媒対照(DMSO)	0	-	99±6	17±3	303±23	25±5	6±2	
ATMG-Pyr	51.2	-	104±10	16±1	285±10	29±2	9±3	
	128	-	98±5	16±1	306±18	35±4	5±3	
	320	-	91±15	14±3	307±30	24±1	7±4	
	800	-	91±5	18±3	294±41	42±19	4±3	
	2000	-	88±10	18±6	315±13	33±7	9±3	
	5000	-	96±14	14±3	337±19	20±1#	5±1	
溶媒対照(DMSO)	0	+	129±10	21±6	288±22	30±9	7±3	
ATMG-Pyr	51.2	+	120±13	18±4	332±36	31±4	3±2	
	128	+	131±20	16±2	303±39	26±2	7±1	
	320	+	118±8	21±8	281±15	27±5	5±1	
	800	+	123±22	18±3	275±41	29±5	9±6	
	2000	+	129±15	14±1	283±60	35±11	7±2	
	5000	+	111±6	16±3	282±25#	30±5	9±4	
陽性対照	NaN ₃	-	597±19	467±21	/	/	/	
	GLU	-	/	/	656±28	/	/	
	2NF	-	/	/	/	477±69	/	
	AAC	-	/	/	/	/	379±87	
	AAN	5	+	1392±124	173±38	/	1178±92	220±9
		20	+	/	/	1424±456	/	/

: 2反復の平均値

陽性対照物質

NaN₃ : アジ化ナトリウム

GLU : グルタルアルデヒド

2NF : 2-ニトロフルオレン

AAC : 9-アミノアクリジン

AAN : 2-アミノアントラセン

(13) クロチアニジン代謝物ATG-Acのラットにおける急性経口毒性試験

(資料2-13)

試験機関：Covance Laboratories Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年：2000年

検 体：クロチアニジン代謝物 ATG-Ac (コード No. BN0230M)

化学名：

検体純度：

供試動物：CD(SD)系ラット、週齢：雄 6～8週齢、雌：10～11週齢、体重：雄 245～264 g、雌 237～263 g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：1濃度の検体投与群を設け、死亡率からLD₅₀値を求めた。

投与方法：検体をコーンオイルで所定濃度に懸濁調製し、胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。尚、投与は調製液を10 mL/kgの割合で行った。動物は投与前に1晩絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を、投与後 30 分以内に少なくとも 1 回および投与後 4 時間までに 4 回、投与後 1～3 日は 1 日 2 回、4 日からは観察期間終了まで 1 日 1 回観察した。体重は投与前日、投与日、投与後 7 および 14 日に測定した。観察期間終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	2000
LD50 (mg/kg)	雄雌共 >2000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし
症状発現および 消失時間	投与後15分より発現、 投与後3時間に消失
毒性徴候の認められなかつ た最高投与量 (mg/kg)	雄 <2000 雌 2000
死亡例の認められなかつた 最高投与量 (mg/kg)	雄雌共 2000

雌雄とも死亡動物は観察されなかった。一般症状では、雄に立毛および頻呼吸がみられたが、雌には中毒症状は認められなかった。体重については、観察期間を通じて順調な増加を示し検体投与の影響はなかった。

剖検では雌の1例に腎盂拡張が認められたのみで、それ以外の動物には特記すべき変化はなく検体投与の影響は認められなかった。

(14) クロチアニジン代謝物 ATG-Ac の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 2-14)

試験機関 : Covance Laboratories Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2000年

検 体 : クロチアニジン代謝物 ATG-Ac (コード No. BNO230M)

化学名 :

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 および TA102 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、1.6~5000 μg /プレートの範囲の 6 濃度 (試験 1)、51.2~5000 μg /プレートの範囲の 6 濃度 (試験 2) で実施した。試験 1 の S9 mix 存在下および非存在下、および試験 2 の S9 mix 非存在下はプレート法、試験 2 の S9 mix 存在下はプレインキュベーション法で行った。試験は 3 連制 (溶媒対照群は 5 連) で 2 回行った。

処理群の復帰変異コロニー数が用量依存性を伴って有意に増加し (Dunnett の検定, $P \leq 0.01$)、かつ増加に再現性が認められる場合に陽性と判定した。

試験結果 : 結果を次表に示した。

試験 2 の TA98 株の S9 mix 非存在下において、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な復帰変異コロニー数の増加が認められたが、その増加は非常に小さく、最高濃度の 1 用量のみで認められた。更に試験 1 の TA98 株では有意な増加が認められず、再現性がなかったことから、偶発的な増加であると考えられた。その他に、2 回の試験において検体が復帰変異コロニー数を統計学的に有意に増加させることはなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、グルタルアルデヒドおよび 2-アミノアントラセンでは各試験

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

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、ATG-Ac は本試験条件下で、薬物代謝酵素系の存在の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないと判断された。

試験1 (表中の数値は3反復の平均値±標準偏差 (溶媒対照群は5反復))

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	—	107±12	14±4	346±22	29±6	5±2	
ATG-Ac	1.6	—	86±11	13±2	365±11	31±4	8±2	
	8	—	105±9	18±8	331±45	22±2	6±4	
	40	—	102±9	15±4	356±11	23±9	11±1	
	200	—	97±10	21±3	336±19	23±2	7±4	
	1000	—	95±7	15±5	381±27	26±11	6±3	
	5000	—	98±1#	18±5	333±36	36±5	10±6	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	112±9	21±4	383±21	27±8	10±3	
ATG-Ac	1.6	+	120±13	21±2	433±25	23±10	11±3	
	8	+	126±18	18±5	420±43	34±2	9±1	
	40	+	136±4*	17±2	451±18*	31±7	9±3	
	200	+	112±15	23±6	463±18*	27±4	9±4	
	1000	+	110±15	23±5	462±67*	24±13	7±1	
	5000	+	100±7	14±4	435±46	25±2	8±2	
陽性対照	NaN ₃	2	—	707±64	511±7	/	/	
	GLU	25	—	/	/	614±15	/	
	2NF	5	—	/	/	/	590±35	
	AAC	50	—	/	/	/	512±55	
	AAN	5	+	2012±112	241±27	/	1490±158	296±16
		20	+	/	/	1728±40	/	/

: 2反復の平均値

* : $p \leq 0.05$ (Dunnettの検定)

陽性対照物質

NaN₃ : アジ化ナトリウム

GLU : グルタルアルデヒド

2NF : 2-ニトロフルオレン

AAC : 9-アミノアクリジン

AAN : 2-アミノアントラセン

試験2 (表中の数値は3反復の平均値±標準偏差(溶媒対照群は5反復))

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
溶媒対照(DMSO)	0	-	104±11	11±4	306±14	27±2	6±2	
ATG-Ac	51.2	-	110±12	14±3	331±20	23±6	8±1	
	128	-	103±4	17±1*	340±16*	29±4	5±1	
	320	-	100±3	18±1*	340±13*	29±6	5±2	
	800	-	110±6	15±4	330±11	28±3	5±2	
	2000	-	100±10	13±2	325±19	36±6*	5±1	
	5000	-	104±6	17±1#	319±18	42±1***	7±1	
溶媒対照(DMSO)	0	+	123±7	15±3	364±30	34±7	10±3	
ATG-Ac	51.2	+	125±6	19±1	428±15	35±5	6±1	
	128	+	139±10	14±1	422±38	31±8	8±2	
	320	+	115±7	21±4	405±35	38±4	9±3	
	800	+	123±4	17±6	400±34	36±5	12±2	
	2000	+	123±9	21±3	399±26	33±12	10±2	
	5000	+	115±14	18±10	399±19	33±3	8±2	
陽性対照	NaN ₃	2	-	580±16	421±10	/	/	
	GLU	25	-	/	/	617±66	/	
	2NF	5	-	/	/	/	554±45	
	AAC	50	-	/	/	/	406±127	
	AAN	5	+	1582±54	202±37	/	1612±105	245±31
		20	+	/	/	1804±515	/	/

: 2反復の平均値

* : $p \leq 0.05$, *** : $p \leq 0.005$ (Dunnettの検定)

陽性対照物質

NaN₃ : アジ化ナトリウム

GLU : グルタルアルデヒド

2NF : 2-ニトロフルオレン

AAC : 9-アミノアクリジン

AAN : 2-アミノアントラセン

3. 製剤を用いた試験成績

(1) クロチアニジン 50%顆粒水和剤のラットを用いた急性経口毒性試験 (資料 3-1)

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

報告書作成年：2000年

検体の純度：50%顆粒水和剤

試験動物：CrI:CD(SD)IGSBR系ラット(雄8~11週齢、雌9~13週齢、投与前日時の体重：雄335~362g、雌210~262g)、1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：検体を5%アラビアゴム水溶液に懸濁し、所定濃度に調製後、投与前に1晩絶食させた動物にプラスチック製シリンジを用いて体重100g当たり2mLを1回強制経口投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。体重は投与前日、投与直前、投与後7及び14日に測定した。試験終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	1710	1000, 1250, 1500, 1750, 1875, 2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	>1710	1628.3 (1417.6-1771.8)
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	投与翌日から開始 投与後4日に終了
症状発現時間 及び消失時間	投与後1時間から発現 投与後4日に消失	投与後15分から発現 投与後4日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1710	1250

試験期間中、死亡例は雌で投与翌日から投与後3日までの間に認められた。中毒症状としては1500mg/kg以上の投与群において嗜眠、振せん及び眼瞼閉鎖が観察された。これら中毒症状は投与直後から投与後3日まで認められた。体重では、生存ラットの大部分において投与後7日まで体重減少が認められた。試験期間中に死亡した動物の剖検では、死亡時の反応によるものと考えられる肺の暗色化及び肝臓の蒼白化/斑紋が認められた。生存ラットの剖検では検

体投与に起因した変化は認められなかった。

雌ラットに対して検体を経口投与した結果、急性半数致死量(LD₅₀値)は1628.3 mg/kgであった。このLD₅₀値以上である1710 mg/kgを雄ラットへ経口投与した結果、死亡例は認められなかった。このことから本検体は雌雄間において顕著な感受性差はないものと考えられる。

(2) クロチアニジン 50%顆粒水和剤のラットを用いた急性経皮毒性試験 (資料 3-2)

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

報告書作成年 : 2000 年

検体の純度 : 50%顆粒水和剤

試験動物 : CrI:CD(SD) IGSBR 系ラット (雄 6~8 週齢、雌 9~10 週齢、投与前日時の体重 : 雄 251~267g、雌 218~239g)、1 群雌雄各 5 匹

試験期間 : 14 日間観察

方法 : 投与前日に背部皮膚約 48cm² (6×8cm) を刈毛し、約 25cm² (5×5cm) の部位に検体を塗布し、ガーゼパッチ及び粘着性包帯で塗布部位を固定した。塗布 24 時間後に皮膚に残った検体を拭き取った。

試験項目 : 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。体重は投与前日、投与直前、投与後 7 及び 14 日に測定した。試験終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果 :

投与方法	経皮	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	>2000	
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間 及び消失時間	投与翌日から発現 投与後 2 日目に消失	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	

試験期間中、死亡例は認められなかった。中毒症状としては雌 2 例において会陰部の汚れが認められた。また投与終了後の投与部位の皮膚において点状出血及び落屑が雌において認められた。これらは皮膚の適用部位に残った検体を拭き取る際に認められたものと考えられた。体重は試験期間中に増加し、剖検所見において特記すべき変化は認められなかった。

(3) クロチアニジン 50%顆粒水和剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 3-3)

試験機関：Covance Laboratories (英国)

[GLP対応]

報告書作成年：2000年

検体の純度：50%顆粒水和剤

試験動物：ニュージーランド白色種ウサギ (13~15 週齢、投与前日時の体重：2.51~2.59kg)、雌 3 匹

試験期間：3 日間観察 (ただし 1 匹については 17 日間観察)

方法：検体を動物の左眼の結膜嚢内に 1 匹当たり 58.7mg (0.1mL 容量相当) を適用し、適用後検体の漏出を防ぐため、数秒間閉眼させた。右側は対照として無処置とした。まず 1 匹のウサギ (前哨動物) を用いて試験を実施し、その後 2 匹のウサギを用いて行った。

試験項目：検体適用前、適用直後、適用後 30 分、1、4、24 (2 回)、48 (2 回)、72 及び 96 時間後に眼の角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Draize 法の基準に従って採点した。一般状態について記録し、適用開始前に体重を測定した。また適用直後に初期疼痛反応も観察した。

また 1 匹のウサギにおいて角膜の損傷が認められたため、フルエレセイン染色液を点眼し、これが消失するまで (試験 17 日目まで) 眼を観察した。

試験結果：刺激性変化の採点を以下の表に示した。

項目		最高 評点	適用後時間								
			0	1/2	1	4	24	48	72	96	
非洗眼群 (3 匹 平均)	角膜	混濁	4	0	0.3	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	1.3	0	0	0	0	0	0
	虹彩	2	0	0.3	0.7	0.3	0.7	0.7	0	0	
	結膜	発赤	3	0	1.0	1.0	1.0	1.3	0.7	0.3	0
		浮腫	4	0	1.7	2.0	2.0	1.0	0.7	0	0
		分泌物	3	1.7	2.7	2.0	1.7	1.0	0.3	0	0
	合計		110	3.3	19.0	13.3	11.0	10.0	6.7	0.7	0

全例において軽度の初期疼痛反応が認められた。

角膜では、前哨動物において投与 30 分後だけに角膜全体の散在性または瀰漫性の混濁 (評点 1) が認められた。虹彩の変化は投与 30 分後から認められ、投与 4 日目に消失した。結膜への反応は、試験 1 日目に顕著に認められたが、深紅色の外観、眼瞼の部分的反外を伴う浮腫及び顕著な眼の分泌物以上のものは認められず、その翌日には回復傾向にあり、試験 4 あるいは 5 日目には消失した。

フルエレsein染色液を点眼し眼を観察した結果、角膜上皮に損傷が認められ、前哨動物ではこれが投与 17 日目まで認められた。しかし投与 5-17 日目の期間中では軽微以上の損傷は認められず、また残り 2 匹のウサギではこの症状が投与後 72 時間以内に消失したことから、前哨動物で認められたこの角膜の損傷は動物自身または検体による物理的な原因、あるいはこれにより悪化したことによって認められたものと考えられた。

試験期間中、全例のウサギに全身毒性あるいは健康状態の悪化を示唆するような所見は認められなかった。

申請者注)：以上の結果をもとに、検体の刺激性を Kay and Calandra の方法を用いて分類した場合、「軽度の刺激性あり」に当てはまるものとする。

以上の結果より、クロチアニジン 50% 顆粒水和剤はウサギの眼粘膜に対して、軽度の刺激性があるものと判断される。

(4) クロチアニジン 50%顆粒水和剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験 (資料 3-4)

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

報告書作成年 : 2001 年

検体の純度 : 50%顆粒水和剤

試験動物 : ニュージーランド白色種ウサギ (雌 8~12 週齢、体重 : 1.69~2.41kg)、
雌 3 匹

試験期間 : 3 日間観察 (ただし 1 匹については 8 日間観察)

方法 : 動物の背部 (3cm×2cm) を刈毛し、蒸留水で湿らせた後、検体 0.5g を適用した。
適用 4 時間後に皮膚に残った検体を湿らせた脱脂綿を用いて拭き取った。まず
1 匹のウサギ (前哨動物) を用いて試験を実施し、その後 2 匹のウサギを用い
て行った。

試験項目 : 検体除去 1、24、48 及び 72 時間後に皮膚の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) を
観察し、Draize 法の基準に従って採点した。一般状態を観察し、投与開始前に
体重を測定した。また 1 匹のウサギにおいて点状出血が認められたため、これ
が消失するまで (適用 8 日後まで) 観察した。

試験結果 : 刺激性変化の採点を以下の表に示した。

刺激性変化	最高 評点	検 体 除 去 後				
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	8 日
紅斑、痂皮	4	0	0	0	0	0
浮腫	4	0	0	0	0	0
合 計	8	0	0	0	0	0

注) 表の点数は 3 匹の平均値である。

検体適用による刺激性はいずれの動物においても認められなかった。1 匹のウ
サギにおいて検体除去後に点状出血が認められたが、これは検体の除去が困難
であったことに関連して認められたものと考えられた。この所見は適用 8 日目
に消失した。一般状態については検体適用による影響は認められなかった。

以上の結果より、クロチアニジン 50%顆粒水和剤はウサギの皮膚に対して刺激性はないものと
判断される。

(5) クロチアニジン 50%顆粒水和剤のモルモットにおける皮膚感作性試験 (資料 3-5)

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

報告書作成年 : 2000 年

検体の純度 : 50%顆粒水和剤

試験動物 : Dunkin-Hartley系モルモット雌 (5~7週齢、体重 : 387~490g)

検体処置群 20匹、検体対照群 20匹、陽性処置群 10匹、陽性対照群 10匹

試験期間 : 25日間観察

方法 : Magnusson & Kligman (Maximisation)法に準じた。

検体は Alembicol D 溶液 (落花生油) に懸濁し、使用した。

感作 : 肩甲骨上の皮膚を 2×4cm の広さに刈毛し、検体処置群にはフロイント完全アジュバンド (FCA) 乳化液、検体の 1.0%溶液及び検体の 1.0%乳化液 (FCA 混合液) をいずれもモルモットの左右一対ずつ計 3 対、1 部位あたり 0.1mL を皮内注射した。

皮内注射 7 日後に、検体処置群及び検体対照群の注射部位を刈毛し、注射 7 日後に、注射部皮膚に検体投与群には検体の 10%溶液を、検体対照群には溶媒のみをそれぞれリント布に含ませ、モルモットに 48 時間閉塞貼付した。

誘発 : 貼付感作開始 14 日後に全動物の左右側腹部を刈毛し、検体処置群及び検体対照群には、それぞれ検体 5 及び 2.5%溶液を、リント布に含ませ、貼付感作処置時と同様に 24 時間閉塞貼付した。

試験項目 : 誘発のための閉塞貼布除去 24 及び 48 時間後に、適用部位の紅斑及び浮腫の有無について肉眼的に観察し、Magnusson & Kligmann の基準に従って採点した。その他に一般状態及び体重についても観察した。

試験結果：各観察時間における皮膚反応が認められた動物数及びその採点を以下の表に示した。検体対照群で認められた最大皮膚反応評点より高値を示した検体処置群動物を陽性と判定した。

5.0%溶液の誘発処置後、1例において対照群の最大反応よりも高い評点の反応が認められた。しかし残りの9匹においては陰性であると考えられた。

なお、本試験機関では6か月に1回、皮膚感作性試験において一般的な陽性対照物質である2-メルカプトベンゾチアゾール(MBTZ)を用いた試験を実施し(最近時：1999年2月23日～1999年3月19日)、安定した陽性反応が検出されることを確認している。

群	検体濃度 (%)				供試動物数	感作反応動物数								感作陽性率 (%)
						24時間				48時間				
						皮膚反応評点								
						0	1	2	3	0	1	2	3	
検体処置群	皮内感作	1.0%溶液	誘発	5.0%溶液	10	7	2	1	0	3	6	1	0	10%
		貼付感作		10%溶液		2.5%溶液	10	0	0	0	6	4	0	
検体対照群	-	-	誘発	5.0%溶液	5	4	1	0	0	4	1	0	0	-
				2.5%溶液		5	0	0	0	5	0	0	0	

注) 評点：0：紅斑なし、1：軽度な紅斑、2：周囲と明らかに区別可能な紅斑、3：中等度の紅斑

以上の結果より、クロチアニジン 50%顆粒水和剤のモルモットにおける皮膚感作性は陰性であると判断される。

(6) クロチアニジン 20%フロアブルのラットを用いた急性経口毒性試験 (資料 3-6)

試験機関 : (株) ポソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年 : 2003 年

検体の純度 : 20%フロアブル

試験動物 : Crj:CD (SD) IGS 系ラット (8 週齢、体重 : 179~193g)、1 群雌 3 匹

試験期間 : 14 日間観察

方法 : 検体を蒸留水で希釈して所定濃度に調製後、投与前に約 16 時間絶食させた動物に、金属製胃ゾンデを用いて体重 100g 当たり 1mL を 1 回強制経口投与した。なお、試験の手順は指針の「毒性等級法」に準じた。

試験項目 : 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。体重は投与直前、投与後 1、3、7 及び 14 日に測定した。試験終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果 :

投与方法	経口
性別	雌
投与量 (mg/kg)	2000 (1 回目、2 回目共に)
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	>2000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間 及び消失時間	発現例なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000

試験期間中、中毒症状及び死亡例は認められなかった。また、体重並びに剖検所見にも特記すべき変化は認められなかった。

(7) クロチアニジン 20%フロアブルのラットを用いた急性経皮毒性試験 (資料 3-7)

試験機関：(株) ポソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：2003年

検体の純度：20%フロアブル

試験動物：Crj:CD(SD) IGS系ラット(8週齢、体重：雄 274~291g、雌 214~221g)、
1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：検体を刈毛した背部皮膚約 30cm² (5×6cm) にリント布約 20cm² (4×5cm) を用いて 24 時間塗布した後、粘着性伸縮テープで被覆固定した。塗布 24 時間後に皮膚に残った検体を温水で湿らせたガーゼを用いて拭き取った。

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

試験結果：

投与方法	経皮	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	>2000	>2000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間 及び消失時間	発現例なし	
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	

試験期間中、中毒症状及び死亡例は認められなかった。また、体重並びに投与部位の皮膚を含めた剖検所見にも特記すべき変化は認められなかった。

(8) クロチアニジン 20%フロアブルのウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 3-8)

試験機関：(株) ポソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：2003年

検体の純度：20%フロアブル

試験動物：日本白色種ウサギ (15 週齢、体重：2.50~3.03kg)、雌 6 匹

試験期間：72 時間観察

方法：検体を非洗眼群 3 匹及び洗眼群 3 匹の動物の左眼の結膜嚢内に 1 匹当たり 0.1mL 投与し、投与後検体の漏出を防ぐため、約 1 秒間閉眼させた。右側は対照として無処置とした。洗眼群の 3 匹については、投与 30 秒後に 100mL の注射用水を用いて 30 秒間洗眼した。対照眼についても同様に洗眼した。

試験項目：検体投与 1、24、48 及び 72 時間後に眼の角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Draize 法の基準に従って採点した。また、一般状態は投与直後から投与 6 時間後までは 1 時間ごとに、投与翌日以降は 1 日 1 回、観察終了日 (投与 3 日後) まで観察した。体重は検体投与日と観察終了日 (投与 3 日後) に測定した。

試験結果：刺激性変化の採点を以下の表に示した。

項目			最高評点	投 与 後 時 間			
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
非洗眼群 (3 匹平均)	角膜混濁	程 度	4	0	0	0	0
		面 積	4	0	0	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0
	結膜	発 赤	3	0.7	0.3	0	0
		浮 腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	1.0	0	0	0
	合 計		110	3.3	0.7	0	0
洗 眼 群 (3 匹平均)	角膜混濁	程 度	4	0	0	0	0
		面 積	4	0	0	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0
	結膜	発 赤	3	0	0	0	0
		浮 腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	1.0	0	0	0
	合 計		110	2.0	0	0	0

非洗眼群において、投与1時間後に結膜の発赤が2例、分泌物が全例(3例)、24時間後では結膜発赤が1例に認められた。これらの刺激性は投与48時間後までに全て消失した。眼のその他の変化として、閉眼が投与直後に全例で観察された。平均値の最大値は3.3であり、最終評価は「極く軽度の刺激性あり」に分類された。一般状態及び体重には検体投与の影響は認められなかった。

洗眼群においては、投与1時間後に分泌物が全例(3例)に見られたが、24時間後には全て消失した。眼のその他の変化は、いずれの動物においても観察されなかった。平均値の最大値は2.0であり、洗眼を行うことにより刺激性の軽減が認められた。一般状態及び体重には検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果より、クロチアニジン 20%フロアブルは、ウサギの眼に対して「極く軽度の刺激性あり」と判断された。また、洗眼により刺激性の軽減が認められた。

(9) クロチアニジン 20%フロアブルのウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 3-9)

試験機関：(株) ポソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：2003年

検体の純度：20%フロアブル

試験動物：日本白色種ウサギ (18 週齢、体重：2.97～3.20kg)、雌 3 匹

試験期間：72 時間観察

方法：動物の背部を刈毛し、左右 2 箇所 of 投与部位を設け、左側には油紙を裏打ちしたリント布 (2.5×2.5cm) へ検体 0.5ml を均一に塗布してから貼付した。右側にはリント布 (2.5×2.5cm) のみを貼付し、その上から自着性弾性包帯で固定した。投与 4 時間後にリント布を取り除き、注射用水で湿らせた脱脂綿を用いて残った検体を拭き取った。

試験項目：検体の除去 1、24、48 及び 72 時間後に皮膚の刺激性変化 (紅斑及び痂皮形成と浮腫の形成) を観察し、Draize 法の基準に従って採点した。また、一般状態は検体投与直後、投与 1、4 及び 5 時間後に、投与翌日以降は 1 日 1 回、観察終了日 (投与 3 日後) まで観察した。体重は検体投与日と観察終了日 (投与 3 日後) に測定した。

試験結果：刺激性変化の採点を以下の表に示した。

刺激性変化	最高評点	検 体 除 去 後			
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
紅斑、痂皮	4	0.7	0	0	0
浮腫	4	0	0	0	0
合計	8	0.7	0	0	0

注) 表の点数は 3 匹の平均値である。

検体投与部位において、除去 1 時間後に紅斑が 2 例で認められたが、24 時間後には消失した。皮膚一次刺激性指数 (P. I. I) は 0.2 であり、「軽度刺激物」に分類された。一般状態及び体重には検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果より、クロチアニジン 20%フロアブルは、ウサギの皮膚に対して「軽度刺激物」と判断された。

(10) クロチアニジン 20%フロアブルのモルモットを用いた皮膚感作性試験 (資料 3-10)

試験機関：(株) ポソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：2003年

検体の純度：20%フロアブル

試験動物：Hartley系白色モルモット雌(6週齢、体重：332～392g)
検体処置群 20匹、検体対照群 10匹

試験期間：30日間観察

方法：Buehler法に準じた。

検体は注射用水を用いて所定濃度に調製した。

感作：感作開始前日に5×5cmの大きさに刈毛・剃毛した動物の左側胸部に100%濃度の検体0.2mLを直径2.5cmのパッチを用いて6時間閉塞貼布し、その上をポリエチレンフィルムのテープで固定した。貼付6時間後にパッチを除去し、注射用水で湿らせた脱脂綿で投与部位を清拭した。この操作を感作開始日、7日後及び14日後の3回行った。検体対照群には注射用水のみを使用した。

誘発：感作開始から27日後に動物の右側胸部5×5cmの大きさに刈毛・剃毛し、1箇所
の投与部位を設けた。翌日それらの部位に50%濃度の検体0.2mLを直径2.5cmの
パッチを用いて6時間閉塞貼布し、その上をポリエチレンフィルムのテープで固
定した。貼付6時間後にパッチを除去し、注射用水で湿らせた脱脂綿で投与部
位を清拭した。

試験項目：誘発貼付除去24及び48時間後に、投与部位の紅斑及び浮腫の有無について肉
眼的観察し、Magnusson & Kligmanの基準に従って採点した。また一般状態は感作開
始から皮膚反応の終了までの30日間について1日1回観察し、体重については感
作開始日(0日)、最終感作日(14日後)、誘発日(28日後)及び観察終了日(30
日後)に測定した。

試験結果：各観察時間における皮膚反応が認められた動物数及びその採点を次の表に示
した。

群	供 試 動物数	検体濃度 感作 / 誘発	感作反応動物数								平均評点		陽 性 動物数	感 作 陽性率
			24 時間				48 時間				24 時間	48 時間		
			皮膚反応評点											
			0	1	2	3	0	1	2	3				
検 体 処置群	20	100%/50%	20	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0%
検 体 対照群	10	注射用水 /50%	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0%

検体除去 24 及び 48 時間後において、検体処置群及び検体対照群のいずれの動物にも皮膚反応は認められず感作率は 0%であった。一般状態及び体重には検体投与による影響は認められなかった。

なお、本試験機関では定期的（年 2 回）に、皮膚感作性試験において一般的な陽性対照物質である DNCB を用いた試験を実施（最近時：2002 年 12 月 27 日～2003 年 4 月 10 日）し、安定した陽性反応が検出されることを確認している。

群	供 試 動物数	DNCB 濃度 感作 / 誘発	感作反応動物数								平均評点		陽 性 動物数	感 作 陽性率
			24 時間				48 時間				24 時間	48 時間		
			皮膚反応評点											
			0	1	2	3	0	1	2	3				
陽性対照 物質 処置群	10	1%/0.25%	0	0	3	7	0	1	5	4	2.7	2.3	10	100%
		1%/イタノール	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0%
陽性対照 物質 対照群	5	イタノール /0.25%	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0%
		イタノール /イタノール	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0%

以上の結果より、クロチアニジン 20%フロアブルのモルモットを用いた皮膚感作性は「陰性」であると判断された。

(11) クロチアニジン水溶剤のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 3-11)

試験機関：(株)ボソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：16%水溶剤

試験動物：Crj:CD(SD) IGS系ラット(7週齢、体重：雄207~215g、雌156~169g)、
1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：検体を蒸留水に懸濁し、所定濃度に調製後、投与前に約16時間絶食させた動物に、金属製胃ゾンデを用いて体重100g当たり2mLを1回強制経口投与した。対照群には蒸留水のみを同量投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10及び14日に測定した。試験終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口	
	雄	雌
性別		
投与量(mg/kg)	0、5000	
LD ₅₀ 値(mg/kg)	>5000	>5000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間 及び消失時間	投与後約4時間から発現 投与翌日に消失	
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	5000	5000

試験期間中、死亡例は認められなかった。

中毒症状としては、自発運動の低下、振戦が観察されたが、投与翌日には全例回復した。

体重では、雄で投与後3日、雌で投与後2日まで増加抑制が認められた。

剖検所見に特記すべき変化は認められなかった。

(12) クロチアニジン水溶剤のマウスを用いた急性経口毒性試験

(資料 3-12)

試験機関：(株)ボソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：16%水溶剤

試験動物：Crj:CD-1(ICR)系マウス(7週齢、体重：雄31.4~35.3g、雌20.9~24.9g)、
1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：検体を蒸留水に懸濁し、所定濃度に調製後、投与前に3~4時間絶食させた動物に、金属製胃ゾンデを用いて体重10g当たり0.2mLを1回強制経口投与した。対照群には蒸留水のみを同量投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10及び14日に測定した。試験終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0、1800、2500、3500、5000、7000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	3423 (2625~4514)	3657 (2730~4930)
死亡開始時間 及び終了時間	投与後約1時間から開始 投与後2時間に終了	投与後約1時間から開始 投与翌日に終了
症状発現時間 及び消失時間	投与後約15分から発現 投与翌日に消失	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1800	1800

試験期間中、死亡例は雌雄で投与後約1時間から投与翌日までの間に認められた。

中毒症状としては、自発運動の低下、腹臥及び呼吸困難が観察されたが、投与翌日には全例回復した。

体重では、雌雄で投与翌日に増加抑制あるいは減少が認められた。

剖検所見に特記すべき変化は認められなかった。

(13) クロチアニジン水溶剤のラットを用いた急性経皮毒性試験

(資料 3-13)

試験機関：(株)ボソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：16%水溶剤

試験動物：Crj:CD(SD) IGS系ラット(7週齢、体重：雄227~239g、雌160~176g)、
1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：乳鉢で微粉末とした検体を蒸留水で湿らせて、刈毛した背部皮膚約30cm²(5×6cm)にリント布約20cm²(4×5cm)を用いて塗布後、サージカルテープで被覆固定した。塗布24時間後に皮膚に残った検体を温水で湿らせたガーゼを用いて拭き取った。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10及び14日に測定した。試験終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経皮	
	雄	雌
投与量(mg/kg)	0、2000	
LD ₅₀ 値(mg/kg)	>2000	>2000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間 及び消失時間	発現例なし	
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	2000	2000

試験期間中、中毒症状及び死亡例は認められなかった。また、体重並びに投与部位の皮膚を含めた剖検所見にも特記すべき変化は認められなかった。

(14) クロチアニジン水溶剤のウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料 3-14)

試験機関：(株)ボソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：16%水溶剤

試験動物：日本白色種ウサギ(14週齢、体重：2.53~2.84kg)、雌9匹

試験期間：3日間観察

方法：予め乳鉢を用いて微粉末とした検体を洗眼群3匹及び非洗眼群6匹の動物の左眼の結膜嚢内に1匹当たり0.1g宛適用し、適用後検体の漏出を防ぐため、約1秒間閉眼させた。右側は対照として無処置とした。その後洗眼群の3匹については適用2~3分後に適量(約200mL)の微温湯を用いて1分間洗眼した。対照眼についても同様に洗眼した。

試験項目：検体適用前、適用1、24、48及び72時間後に眼の角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Draize法の基準に従って採点した。また、一般状態は適用6時間後までは1時間ごとに、その後は適用24、48及び72時間後に観察し、体重は検体適用前及び適用72時間後に測定した。

試験結果：刺激性変化の採点を以下の表に示した。

項目		最高 評点	適用後時間				
			1時間	24時間	48時間	72時間	
非洗眼群 (6匹平均)	角膜 混濁	程度	4	0.2	0.7	0.2	0
		面積	4	0.2	0.7	0.2	0
		虹彩	2	0	0.2	0	0
	結膜	発赤	3	1.0	0.8	0.8	0
		浮腫	4	1.5	0.8	0	0
		分泌物	3	2.0	0.5	0	0
		合計	110	9.8	8.5	2.5	0
洗眼群 (3匹平均)	角膜 混濁	程度	4	0	0.3	0	0
		面積	4	0	0.3	0	0
		虹彩	2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	0.3	0.7	0	0
		浮腫	4	1.0	0	0	0
		分泌物	3	1.0	0	0	0
		合計	110	4.7	3.0	0	0

非洗眼群において適用 1~48 時間後に角膜混濁、虹彩の異常、結膜の発赤、浮腫及び眼脂分泌が認められた。これらの刺激反応は適用 72 時間後の観察ではすべて消失した。また、洗眼群においても非洗眼群と同様の反応が認められたが、投与 48 時間後にはすべて消失した。

以上の結果より、クロチアニジン水溶剤はウサギの眼粘膜に対して、軽度の刺激性があるものと判断され、洗眼効果が認められた。

(15) クロチアニジン水溶剤のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 3-15)

試験機関：(株)ポゾリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：16%水溶剤

試験動物：日本白色種ウサギ(14週齢、体重：2.80~3.03kg)、雌6匹

試験期間：3日間観察

方法：動物の背部を左右2箇所刈毛し、左側には予め乳鉢を用いて微粉末とした検体0.5gを0.5mLの注射用水で湿らせ塗布したリント布(2.5×2.5cm)を、また右側には同量の注射用水で湿らせたリント布(2.5×2.5cm)をそれぞれ適用して油紙で被覆した後、弾性包帯で固定した。適用4時間後に皮膚に残った検体を注射用水で湿らせた脱脂綿を用いて拭き取った。

試験項目：検体の除去1、24、48及び72時間後に皮膚の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)を観察し、Draize法の基準に従って採点した。また、一般状態は適用6時間後までは1時間ごとに、その後は除去24、48及び72時間後に観察し、体重は検体適用前及び除去72時間後に測定した。

試験結果：刺激性変化の採点を以下の表に示した。

刺激性変化	最高 評点	検体除去後			
		1時間	24時間	48時間	72時間
紅斑、痂皮	4	0	0	0	0
浮腫	4	0	0	0	0
合計	8	0	0	0	0

注) 表の点数は6匹の平均値である。

動物には何ら皮膚の変化は認められなかった。また、一般状態及び体重の推移には検体適用による影響は認められなかった。

以上の結果より、クロチアニジン水溶剤はウサギの皮膚に対して、刺激性はないものと判断される。

(16) クロチアニジン水溶剤のモルモットにおける皮膚感作性試験

(資料 3-16)

試験機関：(株)ボソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：16%水溶剤

試験動物：Hartley系モルモット雌(5週齢、体重：263~314g)

検体処置群 20匹、検体対照群 20匹

試験期間：30日間観察

方法：Buehler法に準じた。

検体は注射用水に懸濁し、使用した。

感作：前日に5×5cmの大きさに刈毛、剃毛した動物の左側胴部に検体の50%懸濁液0.2mLを塗布したリント布を6時間閉塞貼布した。初回感作より7日及び14日後に同様に計3回感作を行った。検体対照群には注射用水のみを使用した。

誘発：最終感作の13日後に5×5cmの大きさに刈毛、剃毛し、その翌日動物の右側胴部に検体の50%懸濁液0.2mLを塗布したリント布を24時間閉塞貼布した。

試験項目：誘発のための閉塞貼布除去24及び48時間後に、適用部位の紅斑及び浮腫の有無について肉眼的に観察し、Draize法の基準に従って採点した。

試験結果：各観察時間における皮膚反応が認められた動物数及びその採点を以下の表に示した。

群	供試動物数	検体濃度 感作 / 誘発	感作反応動物数										平均評点		陽性動物数	感作陽性率		
			24時間					48時間					24時間	48時間				
			皮膚反応評点															
0	1	2	3	4	0	1	2	3	4									
検体処置群	20	50% / 50%	紅斑	20	0	0	0	0	紅斑	20	0	0	0	0	0	0	0	0%
			浮腫	20	0	0	0	0	浮腫	20	0	0	0	0				
検体対照群	20	0% / 50%	紅斑	20	0	0	0	0	紅斑	20	0	0	0	0	0	0	0	0%
			浮腫	20	0	0	0	0	浮腫	20	0	0	0	0				

群	供試動物数	DNCB 濃度 感作 / 誘発	感作反応動物数										平均評点		陽性動物数	感作陽性率		
			24 時間					48 時間					24 時間	48 時間				
			皮膚反応評点															
			0	1	2	3	4	0	1	2	3	4						
DNCB 処置群	10	1% / 0.25%	紅斑	0	5	2	3	0	紅斑	0	3	5	2	0	2.3	2.4	10	100%
			浮腫	5	5	0	0	0	浮腫	5	5	0	0	0				
DNCB 対照群	5	0% / 0.25%	紅斑	5	0	0	0	0	紅斑	5	0	0	0	0	0	0	0	0%
			浮腫	5	0	0	0	0	浮腫	5	0	0	0	0				

検体除去 24 及び 48 時間後において検体処置群及び検体対照群のいずれの動物にも皮膚反応は認められず検体の感作率は 0% であった。

また、一般状態及び体重の推移には検体適用による影響は認められなかった。

なお、本試験機関では 6 か月に 1 回、皮膚感作性試験において一般的な陽性対照物質である DNCB を用いた試験を実施（最近時：1999 年 7 月 7 日～8 月 6 日）し、安定した陽性反応が検出されることを確認している。

以上の結果より、クロチアニジン水溶剤のモルモットにおける皮膚感作性は陰性であると判断される。

(17) クロチアニジン箱粒剤のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 3-17)

試験機関：(株)ボゾリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：1.5%粒剤

試験動物：Crj:CD(SD) IGS系ラット (7週齢、体重：雄 210~224g、雌 167~179g)、
1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、所定濃度に調製後、投与前に約16時間絶食させた動物に、金属製胃ゾンデを用いて体重100g当たり2mLを1回強制経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース水溶液のみを同量投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10及び14日に測定した。試験終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 5000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	>5000	>5000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間 及び消失時間	発現例なし	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

試験期間中、中毒症状及び死亡例は認められなかった。

体重では、雌雄で投与翌日に増加抑制が認められた。

剖検所見に特記すべき変化は認められなかった。

(18) クロチアニジン箱粒剤のマウスを用いた急性経口毒性試験

(資料 3-18)

試験機関：(株)ボゾリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：1.5%粒剤

試験動物：Crj:CD-1(ICR)系マウス(7週齢、体重：雄30.2~32.9g、雌21.0~24.7g)、
1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、所定濃度に調製後、投与前に3~4時間絶食させた動物に、金属製胃ゾンデを用いて体重10g当たり0.2mLを1回強制経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース水溶液のみを同量投与した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10及び14日に測定した。試験終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口	
	雄	雌
投与量(mg/kg)	0、5000	
LD ₅₀ 値(mg/kg)	>5000	>5000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間 及び消失時間	投与後約15分から発現 投与後4時間に消失	
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	5000	5000

試験期間中、死亡例は認められなかった。

中毒症状としては、自発運動の低下が観察されたが、投与後4時間には全例回復した。

体重並びに剖検所見に特記すべき変化は認められなかった。

(19) クロチアニジン箱粒剤のラットを用いた急性経皮毒性試験

(資料 3-19)

試験機関：(株)ボソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：1.5%粒剤

試験動物：Cri:CD(SD) IGS系ラット(7週齢、体重：雄239~250g、雌170~191g)、
1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：乳鉢で微粉末とした検体を蒸留水で湿らせて、刈毛した背部皮膚約30cm²(5×6cm)にリント布約20cm²(4×5cm)を用いて塗布後、サージカルテープで被覆固定した。塗布24時間後に皮膚に残った検体を温水で湿らせたガーゼを用いて拭き取った。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10及び14日に測定した。試験終了時の全動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経皮	
	雄	雌
性別		
投与量(mg/kg)	0、2000	
LD ₅₀ 値(mg/kg)	>2000	>2000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間 及び消失時間	発現例なし	
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	2000	2000

試験期間中、中毒症状及び死亡例は認められなかった。また、体重並びに投与部位の皮膚を含めた剖検所見にも特記すべき変化は認められなかった。

(20) クロチアニジン箱粒剤のウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料 3-20)

試験機関：(株)ボゾリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：1.5%粒剤

試験動物：日本白色種ウサギ(14週齢、体重：2.58~3.09kg)、雌9匹

試験期間：3日間観察

方法：予め乳鉢を用いて微粉末とした検体を洗眼群3匹及び非洗眼群6匹の動物の左眼の結膜嚢内に1匹当たり0.1g宛適用し、適用後検体の漏出を防ぐため、約1秒間閉眼させた。右側は対照として無処置とした。その後洗眼群の3匹については適用2~3分後に適量(約200mL)の微温湯を用いて1分間洗眼した。対照眼についても同様に洗眼した。

試験項目：検体適用前、適用1、24、48及び72時間後に眼の角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Draize法の基準に従って採点した。また、一般状態は適用6時間後までは1時間ごとに、その後は適用24、48及び72時間後に観察し、体重は検体適用前及び適用72時間後に測定した。

試験結果：刺激性変化の採点を以下の表に示した。

項目		最高 評点	適用後時間				
			1時間	24時間	48時間	72時間	
非洗眼群 (6匹平均)	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
		虹彩	2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1.0	0.7	0	0
		浮腫	4	1.7	0	0	0
		分泌物	3	2.0	0	0	0
		合計	110	9.3	1.3	0	0
洗眼群 (3匹平均)	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
		虹彩	2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1.0	0.3	0	0
		浮腫	4	1.0	0	0	0
		分泌物	3	1.0	0	0	0
		合計	110	6.0	0.7	0	0

非洗眼群において適用 1～24 時間後に結膜の発赤、浮腫及び眼脂分泌が認められた。これらの刺激反応は適用 48 時間後の観察ではすべて消失した。また、洗眼群においても非洗眼群と同様の反応が認められたが、評点は低く、投与 48 時間後にはすべて消失した。

以上の結果より、クロチアニジン箱粒剤はウサギの眼粘膜に対して、極く軽度の刺激性があるものと判断され、洗眼効果が認められた。

(21) クロチアニジン箱粒剤のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 3-21)

試験機関：(株)ボソリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：1.5%粒剤

試験動物：日本白色種ウサギ(14週齢、体重：2.72~3.21kg)、雌6匹

試験期間：3日間観察

方法：動物の背部を左右2箇所刈毛し、左側には予め乳鉢を用いて微粉末とした検体0.5gを0.5mLの注射用水で湿らせ塗布したリント布(2.5×2.5cm)を、また右側には同量の注射用水で湿らせたリント布(2.5×2.5cm)をそれぞれ適用して油紙で被覆した後、弾性包帯で固定した。適用4時間後に皮膚に残った検体を注射用水で湿らせた脱脂綿を用いて拭き取った。

試験項目：検体の除去1、24、48及び72時間後に皮膚の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)を観察し、Draize法の基準に従って採点した。また、一般状態は適用6時間後までは1時間ごとに、その後は除去24、48及び72時間後に観察し、体重は検体適用前及び除去72時間後に測定した。

試験結果：刺激性変化の採点を以下の表に示した。

刺激性変化	最高 評点	検 体 除 去 後			
		1時間	24時間	48時間	72時間
紅斑、痂皮	4	0	0	0	0
浮腫	4	0	0	0	0
合計	8	0	0	0	0

注) 表の点数は6匹の平均値である。

動物には何ら皮膚の変化は認められなかった。また、一般状態及び体重の推移には検体適用による影響は認められなかった。

以上の結果より、クロチアニジン箱粒剤はウサギの皮膚に対して、刺激性はないものと判断される。

(22) クロチアニジン箱粒剤のモルモットにおける皮膚感作性試験

(資料 3-22)

試験機関：(株)ボゾリサーチセンター
[GLP対応]

報告書作成年：1999年

検体の純度：1.5%粒剤

試験動物：Hartley系モルモット雌(5~6週齢、体重：297~363g)

検体処置群 20匹、検体対照群 20匹

試験期間：30日間観察

方法：Buehler法に準じた。

検体は注射用水に懸濁し、使用した。

感作：前日に5×5cmの大きさに刈毛、剃毛した動物の左側胴部に検体の50%懸濁液0.2mLを塗布したリント布を6時間閉塞貼布した。初回感作より7日及び14日後に同様に計3回感作を行った。検体対照群には注射用水のみを使用した。

誘発：最終感作の13日後に5×5cmの大きさに刈毛、剃毛し、その翌日動物の右側胴部に検体の50%懸濁液0.2mLを塗布したリント布を24時間閉塞貼布した。

試験項目：誘発のための閉塞貼布除去24及び48時間後に、適用部位の紅斑及び浮腫の有無について肉眼的に観察し、Draize法の基準に従って採点した。

試験結果：各観察時間における皮膚反応が認められた動物数及びその採点を以下の表に示した。

群	供試動物数	検体濃度 感作 / 誘発	感作反応動物数										平均評点		陽性動物数	感作陽性率		
			24時間					48時間					24時間	48時間				
			皮膚反応評点															
			0	1	2	3	4	0	1	2	3	4						
検体処置群	20	50% / 50%	紅斑	20	0	0	0	0	紅斑	20	0	0	0	0	0	0	0	0%
			浮腫	20	0	0	0	0	浮腫	20	0	0	0	0				
検体対照群	20	0% / 50%	紅斑	20	0	0	0	0	紅斑	20	0	0	0	0	0	0	0	0%
			浮腫	20	0	0	0	0	浮腫	20	0	0	0	0				

群	供試動物数	DNCB 濃度 感作 / 誘発	感作反応動物数										平均評点		陽性動物数	感作陽性率		
			24 時間					48 時間					24 時間	48 時間				
			皮膚反応評点															
			0	1	2	3	4	0	1	2	3	4						
DNCB 処置群	10	1% / 0.25%	紅斑	0	5	2	3	0	紅斑	0	3	5	2	0	2.3	2.4	10	100%
			浮腫	5	5	0	0	0	浮腫	5	5	0	0	0				
DNCB 対照群	5	0% / 0.25%	紅斑	5	0	0	0	0	紅斑	5	0	0	0	0	0	0	0	0%
			浮腫	5	0	0	0	0	浮腫	5	0	0	0	0				

検体除去 24 及び 48 時間後において検体処置群及び検体対照群のいずれの動物にも皮膚反応はみられず検体の感作率は 0% であった。

また、一般状態及び体重の推移には検体適用による影響は認められなかった。なお、本試験機関では 6 か月に 1 回、皮膚感作性試験において一般的な陽性対照物質である DNCB を用いた試験を実施（最近時：1999 年 7 月 7 日～8 月 6 日）し、安定した陽性反応が検出されることを確認している。

以上の結果より、クロチアニジン箱粒剤のモルモットにおける皮膚感作性は陰性であると判断される。