

2) 催奇形性

i) ラットを用いた催奇形性試験

(資料 21)

試験機関: (財) 食品農医薬品安全性評価センター (GLP 対応)
報告書作成年: 1991 年

検体純度: %

試験動物: SD 系ラット 12 週齢 1 群 25 匹
開始時体重 雄: 331~371g 雌: 196~238g
(追加試験開始時体重 雄: 330~373g 雌: 225~252g)

投与期間: 11 日間 (1989 年 11 月 14 日~1989 年 11 月 24 日)
(追加試験 1990 年 10 月 31 日~1990 年 11 月 9 日)

方 法: 検体をコーンオイルに懸濁し、14.3、100、700mg/kg/日の投与用量で妊娠 7 から 17 日まで毎日 1 回胃ゾンデを用いて強制経口投与した。
また、700mg/kg/日投与群でも母体に影響が認められなかったため追加試験として最高投与可能量である 1,500mg/kg/日の投与用量で同様に投与した。
投与容量は、妊娠 7 日目の体重 100g 当たり 0.5ml とし、対照群には投与群と同量のコーンオイルのみを投与した。
交配は、陰垢観察から交配適期と判断された雌と雄を 1 対 1 で終夜同居させて行った。交尾の確認は、翌朝陰垢中に精子を確認した雌を交尾成立動物と判定し、その日を妊娠 0 日とした。

用量設定根拠投与用量; 0、20、100、250 及び 500 mg/kg の用量で各 5 匹のラットを用いて実施した用量設定試験の結果、100mg/kg 以上の投与群で肝重量及び対体重比が増加し、500mg/kg 投与群で腎重量の増加が母動物に認められた。胎児動物では 500 mg/kg 投与でも何等検体投与の影響は認められなかった。これらのことから本試験の最高用量は、母動物の臓器重量変化及び体重増加抑制が予想される 700 mg/kg とし、以下公比 7 で減じ、100 及び 14.3 mg/kg を設定した。

観察・検査項目: 母動物; 一般状態を毎日観察し、異常の有無を記録した。
体重を妊娠 0、4、7~17 及び 20 日に測定した。
飼料摂取量は妊娠 1、4、8、12、16 及び 20 日にそれぞれ前日からの 1 日飼料摂取量を測定した。
妊娠 20 日目にエーテル麻酔後放血屠殺し、妊娠黄体数、着床数、吸収胚数(早期死胚数、後期死胚数)、死亡胎児数及び生存胎児数を記録し胎盤重量を測定の後、性比、着床率、胎児生存率及び死胚児率を算出した。
胎児摘出後の母動物は剖検し、臓器組織の異常の有無を肉眼的に観察した後、心、肺、肝、腎、脾、副腎及び卵巣重量を測定した。肉眼的観察で観察された皮下腫瘍については、組織学的病理検査を実施した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

胎児動物; 生存胎児は外表検査を行った後、性別を判定し、個体別に体重を測定した。その後約 1/2 の胎児は 70%エチルアルコールに固定後、Dawson 変法に準じてアリザリンレッドS染色透明骨格標本を作製し、骨格奇形及び変異の有無、化骨進行度を検査した。残りの 1/2 の胎児はブアン液に固定後、頭部及び腹部については Wilson 変法で、胸部については西村の顕微解剖法によって内臓異常の有無を検査した。

結果: 結果の概要を後頁の表にまとめた。

母動物に及ぼす影響; 試験期間を通じて各群共に死亡例は認められなかった。

また一般状態及び体重変化には、検体投与による影響は認められなかった。

1,500mg/kg/日投与群及び 700mg/kg/日投与群の妊娠 12 日目の摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示したが、その変動は軽微でかつ単発的に認められたもので、検体投与による変化とは考えられなかった。

その他の投与群では対照群との間に差は認められなかった。

剖検所見では、下垂体の黒色斑、胸腺及び肺の黒色・赤色あるいは有色斑、肝の奇形結節、卵巣の嚢胞、皮下腫瘍(血栓形成を伴う肉芽組織)及びリンパ節の肥大が対照群を含む各投与群に散見されたのみで、検体投与に起因する変化は認められなかった。

各臓器の重量及び対体重比共に対照群との間に差は認められなかった。

また、妊娠末期開腹検査における着床所見では、妊娠黄体数、着床数共対照群と比較して検体投与各群に差は認められなかった。100mg/kg/日投与群において着床率が、対照群に比較して統計学的に有意な低値を示したが、700 及び 1,500mg/kg/日投与群では対照群との間で差は認められず、この 100mg/kg/日投与群の変化は、検体投与に起因したとは考えられなかった。

1,500mg/kg/日投与群の胎盤重量が対照群と比較して低い値を示したが、背景データの範囲内(417~425mg)の軽微な変化であり、胎盤重量に関連すると考えられる胎児重量には変化は認められず、検体投与による変化とは考えられなかった。

以上のように、検体は最大投与可能量である 1,500mg/kg/日投与によっても、母動物に対する影響は認められなかった。

胎児動物に及ぼす影響; 外表異常としては 1,500mg/kg/日投与群の 2 例に臍帯ヘルニアが、同群の 1 例に多指が、14.3 mg/kg/日投与群の 1 例に無眼球及び臍帯ヘルニアを伴う矮小児(対照群の平均生存胎児重量の 60%以下)が、追加試験の対照群の 1 例に矮小児が認められたのみで検体投与に起因する異常は認められなかった。骨格変異としては頸肋、腰肋、14 肋骨が対照群を含めた 14.3、100 及び 700 mg/kg/日の投与群に、また追加試験では頸肋、胸骨核非対称、13 肋骨短小、腰骨、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

12 肋骨、腰椎椎体の分離及び仙椎の腰椎化が、対照群及び 1,500 mg/kg/日投与群に散見されたが、発現頻度には検体投与に起因すると考えられる変動は認められなかった。

骨格奇形としては、追加試験の対照群で胸椎椎弓の過剰、肋骨の癒合及び腰椎椎弓の欠損を伴った胎児 1 例、頸椎椎弓の癒合及び胸椎核の離開が夫々 1 例認められた。1,500 mg/kg/日では外表検査で観察された多指の認められた 1 例に、指骨の過剰を伴う多指が認められたのみで、他の投与群では骨格奇形は認められなかった。また化骨進行度を観察した結果、追加試験も含めて全投与群で化骨遅延は認められなかった。

内臓異常としては、脳ヘルニア、右奇静脈遺残、胸腺頸部残留及び肝奇形結節が対照群を含めた他の投与群に単発的に認められ、追加試験では脳ヘルニアと無眼球の複合異常及び左臍帯動脈が対照群に、また胸腺頸部残留が対照群及び 1,500 mg/kg/日投与群に認められたが、これらの発現頻度には検体投与に起因すると考えられる明らかな増加は認められず、自然発生的な所見と考えられた。

以上のように、検体の 1,500 mg/kg/日以下の投与では胚致死作用及び催奇形性作用ならびに発育遅延作用は認められなかった。

結論:

以上の結果から、クミルロンは最大投与可能量である 1,500 mg/kg/日投与によっても、母動物に対する影響は認められず、また胎児動物の観察により、胚致死作用、催奇形性作用及び発育遅延作用も認められなかった。これらのことから、クミルロンのラットを用いた催奇形性試験における母動物及び胎児動物に対する最大無作用量は、1,500mg/kg/日以上と判断された。

	母動物	胎児動物
最大無影響量	1,500mg/kg/日以上	1,500 mg/kg/日以上
胎児動物の胚致死作用、催奇形性作用及び発育遅延作用はなし。		

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

<母動物>

		本試験				追加試験	
投与量 (mg/kg/日)		0	14.3	100	700	0	1,500
1 群 当 り 動 物 数		25	25	25	25	25	25
一 般 状 態		検体投与に起因する変化なし					
死 亡 数 (%)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
妊 娠 数 (%)		24 (100)	23 (96)	24 (100)	25 (100)	25 (100)	23 (92)
体 重 増 加 量(g) ^{1) a)}		90	96	87	87	90	89
累 積 摂 餌 量(g) ^{1) b)}		82	83	78	77	86	84
剖 検 所 見		検体投与に起因する変化なし					
臓 器 重 量 ¹⁾		検体投与に起因する変化なし					
着 床 所 見	検査動物数	24	23	24	25	25	23
	黄 体 数 ¹⁾	352	336	349	352	364	335
	着 床 数 (%) ²⁾	337 (95.7)	326 (97.0)	321 (92.0)*	335 (95.2)	331 (90.9)	321 (95.8)
	胎 盤 重 量 (g) ¹⁾	432	429	446	444	444	418*
	生 存 胎 児 数 (%) ¹⁾	310 (92.0)	308 (94.5)	298 (92.8)	314 (93.7)	309 (93.4)	304 (94.7)
	死 亡 胎 児 数 (%) ¹⁾	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)
	吸 収 胚 数 (%) ¹⁾	27 (8.0)	18 (5.5)	21 (6.5)	21 (6.3)	21 (6.3)	17 (5.3)

*; P<0.05 で統計学的有意差を示す。 ¹⁾; Student の t 検定、 ²⁾; Mann-Whitney の U 検定

アンダーライン; Jonckheere の傾向検定を実施したが有意差はなかった。

a); 妊娠 20 日目の体重から妊娠 7 日目の体重を差し引いた値。

b); 妊娠 8 日から 20 日までのラット 1 匹当りの累積摂餌量

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

<胎児動物>

投与量 (mg/kg/日)		本試験				追加試験		
		0	14.3	100	700	0	1,500	
生存胎児重量 ¹⁾ (g)	雄	3.65	3.66	3.62	3.60	3.53	3.55	
	雌	3.46	3.45	3.45	3.45	3.37	3.36	
性 比 (雄/雌) ³⁾		0.97(153/157)	1.17(166/142)	0.97(147/151)	0.89(148/166)	0.92(148/161)	0.99(151/153)	
2) 外 表 検 査	検査胎児数	310	308	298	314	309	304	
	異常胎児数 (%)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	3 (1.0)	
	無眼球症	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	臍帯ヘルニア	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.7)	
	矮小児	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	
	多指	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	
2) 骨 格 検 査	検査胎児数	161	161	155	163	157	160	
	変 異	変異胎児数(%)	9 (5.6)	6 (3.7)	5 (3.2)	1 (0.6)	11 (7.0)	7 (4.4)
		頸 肋	2 (1.2)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	4 (2.5)	3 (1.9)
		腰 肋	7 (4.3)	5 (3.1)	4 (2.6)	1 (0.6)	4 (2.5)	3 (1.9)
		胸骨核非対称	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	1 (0.6)
		14 肋 骨	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		13 肋骨短小	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.3)	0 (0.0)
		12 肋 骨	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)
		腰椎椎体分離	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)
	仙椎の腰椎化	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	
	奇 形	奇形胎児数(%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.9)	1 (0.6)
		胸椎椎弓癒合	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)
		胸椎椎弓過剰	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)
		胸骨核離開	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)
		肋骨癒合	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)
胸椎椎弓欠損		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	
多指	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)		
化 骨 進 行 度	頸 椎 椎 体 (%)	196/1127 (17.4)	196/1127 (17.4)	168/1085 (15.5)	198/1141 (17.4)	180/1099 (16.4)	153/1120 (13.7)	
	腰椎椎体分離 (%)	2/161(1.2)	4/161(2.5)	3/155(1.9)	1/163(0.6)	2/157(1.3)	0/160(0.0)	
	胸骨核未化骨 (%)	33/962(3.4)	42/966(4.3)	55/930(5.9)	50/978(5.1)	52/942(5.5)	50/960(5.2)	
	胸骨未化骨遅延(%)	157/962(16.3)	159/966(16.5)	154/930(16.6)	179/978(18.2)	108/942(11.5)	106/960(11.0)	
	その他の化骨遅延	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
仙尾椎数 ¹⁾	9.1	9.1	9.0	8.9	8.8	8.8		
2) 内 臓 検 査	検査胎児数	149	147	143	151	151	145	
	異常胎児数 (%)	15 (10.1)	15 (10.2)	15 (10.5)	14 (9.3)	11 (7.3)	2 (1.4)	
	脳ヘルニア	0 (0.0)	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.7)	0 (0.0)	
	胸腺頭部残留	5 (3.4)	8 (5.3)	11 (7.7)	9 (6.0)	9 (6.0)	2 (1.4)	
	右奇静脈遺残	0 (0.0)	1 (0.7)	0 (0.0)	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	左臍体動脈	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.7)	0 (0.0)	
	肝奇形結節	12 (8.1)	5 (3.4)	4 (2.8)	5 (3.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	
無眼球	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.7)	0 (0.0)		

性比以外の()内は%を示す、¹⁾:Student の t 検定、²⁾:Mann-Whitney の U 検定、³⁾: χ^2 検定

ii) ラットを用いた催奇形性試験

(資料 22)

試験機関: (財) 食品農医薬品安全性評価センター (GLP 対応)

報告書作成年: 1995 年

検体純度: %
試験動物: SD 系ラット 12 週齢 1 群 25 匹
開始時体重 雄: 343~383g 雌: 206~247g
投与期間: 11 日間 (1995 年 8 月 22 日~1995 年 9 月 1 日)
方 法: 検体を 1%メチルセルロース水溶液に懸濁し、1,000mg/kg/日の投与用量で妊娠 7 から 17 日まで毎日 1 回胃ゾンデを用いて強制経口投与した。
投与容量は、妊娠 7 日目の体重 100g 当たり 0.5ml とし、対照群には投与群と同量の 1%メチルセルロース水溶液のみを投与した。
交配は、膣垢観察から交配適期と判断された雌と雄を 1 対 1 で終夜同居させて行った。交尾の確認は、翌朝膣垢中に精子を確認した雌を交尾成立動物と判定し、その日を妊娠 0 日とした。

用量設定根拠: 投与用量は、先に実施した「クミルロンのラットを用いた催奇形性試験」(資料 21) において、コーンオイルを溶媒に用いた場合、最大投与可能量である 1,500mg/kg/日の投与によっても母体及び胎児に対して検体の毒性兆候は何ら認められなかったことから判断し、1%メチルセルロース水溶液を溶媒としたウサギの催奇形性試験(資料 24) での最高用量と同じ 1,000mg/kg/日投与群を設定した。

観察・検査項目: 母動物; 一般状態を毎日観察し、異常の有無を記録した。

体重を妊娠 0、4、7~17 及び 20 日に測定した。

摂餌量は妊娠 1、4、8、12、16 及び 20 日にそれぞれ前日からの 1 日摂餌量を測定した。

妊娠 20 日目にエーテル麻酔後放血屠殺し、妊娠黄体数、着床数、吸収胚数(早期死胚数、後期死胚数)、死亡胎児数及び生存胎児数を記録し胎盤重量を測定の後、性比、着床率、胎児生存率及び死胚児率を算出した。

胎児摘出後の母動物は剖検し、臓器組織の異常の有無を肉眼的に観察した後、心、肺、肝、腎、脾、副腎及び卵巣重量を測定した。どの臓器にも検体投与に起因する肉眼的異常は認められなかったため臓器の組織学的病理検査は実施しなかった。

胎児動物; 生存胎児は外表検査を行った後、性別を判定し、個体別に体重を測定した。

その後約 1/2 の胎児は 70%エチルアルコールに固定後、Dawson 変法に準じてアリザリンレッド S 染色透明骨格標本を作製し、骨格奇形及び変異の有無、化骨進行度を検査した。残りの 1/2 の胎児はブアン液に固定後、頭部及び腹部については Wilson 変法で、胸部については西村の顕微解剖法によって内臓異常の有無を検査した。

結果： 結果の概要を後頁の表にまとめた。

母動物に及ぼす影響；

試験期間を通じて各群共に死亡例は認められなかった。

また、一般状態及び体重変化には検体投与による影響は認められなかった。

検体投与群の妊娠 20 日目の摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示したが、その差は軽微であり、累積摂取量に差は認められなかった。

剖検所見では、胸腺の赤色斑及び赤色化、肺の赤色斑及び有色(褐色)斑、肝の奇形結節が対照群及び検体投与群に散見されたのみで検体投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

臓器重量では、検体投与群で対照群に比べ副腎の相対重量が有意な高値を示したが、軽微な変化であり、絶対重量には有意差は認められず、背景値(副腎相対重量：24~28mg%)の範囲内であるため、検体投与による変化とは判断されなかった。

また、妊娠末期開腹検査における着床所見では、対照群と比較して検体投与群に差は認められなかった。

以上のように、検体 1,000mg/kg/日投与による、母動物に対する影響は認められなかった。

胎児動物に及ぼす影響；

妊娠末期開腹検査における生存胎児重量では、対照群に比べ検体投与群の雄で有意な高値を示したが、その差は軽微であり、雌には同様の変化が認められなかったため、検体投与による変化とは考えられなかった。

外表異常としては、対照群で短尾が 1 例、矮小児が 2 例観察されたが、検体投与群では観察されなかった。

化骨進行度としては、検体投与群で胸骨核の化骨数が有意な低値を示し、中手骨の化骨数が有意な高値を示したが、いずれも軽微な変化であり明らかな胎児の発育亢進を示唆する変化ではなかった。その他の化骨遅延の発現率に差は認められなかった。

骨格変異としては、変異を伴った胎児の発現率に対照群と検体投与群で差は認められなかった。観察された変異は対照群で 13 肋骨の短小、13 肋骨の欠損及び 7 腰椎、検体投与群で胸骨格の非対称、対照群及び検体投与群で頸肋、腰肋及び胸椎椎体の分離であり、いずれも小数例であった。

骨格奇形としては、対照群の 1 例に頸椎椎弓と胸椎椎弓の癒合が観察されたのみであった。

内臓異常としては、異常を伴った胎児の発現率に対照群と検体投与群で差は認められなかった。観察された異常は、房室口遺残、左臍帯動脈遺残、肝奇形結節、胸腺

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

頸部残留、腎盂及び尿管の拡張で、いずれも対照群及び検体投与群で散見されたのみであった。

以上のように、検体 1,000mg/kg/日投与による、胚致死作用及び催奇形性作用ならびに発育遅延作用は認められなかった。

結論:

以上の結果から、1%メチルセルロース水溶液を溶媒としたクミルロンの 1,000mg/kg/日投与によって、母動物に対しての影響は認められず、また、胎児動物の観察により、胚致死作用、催奇形性作用及び発育遅延作用も認められなかった。これらのことから、ラットを用いた 1%メチルセルロース水溶液を溶媒としたクミルロンの催奇形性試験における母動物及び胎児動物に対する最大無影響量は、1,000mg/kg/日以上と判断された。

また、先に実施したコーンオイルを溶媒とした試験においても 1,500mg/kg/日投与により影響が認められなかったことから、溶媒を変えることによる影響はないと推察される。

	母動物	胎児動物
最大無影響量	1,000mg/kg/日以上	1,000mg/kg/日以上
胎児動物の胚致死作用、催奇形性作用及び発育遅延作用はなし。		

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

<母動物>

投与量 (mg/kg/日)	0	1,000
1 群 当 り 動 物 数	25	25
一 般 状 態	検体投与に起因する変化なし	
死 亡 数 (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
妊 娠 数 (%)	24 (96)	25 (100)
体 重 増 加 量(g) ^{1) a)}	97	90
累 積 摂 餌 量(g) ^{1) b)}	85	82
剖 検 所 見	検体投与に起因する変化なし	
臓 器 重 量 ¹⁾ 副腎 対体重比 ^{c)}	100	106*
着 床 所 見	検査動物数	24
	黄 体 数 ¹⁾	378
	着 床 数 (%) ²⁾	343 (90.7)
	胎 盤 重 量 (g) ¹⁾	430
	生 存 胎 児 数 (%) ¹⁾	325 (94.8)
	死 亡 胎 児 数 (%) ¹⁾	0 (0.0)
	吸 収 胚 数 (%) ¹⁾	18 (5.3)

*; P<0.05 で統計学的有意差を示す。 ¹⁾; Student の t 検定、 ²⁾; Mann-Whitney の U 検定
アンダーライン ; Jonckheere の傾向検定を実施したが有意差はなかった。

a); 妊娠 20 日目の体重から妊娠 7 日目の体重を差し引いた値。

b); 妊娠 8 日から 20 日までのラット 1 匹当りの累積摂餌量

c); 臓器重量は統計学的に有意差のあったもののみを示した。

<胎児動物>

投与量 (mg/kg/日)		0	1,000	
生存胎児重量 ¹⁾ (g)	雄	3.39	3.55	
	雌	3.28	3.33	
性比 (雄/雌) ³⁾		1.02 (164/161)	1.12 (167/149)	
外 ²⁾ 表 検 査	検査胎児数	325	316	
	異常胎児数 (%)	2 (0.8)	0 (0.0)	
	短尾	1 (0.3)	0 (0.0)	
	矮小児	2 (0.6)	0 (0.0)	
骨 格 異 常 形 化 骨 進 行 度	検査胎児数	169	165	
	変 異	変異胎児数(%)	10 (4.1)	11 (6.7)
		頸肋	1 (0.6)	2 (1.2)
		腰肋	4 (2.4)	3 (1.8)
		胸骨核非対称	0 (0.0)	3 (1.8)
		7腰椎	1 (0.6)	0 (0.0)
		13肋骨短小	2 (1.2)	0 (0.0)
		13肋骨欠損	1 (0.6)	0 (0.0)
		腰椎椎体分離	1 (0.6)	3 (1.8)
	奇 形	奇形胎児数(%)	1 (0.6)	0 (0.0)
		胸椎/頸椎椎弓癒合	1 (0.6)	0 (0.0)
	化 骨 進 行 度	頸椎椎体 (%)	151/1176 (12.8)	153/1155 (13.2)
		胸椎椎体分離 (%)	1/169 (0.6)	3/165 (1.8)
		胸骨核未化骨 (%)	51/1014 (5.5)	30/990 (3.0)*
中手骨 (%)		1253/1690 (74.1)	1280/1650 (77.6)*	
その他の化骨遅延		なし	なし	
仙尾椎数 ¹⁾		8.4	8.7	
内 臓 検 査	検査胎児数	155	151	
	異常胎児数 (%)	53 (34.2)	58 (38.4)	
	房室口遺残	1 (0.6)	1 (0.7)	
	左臍帯動脈遺残	2 (1.3)	4 (2.6)	
	肝奇形結節	12 (7.7)	9 (6.0)	
	胸腺頸部残留	36 (23.2)	44 (29.1)	
	腎盂拡張	9 (5.8)	8 (5.3)	
	尿管拡張	3 (1.9)	0 (0.0)	

*; P<0.05 で統計学的有意差を示す。 性比以外の()内は%を示す。

1); Student の t 検定, 2); Mann-Whitney の U 検定, 3); χ^2 検定

iii) ウサギを用いた催奇形性試験

(資料 23)

試験機関: (財) 食品農医薬品安全性評価センター (GLP 対応)

報告書作成年: 1990 年

検体純度: 97.7%
試験動物: ニューージーランドホワイト種 ウサギ 1 群 15 匹、開始時 5-6 ヶ月齢
開始時体重 雄; 3.52kg~4.44 kg 雌; 3.28kg~4.20 kg
投与期間: 13 日間 (1990 年 3 月 12 日~1990 年 3 月 24 日)
方 法: 検体をコーンオイルに懸濁し、最大投与可能量 300mg/kg/日を最高投与量とし、以下 120、60mg/kg/日の投与用量で妊娠 6 から 18 日まで毎日 1 回強制経口投与した。
対照群には、検体投与群と同容量のコーンオイルのみを投与した。

用量設定根拠 ; ウサギを用いた用量設定試験において、検体のコーンオイルの物理的に調製可能でかつウサギへの最大調製可能量 (1ml/kg/日投与容量) である 300mg/kg/日投与によっても検体投与による影響は認められなかった。従って、最高投与量は最大調製可能量である 300 mg/kg とし、以下も用量設定試験と同様の用量を設定した。
投与容量は、下痢、軟便、死亡等の発現しない最高容量である体重 100g 当たり 0.1ml とした。

交配は、外陰部が十分に腫脹し、紫紅色を呈した雌を交配用ケージに雄と同居させて行った。3 回の交尾確認の後、膣垢中に精子を確認した雌を交尾成立動物と判定し、その日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目:

母動物; 一般状態及び死亡の有無を毎日観察した。

体重は、妊娠 0、4、6~18、20、24、28 及び 29 日に測定した。

摂餌量は、妊娠 4、8、12、16、20、24、28 及び 29 日に夫々前日からの 1 日摂取量を測定した。

妊娠 29 日目にペントバルビタールナトリウムを耳介静脈内に注射して麻酔後、放血屠殺し、妊娠黄体数、着床数、吸収胚数 (早期死胚数、後期死胚数)、死亡胎児数及び生存胎児数を記録し、胎盤重量測定後着床率、胎児生存率及び死胚児率を算出した。

胎児摘出後の母動物は剖検し、臓器の肉眼的観察を行った後、心、肺、肝、腎、脾、副腎及び卵巣重量を測定した。

胎児動物; 生存胎児は外表検査及び体重測定を行った後、開腹し性別を判定した。

全例 95%エチルアルコールに固定して内臓異常の有無を実体顕微鏡下で検査後、Dawson 変法に準じてアリザリンレッド S 染色透明骨格標本を作製し、骨格奇形及び変異の有無、化骨進行度を検査した。

死亡胎児については外表検査後 10%中性緩衝ホルマリン液に固定し保存した。

結 果： 母動物及び胎児動物についての結果を後頁の表に示した。

母動物に及ぼす影響；

投与初期(妊娠 9 日)に対照群の 1 例が肺の疾患に関連した呼吸障害で死亡したが、これは肺への誤投与によると考えられた。また 120mg/kg/日投与群の 1 例が妊娠 6 日の投与直前の保定時に後躯麻痺を示し、腰椎骨折の疑いがあったため切迫屠殺した。これら 2 例以外は妊娠期間を通じ、死亡例は認められなかった。

一般状態の変化では、頸部の痲皮、腹部被毛の汚染及び脱毛が各群に散見されたが、検体投与によると考えられる特異的な変化は認められなかった。

体重変化では、60mg/kg/日投与群で投与期間(妊娠 6～18 日)に体重増加量が対照群を上回り、統計学的有意差を示したが、120 及び 300 mg/kg/日投与群ではこのような変化は認められず、傾向検定の結果、用量に依存した変化でないと判断された。

摂餌量では、120 mg/kg/日投与群において、妊娠 4 及び 8 日に対照群に比較して統計学的に有意な低値を示し、かつ 8～16 日の累積摂餌量は傾向検定の結果用量依存性を示したが、妊娠 4 日目は検体投与前の変化であり、同群の 12 日以後の測定時及び 300 mg/kg/日投与群では対照群と比較して変化は認められなかったことから、検体投与に起因した変化とは考えられなかった。

剖検所見においては肺の赤色斑及び腎の嚢胞が少数例に観察されたが、これらを含めて検体投与に起因したと考えられる特異な変化は認められなかった。

また主要臓器の重量測定をした結果では、120 mg/kg/日投与群の心の重量及び対体重比が、300mg/kg/日投与群の心の対体重比が対照群に比較して統計学的に有意な低値を示した。しかし、これは心重量の重い個体が対照群に偏ったことによる群間差と考えられた。

120mg/kg/日投与群で着床数が対照群に比べ統計学的に有意に少なく、この結果、同群の着床率が統計学的に有意な低値を示した。しかし、300mg/kg/日投与群では同様の変化は認められず、検体投与の影響とは考えられなかった。

120 及び 300mg/kg/日投与群で胎盤重量が高値を示したが、これは生存胎児数の減少に伴う生存胎児重量の増加傾向によるものであり、傾向検定の結果用量依存性も認められず、自然発生的なものと考えられた。

以上のように、統計学的に対照群に比較して有意な差が認められた検査項目があったが、8～16 日の累積摂餌量以外はいずれも用量に依存した変化ではなく、検体投与による変化とは考えられなかった。また、8～16 日の累積摂餌量に用量依存性は認められたが、12 日以降の摂取量は対照群と比較し変化はなく、検体投与の影響とは考えられなかった。

従って、検体を最大投与可能量である 300mg/kg/日以下の用量でウサギに投与した場合、母動物に対する影響はないと判断された。

胎児動物に及ぼす影響；

外表検査では、対照群を含めた各投与群で矮小児(対照群の平均胎児重量の 60%以

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

下)が認められたが、その発現率には用量依存性はなく、検体投与に起因する変化とは考えられなかった。その他臍帯ヘルニア、短尾、手関節の屈曲が観察されたが、単発性の発現であり、自然発生的な所見と考えられた。

骨格変異では対照群を含めた各群に13肋骨が高頻度に、頸肋、胸椎椎体分離、胸骨核非対称、胸骨核連結、過剰胸骨核、12肋骨欠損、仙椎の腰椎化及び腰椎の仙椎化が少数例に観察されたが、発現頻度に群間差は認められず、検体投与に起因する変化ではなかった。

骨格奇形では、胸骨核の癒合が対照群及び60 mg/kg/日投与群に認められたが、120mg/kg/日及び300mg/kg/日投与群には認められず、検体投与による変化とは考えられなかった。その他胸骨核の分岐・変形、胸椎椎体の癒合、胸椎椎弓の欠損、肋骨の結節・欠損・離開・癒合及び尾椎の癒合が検体投与群に単発的に観察されたのみで、検体投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

化骨進行度を観察した結果では胸椎/腰椎数、指趾骨及び仙尾椎骨の化骨数、胸骨核の化骨状態に群間差は認められず、検体投与に起因する化骨遅延は認められなかった。

内臓検査では、肝奇形結節が対照群を含む各群の複数例に、また心室中隔欠損、右房室發育不全及び三尖弁狭窄などを伴った動脈幹遺残及び肺動脈形成不全が重度な奇形として観察されたが、いずれもその発現率に用量依存性の増加は認められず、検体投与の影響を示唆する変化ではなかった。

以上のように、どの試験項目においても胎児動物に対しては、検体に起因した特異な変化は観察されなかった。

従って、検体の300 mg/kg/日以下の投与では、胚の致死作用及び催奇形性作用ならびに發育遅延作用は認められなかった。

結論

以上の結果から、クミルロンは、最大投与可能量である300mg/kg/日投与によっても母動物への影響は認められず、また胎児動物に対しても胚の致死作用及び催奇形性作用ならびに發育遅延作用は認められず、クミルロンのウサギを用いた本試験における母動物及び胎児動物に対する最大無作用量は300 mg/kg/日以上であると推定された。

	母動物	胎児動物
最大無影響量	300mg/kg/日以上	300 mg/kg/日以上
胎児動物の胚致死作用、催奇形性及び發育遅延作用はなし。		

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

<母動物>

投与量 (mg/kg/日)		0	60	120	300	
1 群 当 り 動 物 数		15	15	15	15	
一 般 状 態	検体投与に起因する異常は認められなかった					
死 亡 数 (%) ^{a)}		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
妊 娠 数 (%)		15 (100.0)	15 (100.0)	14 (93.33)	15 (100.0)	
体 重 増 加 量 ¹⁾ (g)	6~18 日	0.06	0.16**	0.08	0.10	
	20~29 日	0.22	0.18	0.15	0.20	
累 積 摂 餌 量 ¹⁾ (g)	8~16 日 [±]	418	416	349	388	
	20~29 日	583	606	567	578	
剖 検 所 見	検体投与に起因する異常は認められなかった					
臓 器 重 量 ^{1) b)}	心	実重量 (g)	10.13	9.17	8.83*	8.97
		対体重比	0.271	0.242	0.236*	0.237*
着 床 所 見	検査動物数	14	15	13	15	
	黄 体 数 ¹⁾	172	157	151	177	
	着 床 数 (%) ²⁾	154 (89.5)	146 (93.0)	111 (73.5)*	156 (88.1)	
	胎 盤 重 量 (g) ¹⁾	4692	5215	5757*	5185*	
	生 存 胎 児 数 (%) ¹⁾	134 (87.0)	128 (87.7)	101 (91.0)	129 (82.7)	
	死 亡 胎 児 数 (%) ¹⁾	14 (9.1)	3 (2.1)	5 (4.5)	6 (3.8)	
	吸 収 胚 数 (%) ¹⁾	6 (3.9)	15 (10.0)	5 (4.5)	21 (13.5)	

* ; P<0.05、 ** ;P<0.01 で統計学的有意差を示す。 ¹⁾ ; Student の t 検定、 ²⁾ ; Mann-Whitney の U 検定 (**); 8 日目のみ有意差が認められた。

アンダーライン ; Jonckheere の傾向検定を実施した項目。累積摂餌量以外は有意差なし。

^{a)} ; 対照群 1 例及び 120mg/kg/日投与群 1 例が死亡したが、夫々誤投与及び腰椎骨折で死亡あるいは切迫屠殺したもので、死亡数としてはカウントしていない。

^{b)} ; 臓器重量は統計学的に有意差のあったもののみを示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

<胎児動物>

投与量 (mg/kg/日)		0	60	120	300	
生存胎児重量 ¹⁾ (g)	雄	35.72	32.55	36.46	35.19	
	雌	33.30	33.12	33.64	36.15	
性 比 (雄/雌) ²⁾		1.09(70/64)	0.75(55/73)	0.98(50/51)	1.08(67/62)	
2) 外 表 検 査	検査胎児数	134	128	101	129	
	異常胎児数 (%)	5 (3.7)	11 (8.6)	1 (1.0)	3 (2.3)	
	臍帯ヘルニア	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	矮 小 児	3 (2.2)	10 (7.8)	1 (1.0)	3 (2.3)	
	短 尾	0 (0.0)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	手関節の屈曲	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
2) 骨 格 検 査	検査胎児数	134	128	101	129	
	変 異	変異胎児数(%)	47 (35.1)	37 (28.9)	47 (46.5)	41 (31.8)
		頸 肋	0 (0.0)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
		胸椎椎体分離	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.0)	0 (0.0)
		胸骨核非対称	2 (1.5)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
		胸骨核連結	2 (1.5)	3 (2.3)	5 (5.0)	2 (1.6)
		過剰胸骨核	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.0)	0 (0.0)
		13 肋 骨	43 (32.1)	32 (25.0)	39 (38.6)	37 (28.7)
		12 肋骨欠損	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)	0 (0.0)
		仙骨の腰椎化	4 (3.0)	2 (1.6)	4 (4.0)	7 (5.4)
	腰椎の仙椎化	0 (0.0)	2 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	奇 形	奇形胎児数(%)	3 (2.2)	5 (3.9)	3 (3.0)	1 (0.8)
		胸 骨 核 癒 合	2 (1.5)	3 (2.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
		胸 骨 核 分 岐	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)	0 (0.0)
		胸 骨 核 変 形	1 (0.7)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
		胸椎椎体癒合	0 (0.0)	1 (0.8)	1 (1.0)	0 (0.0)
		胸椎椎弓欠損	0 (0.0)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
		肋 骨 結 節	0 (0.0)	1 (0.8)	1 (1.0)	0 (0.0)
		3 肋 骨 欠 損	0 (0.0)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
肋 骨 離 開		0 (0.0)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	
肋 骨 癒 合	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)		
尾 椎 癒 合	0 (0.0)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)		
化 骨 進 行 度	胸椎数	12 / 6	0/134 (0.0)	0/128 (0.0)	1/101 (1.0)	0/129 (0.0)
	／	12 / 7	84/134 (62.7)	92 /128 (71.9)	56/101 (55.4)	79/129 (61.2)
	腰椎数	12 / 8	7/134 (5.2)	4/128 (3.1)	6/101 (5.9)	13/129 (10.1)
	(%)	13 / 6	22/134 (16.4)	18/128 (14.1)	23/101 (22.8)	20/129 (15.5)
		13 / 7	21/134 (15.7)	14/128 (10.9)	15/101 (14.9)	17/129 (13.2)
	胸骨核未化骨 (%)		10/804 (1.2)	5/768 (0.7)	4/606 (0.7)	7/774 (4.8)
胸骨核化骨遅延 (%)		46/804 (5.7)	54/768 (8.3)	42/606 (6.9)	37/774 (4.8)	
仙尾椎数		20.0	20.0	20.0	19.9	

*; P<0.05, **; P<0.01 で統計学的有意差を示す。 性比以外の()内の数字は%を示す。

¹⁾; Student の t 検定、²⁾; Mann-Whitney の U 検定、³⁾; χ^2 検定

アンダーライン: Cochran-Armitage の傾向検定を行った項目。有意差はなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

投与量 (mg/kg/日)		0	60	120	300
D 内 臓 検 査	検査胎児数	134	128	101	129
	異常胎児数 (%)	19 (1.4)	12 (0.8)	8 (0.6)	10 (0.7)
	胸腺頸部残留	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)
	二分裂心	2 (1.5)	2 (1.6)	1 (1.0)	0 (0.0)
	大血管転換	0 (0.0)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
	動脈幹遺残	1 (0.7)	1 (0.8)	2 (2.0)	0 (0.0)
	肺動脈形成不全*	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.0)	3 (2.3)
	肺形成不全	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	肺分葉異常	2 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	肝奇形結節**	15 (11.2)	7 (5.5)	2 (2.0)	6 (4.7)
腎盂拡張	0 (0.0)	1 (0.8)	1 (1.0)	0 (0.0)	

*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$ で統計学的有意差を示す。

D; Mann-Whitney の U 検定。

アンダーライン: Cochran-Armitage の傾向検定を行った項目。(項目名に検定結果を示した。)

iv) ウサギを用いた催奇形性試験

(資料 24)

試験機関: (財) 食品農医薬品安全性評価センター (GLP 対応)
報告書作成年: 1995 年

検体純度: %
試験動物: ニューゼーランドホワイト種 妊娠ウサギ
1 群 15 匹 (対照群に 2 例、最高用量群に 1 例死亡例が認められたために夫々対照群に 2 例、最高用量群に 1 例追加した。)
開始時 18 週齢 開始時体重 雄; 2.36kg~3.35 kg 雌; 2.97kg~3.86 kg
投与期間: 13 日間 (1995 年 9 月 12 日~1995 年 9 月 24 日)
方 法: 検体を 1%メチルセルロース水溶液に懸濁し、1000mg/kg/日を最高投与量とし、以下公比約 3 で除して 300、100 mg/kg/日の投与用量で妊娠 6 から 18 日まで毎日 1 回強制経口投与した。投与容量は、体重 100g 当たり 0.5ml とした。対照群には、検体投与群と同容量の 1%メチルセルロース水溶液のみを投与した。

用量設定根拠: コーンオイルを媒体として先に実施したウサギを用いた催奇形性試験 (資料 23) で、最大投与可能量である 300mg/kg でも母動物及び胎児動物に対して検体の影響が認められなかったため、無影響量の基準となる 1000mg/kg/日を最高用量として、以下公比約 3 で除し 300 及び 100mg/kg を設定した。

交配は、外陰部が十分に腫脹し、紫紅色を呈した雌を交配用ケージに雄と同居させて行った。交尾確認の後、膣垢中に精子を確認した雌を交尾成立動物と判定し、その日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目:

母動物: 一般状態及び死亡の有無を毎日観察した。

体重は、妊娠 0、4、6~18、20、24 及び 29 日に測定した。

摂餌量は、妊娠 4、8、12、16、20、24、28 及び 29 日に夫々前日からの 1 日摂取量を測定した。

妊娠 29 日目にペントバルビタールナトリウムを耳介静脈内に注射して麻酔後、放血屠殺し、妊娠黄体数、着床数、吸収胚数 (早期死胚数、後期死胚数)、死亡胎児数及び生存胎児数を記録し、胎盤重量測定後着床率、性比、胎児生存率及び死胚児率を算出した。

胎児摘出後の母動物は剖検し、臓器の肉眼的観察を行った後、心、肺、肝、腎、脾、副腎及び卵巣重量を測定した。

胎児動物: 生存胎児は外表検査を行った後、性比を判定し、個別別に体重を測定した。

その後全例を 95%エチルアルコールに固定後、顕微解剖法により頭部を除き内臓異常の有無を検査した後、Dawson 変法に準じてアリザリンレッド S 染色により骨格標本作製し、骨格奇形及び変異の有無、化骨進行度を検査した。

死亡胎児については外形検査後 10%中性緩衝ホルマリン液に固定し保存した。

結果： 母動物及び胎児動物についての結果を後頁の表に示した。

母動物に及ぼす影響；

投与過誤及び誤嚥によると考えられる死亡例が対照群に1例ずつ、また対照群にもう1例及び1000mg/kg/日投与群に1例死亡例が認められたが、死因は確定出来なかった。更に300 mg/kg/日投与群の1例が腰椎骨折の疑いがあったため妊娠9日目に切迫屠殺した。これら以外は妊娠期間を通じ、死亡例は認められなかった。

一般状態の変化では、300 mg/kg/日投与群の1例に痲皮が認められたのみで、検体投与によると考えられる特異的な変化は認められなかった。

1000mg/kg/日投与群で流産が1例観察されたが、剖検の結果肺の褐色斑点が認められたのみで流産の原因は不明であった。

体重変化では、検体投与群と対照群との間に差は認められなかった。

摂餌量では、1000mg/kg/日投与群で妊娠8日に対照群に比較して統計学的に有意な低値を、300mg/kg/日投与群で妊娠29日に有意な高値を示したが、いずれも継続した変化ではなく、累積摂餌量には差はないため検体投与に起因した変化とは考えられなかった。

剖検所見においては検体投与に起因したと考えられる特異な変化は認められなかった。

また主要臓器の重量測定をした結果では、1000mg/kg/日投与群の脾の絶対重量及び対体重比が、統計学的に有意な高値を示し、検体投与の影響が考えられた。100mg/kg/日投与群の腎の対体重比が対照群に比較して統計学的に有意な高値を示したが、他の高用量投与群では変化は認められず、検体投与に起因した変化とは考えられなかった。

以上のように、検体投与に起因すると考えられる変化は脾の絶対重量及び対体重比の増加で、その他の項目には影響は認められなかった。

従って、1000mg/kg/日投与群での脾の絶対重量及び対体重比の変化を指標として、検体の母動物に対する最大無作用量は300 mg/kg/日と判断された。

胎児動物に及ぼす影響；

300及び1000mg/kg/日投与群で対照群に比較し、雌の生存胎児数が統計学的に有意な低値を示し、また1000mg/kg/日投与群で着床数が有意な高値を示したが、検体投与は着床後の器官形成期からであるため、検体が着床及び受精時の性の決定に対して影響するとは考えらず、更に生存胎児数には差は認められなかった。従ってこれらの変化は検体投与に起因する変化ではないと判断した。

外表検査では、矮小児(対照群の平均胎児重量の60%以下)が100、300及び1000mg/kg/日投与群に夫々7例、2例及び3例観察されたが、傾向検定の結果発現頻度に用量依存性がないため検体投与の影響とは考えられなかった。

化骨進行度を観察した結果では、300 mg/kg/日投与群で胸骨核の化骨遅延数が、ま

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

た 100mg/kg/日投与群で仙尾椎骨の化骨数が有意な低値を示したが傾向検定の結果、どちらも用量依存性は認められず、検体の影響とは考えられなかった。その他胸椎／腰椎数、胸骨核の未化骨数等には群間差は認められず、検体投与に起因する化骨遅延は認められなかった。

骨格変異では、変異を伴った胎児の発現率に对照群との間に差は認められなかった。所見別では对照群を含めた各群に 13 肋骨が高頻度に、胸骨核非対称が对照群に 1 例、腰椎の仙椎化が 100 及び 300mg/kg/日投与群で各 1 例が観察された。

骨格奇形では、1000mg/kg/日投与群の 1 例に肋骨の結節が認められたのみであった。

内臓検査では、对照群の 1 例に分葉異常が、1000mg/kg/日投与群の 1 例に腎盂の拡張が観察されたのみであった。

以上のように、どの試験項目においても傾向検定の結果、用量依存性の変化は認められず、胎児動物に対して検体投与による変化は観察されなかった。

従って、検体の 1000mg/kg/日以下の投与では、胚の致死作用及び催奇形性作用ならびに発育遅延作用は認められなかった。

以上の結果から、クミルロンの本試験における母動物に対する最大無影響量は 1000mg/kg/日投与による脾の実重量及び対体重比の増加を指標として、300mg/kg/日と判断し、胎児動物に対しては最高用量である 1000mg/kg/日投与でもなんら影響は認められず最大無影響量は 1000 mg/kg/日以上であると推定された。

	母動物	胎児動物
最大無影響量	300mg/kg/日	1000 mg/kg/日以上

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

<母動物>

投与量 (mg/kg/日)		0	100	300	1,000	
1 群 当 り 動 物 数		17	15	15	16	
一 般 状 態		検体投与に起因する異常は認められなかった。			流産 (1)	
死 亡 数 (%) ^{a)}		1 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.7)	
妊 娠 数 (%)		14 (100.0)	15 (100.0)	14 (100.0)	13 (81.3)	
体 重 増 加 量 ¹⁾ (g)	6~18 日	121	95	121	106	
	20~29 日	98	140	173	115	
累 積 摂 餌 量 ¹⁾ (g)	8~16 日*	416	365	409	366	
	20~29 日	408	408	483	409	
剖 検 所 見		検体投与に起因する異常は認められなかった				
臓 器 重 量 ^{1)b)}	脾	実重量 (g)	1.06	1.27	1.22	1.31*
		対体重比	0.032	0.039	0.036	0.038*
	腎	対体重比	0.493	0.537*	0.509	0.501
着 床 所 見	検査動物数	14	15	14	11	
	黄 体 数 ¹⁾	132	143	135	119	
	着 床 数 (%) ²⁾	115 (88.1)	124 (87.1)	129 (95.1)	110 (92.5)	
	胎 盤 重 量 (mg) ¹⁾	5326	5224	5450	5522	
	生 存 胎 児 数 (%) ¹⁾	109 (93.6)	119 (96.2)	121 (93.9)	92 (84.4)	
	死 亡 胎 児 数 (%) ¹⁾	2 (1.6)	3 (2.1)	3 (1.9)	10 (7.3)	
	吸 収 胚 数 (%) ¹⁾	4 (4.8)	2 (1.6)	5 (4.2)	8 (8.2)	

*; P<0.05、 **;P<0.01 で統計学的有意差を示す。 ¹⁾; Student の t 検定、 ²⁾; Mann-Whitney の U 検定 (**); 8 日目のみ有意差が認められた。

アンダーライン; Jonckheere の傾向検定を実施した項目。累積摂餌量以外は有意差なし。

^{a)}; 対照群 2 例及び 300mg/kg/日投与群 1 例が死亡したが、夫々誤投与・誤嚥及び腰椎骨折で死亡あるいは切迫屠殺したもので、死亡数としてはカウントしていない。死因を決定できなかった例数を表示した。

^{b)}; 臓器重量は統計学的に有意差のあったもののみを示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

<胎児動物>

投与量 (mg/kg/日)		0	100	300	1,000		
生存胎児重量 ¹⁾ (g)	雄	39.49	39.71	41.00	39.22		
	雌	38.19	38.36	39.58	38.18		
性比 (雄/雌) ³⁾		1.27 (61/48)	1.05 (61/58)	0.70 (50/71)*	0.59 (34/58)**		
2)外表 検査	検査胎児数	109	119	121	92		
	異常胎児数 (%)	0	7 (5.9)	2 (1.7)	3 (3.3)		
	矮小児	0	7 (5.9)	2 (1.7)	3 (3.3)		
2)骨 格 検査	検査胎児数	109	119	121	92		
	変異	変異胎児数(%)	68 (62.4)	85 (71.4)	66 (54.5)	65 (70.7)	
		13肋骨	67 (61.5)	85 (71.4)	60 (54.5)	65 (70.7)	
		胸骨核非対称	1 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
		腰椎の仙椎化	0 (0.0)	1 (0.8)	1 (0.8)	0 (0.0)	
	検査胎児数	109	119	121	92		
	奇形	奇形胎児数(%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.1)	
		肋骨結節	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.1)	
	検査胎児数	109	119	121	92		
	化骨 進行 度	胸椎数	12 / 6	0/109 (0.0)	2/119 (1.7)	0/121 (0.0)	1/92 (1.1)
			12 / 7	32/109 (29.4)	25/119 (21.0)	30/121 (24.8)	16/92 (17.4)
		腰椎数 (%)	12 / 8	10/109 (9.2)	7/119 (5.9)	25/121 (20.7)	10/92 (10.9)
13 / 6			21/109 (19.3)	17/119 (14.3)	18/121 (14.9)	9/92 (9.8)	
		13 / 7	46/109 (42.2)	68/119 (57.1)	48/121 (39.7)	56/92 (60.9)	
胸骨核未化骨 (%)		48/654 (7.3)	43/714 (6.0)	69/726 (9.5)	33/552 (6.0)		
胸骨核化骨遅延 (%)		49/654 (7.5)	38/714 (5.3)	33/726 (4.5)*	54/522 (9.8)		
仙尾椎数	20.3	19.8*	20.2	20.0			
2)内 臓 検査	検査胎児数	109	119	121	92		
	内臓 異常	内臓異常胎児数 (%)	1 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.2)	
		肺分葉異常	1 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	腎盂拡張	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.2)		

*; P<0.05, **; P<0.01 で統計学的有意差を示す。性比以外の()内の数字は%を示す。

¹⁾; Student の t 検定、²⁾; Mann-Whitney の U 検定、³⁾; χ^2 検定

アンダーライン: Cochran-Armitage の傾向検定を行った項目。有意差はなかった。

(13) 変異原性

1) 細菌を用いた復帰変異試験 (Ames test)

(資料 25)

試験機関: (財) 食品農医薬品安全性評価センター (GLP 対応)

報告書作成年: 1988 年

検体純度: %

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA100、TA98、TA1535、TA1537 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* の WP2uvrA 株を用い、ラットの肝より調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) 存在下 (代謝活性化法) と非存在下 (直接法) で Ames らの方法により変異原性を検定した。検体は DMSO に溶解し、対照には DMSO のみをプレート当たり 100 μ l 添加した。陽性対照として、直接法の場合は、AF-2、ENNG、ACR を、代謝活性化法の場合には、2-AA を、夫々 DMSO に溶解して用いた。

1 濃度当たり夫々 2 枚のプレートを使用し、プレート当りの平均値を算出した。

結果の判定は、復帰変異コロニー数が溶媒対照の 2 倍以上に増加し、かつ再現性あるいは、検体の濃度に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

用量設定根拠 ; 濃度設定試験において最高濃度で TA1535、TA98、TA1537 に生育阻害作用が認められたため、本試験でも最高濃度を 5,000 μ g/プレートに設定し、以下公比 2 で 6 濃度設定した。

また本試験で直接法における塩基置換型菌株のコロニー数増加には明確な濃度相関性に欠けていたため、追加試験として TA100 株では 320-10.0 μ g/プレート、TA1535 株では 20.0-0.63 μ g/プレートの夫々 6 濃度を用いて濃度相関性の有無を確認した。

陽性対照

直接法	AF-2	; 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
	ENNG	; 1-エチル-2-ニトロ-3-ニトログアニジン
	ACR	; 9-アミノアクリジン
代謝活性化法	2-AA	; 2-アミノアントラセン

結 果: 試験結果を次表に示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

本試験結果

薬物	濃度 (μg / plate)	S9 mix	平均復帰変異コロニー数/plate				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA 100	TA 1535	WP2 $avrA$	TA 98	TA 1537
溶媒対照(DMSO)	0	—	160	21	21	12	5
検 体	156	—	212	47	18	21	6
	313	—	188	59	20	14	5
	625	—	209	56	19	12	5
	1,250	—	196	50 ¹⁾	24	17	7
	2,500	—	222 ¹⁾	41 ¹⁾	22	14	6
	5,000	—	190 ¹⁾	40 ¹⁾	19	19 ¹⁾	6 ¹⁾
溶媒対照(DMSO)	0	+	172	9	25	39	20
検 体	156	+	194	16	27	40	17
	313	+	189	19	22	26	14
	625	+	178	12	20	35	11
	1,250	+	177	16	31	32	18
	2,500	+	170	21	25	31 ¹⁾	13 ¹⁾
	5,000	+	155	9	15	17 ¹⁾	12 ¹⁾
陽 性 対 照	AF-2	0.01	—	477		162	
		0.1	—				280
	ENNG	5	—		472		
	ACR	80	—				156
	2-AA	0.5	+				130
		1	+	1,527			
		2	+		202		154
		20	+			792	

¹⁾; 菌株の生育阻害が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

追加試験結果 - 1

薬物	濃度 (μg / plate)	復帰変異コロニー数 / plate	
		TA 100	
		-S9 mix	+S9 mix
溶媒対照 (DMSO)	0	154, 167 (161)	143, 143 (143)
検 体	10.0	160, 194 (177)	136, 141 (139)
	20.0	192, 198 (195)	135, 145 (140)
	40.0	205, 183 (194)	153, 140 (147)
	80.0	188, 187 (188)	127, 154 (141)
	160	193, 199 (196)	103, 152 (128)
	320	174, 157 (166)	119, 129 (124)

()内は平均値

追加試験結果 - 2

薬物	濃度 (μg / plate)	復帰変異コロニー数 / plate	
		TA 1535	
		-S9 mix	+S9 mix
溶媒対照 (DMSO)	0	15, 17 (16)	12, 12 (12)
検 体	0.63	18, 24 (21)	6, 13 (10)
	1.25	23, 20 (22)	12, 8 (10)
	2.50	41, 22 (32)	11, 12 (12)
	5.00	34, 37 (36)	9, 18 (14)
	10.0	48, 42 (45)	15, 10 (13)
	20.0	51, 49 (50)	20, 15 (18)

()内は平均値

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

直接法及び代謝活性化法に用いた陽性対照物質は、検定菌株に対し顕著な復帰突然変異を誘発した。

検体処理の代謝活性化法では復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。しかし直接法では、TA100 菌株ならびに TA1535 菌株の復帰変異コロニー数は、本試験では濃度依存性は認められないものの増加していた。これは検体の培地中での溶解性に起因するものと考えられた。低濃度を用いた TA100 及び TA1535 菌株に対して行った追加試験の結果、TA100 菌株では検体の濃度に依存した復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。しかし TA1535 菌株では、検体の濃度に依存した復帰変異コロニー数の増加が認められ、20 μ g/プレートでは溶媒対照に比べ 3.13 倍になり、陽性(+)と判断した。

結 論：以上の結果より本試験条件下においてクミロンは、直接法で TA1535 菌株に認められた復帰変異コロニー数の増加により、遺伝子突然変異性を有するものと判定されたが、その比活性は弱いと考えられた。

2) 哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

(資料 26)

試験機関: (財) 食品農医薬品安全性評価センター (GLP 対応)

報告書作成年: 1989 年

検体純度: %

試験方法: チャイニーズ・ハムスターの肺由来の、継代培養した肺線維芽細胞 (CHL/IU) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下 (代謝活性化法) 及び非存在下 (直接法) において染色体異常誘発性を検定した。

溶媒は DMSO を用い、陽性対照として直接法の場合は N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン (MNNG) を $2 \mu\text{g/ml}$ 、代謝活性化法の場合は 1, 2-ベンゾピレン (B(a)P) を $30 \mu\text{g/ml}$ 用いた。

直接法として 24 時間処理の場合は細胞浮遊液 5ml (3.5×10^4 細胞)、48 時間処理の場合は同量 (2×10^4 細胞) を直径 60mm のプレートに播種し、培養 3 日後に検体あるいは陽性対照溶液 $25 \mu\text{l}$ を加え、24 時間及び 48 時間培養後に染色体標本を作成した。代謝活性化法としては、直接法と同様に調製した細胞浮遊液 5ml を播種し、培養 3 日目に培養液 2.5ml を除き S9 mix $500 \mu\text{l}$ 、検体及び陽性対照物質溶液 $15 \mu\text{l}$ を加え 6 時間培養した。その後、滅菌生理食塩水で細胞を洗浄し、新しい培養液 3ml を加え 18 時間培養後、染色体標本を作成した。顕微鏡下 (x600) で各濃度 1 プレート当たり 100 個の分裂中期像を 2 プレート、合計 200 個観察した。数的異常については、倍数性細胞 (polyploid cell) の出現数を計測し、構造異常については、染色分体型、染色体型ギャップ (gap)、染色分体切断 (chromatid break: ctb)、染色体切断 (chromosome break: csb)、染色分体交換 (chromatid exchange: cte)、染色体交換 (chromosome exchange: cse)、その他 (染色体断片化等) に分類し、これらの異常を 1 個でも保有する細胞を異常細胞として計測した。ギャップのみを保有した細胞についても合わせて計測した。同一細胞に 2 種以上の異常型が出現した場合は、それぞれの出現数を 1 個と記録した。

各試験群の倍数性細胞及び構造異常を有する細胞の出現頻度は、下記に示す基準を用い、かつ再現性あるいは検体の濃度に依存性が認められ場合に陽性と判定した。

5%未満	:	陰性(-)
5%以上 10%未満	:	疑陽性(±)
10%以上	:	陽性(+)

用量設定根拠: 試験前に濃度設定のため細胞増殖抑制試験を実施し、溶解限界濃度である

$880 \mu\text{g/ml}$ 群においても生存細胞が認められたため、本試験は溶解限度を含めた 110、220、440 及び $880 \mu\text{g/ml}$ の 4 濃度で実施した。

結果: 試験の結果を次頁の表にまとめた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

薬物	濃度 (μ g/ml)	処理 時間	S9mix の 有無	異常を有する細胞数						A ¹⁾ +gap (%)	B ²⁾ -gap (%)	倍数 性細 胞(%)	判 定
				染色体			染色分体		その 他				
				gap	csb	cse	ctb	cte					
溶媒対照 (DMSO)	0	24 時 間	-	0	0	0	0	2	0	1.0	1.0	0.0	-
検 体	110		-	1	0	0	0	1	0	1.0	0.5	0.0	-
	220		-	1	0	0	0	1	0	1.0	0.5	1.0	-
	440		-	1	0	1	3	0	0	2.5	1.0	1.5	-
	880		-	1	0	1	1	2	0	2.5	2.0	1.0	-
陽性対照 (MNNG)	2	-	27	0	3	41	151	0	82.5	80.0	0.0	+	
溶媒対照 (DMSO)	0	48 時 間	-	2	0	0	0	2	0	2.0	1.0	0.0	-
検 体	110		-	0	0	2	0	0	0	1.0	1.0	0.0	-
	220		-	0	2	1	0	0	0	1.5	1.5	0.0	-
	440		-	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	880		-	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	2.0	-
陽性対照 (MNNG)	2	-	14	0	12	36	79	1	52.5	51.5	3.5	+	
溶媒対照 (DMSO)	0	24 時 間	+	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
検 体	110		+	3	1	0	1	4	0	4.5	3.5	1.0	-
	220		+	5	0	0	6	22	0	12.5	11.5	5.0	+
	440		+	7	0	0	14	24	0	16.5	14.5	5.0	+
	880		+	3	0	0	11	17	0	11.5	10.5	4.5	+
陽性対照 (MNNG)	30	+	8	1	3	9	62	0	36.5	35.5	0.5	+	

A¹⁾; gapのみ保有した細胞を含めた場合、B²⁾; gapのみ保有した細胞を含めない場合

csb; 染色体切断、cse; 染色体交換、ctb; 染色分体切断、cte; 染色分体交換

直接法の場合、染色体異常を有する細胞の出現頻度は各処理群共に溶媒対照群と同等の値を示し、誘発傾向は認められなかった。しかし、代謝活性化法では濃度相関を伴った染色体異常出現頻度の上昇が観察され、陽性と判断された。

結 論: 以上の結果より、本試験条件下では、代謝活性化法でクミロンは CHL/IU 細胞に対し低頻度ながら染色体構造異常を、更に極僅かであるが、倍数性細胞についても誘発するものと判定された。

3) 細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 27)

試験機関: (財) 食品農医薬品安全性評価センター (GLP 対応)
報告書作成年: 1988 年

- 検体純度: %
- 試験方法: 枯草菌 *Bacillus subtilis* の DNA 修復能保有株 (H 17) 及び欠損株 (M 45) を用い、ラット肝から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下 (代謝活性化法) 及び非存在下 (直接法) において DNA 損傷の誘発性を検定した。
- 検体を DMSO に溶解し、直径 8 mm、厚さ 1.5 mm のペーパーディスクに、直接法の場合は 50 μ l 浸みこませ固化した孢子寒天平板培地上に置いた。また代謝活性化法の場合は検体溶液 25 μ l 及び S9 mix 溶液 25 μ l を浸みこませ固化した孢子寒天平板培地上に置いた。平板は 5°C で 24 時間放置後、37°C で 24 時間培養した。
- 阻止帯の長さを用手法で測定し、ペーパーディスクの直径を差し引いて解析した。両菌株の生育阻止域の差が 2 mm 以上 4 mm 未満、かつその比が 1.2 以上の場合を疑陽性、4 mm 以上かつその比が 1.2 以上の場合を陽性と判定した。なお、溶媒対照として DMSO、陰性対照としてカナマイシン (Kanamycin) を滅菌蒸留水に溶解し、また陽性対照として直接法の場合はマイトマイシン C (Mitomycin C) を滅菌蒸留水に、代謝活性化法の場合は Trp-P-1 を DMSO に溶解して用いた。
- 用量設定根拠: 検体の濃度は予備試験に基づき、直接法の場合は溶解限界濃度である 8,800 μ g/ディスクを最高濃度とし、以下 5 濃度 (公比 10/3.)、代謝活性化法の場合は直接法の 1/2 の濃度とした。
- 結果: 結果は、次頁の表に示した。検体の溶解限界濃度 8,800 μ g/ディスクを用いた直接法及びその 1/2 濃度を用いた代謝活性化法においても、試験菌株に対して生育阻止は認められなかった。一方陽性対照に用いたマイトマイシン C 及び Trp-P-1 では両菌株の間に顕著な生育阻止域の差を認めた。
- 結論: 以上の結果より、クミルロンは DNA 損傷の誘発性を有しないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

(3 反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	S9 mix	阻止域 (mm)		差 (mm)	判定
			M 45	H 17		
溶媒対照 (DMSO)	0	-	0.0	0.0	0.0	-
検体	550	-	0.0	0.0	0.0	-
	1,100	-	0.0	0.0	0.0	-
	2,200	-	0.0	0.0	0.0	-
	4,400	-	0.0	0.0	0.0	-
	8,800	-	0.0	0.0	0.0	-
陰性対照 (Kanamycin)	0.3	-	9.3	10.2	<0.0	-
陽性対照 (Mitomycin C)	0.02	-	12.0	0.0	12.0	+
溶媒対照 (DMSO)	0	+	0.0	0.0	0.0	-
検体	275	+	0.0	0.0	0.0	-
	550	+	0.0	0.0	0.0	-
	1,100	+	0.0	0.0	0.0	-
	2,200	+	0.0	0.0	0.0	-
	4,400	+	0.0	0.0	0.0	-
陽性対照 (Trp-P-1)	20	+	12.3	0.0	12.3	+

4) マウスを用いた小核試験

(資料 28)

試験機関: (財) 残留農薬研究所 (GLP 対応)

報告書作成年: 1991 年

検体純度: %

試験動物: ICR 系マウス (Crj: CD-1) 1 群 雄 5 匹

開始時 7 週齢、 開始時体重 30.1g-36.6g

試験期間: 2 週間

試験方法: 小核予備試験の用量設定のための毒性試験及び小核予備試験の結果から、投与用量は 500、1,000 及び設定限界用量の 2,000mg/kg とした。

検体は 0.5%CMC 水溶液に懸濁させ、20ml/kg の容量で、胃ゾンデを用いて 1 回強制経口投与した。

陽性対照群はマイトマイシン C (Mitomycin C) を 10mg/kg の用量で、陰性対照群は溶媒のみを 20ml/kg の容量で経口投与した。

投与 24 時間後に頸椎脱臼により屠殺したマウスの両側大腿骨を摘出し、その一端から牛胎児血清を注入して、骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。この骨髓細胞を遠心分離し余分の血清を棄て、残った少量の血清に細胞を再浮遊させた。ついでピペットで小滴をスライドグラスに取り、各動物当たり 2 枚の塗抹標本を作成した。塗抹標本は、一晚室温で空気乾燥させた後、メタノールで 5 分間固定し、2%ギムザ液で染色した。各動物当たり 1 枚の標本について、Schmidt の方法に従い観察した。1,000 個の多染性赤血球を観察し小核を有するものの数を計測した。また同時に 1,000 個の赤血球を観察し、その中に占める多染性赤血球の割合を求めた。小核を有する多染性赤血球の頻度 (F) 及び多染性赤血球の全赤血球に対する割合 (R) は、下記のように計算した。

$$F = \frac{\text{小核を有する多染性赤血球}}{\text{多染性赤血球}} \times 100 (\%)$$

$$R = \frac{\text{多染性赤血球}}{\text{多染性赤血球} + \text{正染性赤血球}} \times 100 (\%)$$

結果: 小核を有する多染性赤血球の頻度及び多染性赤血球の全赤血球に対する割合は次頁の表に示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

小核を有する多染性赤血球の出現頻度

動物 番号	小核を有する多染性赤血球/多染性赤血球 (%)				
	陰性対照 (溶媒)	陽性対照 (マイトマイシン C)	検 体 (mg/kg)		
			500	1,000	2,000
1	0.1	4.9	0.2	0.1	0.1
2	0.1	4.9	0.1	0.1	0.2
3	0.1	7.2	0.2	0.2	0.2
4	0.2	1.7	0.0	0.0	0.1
5	0.2	1.3	0.4	0.1	0.0
平均	0.14	4.00	0.18	0.10	0.12
S ^K	/	—	N.S.	N.S.	N.S.

S^K; Kastenbaum-Bowman の数表による統計学的解析 (P>0.05)

多染性赤血球の全赤血球に対する割合

動物 番号	小核を有する多染性赤血球/多染性赤血球 (%)				
	陰性対照 (溶媒)	陽性対照 (マイトマイシン C)	検 体 (mg/kg)		
			500	1,000	2,000
1	63.0	47.2	60.3	57.2	42.7
2	54.7	44.3	50.3	51.5	51.6
3	60.2	57.1	59.4	52.4	64.4
4	60.5	53.4	64.2	47.9	76.2
5	54.4	60.7	56.0	66.5	53.4
平均	58.6	52.5	58.0	55.1	57.7
S ^W	/	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

S^W; Wilcoxon の順位和検定を用いた統計学的解析 (P>0.05)

検体のいずれの用量群においても、陰性対照群に比較し小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められなかった。しかし、マイトマイシン C を投与した陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球出現頻度に明らかな増加が認められた。全赤血球に対する多染性赤血球の割合は、陽性対照群及び検体全投与群には有意な差は認められず、検体は、骨髓細胞の増殖に対する抑制作用は認められなかった。

結論: 以上の結果よりクミルロンのマウスを用いた小核試験は陰性であると判断された。

(14) 生体の機能に及ぼす影響

(資料 29)

クミルロンにおける薬理試験

試験機関: 薬効開発研究会東松山研究所
報告書作成年: 1989 年

検体純度: %

i) マウスの中樞神経系に対する作用

① マウスの自発行動に対する影響

試験動物: ICR 系マウス 開始時 6 週齢、 1 群雄 10 匹
開始時体重 26.1g~31.7g
方 法: 検体を 0.05% Tween-80 生理食塩溶液に懸濁し、体重 10g 当たり 0.2ml の容量で、300、1,000 及び 3,000 mg/kg を経口投与した。
投与後 5、15、30 分、1、3、6 及び 24 時間まで Irwin の多次元観察法に準じて、行動及び徴候の観察を行った。
対照群には 0.05% Tween-80 生理食塩溶液のみを検体投与群と同容量投与した。
結 果: いずれの検体投与群共、対照群と同様に特異な徴候は認められなかった。

② マウスの自発運動量に対する影響

試験動物: ICR 系マウス 開始時 6 週齢 1 群雄 10 匹
開始時体重 25.6g~33.8g
方 法: 検体を 0.05% Tween-80 生理食塩溶液に懸濁し、体重 10g 当たり 0.2ml の容量で、300、1,000 及び 3,000mg/kg を経口投与し、Irwin の回転カゴ法で、投与直後から 20 分間隔で 200 分後までの回転数を測定し、対照群と比較した。動物の選定に際し、検体投与前の回転数が、10 分当たり 100~200 回転の動物を選んだ。対照群には 0.05% Tween-80 生理食塩溶液のみを検体投与群と同容量与えた。
結 果: 対照群では、投与直後からの 20 分間に 343±42 回転を数え、最も多く、以後増減をくりかえしながら減少した。
検体投与群では、対照群とほぼ同様の経過を示し、いずれの時点においても有意差は認められなかった。

ii) 呼吸・循環器系に対する作用

- 試験動物: 日本白色種ウサギ 1 群雄 3 匹
開始時体重 3.35kg~3.60 kg
- 方 法: 検体を 0.05% Tween-80 生理食塩溶液に懸濁し、体重 1kg 当たり 0.2ml の容量で、1、3 及び 10mg/kg を大腿静脈内にカニューレにより投与した。
投与後 30 分間の呼吸、血圧、心拍数・心電図への影響を観察した。
Urethane 麻酔下で、呼吸は気管カニューレを挿管し、呼吸用ピックアップを介して、血圧は大腿動脈に挿入した動脈カニューレから圧カトランスデューサを介して、心拍数は瞬時心拍計を介してポリグラフ上に記録した。また同時に標準第 1 誘導法で心電図を記録した。
- 結 果:
- 呼吸数; 対照群、1 及び 3mg/kg 投与群では変化はなかった。
10mg/kg 投与群では、投与後徐々に増加し、20 分後には投与前に比較し、平均 20.3% の増加を示した。
- 呼吸振幅; 対照群、1 及び 3mg/kg 投与群では変化は認められなかった。
10mg/kg 投与群では、投与後軽度に減少し、30 分後には投与前に比較し、平均 7.5% の減少を示した。
- 血圧; 対照群、1 及び 3mg/kg 投与群では変化は認められなかった。
10mg/kg 投与群では、投与後 5~10 分に軽度な血圧下降(減少率は収縮期血圧で 11.9~12.0%、拡張期血圧で 11.9~14.2%)を示した。
- 心拍数; 対照群と同様に全検体投与群で変化は認められなかった。
- 心電図; 対照群と同様に全検体投与群で明らかな変化は認められなかった。

iii) 平滑筋に対する作用

① 摘出回腸に対する影響

- 試験動物: Hartley 系モルモット 1 群雄 3 匹
開始時体重 380g~416g
- 方 法: 18 時間絶食させたモルモットの回腸を摘出し、栄養液(Tyrode 液、28℃)を満たした Magnus 装置に 0.5g の負荷を与えて懸垂し、O₂/CO₂ (95%/5%) 混合ガスを通じながら、収縮反応をヘーベルを介し記録した。
検体の単独作用と acetylcholine 及び histamine 累積投与による収縮反応への影響をそれぞれ 10⁻⁶~10⁻⁴g/ml の濃度で 3 例検討した。検体は 0.05% Tween-80 溶液に懸濁し、投与容量は、0.1ml/bath とした。
- 結 果: 検体は、10⁻⁶~10⁻⁴g/ml の濃度で回腸の静止時緊張に対して何ら影響を及ぼさなかつ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

た。また同濃度で、acetylcholine 及び histamine による収縮反応に対しても影響は与えなかった。

② 摘出子宮への影響

- 試験動物: Wistar 系ラット 1 群雌 3 匹
開始時体重 250g~264g
- 方 法: スメアテストで発情期間を確認した処女ラットから摘出した子宮を用い、検体の単独作用及び acetylcholine、oxytocin の累積投与による収縮反応への影響を 10^{-6} ~ 10^{-4} g/ml の濃度で検討した。
子宮は、栄養液を満たした Magnus 装置に 0.5g 負荷を与えて懸垂した。
 O_2/CO_2 、(95%/5%) の混合ガスを通じながら、収縮反応をアイソトニックトランスデューサを介し、レコーダーに記録した。
検体は、0.05% Tween-80 生理食塩溶液に懸濁し、投与容量は、0.1ml/bath とした。
- 結 果: 10^{-6} ~ 10^{-4} g/ml 濃度での検体は、子宮の静止時緊張に影響を及ぼさなかった。また、同濃度では acetylcholine 及び oxytocin の収縮反応に対しても影響を与えなかった。

iv) 消化管機能に対する作用

- 試験動物: ICR 系マウス 1 群雄 10 匹 開始時 6 週齢
開始時体重 22.0g~29.0g
- 方 法: 検体を 0.05% Tween-80 生理食塩溶液に懸濁し、体重 10g 当たり 0.2ml の容量で、300、1,000 及び 3,000mg/kg を経口投与した。対照群には同容量の 0.05% Tween-80 生理食塩溶液のみを与えた。検体投与 30 分後に、10% アラビアゴム溶液に 10% に懸濁した活性炭末を経口投与した。
活性炭末投与後 20 分に致死せしめ、開腹し、幽門より炭末先端部までの長さ、小腸の長さを測定し、移行率を求めた。
- 結 果: 対照群に比較して検体投与のいずれの群においても差は認められなかった。

v) 末梢神経系に対する作用

横隔膜神経筋への影響

- 供試動物： Wistar系ラット 1群雄7匹、 開始時7週齢
開始時体重 195g~235g
- 方 法： Bulbing及び久我の方法に準じて横隔膜神経筋標本を作成し、Magnus装置に1gの負荷をかけ懸垂し、混合ガス（O₂/CO₂、95%/5%）泡出下で矩形波刺激（1V、1msec、0.1 Hz）を横隔膜神経に連続的に与え、筋収縮をFDピックアップを介しポリグラフに記録した。
10⁻⁶~10⁻⁴g/mlの単独作用を各用量につき3例と、d-tubocurarine（3×10⁻⁶g/ml）及びphysostigmine（3×10⁻⁶g/ml）の反応に対する影響を単独作用の見られない10⁻⁴g/mlで3例検討した。
- 結 果： 検体の10⁻⁶~10⁻⁴g/mlの濃度では、ラットの神経刺激による横隔膜筋収縮に影響を及ぼさなかった。
また10⁻⁴g/mlでもd-tubocurarine及びphysostigmineの反応に対しても影響を及ぼさなかった。

vi) 血液系に対する作用

① 血液凝固時間への影響

- 試験動物： Wistar系ラット 1群雄10匹、 開始時7週齢
開始時体重 173g~206g
- 方 法： 検体を0.05%Tween-80生理食塩溶液に懸濁し、体重10g当たり0.2mlの容量で、300、1,000及び3,000 mg/kgを経口投与し、1時間後にpentobarbital麻酔下で頸静脈より3.8%クエン酸ナトリウム1容に血液9容の割合で採血し、3,000rpmで15分間遠心分離して得られた血漿を試験に供した。プロトロビン時間は、Quick一段法にて行った。血漿0.1mlを試験管に入れ37℃で3分間加温した。これに37℃で保温しておいたsimplastin0.2mlを添加し、fibrin析出までの時間を測定した。また、活性部分トロンボプラスチン時間については血漿及びPlatelin-A0.1mlを試験管に入れ、37℃で3分間加温し、これに37℃で保温しておいた25mM CaCl₂0.1mlを添加し、fibrin析出までの時間を測定した。
- 結 果： いずれの投与群もプロトロビン時間及び活性部分トロンボプラスチン時間共対照群と差はなく血液凝固への影響は認められなかった。

② 溶血試験

- 試験動物： 日本白色種ウサギ 1 群雄 3 匹
開始時体重 3.30 kg~3.43 kg
- 方 法： ウサギから採取した血液を遠心分離後生理食塩水で洗浄し、2.5%赤血球生食浮遊液とした。これの 2ml に検体を 10^{-6} ~ 10^{-4} g/ml の割合に懸濁した 0.05%Tween-80 生理食塩溶液 2ml を加え、溶血の有無を観察した。対照として、0.05%Tween-80 生理食塩溶液を、陽性対照として Saponin を用いた。
- 結 果： 陽性対照として用いた Saponin は明らかな溶血作用を示したが、対照群を含めた他の群では溶血作用は示さなかった。

以上の結果からクミルロンは中枢神経系、呼吸・循環器系、自律神経系、消化管機能、末梢神経系及び血液系に対して影響を与えないことから、本剤の薬理学的作用は非常に弱いものと推察された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

クミルロンの「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 一般状態 [Irwin 法]	マウス	経口 (生理食塩水)	0、300、 1,000、 3,000	♂ 10	>3,000	>3,000	特異的な症状は認められなかった。
中枢神経系 自発運動 [Irwin 法]	マウス	経口 (生理食塩水)	0、300、 1,000、 3,000	♂ 10	>3,000	>3,000	20 分間隔で 200 分間回転カゴ法で実施。無処理と同様の運動量を示した。
呼吸器/ 循環器系	ウサギ	静脈注射 (生理食塩水) (ウレタン麻酔下)	0、 1、 3、 10	♂ 5	10	3	呼吸数:10mg 群で 20 分後に 20.3%増加。 呼吸振幅:10mg 群で 30 分後に 7.5%の増加。 血圧:10mg 群で 5~10 分後に軽度の低下。
平滑筋 [回腸]	モルモット	摘出回腸 (生理食塩水)	10^{-6} ~ 10^{-4} g/ml	♂ 3	$>10^{-4}$ g/ml	$>10^{-4}$ g/ml	回腸の静止時緊張に影響なし。アセチルコリン及びヒスタミンによる収縮反応に影響なし。
平滑筋 [子宮]	モルモット	摘出子宮 (生理食塩水)	10^{-6} ~ 10^{-4} g/ml	♀ 3	$>10^{-4}$ g/ml	$>10^{-4}$ g/ml	子宮の静止時緊張に影響なし。アセチルコリン及びオキシトシンによる収縮反応に影響なし。
消化管機能	マウス	経口 (生理食塩水)	0、300、 1,000、 3,000	♀ 10	>3,000	>3,000	消化管機能に影響なし。
末梢神経系 横隔膜神経筋	ラット	Bulbing・久我法 (生理食塩水)	10^{-6} ~ 10^{-4} g/ml	♂ 7	$>10^{-4}$ g/ml	$>10^{-4}$ g/ml	横隔膜筋収縮に影響なし。 d-tubocurarine 及び physostigmine の反応に対して影響なし。
血液系 血液凝固	ラット	経口 (生理食塩水)	0、300、 1,000、 3,000	♂ 10	>3,000	>3,000	血液凝固時間に影響なし
血液系 溶血	ウサギ	血液処理 (生理食塩水)	10^{-6} ~ 10^{-4} g/ml	♂ 3	$>10^{-4}$ g/ml	$>10^{-4}$ g/ml	溶血作用なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

(16) その他

マウスを用いた薬物代謝酵素誘導確認試験

(資料 30)

。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

結 論： 以上のように検体の高用量をマウスに単回投与し、生化学的及び組織病理学的手法を用いて検索した結果、クミロンはプロモーターとして知られているフェノバルビタールに類似した諸変化をマウスの肝に引き起こし、肝薬物代謝酵素の誘導能を有することが確認された。従って、このことが発癌性試験における肝細胞腺腫の増加の主要因の一つと考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

2. 原体混在物及び代謝物毒性

(1) 急性毒性

1) のラットを用いた急性経口毒性試験 (資料 31)

[動物・植物・土壌代謝物]

試験機関:Safepfarm Laboratories Limited(英国)(GLP 対応)

報告書作成年:1993 年

検体純度: %以上

供試動物: Sprague-Dawley 系ラット 1 群雌雄各 5 匹、 開始時 5~8 週齢
開始時体重 雄;144g~155g 雌;133g~150g

観察期間: 14 日間

投与方法: 検体を arachis オイルに懸濁させ、金属製カニューレを用いて胃内に 1 回強制経口投与した。投与容量は体重 1 kg 当たり 10ml の割合とした。投与用量は用量設定試験の結果に基づき、5,000 mg/kg の 1 用量とした。

観察・検査項目: 中毒症状及び生死を投与後 30 分、1、2 及び 4 時間に、その後は 1 日 1 回、14 日間にわたって観察した。体重は投与日の投与前と投与 7 日及び 14 日後に、死亡動物については死亡時に測定した。試験終了時に全生存動物を頸椎脱臼により屠殺して解剖し、死亡動物については死亡時に、組織の肉眼的病理検査を実施した。

結 果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	5,000
LD ₅₀ (mg/kg)	>5,000
死亡開始時間及び終了時間	開始: 1 日後 終了: 2 日後
症状発現時間及び消失時間	発現: 8 時間後 消失: 9 日後
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	—
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	—

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

投与 1 日後に雄の 1 例が死亡しているのが確認された。
死亡動物を含めて全動物に運動失調、屈背姿勢、嗜眠、下垂症、呼吸率の低下、呼吸困難が投与後 30 分から観察された。また起毛も散見された。
剖検所見では、投与 1 日後に死亡した動物に肺の出血、肝及び腎の暗調、胃の非腺上皮の痂皮形成が認められたが、試験終了時に解剖した動物には、異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

2) の急性毒性試験(文献資料) (資料 32)

[植物代謝物]

文献名: Food and Chemical Toxicology, Vol.20 Sup., 675

著 者: D.L.J. Opdyke and C. Letizia

報告書作成年: 1982 年

本文献は、 の毒性についての総説であり、ここでは急性毒性試験についてまとめた。

< 急性毒性 >

供試動物	投与方法	LD ₅₀ 値 (mg/kg)	報告者及び文献名
ラット	経口	1,300	Moreno, O. M. Report to RIFM, 7 October (1977 年)
ウサギ	経皮	4,300	
マウス	経口	1,950	Bukhalovskii, A. A. & Shugaev, B. B. Promyshlennost Stinteticheskogo Kauchuka (2), 4. (1976 年)
ラット	経口	2,250	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

3) のラットを用いた急性経口毒性試験 (資料 33)

[植物・土壌代謝物]

試験機関: Safeparm Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)
報告書作成年: 1993 年

検体純度: %以上
供試動物: Sprague-Dawley 系ラット 1 群雌雄各 5 匹、 開始時 5~8 週齢
開始時体重 雄; 145g~165g 雌; 130g~161g
観察期間: 14 日間
方法: 検体を arachis オイルに懸濁させ、金属製カニューレを用いて胃内に 1 回強制経口投与した。投与容量は体重 1 kg 当たり 10ml の割合とした。投与用量は用量設定試験の結果に基づき、5,000 mg/kg の 1 用量とした。
観察・検査項目: 中毒症状及び生死を投与 30 分、1、2 及び 4 時間後に、その後は 1 日 1 回、14 日間にわたって観察した。体重は投与日の投与前と投与 7 日及び 14 日後に測定した。試験終了時に全個体を頸椎脱臼により屠殺して解剖し、組織の肉眼的病理検査を実施した。

結 果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	5,000
LD ₅₀ (mg/kg)	>5,000
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	中毒症状認められず
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5,000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5,000

投与による異常な行動及び中毒症状は全動物に認められず、死亡例もなかった。
試験終了時の剖検所見においても、組織の肉眼的異常は全動物に認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

(2) 変異原性試験

1) の細菌を用いた復帰変異試験 (Ames test) (資料 34)

[動物・植物・土壌代謝物]

試験機関: Safeparm Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)
報告書作成年: 1993 年

検体純度: %

供試方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98, TA 1535, TA 1537 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用い、ラットの肝より調製した薬物代謝酵素系存在下 (代謝活性化法) と非存在下 (直接法) で Ames らの方法により変異原性を検定した。検体は DMSO に溶解し、対照には DMSO のみを添加した。陽性対照として、直接法の場合は、ENNG、9-AA、4-NQO を、代謝活性化法の場合には、2-AA、BP をそれぞれ DMSO に溶解して用いた。

用量設定根拠: サルモネラ菌の TA 100 及び大腸菌の WP2uvrA 菌株を用いた濃度設定試験では 5,000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高濃度とし、以下 5 濃度 (公比 1/2) 設定した。最高濃度でも復帰変異コロニー数に変化が認められなかったため、本試験でも最高濃度を 5,000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に設定し、以下公比 1/5 で 5 濃度設定した。また本試験の直接法においてサルモネラ菌の TA 1535 菌株の復帰変異コロニー数が 5,000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 群でわずかではあるが、統計学的に有意に増加したため (試験 1)、追加試験として最高濃度を 5,000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に設定し、以下公比 1/2 で 5 濃度設定した試験を実施した (試験 2)。更にこの追加試験においても、直接法で同菌株の 2,500 及び 5,000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ において復帰変異コロニー数の増加が認められたため、TA 1535 菌株についてのみ 5,000 から 1,250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ までの 5 濃度を設定して直接法で実施した (試験 3)。

1 濃度当たり夫々 3 枚のプレートを使用し、プレート当りの平均値を算出した。ただし、TA 1535 菌株のみを用いた試験 3 では、1 濃度当たり 6 枚のプレートを使用しその平均値を算出し判定した。

ENNG:	N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
4-NQO:	4-nitroquinoline-1-oxide
9-AA:	9-Aminoacridine
2-AA:	2-Aminoanthracene
BP:	Benzo (a) pyrene

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

表 1 本試験 (試験 1)

薬物	濃度 (μg / plate)	S9 mix	平均復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 $uvrA$	TA 98	TA 1537	
溶媒対照(DMSO)	0	-	108.7	13.0	11.7	13.3	11.0	
検 体	8.0		115.0	15.7	12.3	15.0	14.3	
	40		106.3	13.7	14.3	16.7	14.0	
	200		119.7	15.7	12.0	14.0	12.0	
	1,000		106.7	16.7	12.7	12.3	11.7	
	5,000		110.3	20.3*	12.3	9.3	3.7	
溶媒対照(DMSO)	0	+	143.3	11.7	11.7	26.3	11.3	
検 体	8.0		128.0	10.7	16.3	19.3	10.0	
	40		140.7	9.7	15.3	26.7	11.3	
	200		122.7	10.3	15.0	22.3	12.3	
	1,000		112.3	9.3	15.3	25.5	11.0	
	5,000		119.0	9.3	12.3	20.3	9.0	
陽 性 対 照	ENNG	3.0	445.0					
		5.0		82.0				
		2.0			191.0			
	4-NQO	0.2				137.7		
	9-AA	80.0					130.0	
	BP	5.0	+	369.7			227.0	88.3
	2-AA	2.0			137.7			
10.0					118.7			

*: $P \leq 0.05$ で統計学的有意差を示す (Dunnett の多重比較法)。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

表 2 追加試験(試験 2).

薬物	濃度 (μg / plate)	S9 mix	平均復帰変異コロニー数/plate				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA 100	TA 1535	WP2uvrA	TA 98	TA 1537
溶媒対照(DMSO)	0	-	135.7	14.3	18.3	18.7	11.0
検 体	312.5		129.0	16.0	13.7	15.7	7.7
	625		124.3	17.7	12.0	20.7	7.3
	1,250		120.3	16.7	11.3	18.0	8.7
	2,500		125.3	26.3**	12.3	17.3	7.7
	5,000		126.7	28.3***	9.0	14.7	9.0
溶媒対照(DMSO)	0	+	106.7	12.7	17.3	21.0	10.3
検 体	312.5		112.3	11.7	12.7	18.0	7.0
	625		115.3	12.7	15.7	16.3	7.3
	1,250		95.3	11.3	15.7	16.3	8.7
	2,500		120.0	15.0	11.0	19.3	8.7
	5,000		101.3	15.3	15.7	17.3	9.7
陽 性 対 照	ENNG	3.0	403.7				
		5.0		104.0			
		2.0			246.3		
	4-NQO	0.2				119.7	
	9-AA	80.0					352.0
	BP	5.0	412.3			193.7	105.0
		2.0		179.0			
		10.0			219.3		

: $P \leq 0.01$ 、* : $P \leq 0.001$ で統計学的有意差を示す (Dunnnett の多重比較法)。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

表 3 TA 1535 における追加試験（試験 3）

薬物	濃度 ($\mu\text{g} / \text{plate}$)	S9 mix	平均復帰変異 コロニー数/plate
			塩基置換型
			TA 1535
溶媒対照(DMSO)	0	—	11.8
検 体	312.5		18.3*
	625		19.8***
	1,250		16.0
	2,500		18.2*
	5,000		15.8
陽性対照 (ENNG)	3.0		183.0

*: $P \leq 0.05$ 、***: $P \leq 0.001$ で統計学的有意差を示す(Dunnett の多重比較法)。

2) のマウスを用いた小核試験

(資料 35)

[動物・植物・土壌代謝物]

試験機関: Safeparm Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)

報告書作成年: 1993 年

検体純度: %

供試動物: ICR 系マウス (Crj: CD-1) 1 群雄 7 匹、 開始時 5~7 週齢
開始時体重 20g~30g

試験期間: 2 週間

試験方法: 検体は 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、20ml/kg の容量で、胃ゾンデを用いて 1 回強制経口投与した。

陽性対照群はシクロホスファミドを 50 mg/kg の用量で、陰性対照群は溶媒のみを 20ml/kg の容量で経口投与した。投与 24 時間後に頸椎脱臼により屠殺したマウスの両側大腿骨を摘出し、その一端から牛胎児血清を注入し、骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。この骨髓細胞を遠心分離し余分の血清を棄て、残った少量の血清に細胞を再浮遊させ、ピペットで小滴をスライドグラスに取り、塗抹標本を作成した。塗抹標本は、一晚室温で空気乾燥させた後、メタノールで 5 分間固定し、ギムザ液で染色後 Schmidt の方法に従い観察した。1,000 個の多染性赤血球を観察し小核を有するものの数を計測した。また同時に 1,000 個の赤血球を観察し、多染性赤血球 (PCE) 及び正染性赤血球 (NCE) の個数を計測し正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合、(PCE/NCE) を求めた。

用量設定根拠; 用量設定試験の結果に基づき、投与用量は 500、1,000 及び設定限界用量の 2,000 mg/kg とした。

結 果: 小核を有する多染性赤血球の個数及び正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合を次頁の表に示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE (平均値±SD)	PCE/(PCE+NCE) (平均値±SD)
24 時間	陰性対照 (0.5%CNMC 水溶液)	0	♂ 7	1.0 ± 1.2	1.85 ± 0.38
	検 体	500		0.4 ± 0.8	2.53 ± 1.8
		1,000		1.6 ± 1.0	2.10 ± 0.80
		2,000		0.7 ± 0.8	3.03 ± 1.73
	陽性対照 (シクロホスファミド)	50		45.0 ± 13.0	1.21 ± 0.24
48 時間	陰性対照 (0.5%CNMC 水溶液)	0		1.3 ± 1.0	1.54 ± 0.52
	検 体	500		1.0 ± 0.8	2.63 ± 1.41
		1,000		0.9 ± 1.1	2.08 ± 1.78
		2,000		1.8 ± 1.0	1.23 ± 0.51
	陰性対照 (0.5%CNMC 水溶液)	0		0.7 ± 0.5	2.40 ± 1.05
72 時間	検 体	500		0.6 ± 0.8	1.70 ± 0.40
		1,000		0.4 ± 0.5	1.75 ± 0.30
		2,000		1.2 ± 1.2	1.46 ± 0.46

PCE ; 多染性赤血球、 NCE ; 正染性赤血球

多染性赤血球 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球

検体のいずれの用量群においても、陰性対照群に比較して小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

また、PCE/NCE 率においても有意な変化は認められなかった。

しかし、シクロホスファミドを用いた陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に明らかな増加が認められた。

以上の結果より、 のマウスにおける小核試験は陰性であると判断された。

3) の細菌を用いた復帰変異試験 (Ames test) (資料 36)

[植物・土壌代謝物]

試験機関: Safeparm Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)
報告書作成年: 1993 年

検体純度: %
方 法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* の TA 100、TA 98、TA 1535、TA 1537 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* の WP2uvrA 株を用い、ラットの肝より調製した薬物代謝酵素 (S9 mix) 系存在下 (代謝活性化法) と非存在下 (直接法) で Ames らの方法により変異原性を検定した。
検体は DMSO に溶解し、対照には DMSO のみを添加した。陽性対照として、直接法の場合は、ENNG、9-AA、4-NQO を、代謝活性化法の場合には、2-AA、BP を夫々 DMSO に溶解して用いた。

用量設定根拠: サルモネラ菌の TA 100 及び大腸菌の WP2uvrA 菌株を用いた濃度設定試験より、本試験では最高濃度を 5,000 µg/プレートに設定し、以下公比 1/5 で 5 濃度設定した (試験 1)。また、確認のため追加試験として最高濃度を 5,000 µg/プレートに設定し、以下公比 1/2 で 5 濃度設定した (試験 2)。1 濃度当たり夫々 3 枚のプレートを使用し、プレート当りの平均値を算出した。結果の判定は、復帰変異コロニー数が溶媒対照の 2 倍以上に増加し、かつ検体の濃度に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

ENNG:	N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
4-NQO:	4-nitroquinoline-1-oxide
9-AA:	9-Aminoacridine
2-AA:	2-Aminoanthracene
BP:	Benzo(a) pyrene

結 果: 表 1 に本試験の結果を、表 2 に追加試験の結果を示した。
直接法及び代謝活性化法に用いた陽性対照物質は、検定菌株に対し顕著な復帰突然変異を誘発した。
一方検体は、直接法及び代謝活性化法のどちらにおいても用いた細菌の菌株全てに対して、復帰変異コロニー数を増加させなかった。

以上の結果より、は代謝活性化法を含めた本試験条件下において、遺伝子突然変異の誘発性はないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

表 1 本試験(試験 1)

薬物	濃度 (μg / plate)	S9 mix	平均復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 $uvrA$	TA 98	TA 1537	
溶媒対照(DMSO)	0	-	155.0	12.0	31.3	31.0	13.7	
検 体	8.0		131.3	14.7	36.3	27.7	11.7	
	40		130.3	12.7	38.0	27.0	12.7	
	200		125.3	12.3	35.3	31.7	13.0	
	1,000		121.0	14.3	31.3	27.3	9.0	
	5,000		128.7	13.3	33.3	16.7	8.3	
溶媒対照(DMSO)	0	+	173.7	12.7	36.7	26.0	7.7	
検 体	8.0		177.0	11.7	40.3	22.0	7.0	
	40		158.3	11.3	38.7	27.3	9.7	
	200		163.3	11.3	40.7	26.5	10.7	
	1,000		171.3	11.0	41.0	21.7	10.7	
	5,000		172.5	14.0	39.7	24.7	11.0	
陽 性 対 照	ENNG	3.0	643.0					
		5.0		202.7				
		2.0			509.3			
	4-NQO	0.2				104.7		
	9-AA	80.0					712.0	
	BP	5.0	+	476.7			184.0	182.7
	2-AA	2.0			150.3			
		10.0				317.0		

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

表 2 追加試験(試験 2)

薬物	濃度 (μg / plate)	S9 mix	平均復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 $uvrA$	TA 98	TA 1537	
溶媒対照(DMSO)	0	-	95.0	12.7	24.0	18.3	13.3	
検 体	312.5		104.7	12.0	31.7	17.7	13.0	
	625		95.7	12.7	27.3	17.0	9.0	
	1,250		100.7	13.7	26.3	18.0	11.7	
	2,500		97.3	15.7	28.7	20.3	7.7	
	5,000		83.3	14.7	26.3	24.3	14.0	
溶媒対照(DMSO)	0	+	96.7	12.7	31.0	24.7	13.0	
検 体	312.5		101.3	13.3	30.3	29.3	12.0	
	625		98.3	13.7	29.7	24.0	11.7	
	1,250		95.3	11.3	15.7	16.3	8.7	
	2,500		120.3	15.0	11.0	19.3	8.7	
	5,000		101.3	15.3	15.7	17.3	9.7	
陽 性 対 照	ENNG	3.0	732.3					
		5.0		226.3				
		2.0			836.3			
	4-NQO	0.2				142.7		
	9-AA	80.0					499.7	
	BP	5.0	+	514.0			269.3	142.3
	2-AA	2.0			143.7			
		10.0				405.7		

4) の細菌を用いた復帰変異試験 (Ames test) (資料 37)

[動物・植物代謝物]

試験機関：Safepharma Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)
報告書作成年：1993 年

検体純度： %以上

試験方法： ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* の TA 100、TA 98、TA 1535、TA 1537 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* の WP2uvrA 株を用い、ラットの肝より調製した薬物代謝酵素系存在下 (代謝活性化法) と非存在下 (直接法) で Ames らの方法により変異原性を検定した。検体は DMSO に溶解し、対照には、DMSO のみをプレート当たり 100 μ l 添加した。陽性対照として、直接法の場合は、ENNG、9-AA、4-NQO を、代謝活性化法の場合には、2-AA、BP をそれぞれ DMSO に溶解して用いた。結果の判定は、復帰変異コロニー数が溶媒対照の 2 倍以上に増加し、かつ再現性あるいは、検体の濃度に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

用量設定根拠：濃度設定試験において最高濃度でも生育阻害作用は認められなかったため、本試験でも最高濃度を 5,000 μ g/プレートに設定し、以下公比 1/5 で 5 濃度設定した (試験 1)。また、確認のため追加試験として最高濃度を 5,000 μ g/プレートに設定し、以下公比 1/2 で 5 濃度を設定した (試験 2)。1 濃度当たり夫々 2 枚のプレートを使用し、プレート当りの平均値を算出した。

ENNG :	N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
4-NQO :	4-nitroquinoline-1-oxide
9-AA :	9-Aminoacridine
2-AA :	2-Aminoanthracene
BP :	Benzo (a) pyrene

結果： 表 1 に本試験の結果を、表 2 に追加試験の結果を示した。
直接法及び代謝活性化法に用いた陽性対照物質は、検定菌株に対し顕著な復帰突然変異を誘発した。
一方、検体は、直接法及び代謝活性化法どちらにおいても用いた細菌の菌株全てに対して、復帰変異コロニー数を増加させなかった。

以上の結果より、 は代謝活性化法を含めた本試験条件下において、遺伝子突然変異の誘発性はないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

表 1 本試験 (試験 1)

薬物	濃度 (μg / plate)	S9 mix	平均復帰変異コロニー数 / plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 $uvrA$	TA 98	TA 1537	
溶媒対照(DMSO)	0	-	133.7	10.7	11.3	15.0	7.3	
検 体	8.0		112.0	17.3	13.3	14.3	9.3	
	40		121.3	17.7	12.3	14.3	6.3	
	200		152.7	17.7	10.0	19.0	7.7	
	1,000		117.0	11.3	12.7	20.0	6.3	
	5,000		121.0	11.3	10.0	14.0	5.3	
溶媒対照(DMSO)	0	+	157.0	12.3	25.0	26.7	8.3	
検 体	8.0		138.7	10.7	23.0	26.7	11.3	
	40		120.7	11.7	30.0	23.0	10.3	
	200		134.0	7.7	18.7	28.7	9.0	
	1,000		115.7	10.0	24.7	25.0	6.3	
	5,000		123.0	9.3	19.3	17.7	7.3	
陽 性 対 照	ENNG	2.0			486.7			
		3.0	558.0					
		5.0		176.0				
	4-NQO	0.2			172.0			
	9-AA	80.0					565.3	
	BP	5.0	+	394.0			153.7	114.7
	2-AA	2.0			163.0			
		10.0				256.0		

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

表 2 追加試験 (試験 2)

薬物	濃度 ($\mu\text{g} / \text{plate}$)	S9 mix	平均復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2uvrA	TA 98	TA 1537	
溶媒対照(DMSO)	0	-	151.7	12.7	27.0	23.0	8.0	
検 体	312.5		164.0	14.7	26.3	19.3	10.3	
	625		154.3	12.7	26.0	25.7	7.3	
	1,250		137.0	13.0	26.3	20.0	9.3	
	2,500		136.3	13.7	22.0	21.0	6.0	
	5,000		159.0	14.0	26.3	21.7	7.3	
溶媒対照(DMSO)	0	+	192.7	12.7	32.3	35.5	14.7	
検 体	312.5		178.0	12.3	26.3	38.7	12.0	
	625		171.3	14.0	26.0	37.0	11.7	
	1,250		152.0	13.7	32.3	29.3	12.0	
	2,500		180.0	12.0	27.3	33.0	13.3	
	5,000		169.7	16.5	29.7	35.0	11.3	
陽 性 対 照	ENNG	3.0			594.7			
		5.0	530.7					
		2.0		171.7				
	4-NQO	0.2				121.7		
	9-AA	80.0					648.0	
	BP	5.0	405.3			172.7	88.3	
	2-AA	2.0		176.0				
		10.0			242.0			

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

3. 製剤を用いた毒性試験

(1) クミロン粒剤の急性毒性

1) ラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 38)

試験機関: Safeparm Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)

報告書作成年: 1992 年

検体純度: 8.0%粒剤

供試動物: Sprague-Dawley 系ラット 1 群雌雄各 5 匹 開始時 5~8 週齢
開始時体重 雄; 134g~151g 雌; 130g~142g

観察期間: 14 日間

投与方法: 検体を蒸留水で懸濁させ、金属製胃ゾンデを用いて胃内に 1 回強制経口投与した。投与容量は体重 1kg 当たり 10ml の割合とした。
投与量は雌雄各 1 動物を用いて 5,000mg/kg の用量で実施した予備試験の結果、死亡例及び一般状態の変化が認められなかったことから、5,000 mg/kg の 1 用量とした。

観察・検査項目: 中毒症状及び生死を投与 30 分、1、2 及び 4 時間後に、その後は 1 日 1 回、14 日間にわたって観察した。体重は投与日の投与前と投与 7 日及び 14 日後に測定した。試験終了時に全個体を頸椎脱臼により屠殺して解剖し、肉眼的病理検査を実施した。

結 果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	5,000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共 : >5,000
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	中毒症状認められず
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5,000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5,000

検体投与による異常な行動及び中毒症状は全動物に認められず、死亡例もなかった。

試験終了時の剖検においても、肉眼的異常は全動物に認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

2) マウスを用いた急性経口毒性試験

(資料 39)

試験機関: Safeparm Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)

報告書作成年: 1992 年

検体純度: 8.0%粒剤
供試動物: CD1 系マウス 1 群雌雄各 5 匹、 開始時 6~8 週齢
開始時体重 雄; 23g~25g 雌; 22g~23g
観察期間: 14 日間
投与方法: 検体を蒸留水で懸濁させ、金属製胃ゾンデを用いて胃内に 1 回強制経口投与した。投与容量は体重 1 kg 当たり 10ml の割合とした。
投与量は雌雄各 1 動物を用いて 5,000mg/kg の用量で実施した予備試験の結果、死亡例及び一般状態の変化が認められなかったことから、5,000 mg/kg の 1 用量とした。
観察・検査項目: 中毒症状及び生死を投与 30 分、1、2 及び 4 時間後に、その後は 1 日 1 回、14 日間にわたって観察した。
体重は投与日の投与前と投与 7 日及び 14 日後に測定した。試験終了時に全個体を頸椎脱臼により屠殺して解剖し、肉眼的病理検査を実施した。
結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5,000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共 : >5,000
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	中毒症状認められず
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5,000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5,000

検体投与による異常な行動及び中毒症状は全動物に認められず、死亡例もなかった。

試験終了時の剖検においても、肉眼的異常は全動物に認められなかった。

3) ラットを用いた急性経皮毒性試験

(資料 40)

試験機関: Safeparm Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)

報告書作成年: 1992 年

検体純度: 8.0%粒剤
 供試動物: Sprague-Dawley 系ラット 1 群雌雄各 5 匹、 開始時 10~14 週齢
 開始時体重 雄; 222g~230g 雌; 219g~240g
 観察期間: 14 日間
 投与方法: 動物の背側部 (5 cm×4 cm) を動物用バリカンを用いて検体投与前日に剪毛した。検体を目盛り付注射筒を用いて、予め蒸留水で湿潤させておいた剪毛部分に均一に塗布した。塗布部分にガーゼ (7 cm×4 cm) をあて Hypertie で半閉塞状態に固定し、末端を更に Blederm で補強した。塗布時間は 24 時間とし、塗布時間経過後直ちに蒸留水で拭き取った。
 観察・検査項目: 中毒症状及び生死を投与後 30 分、1、2 及び 4 時間にその後は少なくとも 1 日 1 回、14 日間にわたり観察した。体重は投与日の投与前と投与後 7 日及び 14 日目に測定した。試験終了時に全個体を頸椎脱臼により屠殺して解剖し、肉眼的病理検査を実施した。

結 果:

投与方法	経 皮
投与量 (mg/kg)	2,000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共 : >2,000
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	中毒症状認められず
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2,000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2,000

検体投与による異常な行動及び中毒症状は全動物に認められず、死亡例もなかった。

試験終了時の剖検においても、肉眼的異常は全動物に認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

4) ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 41)

試験機関: Safepharm Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)

報告書作成年: 1992 年

検体純度: 8.0%粒剤
供試動物: ニュージーランドホワイト種ウサギ 6匹(雄4匹、雌2匹)
開始時 12~16週齢、 開始時体重 2.26 kg~2.56 kg
観察期間: 72時間
投与方法: 0.5gの検体を、0.5mlの蒸留水で湿潤させてガーゼパッチ(2.5cm四方)にのせ、前日に動物用バリカンで剪毛したウサギの背側部に貼付し、パッチを外科用絆創膏(2.5cm×4.0cm)で固定した。曝露時間は4時間とした。曝露終了後に蒸留水で湿した脱脂綿で残存した検体を取り除いた。
観察・検査項目: パッチ除去後1、24、48及び72時間に適用部位について紅斑、痂皮及び浮腫の形成の有無を観察し、Draize法により評価、判定した。
結 果: 観察した刺激性変化の評点は以下の表の通りであった。

変 化	最高評点	観 察 時 間			
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
紅斑及び痂皮	4	2	2	0	0
浮 腫	4	0	0	0	0
合 計	8	2	2	0	0
一次刺激性指数	0.7*	0.2*			

*: 処理動物の一次刺激性指数は、24時間と72時間時点の合計を12で除した値。

パッチ除去1及び24時間後の観察時に2例に非常に軽度の紅斑が認められたが、その後は回復した。この結果、検体の皮膚一次刺激性指数は0.2と計算された。

以上のことから、クミルロンの8.0%粒剤はニュージーランドホワイト種ウサギに対して軽度の皮膚一次刺激性があると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

5) ウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料 42)

試験機関: Safeparm Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)

報告書作成年: 1992 年

- 検体純度: 8.0%粒剤
- 供試動物: ニュージーランドホワイ種ウサギ 6匹(雄1匹、雌5匹)
開始時 12~16週齢、 開始時体重 2.52 kg~2.81 kg
- 供試期間: 72時間観察
- 投与方法: 予め粉末にした検体 100 mgを右眼の下眼瞼結膜嚢内に投与した。左眼は、無処理とし、対照とした。
- 観察・検査項目: 投与後1、24、48及び72時間に結膜、虹彩、角膜について肉眼的観察を行い Draize 法により評価し、Kayらの基準に基づいて判定した。
- 結 果: 観察した刺激性変化の評点(6匹の平均)は以下の表の通りであった。

項 目	最高評点	適 用 後 時 間				
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
角 膜	80	0	0	0	0	
虹 彩	10	4.1	0	0	0	
結 膜	発 赤	6	2.7	1.7	0	0
	浮 腫	8	2.7	0.3	0	0
	分泌物	6	3.3	0	0	0
合 計 評 点	110	12.8	2.0	0	0	

試験期間を通して、角膜に対する影響は認められなかった。

虹彩については、投与1時間後に5例の処置眼に炎症が認められたが、24時間後の観察時には異常は認められなかった。

結膜については、投与1時間後に全動物の処置眼に中等度の刺激性が認められ、そのうち5例では24時間後の観察時まで極軽度の刺激性が持続した。しかし、48時間後には異常は認められなかった。

以上の結果から、クミルロンの8.0%粒剤はニュージーランドホワイ種ウサギに対して極軽度の刺激性があると判断された。

6) モルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 43)

試験機関: Safeparm Laboratories Limited (英国) (GLP 対応)

報告書作成年: 1992 年

- 検体純度: 8.0%粒剤
- 供試動物: 白色 Dunkin-Hartley 系モルモット 雌 1 群 20 匹(陽性対照群 1 群 10 匹)
開始時 8~12 週齢、 開始時体重 335g~450g
- 投与方法: Buehler 法
- 感作曝露; 試験開始日に各動物の左腹側部を剪毛し、検体の 50%水溶液 0.5ml を吸湿性リント布(15×35 mm)にしみ込ませて適用部位に置き、外科用粘着テープで固定し、その上をアルミ箔で被覆し、伸縮性粘着テープで固定した。この状態を 6 時間持続した。陽性対照として DNCB の 0.5%無水エタノール溶液 0.5ml を同様に処理した。7 日目及び 14 日日にも同様の処理を繰り返し行い、6 時間曝露を計 3 回行った。夫々の対照動物には溶媒のみを同様に処理した。
- 惹起曝露; 28 日目に処理直前に剪毛した右腹側部に、検体の 50%水溶液 0.5ml をしみ込ませたリント布をあて外科用粘着テープで固定し、アルミ箔で被覆して更に固定した。陽性対照として DNCB の 0.5%無水エタノール 0.5ml を、また、夫々の対照動物には溶媒のみを同様に処理した。処理 6 時間後に被覆を取り除いた。
- 用量設定根拠;
- 感作時濃度; 2 匹のモルモットを用い、検体を蒸留水に 5、10、25 及び 50%の濃度に懸濁させて各々 0.5ml を投与した。6 時間閉塞曝露終了後、24 あるいは 48 時間に皮膚反応を観察した結果、最高濃度でも過度の皮膚刺激を示さなかったため、本試験における最高濃度を 50%水溶液とした。
- 惹起時濃度; 2 匹のモルモットを用い、検体の 25 及び 50%水溶液各々 0.5ml を、投与 0、7 及び 14 日目に再度 6 時間閉塞曝露し、その 24 あるいは 48 時間後に皮膚刺激性を観察した結果、影響が認められなかったため、本試験の最高濃度を 50%水溶液とした。
- 観察・検査項目: 惹起貼付除去後 24 及び 48 時間目に、右腹側部皮膚の感作性変化を観察した。
- 結 果: 各観察時間における感作性変化が認められた動物数を次頁の表に示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

	感 作 惹 起		供 試 動 物 数	感作反応動物数										感 作 陽性率	
				24 時間後					48 時間後					24 時 間	48 時 間
				皮膚反応評点					皮膚反応評点						
				0	1	2	3	計	0	1	2	3	計		
検 体	検体 50% 水溶液	検体 50% 水溶液	19*	19	0	0	0	0/19	19	0	0	0	0/19	0	0
	蒸留水	検体 50% 水溶液	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0
陽 性 対 照 (DN CB)	DNCB0.5% エタノール液	DNCB0.15% エタノール液	9*	0	0	9	0	9/9	0	4	5	0	9/9	100	100
	エタノール	DNCB0.15% エタノール液	10	0	9	1	0	10/10	1	9	0	0	9/10	100	90

* 検体及び陽性対照の感作群で夫々7日目と15日目に1匹ずつ切迫屠殺した。

24時間及び48時間後の観察時においては、検体投与動物及び対照動物(蒸留水投与動物)の投与部位には有害な反応は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたDN CB 投与群では、24時間後の観察時に全ての動物に中等度及び慢性の発赤が認められ、このうち5例については48時間後の観察時まで持続した。

なお、切迫屠殺した動物は、行動が不活発で体温が低下していた。また、体重が投与前から低く、呼吸困難であった。しかし、これらの症状は検体に起因したものではなかった。

以上の結果から、クミルロンの8.0%粒剤はモルモットの皮膚感作性は陰性であると判断された。

(2) クミロン水和剤の急性毒性

1) ラットを用いた急性経口毒性試験

(資料44)

試験機関:Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)
報告書作成年:2000年

検体純度: 45%水和剤(フロアブル)
 供試動物: Sprague-Dawley系ラット 1群雌雄各 5匹 開始時 8週齢
 開始時体重 雄;210~227g 雌;226~254g
 観察期間: 14日間
 投与方法: 検体の原液を 5000 mg/kgになるように、検体の比重を基に 4.61 ml/kg の容量で1回強制経口投与した。
 観察・検査項目: 一般状態と死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後に、その後は毎日1度14日間観察した。
 体重は投与日の投与前、投与後7及び14日目に測定した。
 試験終了時に頸部脱臼により屠殺し、剖検した。

結 果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	5,000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共 : >5,000
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	中毒症状認められず
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5,000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5,000

雌雄共死亡例は認められなかった。検体に関連したと考えられる臨床症状は認められなかった。

全ての動物は、正常な体重増加を示した。

剖検所見においても投与の影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

2) マウスを用いた急性経口毒性試験

(資料45)

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

報告書作成年: 2000年

検体純度: 45%水和剤(フロアブル)

供試動物: CD-1: (ICR) BR系マウス 1群雌雄各 5匹 開始時 8週齢
開始時体重 雄; 27~29g 雌; 20~23g

観察期間: 14日間

投与方法: 検体の原液を5000 mg/kgになるように、検体を10 ml/kgの容量で1回強制経口投与した。

観察・検査項目: 一般状態と死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後に、その後は毎日1度14日間観察した。

体重は投与日の投与前、投与後7及び14日目に測定した。

試験終了時に頸部脱臼により屠殺し、剖検した。

結 果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	5,000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共 : >5,000
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	中毒症状認められず
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5,000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5,000

雌雄共死亡例は認められなかった。検体に関連したと考えられる臨床症状は認められなかった。

全ての動物は、正常な体重増加を示した。剖検所見においても投与の影響は認められなかった。

3) ラットを用いた急性経皮毒性試験

(資料46)

試験機関:Safeparm Laboratories(英国)(GLP対応)

報告書作成年:2000年

検体純度: 45%水和剤(フロアブル)

供試動物: Sprague-DawleyCD系ラット 1群雌雄各5匹、 開始時 8週齢
 開始時体重 雄;216~232g 雌;205~241g

観察期間: 14日間

投与方法: 検体を目盛りつきシリンジを用いて、剪毛したラットの背部(全体表面積の約10%)に体重1kg当り 2000mg/kgの用量で均一に塗布した。処理部をガーゼで覆い粘着性包帯で固定した。24時間後にガーゼ及び包帯を除去し、検体が残存ないように蒸留水で湿らせた脱脂綿で処理部及びその周囲を拭き取った。

観察・検査項目: 一般状態及び死亡の有無を投与30分、1、2及び4時間後に、その後は14日の間に1度観察した。
 体重は、投与日の投与前、投与7及び14日後に測定した。
 試験終了時に全動物を頸部脱臼により屠殺し、剖検を実施した。

結 果

投与方法	経 皮
投与量 (mg/kg)	2,000
LD50 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共 : >2,000
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	中毒症状認められず
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2,000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2,000

雌雄共死亡例は認められなかった。

検体に関連したと考えられる一般症状の変化は認められなかった。

試験期間中に皮膚刺激性の反応は認められなかった。

全ての動物は、正常な体重増加を示した。

剖検所見においても投与の影響は認められなかった。

4) ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料47)

試験機関: Safepfarm Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年: 2000年

検体純度: 45%水和剤(フロアブル)

供試動物: ニュージーランド白色ウサギ 1群 雄6匹 開始時 12~16週齢
開始時体重 2.46~2.87kg

観察期間: 72時間観察

投与方法: 0.5mlの検体をガーゼパッチ(2.5 × 2.5cm)に湿らせ、6匹のウサギの剪毛した背部の皮膚に適用した。パッチを外科用粘着テープで覆って固定し、各動物の胴体をコルセットで巻いた。

4時間後に、ガーゼ及びコルセットを取り除き適用部位を湿らせた脱脂綿で残存する検体を拭き取った。

観察・検査項目: 検体除去1、24、48及び72時間後に適用部位の皮膚反応を観察した。刺激性変化の採点は、Draize法に準拠した。

結果: 観察された刺激性変化の評点(Draize法)を下表に示した。

項目	最高 評点	塗布後時間			
		1時間	24時間	48時間	72時間
紅斑・痂皮	4	(1.0)	1.0	(0.0)	0.0
浮腫	4	(0.8)	0.0	(0.0)	0.0
合計	8	(1.8)	1.0	(0.0)	0.0

1時間から72時間の数字は、6匹の平均、()内の数字は刺激性の評価には使用しなかった。

極軽度の紅斑が1時間及び24時間後の観察時に全動物の処理部に認められ、極軽度の浮腫が1時間後の観察時に5動物に認められた。48時間後には全ての動物が正常に復した。

以上のように、クミロン水和剤を4時間半閉塞状態でウサギに接触させ、一次刺激性の指数を計算した結果、24時間及び72時間後の合計の平均値は0.5となり、本剤はウサギの皮膚に対して軽度の刺激性があると判断された。

5) ウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料48)

試験機関: Safeparm Laboratories (英国) (GLP対応)
報告書作成年: 2000年

- 検体純度: 45%水和剤(フロアブル)
 供試動物: ニュージランド白色系ウサギ 開始時 12~16週齢
 開始時体重 2.54~3.01 kg 非洗眼群 雄4匹、雌2匹
 観察期間: 72時間
 投与方法: 検体 0.1ml を6匹のウサギの右眼に点眼し、左眼は無処理対照とした。洗眼はしなかった。
 観察・検査項目: 検体投与後1、24、48及び72時間後に角膜、虹彩及び結膜の変化を観察した。刺激性変化の採点は、Kay and Calandraの基準に従った。
 結果: 観察された刺激性変化の評点(Draize法)を下表に示した。

	最高 評点	点 眼 後 時 間				
		1時間	24時間	48時間	72時間	
角 膜	80	0.0	0.0	0.0	0.0	
虹 彩	10	2.5	0.0	0.0	0.0	
結 膜	発 赤	6	3.3	1.3	0.0	0.0
	浮 腫	8	2.0	0.0	0.0	0.0
	分泌物	6	2.3	0.3	0.0	0.0
合計評点	110	10.1	1.6	0.0	0.0	

数字は群の平均を示す。

角膜には影響は認められなかった。

虹彩の炎症が投与1時間後の観察時点で3匹の動物に観察されたが、他の動物及び他の観察時点では異常は認められなかった。

極軽度から中等度の結膜への刺激性が、投与1時間後の観察時点で全処理眼に認められ、24時間後には4匹の処理眼に極軽度の刺激性が認められた。

全ての処理眼は、48時間後では正常であった。

以上のようにクミルロン水和剤を6匹のウサギの結膜嚢に1回点眼した場合、合計最高評点10.1が観察され、Kay and Calandraの基準により、ウサギの眼に対して極軽度の刺激性があると判断された。

6) モルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 49)

試験機関: Safepharma Laboratories (英国) (GLP対応)

報告書作成年: 2000年

検体純度: 45%水和剤(フロアブル)

供試動物: Dunkin-Hartley系モルモット 開始時 8~12週齢
開始時体重 300~377g、 1群20匹 (陽性対照群1群10匹)

投与方法: Buehler法

感作暴露; 試験開始日(0日)に動物の左腹側部を剪毛し、検体の原液を吸湿性リント布(20mm×20mm)にしみ込ませて適用部位に置き、外科用粘着テープで固定し、その上をアルミ箔で被覆し、更に伸縮性粘着テープで固定した。この状態を6時間維持した。この手順を7日目及び14日目にも同じ部位に行い、6時間暴露を計3回行った。陽性対照としてDNCBの0.5%無水エタノール溶液を用い、検体の場合と同様の処理をした。又夫々の対照動物には溶媒のみを同様に処理した。

惹起暴露; 28日目の投与直前に剪毛した動物の右腹側部に検体の原液しみ込ませた吸湿性リント布(20mm×20mm)を置き、外科用粘着テープで固定した。
刺激性のない最高濃度が惹起暴露に用いられたことを確認するために、検体の75%水溶液を右腹側部の別の部位に同様に処理した。これらの部位をアルミ箔で被覆し、伸縮性粘着テープで固定した。
陽性対照としてDNCBの0.05%及び0.025%無水エタノール溶液用い、検体の場合と同様の処理をした。又夫々の対照動物には溶媒のみを同様に処理した。
処理6時間後にこれらの被覆物を取り除き、処理部を不滅インキで識別出来る様に印を付けた。惹起部位の評価をするために29日目に再度右腹側部を動物用バリカンを用いて剪毛した。

用量設定根拠;

感作時濃度; 2匹のモルモットを用い、検体の原液及び検体を蒸留水で種々の濃度(75%、50%及び25%)に調製した溶液を処理した。6時間閉鎖暴露終了後、24時間及び48時間目に皮膚反応を観察した結果、最高濃度でも皮膚刺激性を示さなかったため、本試験の感作時の濃度は原液とした。

惹起時濃度; 2匹のモルモットを用い、検体の原液及び75%水溶液を処理し、更に処理7及び14日後に再度同様に処理した。両濃度共に皮膚刺激性を示さなかったため、両濃度を惹起暴露時の濃度とした。

観察・検査項目: 惹起貼付除去後24及び48時間目に、右腹部皮膚の感作性変化を観察した。

結 果: 結果を次頁の表に示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

			供 試 動 物 数	感作反応動物数											感 作 陽性率		
				24 時間後						48 時間後					24 時 間	48 時 間	
				皮膚反応評点						皮膚反応評点							
				0	1	2	3	4	計	0	1	2	3	4			計
感 作	惹 起																
検 体	検 体 原 液	検 体 原 液	20	0	0	0	0	0	0/20	0	0	0	0	0	0/20	0	0
	検 体 原 液	検体 75% 水溶液	20	0	0	0	0	0	0/20	0	0	0	0	0	0/20	0	0
	蒸留水	検 体 原 液	10	0	0	0	0	0	0/10	0	0	0	0	0	0/20	0	0
	蒸留水	検体 75% 水溶液	10	0	0	0	0	0	0/10	0	0	0	0	0	0/20	0	0
陽 性 対 照 (DNCB)	DNCB0.5% エタノール液	DNCB0.05% エタノール液	9*	0	6	3	0	0	9/9	2	7	0	0	0	7/9	100	78
	DNCB0.5% エタノール液	DNCB0.025% エタノール液	9*	4	5	0	0	0	5/9	0	0	0	0	0	0/9	56	0
	エタノール	DNCB0.05% エタノール液	10	0	0	0	0	0	0/10	0	0	0	0	0	0/10	0	0
	エタノール	DNCB0.025% エタノール液	10	0	0	0	0	0	0/10	0	0	0	0	0	0/10	0	0

* ; 4日目に死亡して発見

検体投与動物及びその溶媒として用いた蒸留水を投与した対照動物の投与部位には有害な皮膚反応は認められなかった。

一方陽性対照として用いたDNCB投与群では1動物が4日目に死亡して発見されたが、この死亡死はDNCBの毒性に起因するものではなかった。

DNCBにより明確に識別出来る紅斑及び浮腫が認められた。これらの反応は、DNCBの既知のアレルギー反応と一致していた。

溶媒として用いた無水エタノールのみの処理では、両濃度共に処理部位には異常は認められなかった。

以上の結果からクミロン水和剤はモルモットの皮膚に対して感作性はないと判断された。

IV. 動植物及び土壌等における代謝分解運命
 <代謝分解運命試験一覧表>

資料番号に網掛けをした試験成績は全て平成7年度に残留農薬安全性評価委員会で評価済み

資料番号	試験の種類及び試験系	試験内容・結果の概要	試験機関(報告年)	頁
50 (GLP)	動物代謝 Fisher系 雌雄ラット	<p>検体 : ^{14}C-標識体2種 用量 : 5mg/kg 及び 500mg/kg 投与液 : メチルセルロース/水懸濁液 投与経路・回数 : 1回強制経口投与 14日間反復経口投与 調査項目 : 排泄と体内分布(4時点)、血中及び血漿中濃度の推移、尿、糞、胆汁中の代謝物の同定・定量</p> <p>^{14}Cの動態及び排泄物中の代謝物プロファイルは、高用量で糞への排泄と組織中濃度が高まる点を除いて、2用量間で類似していた。また、尿排泄率が雄より雌で高かったものの、全体に性差は小さかった。^{14}Cは24時間で70~90%が尿と糞に排泄され、7日後の体内残留量は投与量の0.01~0.12%であった。主たる排泄経路は糞(投与量の70~96%)であり、尿には投与量の3(高用量)~28%(低用量)が排泄された。胆汁には24時間で低用量投与量の7~8%の^{14}Cが排泄された。両用量共血漿中^{14}Cの濃度のTmaxは2時間、半減期は15~17時間であった。血漿中^{14}C濃度のTmax時点を含む4時点で、^{14}Cの主たる分布臓器は肝と腎であった。尿中の主要代謝物はと、糞中の主要成分は未変化のクミルロンとであった。他に、が微量代謝物として尿または糞から検出された。胆汁からは抱合体の他に何種かの代謝物が検出された。吸収率は低用量で21~59%、高用量で12~16%と推定された。非放射性クミルロンの低用量を14日間反復投与した後の^{14}Cクミルロンの排泄、体内分布、排泄物中の代謝物プロファイルは微量物質を除いては1回投与のそれと大差なかった。</p>	(財)残留農薬研究所 Ricerca Inc. (米国) (1993年)	250
51 (GLP)	植物代謝 水稻	<p>検体 : ^{14}C-標識体2種 施用量 : 3.2 及び 6.4kg a.i./ha 施用液 : フロアブル製剤 稲栽培法 : 温室内で収穫期までポット栽培 土壌 : 米国水田土壌(微砂質壤土) 施用回数 : 移植後に1回 施用部位 : 葉中央部(葉からの移行性) 田面水(根からの移行性及び稲体中残留物) 分布 : 葉、稈、玄米及び籾殻中の残留物を同定・定量し、また幼苗を用い茎葉(葉面塗布)と根からの吸収移行性を比較</p> <p>クミルロンの葉表面からの浸透移行性は低く、根からの吸収が水稻におけるクミルロンの主たる吸収経路であった。土壌を介しての根からの吸収は生育期間中続き、^{14}Cは稲体の全身に分布した。田面水処理後の収穫期稲体中の全放射能残留量(TRR)は高かった。葉と稈(稲藁)中のTRRの多くは抽出可能であった。玄米ではTRRの48~65%が残渣に残った。葉及び稈抽出液中の主要残留物はクミルロン、であり、他に微量物質として、が検出された。玄米抽出液中の主要成分はクミルロンとであった。稲藁抽出液中の主要残留物は、クミルロン、及びであり、他に微量代謝物が数種同定された。</p> <p style="text-align: center;"> <u>収穫期 TRR (ppm eq.) (32. kg a.i./ha)</u> 稲藁 22.8~29.4 玄米 0.4 ~0.6 </p>	(財)残留農薬研究所 Ricerca Inc. (米国) (1993年)	270

資料番号に網掛けをした試験成績は全て平成7年度に残留農薬安全性評価委員会で評価済み

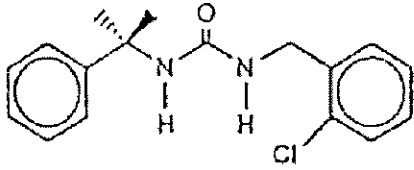
資料番号	試験の種類及び試験系	試験内容・結果の概要	試験機関(報告年)	頁
52 (GLP)	土壌中での運命: 好気水系代謝 米国土壌 (微砂質埴土)	検 体 : ^{14}C -標識体 2 種 施用量(初濃度) : 乾土 1g 当り 3.2ppm 試 験 条 件 : 暗所、好気条件、25°C 試 験 期 間 : 119 日後まで 分 析 : 経時的に土壌、水中の残留物を同定・定量した他、揮発性物質を分析 クミルロンは、半減期 3~4 日と 132 日の 2 相性の 1 次減衰式に従って CO_2 にまで代謝された。 CO_2 以外の主要代謝物は であつた。他に 2 種の微量代謝物が同定された。これらは何れも水相に分布していた。土壌中の残留物のほぼ全量はクミルロンであつた。 は試験期間中、経時的に増加した。	(財)残留農薬研究所 Ricerca Inc. (米国) (1992 年)	286
53 (GLP)	土壌中での運命: 嫌気水系代謝 米国水田土壌 (微砂質埴土)	検 体 : ^{14}C -標識体 2 種 施用量(初濃度) : 乾土 1g 当り 3.2ppm 試 験 条 件 : 暗所、嫌気条件(N_2 通気)、25°C 試 験 期 間 : 1 年間(52 週間) 分 析 : 経時的に土壌、水中の残留物を同定・定量した他、揮発性物質を分析 クミルロンの半減期は 2.5~2.6 年であつた。微量代謝物として 、 、 が検出・同定された。	(財)残留農薬研究所 Ricerca Inc. (米国) (1992 年)	293
54	土壌中での運命及び土壌残留物の後作物への移行性 ・湛水条件 土壌代謝 ・畑条件 土壌代謝 ・土壌中代謝残留物のだいでへの移行性 日本水田土壌 (砂埴土)	<u>湛水条件土壌代謝</u> 検 体 : ^{14}C -標識体 2 種 施用量(初濃度) : 乾土 1g 当り 4.5ppm 試 験 条 件 : 暗所、湛水条件、25°C 試 験 期 間 : 231 日後まで 分 析 : 28 日及び 231 日の 2 時点 <u>畑条件土壌代謝</u> 検 体 : ^{14}C -標識体 2 種 施用量(初濃度) : 乾土 1g 当り 4.5ppm 試 験 条 件 : 暗所、好気畑条件、25°C 試 験 期 間 : 84 日後まで 分 析 : 経時的に土壌中の残留物及び揮発性物質の生成を分析 <u>だいでへの移行性</u> だいでは種 : 85 日間上記同条件で前処理した土壌には種栽培条件 : 温室内栽培 分 析 : は種 33 日後と収穫期(82 日後)にだいで体中の残留物を分析 <u>湛水条件土壌代謝</u> 231 日間で 56~63%が代謝分解された。土壌/水中から検出された主要代謝物は 、 及び であつた。 <u>畑条件土壌代謝</u> 約 52 日の半減期で最終的に CO_2 にまで代謝された。主要代謝物は CO_2 と 及び土壌結合残留物であつた。他に主な微量物質として と が検出された。 <u>だいでへの移行性</u> 土壌中残留物の主体であるクミルロンは根部で主に と 環固有の代謝物に代謝された。 は地上部に容易に移行し、茎葉中の主残留物となつた。 環固有の代謝物の地上部への移行性はそれに比べて低く、茎葉中では数種の高極性代謝物として検出された。子実中の ^{14}C の濃度は、両標識体共根及び茎葉部に比べて顕著に低かつた。	(財)残留農薬研究所 (1992 年)	300

資料番号に網掛けをした試験成績は全て平成7年度に残留農薬安全性評価委員会で評価済み

資料番号	試験の種類及び試験系	試験内容・結果の概要	試験機関(報告年)	頁								
55 (GLP)	水中での加水分解 滅菌緩衝液 pH5、7、9	検体 : ¹⁴ C-標識体 1種 濃度 : 0.4ppm 試験条件 : 暗所、滅菌条件、25℃ 試験期間 : 28日間 分析 : 3種のpH条件下での加水分解速度と分解生成物の調査	(財)残留農薬研究所 Ricerca Inc. (米国) (1991年)	309								
		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>pH 5</th> <th>pH7</th> <th>pH9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>28日間の分解率</td> <td><0.2%</td> <td>ND</td> <td><1%</td> </tr> <tr> <td>半減期(日)</td> <td>1.5×10³</td> <td>計算不能</td> <td>2.8×10³</td> </tr> </tbody> </table>				pH 5	pH7	pH9	28日間の分解率	<0.2%	ND	<1%
	pH 5	pH7	pH9									
28日間の分解率	<0.2%	ND	<1%									
半減期(日)	1.5×10 ³	計算不能	2.8×10 ³									
56 (GLP)	水中での光分解 滅菌緩衝液(pH5) 及び滅菌田面水	検体 : ¹⁴ C-標識体 2種 濃度 : 0.4ppm 光源 : キセノン光 試験条件 : 滅菌条件、25℃ 試験期間 : 15日間連続照射	(財)残留農薬研究所 Ricerca Inc. (米国) (1992年)	311								
		クミロンは緩衝液中では光分解されなかった。田面水では光増感光分解を受け、222日(太陽光換算で444日)の半減期でと多数の微量物質に分解された。主要光分解生成物は であった。										
57	土壌吸着平衡定数の測定	検体 : クミロン純品 試験土壌 : 水田土壌4種 試験方法 : 土壌を最大容水量の60%になるように調整し、クミロン飽和溶液の1/2濃度希釈液を加え、8時間振とう後遠心分離し、固・液相のクミロン濃度を測定した。	日本カーリット(株) 研究開発センター (1991年)	316								
		クミロンの土壌吸着平衡定数(Koc) = 789										

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

代謝物等名称・構造一覧表-1

No.	各代謝試験報告書中の略称・呼称	構造
I	JC-940 クミルロン 1-(2-クロロベンジル)-3-(1-メチル-1-フェニルエチル)ウレア	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は丸紅株式会社にある。

代謝物等名称・構造一覧表-2

No.	各代謝試験報告書中の略称・呼称	構 造
	CO ₂ 、二酸化炭素	C O ₂