

1-10-5 チャイニーズハムスターV79 細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験 (資料 25)

試験機関 : Darmstadt 技術大学(ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1986 年(実験 1)、1987 年(実験 2)

検体の純度 :

方法 : チャイニーズハムスターV79 細胞の継代培養した継代 2 日後の対数増殖期の培養細胞を用い、代謝活性化系の存在下及び非存在下で染色体異常誘発性を検定した。

実験 1 (資料 25-1)

試験区 : 検体の 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (S-9 mix 非存在下) 及び 210  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (S-9 mix 存在下) で細胞毒性が高かったので、以下の濃度の試験区を設けた。

試料採取時期	薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S-9 mix の有無
処理開始 7 時間後	陰性対照 (DMSO)	1%	-
		1%	+
	検体	160.0	-
		170.0	+
処理開始 18 時間後	陰性対照	0	-
		0	+
	陰性対照 (DMSO)	1%	-
		1%	+
	検体	12.0	-
		60.0	-
		160.0	-
		13.0	+
		60.0	+
		170.0	+
陽性対照 (EMS)	0.94mg/mL	-	
陽性対照 (CPA)	1.40	+	
処理開始 28 時間後	陰性対照 (DMSO)	1%	-
		1%	+
	検体	160.0	-
		170.0	+

試験方法 : 48 時間 (7 及び 28 時間試料採取) 及び 55 時間 (18 時間試料採取) 培養後、代謝活性化系の有無に係わらず検体の上記の濃度を含む血清無添加培地に交換して 2 反復で処理した。処理開始 4 時間後、生理食塩液で洗浄後、通常培地と交換した。さらに、処理開始 5、15.5 又は 25.5 時間後にコルセミド (0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加して細胞分裂を停止させた。この 2 (7 時間試料採取) 又は 2.5 (18 及び 28 時間試料採取) 時間後に培養細胞をトリプシン処理して、細胞を分離し、細胞ペレットは低張塩化カリウム溶液を用いて膨潤させた後、固定した。固定細胞を各反復当たり少なくともスライド 1 枚に広げ、乾燥/染色して検査用標本を作製した。

分裂指数 : 各反復から細胞 1000 個あたり中期細胞数を計測 (合計 2000 細胞) して求めた。

染色体異常の評価：各反復当り良く拡がった染色体を少なくとも 100 個分析し、染色体異常を有する細胞数及び染色体異常の数を観察した。構造異常についてはギャップ、切断、断片化、欠失、交換、多重染色体異常及び染色体細粉化に分類し、計数した。

結 果 :

処理開始 7、18 及び 28 時間後試料採取における細胞 100 個当り染色体異常の出現頻度並びに細胞分裂指数について、それぞれ表 1~4 に示す。

7 時間後試料採取において、検体の 160.0  $\mu$ g/mL (S-9 mix 非存在下) 及び 170.0  $\mu$ g/mL (S-9 mix 存在下) 処理区は陰性対照群に比し、細胞分裂の抑制(それぞれ 52.4% 及び 73.8%) を伴い染色体異常の出現率に僅かな増加(それぞれ 4.0 及び 3.5%) がみられた。又、18 時間後試料採取においても 160.0  $\mu$ g/mL (S-9 mix 非存在下) で染色体異常の出現率が 4% と僅かに高かった。

一方、陽性対照として用いた GPA (S-9 mix 存在下) では顕著な染色体異常の出現率の増加が認められたが、EMS (S-9 mix 非存在下) では溶媒対照 (3.0%) と大差のない値 (4.5%) であった。

以上の結果から、本検体の V79 細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験における変異原性は S-9 mix の代謝活性化系の有無に係わらず細胞分裂の抑制がある場合に弱い陽性を示すと考えられるが、2 反復(細胞 200 個の検査)の試験のために統計学的解析もできないこと、及び代謝活性化系の非存在下における陽性対照の出現率が低いことから、この試験系又は方法に問題があった可能性も否定できない。そのため、確認実験(実験 2)を行った。

表 1 細胞 100 個当り染色体異常の出現頻度(7 時間後試料採取)

薬物		溶媒対照 (DMSO)	検体	溶媒対照 (DMSO)	検体
濃度 ( $\mu$ g/mL)		1%	160.0	1%	170.0
S-9 mix の有無		-	-	+	+
観察細胞数		200	200	200	200
染色体異常を有する細胞数	ギャップを含む	2.0	8.0	3.0	8.0
	ギャップを除く	0.5	4.0	0.5	3.5
染色体型	ギャップ	1.5	5.0	2.5	4.0
	切断	0.5	4.0	0.5	1.0
	断片化				1.0
染色分体型	ギャップ		0.5		0.5
	切断				
	断片化				0.5
欠失			0.5		0.5
染色体交換					1.0
多重異常					
細粉化					

表 2 細胞 100 個当り染色体異常の出現頻度 (18 時間後試料採取)

薬物	陰性対照	溶媒対照 (DMSO)	陽性対照 (EMS)	検体			陰性対照	溶媒対照 (DMSO)	陽性対照 (CPA)	検体			
				12.0	60.0	160.0				13.0	60.0	170.0	
濃度 (μg/mL)	0	1%	0.94mg/mL	12.0	60.0	160.0	0	1%	1.4	13.0	60.0	170.0	
S-9 mix の有無	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
観察細胞数	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	
染色体異常を有する細胞数	ギヤップを含む	3.5	7.0	7.0	3.0	2.5	5.5	2.5	2.5	16.0	7.5	1.0	1.5
	ギヤップを除く	1.5	3.0	4.5	2.5	2.0	4.0	1.0	0.0	12.5	3.5	1.0	1.0
染色体型	ギヤップ	2.0	4.5	3.0	1.0	0.5	2.0	1.0	2.5	5.0	5.5		1.0
	切断	1.0	2.0	1.0	2.0	1.5	1.5	0.5		5.5	1.5	1.0	
	断片化		0.5	0.5		0.5	1.5			1.5	0.5		1.0
染色体分体型	ギヤップ							0.5		0.5			
	切断				1.0		1.0			2.0	0.5		
	断片化									0.5			
欠失	0.5						0.5			0.5			
染色体交換			3.5			1.0				4.5	0.5		0.5
多重異常		0.5							0.5				
細粉化													

表 3 細胞 100 個当り染色体異常の出現頻度 (28 時間後試料採取)

薬物		溶媒対照 (DMSO)	検体	溶媒対照 (DMSO)	検体
		濃度 (μg/mL)	1%	160	1%
S-9 mix の有無		-	-	+	+
観察細胞数		200	200	200	200
染色体異常を有する細胞数	ギヤップを含む	3.5	4.5	2.5	4.5
	ギヤップを除く	0.5	1.5	0.5	1.5
染色体型	ギヤップ	4	3	2	3
	切断		1.5		1
	断片化	0.5		0.5	
染色体分体型	ギヤップ			0.5	
	切断				
	断片化				
欠失					0.5
染色体交換					
多重異常					
細粉化					

表 4 細胞分裂指数

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S-9 mix の 有無	試料採取時 期(時間)	分裂指数	
				絶対	陰性対照比
溶媒対照 (DMSO)	1%	-	7	8.4	100.0
検体	160.0	-	7	4.0	47.6
溶媒対照 (DMSO)	1%	+	7	20.6	100.0
検体	170.0	+	7	5.4	26.2
陰性対照	0	-	18	9.5	100.0
溶媒対照 (DMSO)	1%	-	18	6.8	100.0
陽性対照 (EMS)	0.94mg/mL	-	18	5.8	61.1
検体	12.0	-	18	10.8	158.8
	60.0	-	18	9.4	138.2
	160.0	-	18	14.4	211.8
陰性対照	0	+	18	11.9	100.0
溶媒対照 (DMSO)	1%	+	18	6.0	100.0
陽性対照 (GPA)	1.4	+	18	6.6	55.5
検体	13.0	+	18	9.4	156.7
	60.0	+	18	10.6	176.7
	170.0	+	18	14.6	243.3
溶媒対照 (DMSO)	1%	-	28	16.0	100.0
検体	160.0	-	28	15.5	96.9
溶媒対照 (DMSO)	1%	+	28	13.3	100.0
検体	170.0	+	28	9.9	74.4

実験 2 (資料 25-1)

試験の実施理由: 実験 1 の結果を確認するために、検体処理区は 4 反復 (陽性対照区は 2 反復) で行った。

試験区: 試験区として以下を設けた。

試料調製時期	薬物	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S-9 mix の有無
処理開始 7 時間後	陰性対照 (DMSO)	1%	-
	検体	160.0	-
	陰性対照 (DMSO)	1%	+
	検体	170.0	+
処理開始 18 時間後	陰性対照	0	-
	陰性対照 (DMSO)	1%	-
	陽性対照 (EMS)	0.94mg/mL	-
	検体	12.0	-
		60.0	-
		160.0	-
	陽性対照 (GPA)	1.40	+

試験方法：実験 1 と同様の方法で行なった。

結 果：

試料採取 7 及び 18 時間における細胞 100 個当り染色体異常の出現頻度について、それぞれ表 5 及び 6 に示す。

S-9 mix 存在下において、検体の 170.0  $\mu$ g/mL 処理区 (7 時間試料採取) は陰性対照区に比し、染色体異常の出現率に有意な増加がみられた。

S-9 mix 非存在下において、検体の 160.0  $\mu$ g/mL 処理区 (7 及び 18 時間試料採取共) は陰性対照区に比し、染色体異常の出現率に有意な増加がみられたが、歴史的背景データ (染色体異常の出現率: 0~4%) の範囲内にあることから生物学的に意義はないものと判断される。

一方、陽性対照として用いた EMS (S-9 mix 非存在下) 及び CPA (S-9 mix 存在下) では顕著な染色体異常の増加が認められた。

以上の両実験結果から、本検体は V79 細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験において、細胞毒性を生じる濃度で S9-mix 存在下の試料採取 7 時間で染色体異常に僅かな増加がみられ、弱い陽性を誘発した。しかし、細胞毒性のみられない濃度では染色体異常の増加はみられなかった。S-9 mix 非存在下では陰性であると判断される。

表 5 細胞 100 個当り染色体異常の出現頻度 (7 時間試料採取)

薬物	溶媒対照 (DMSO)	検体	溶媒対照 (DMSO)	検体
濃度 ( $\mu$ g/mL)	0.0	160.0	0.0	170.0
S-9 mix の有無	-	-	+	+
観察細胞数	400	400	400	400
染色体異常を有する細胞数	キヤップを含む	4.25	3.75	9.50
	キヤップを除く	1.25	1.25	6.75 $\uparrow$
染色体型	キヤップ	2.5	2.25	3.0
	切断	0.5	0.75	3.0
	断片化	0.5	0.25	1.5
染色体分型	キヤップ	0.5	0.25	0.25
	切断		0.25	1.0
	断片化		0.25	
欠失		0.25		
染色体交換	0.5	0.5		1.25
多重異常				
細粉化				

$\uparrow$  : Mann-Whitney U-検定  $p < 0.05$

\* : 背景データ (0~4%) の範囲内にあり生物学的意義はないと考えられる。

表 6 細胞 100 個当り染色体異常の出現頻度 (18 時間試料採取)

薬物	陰性対照	溶媒対照 (DMSO)	陽性対照 (EMS)	陽性対照 (CPA)	検体			
					12.0	60.0	160.0	
濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )		0.0	0.94mg/mL	1.40	12.0	60.0	160.0	
S-9 mix の有無	-	-	-	+	-	-	-	
観察細胞数	400	400	200	200	400	400	400	
染色体異常を有する細胞数	キヤップを含む	4.0	4.0	35.5	20.5	4.0	5.0	7.0
	キヤップを除く	0.5	1.25	29.0	13.0	1.75	1.25	3.51*
染色体型	キヤップ	4.0	3.25	13.0	8.5	2.5	4.25	3.75
	切断	0.25	0.75	19.0	5.0	0.25	0.25	1.25
	断片化			12.0	1.0	0.75	0.25	1.25
染色分体型	キヤップ			0.5	0.5			
	切断			2.5	0.5	0.25	0.25	0.25
	断片化			3.5	1.5		0.25	0.5
欠失		0.25				0.25	0.25	
染色体交換	0.25	0.25	7.5	8.5	0.5	0.25	1.25	
多重異常			1.0	1.0			0.25	
細粉化								

↑ : Mann-Whitney U-検定  $p < 0.05$

\* : 背景データ (0~4%) の範囲内にあり生物学的意義はないと考えられる。

表 7 細胞分裂指数

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S-9 mix の有無	試料採取時期 (時間)	分裂指数	
				絶対	陰性対照比
溶媒対照 (DMSO)	0	-	7	3.33	100.0
検体	160.0	-	7	2.53	75.8
溶媒対照 (DMSO)	0	+	7	10.55	100.0
検体	170.0	+	7	7.70	72.6
陰性対照	0	-	18	13.30	100.0 <sup>a</sup>
溶媒対照 (DMSO)	0	-	18	11.35	100.0 <sup>b</sup>
陽性対照 (EMS)	0.94mg/mL	-	18	3.05	23.3 <sup>a</sup>
検体	12.0	-	18	8.55	75.4 <sup>b</sup>
	60.0	-	18	7.25	64.0 <sup>b</sup>
	160.0	-	18	8.83	77.2 <sup>b</sup>
陽性対照 (CPA)	1.4	+	18	7.0	<sup>c</sup>

<sup>a, b</sup> : 試験群と対応する陰性対照群

<sup>c</sup> : 対応する陰性対照群なし

1-10-7 マウスの骨髓細胞を用いた小核試験

(資料 26)

試験機関：ハンントン・リサーチ・センター(英国)

[GLP 対応]

報告書作成年：1989年

検体の純度：

試験動物：Swiss系 CD-1 異系交配マウス、1群雌雄各 15 匹(陽性対照群は雌雄各 5 匹)

方法：検体を 1%メチルセルロース溶液に懸濁して、5000mg/kg を単回強制経口投与し、死亡の有無及び一般状態を観察した。投与量は本試験前に実施された予備毒性試験に基づいて設定した。375、750、1500、3000 及び 6000mg/kg で試験を行ったところ、ごく軽微な毒性症状が認められたにすぎなかったため、本試験の投与量は 5000mg/kg に設定した。溶媒対照群及び陽性対照群を含めた群の構成は次のとおりであった。

群	薬物	投与量 (mg/kg)	マウスの匹数	
			雄	雌
1	溶媒対照	-	15	15
2	検体	5000	15	15
3	陽性対照(マイトマイシン C)	12	5	5

検体投与群及び溶媒対照群の雌雄各 5 匹を投与後 24、48 及び 72 時間に、陽性対照群の動物は投与 24 時間後に屠殺して、各動物の両大腿骨から骨髓塗抹標本を作製し、ギムザ液で染色した。動物ごとに多染性赤血球 1000 個当り小核を有する赤血球数を計数した。また、各動物の正染性赤血球数と多染性赤血球数の比は赤血球 1000 個を検査して求めた。小核を有する正染性赤血球数は Schmid の方法に従って記録した。

結果：結果を次表に示した。

3 屠殺時期のいずれにおいても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に統計学的有意な増加は認められなかった ( $P > 0.05$ )。マイトマイシン C では、小核を有する多染性赤血球数に統計学的有意な増加が認められた。

また、小核を有する正染性赤血球の出現頻度に、検体による実質的な増加は認められなかった。検体投与群において、正染性赤血球数に対する多染性赤血球数の比率に統計学的有意な減少は認められなかった ( $P > 0.05$ )。一方、マイトマイシン C では、この比率に統計学的に有意な減少が認められた ( $P < 0.001$ )。

以上の結果から、検体は本試験条件下でマウス骨髓細胞に対する変異原性あるいは骨髓細胞毒性は認められないと判断される。

時間 (h)	薬物	投与量 (mg/kg)	p/n 比		小核を有する赤血球の出現頻度		
			平均値	P	多染性赤血球数		正染性赤血球数
					平均値 ‰	P	平均値 ‰
24	溶媒	-	0.802	-	0.3	-	0.0
	検体	5000	0.788	0.456	0.3	0.413	0.0
	マイトマイシン C	12	0.296	<0.001	28.6	<0.001	0.0
48	溶媒	-	0.752	-	0.3	-	0.2
	検体	5000	0.928	0.928	0.3	0.515	0.0
72	溶媒	-	1.132	-	0.7	-	0.2
	検体	5000	1.023	0.197	0.6	0.471	0.0

p/n 比 : 正染性赤血球数に対する多染性赤血球数の比

P : Wilcoxon の順位和検定を用いた統計処理の結果 (片側検定)

‰ : 赤血球数 1000 個中の数



1-10-8 細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 27)

試験機関：財団法人 残留農薬研究所(日本)

[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検体の純度：

方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換え修復機構保持株(H-17)と欠損株(M-45)を用い、代謝活性化及び非活性化法によって DNA の損傷の誘発性を検定した。

被験物質を溶解させるために、DMSO を用いた。検体の DMSO に対する溶解限度 1000  $\mu\text{g}/\text{disk}$  (50mg/mL) を最高用量として、6 用量 (20、50、100、200、500、1000  $\mu\text{g}/\text{disk}$ ) で試験を実施した。陰性対照としてカナマイシンを 0.2  $\mu\text{g}/\text{disk}$  の用量で、陽性対照としてマイトマイシン C (代謝活性化系非存在下) を 0.01  $\mu\text{g}/\text{disk}$  の用量及び 3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド[4,3-B]インドール(Trp-P-1) (代謝活性化系存在下) を 5  $\mu\text{g}/\text{disk}$  の用量で用いた。試験は各用量 2 枚のプレートで実施した。

結果：結果を次頁の表に示す。

検体は代謝活性化の有無にかかわらず両株に生育阻止を誘起したが、その差はいずれも 1 mm 以下であった。

一方、陽性対照のマイトマイシン (代謝活性化系非存在下) 及び Trp-P-1 (代謝活性化系存在下) では、両株の間に明らかな生育阻止の差が生じた。また、陰性対照として用いたカナマイシンでは、両株に同程度の生育阻止帯を誘起した。

以上の結果より本検体は DNA 損傷の誘発性がないものと判断される。

DNA 修復試験結果

薬物	濃度 ( $\mu$ g/disk)	-S9 分画			+S9 分画		
		阻止帯 (mm)*		差 (mm)	阻止帯 (mm)*		差 (mm)
		M-45	H-17		M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
ジメト モルフ	20	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
	100	1	0	1	1	1	0
		1	0	1	0	0	0
	200	2	2	0	2	2	0
		3	2	1	2	2	0
	500	2	1	1	3	3	0
		2	1	1	3	3	0
	1000	2	2	0	4	3	1
		3	2	1	3	3	0
カナマイシン	0.2	10	9	1			
		9	8	1			
マイト マイシン C	0.01	22	3	19			
		23	3	20			
Trp-P-1	5				11	0	11
					12	0	12

\*: 生育阻止帯の直径からディスクの直径 (8mm) を差し引いた値

1-10-9 ラット初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (資料 28)

試験機関 : Darmstadt 技術大学、LMP (ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1986 年

検体の純度 :

試験方法 :

処理 : 検体は DMSO に溶解し、最終濃度 2.5、10.0、25.0、100.0 及び 250.0  $\mu\text{g/mL}$  培地、陰性対照は DMSO 1%、陽性対照は DMBA (7,12-ジメチルベンゾ (a) アントラセン) 25.64  $\mu\text{g/mL}$  培地を用いた。各濃度 6 反復で行った。

3.5~4  $\times 10^6$  個の初代培養肝細胞を含むヒドロキシ尿素添加培地 4mL (最終濃度 15 mM) を 1 時間振とう培養した。ついで、検体溶液及び ( $^3\text{H}$ )-チミジン (1.0  $\mu\text{Ci/mL}$ ) を添加し、さらに 3 時間培養を継続した。培養は 37°C、95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$  気中で行った。

核の分離 : 4 時間培養後、細胞を磷酸緩衝生理食塩液で洗浄し、チミジン (0.5 mg/mL) を各試料に添加した。細胞核は融解液 (10 mM Tris-HCl; 15 mM NaCl; 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; Nonidet P40 0.5%, pH 8.5) を添加して室温で細胞を 10 分間融解し、細胞核を遠沈し、ペレットを Nonidet P40 を含まない上記の溶液で洗浄した。

DNA の分離 : この細胞核を融解液 (2.5 mM EDTA; 2% SDS; 0.1 M ; 1 mg/mL プロテイナーゼ K, pH 10) を用いて、37°C で 30 分間融解した。DNA は 10% トリクロロ酢酸 (TCA) を添加して沈殿させ、4°C で 30 分間冷却後遠沈して、ペレットを 5% TCA に再溶解した (90°C で 20 分間)。

DNA 含量の測定 : Burton 法に従い、比色法で測定した。

放射能の測定 : 放射能は LSC で測定した。結果は ( $^3\text{H}$ )-チミジン取り込み量を dpm/ $\mu\text{g}$  DNA として示した。

結果の判定 : ( $^3\text{H}$ )-チミジン取り込み量が細胞毒性を認めるまでの濃度、あるいは溶解限度で陰性対照の範囲内にあるとき、検体は陰性と判定する。陰性対照の 2 倍以上の ( $^3\text{H}$ )-チミジン取り込み量の増加が検体の 1 濃度以上で見られるとき陽性と判定する。

用量設定根拠 : 検体濃度が 1~250  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で 6 濃度を用い、処理 3 時間後の細胞の生存率を測定した結果、250  $\mu\text{g/mL}$  区の生存率が陰性対照区に比し、62.6%であったことから、本実験の最高濃度を 250  $\mu\text{g/mL}$  として、5 濃度を設定した。

試験結果：結果を次表に示した。

(<sup>3</sup>H)-チミジン取り込み量

群	濃度 (μg/mL)	平均 dpm/μg DNA ± 標準偏差
陰性対照 (DMSO)	-	115.6 ± 13.2
検体	2.5	113.1 ± 18.9
	10.0	96.9 ± 20.7
	25.0	115.4 ± 13.8
	100.0	93.3 ± 15.2
	250.0	91.2 ± 51.4
陽性対照 (DMBA)	25.64	350.9 ± 52.4

DMBA=7,12-ジメチルベンゾ(a)アントラセン

検体処理区の (<sup>3</sup>H)-チミジン取り込み量は陰性対照区の取り込み量と同等で、濃度依存性の増加も見られなかった。

これに対して、陽性対照区は陰性対照区の3倍の増加であった。

以上の結果より、本試験条件下で、本検体はラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験において陰性であると判断される。

1-10-10 シリアンハムスター胚(SHE)細胞を用いた細胞形質転換試験 (資料 29)

試験機関 : Darmstadt 技術大学(ドイツ)  
[GLP 対応]

報告書作成年 : 1986 年

検体の純度 :

方法 : シリアンハムスター胚(SHE)細胞の二次培養細胞を用い、代謝活性化系の存在下及び非存在下で細胞形質転換の有無を検定した。

用量設定根拠 : 検体の細胞毒性をコロニー形成法で測定した。その結果、代謝活性化系の非存在下では 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上、代謝活性化系の存在下では 260  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で細胞毒性が認められた。又、代謝活性化系の存在下では S-9 mix の毒性のために、6 時間以上処理できなかった。これらの結果から以下の試験区を設定した。

試験区 : 以下の試験区を設けた。

試料採取時期	薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S-9 mix の有無
6 及び 48 時間 処理後	陰性対照 培地のみ	0	-
	DMSO	1%	-
	陽性対照 MNNG	0.5	-
	検体	5.0	-
		10.0	-
25.0		-	
6 時間処理後	陰性対照 培地のみ	0	+
	DMSO	1%	+
	陽性対照 BaP	5.0	+
	検体	25.0	+
		250.0	+
		260.0	+
265.0		+	

MNNG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

BaP: ベンゾ(a)ピレン

DMSO: ジメチルスルホキシド

試験方法 : フィーダー細胞を植え付け 2 又は 3 日後に、トリプシンで処理した。トリプシンの作用は栄養培地で希釈(1:5)して停止させた。遠心分離後、細胞ペレットをリン酸緩衝生理食塩液に再懸濁し、5000 ラドの X-線を照射した。10%牛胎児血清添加培地 2mL を入れた 25cm<sup>2</sup> のプラスチック製フラスコ 10 個に、この 4~6  $\times 10^4$  個の細胞を播種した。24 時間後ターゲット細胞 500 個をさらに培地 2mL を用いて同じフラスコに播種した。さらに 24 時間後、検体の 4 濃度を各フラスコに処理し、培地の最終容量を 8mL とした。代謝活性化系存在下の処理区も並行して設けた。代謝活性化系存在下の培地は処理開始 6 時間後に、又代謝活性化系非存在下の培地は処理開始 6 及び 48 時間後に、検体及び S-9 mix 無添加の培地に交換した。ターゲット細胞を播種

7~9 日後に、固定/染色してコロニー数を計数し、細胞形質転換について評価した。

コロニーの分析は、試験区当り 1000 個のコロニーを評価した。形質転換細胞は主としてコロニーの中心部で 3 次元的に積み重なった (pile-up) 細胞、及び周辺部で細胞の配列が乱れ互いに交差したような形 (criss-cross) と定義した。

結果： 結果を次表に示す。

検体の 2 処理区で、形質転換コロニー数が各 1 個ずつ認められた。これらは偶発的であると考えられる。陰性対照群の背景データは 60000 コロニー 以上の評価で形質転換率は 0.06%であった。

陽性対照区では形質転換コロニー (15~17 個) の誘発が MNNG (S-9 mix 非存在下) 及び BaP (S-9 mix 存在下) で認められた。

以上の結果から、本試験条件下で SHE 細胞を用いた細胞形質転換試験において、検体による細胞形質転換は認められなかったと判断される。

試料採取時期	薬物	濃度 (μg/mL)	S-9 mix の有無	評価コロニー数	形質転換コロニー数	形質転換コロニー数の割合%	コロニー形成率%
6 時間 処理後	陰性対照 培地	0	-	1000	0	0.0	
	DMSO	1%	-	1000	0	0.0	100.0
	陽性対照 MNNG	0.5	-	1000	15	1.5	52.7
	検体	5	-	1000	1	0.1	88.5
		10	-	1000	0	0.0	80.0
		25	-	1000	0	0.0	77.2
50		-	1000	0	0.0	52.8	
6 時間 処理後	陰性対照 培地	0	+	1000	0	0.0	
	DMSO	1%	+	1000	0	0.0	100.0
	陽性対照 BaP	5	+	1000	17	1.7	51.8
	検体	25	+	1000	0	0.0	89.8
		250	+	1000	0	0.0	79.1
		260	+	1000	0	0.0	60.6
265		+	1000	0	0.0	47.2	
48 時間 処理後	陰性対照 培地	0	-	1000	0	0.0	
	DMSO	1%	-	1000	0	0.0	100.0
	陽性対照 MNNG	0.5	-	1000	16	1.6	50.6
	検体	5	-	1000	0	0.0	86.8
		10	-	1000	0	0.0	75.8
		25	-	1000	1	0.1	61.2
50		-	1000	0	0.0	47.6	

1-11 生体機能影響試験

(資料 30, 31)

試験機関：トシコル・ラットリス（英国）

松本歯科大学 歯科薬理学教室\*（日本）

報告書作成年：1991 年、\*1993 年

検体の純度：

(I) マウスの中樞神経系に対する作用

① マウスの一般症状

供試動物：CD-1 系マウス（4～5 週齢）、1 群雌雄各 5 匹、開始時体重範囲  
雄 19.4～24.8g、雌 18.1～21.3g

方 法：動物は検体投与前 24 時間絶食させた。検体を滅菌水に懸濁して、容量  
10mL/kg で 30、100 及び 300mg/kg の用量を強制経口投与し、投与 45 及  
び 105 分後に一般状態を Irwin 法で観察した。

結 果：30、100 及び 300mg/kg 投与群で立毛及び皮膚血流量の増加が認められ  
た。100 及び 300mg/kg 群で、ケージ中の分散状態の増大、感情鈍麻及び  
あえぎ呼吸が見られた。これらの影響は一般的に 105 分時に顕著であっ  
た。しかし、その程度は小さく有意な影響は認められなかった。

② 自発運動に対する作用

供試動物：CD-1 系マウス（約 5 週齢）、1 群雄 6 匹、開始時体重範囲：19.4～23.0g

方 法：一般症状の観察実験と同様の方法で検体の 100mg/kg を投与した。動物は  
床の中央に引いた線で 2 等分されたケージに收容し、投与 1 時間後に動  
物が 3 分間に線を横断する回数を計測した。標準物質としてクロルジア  
ゼポキシド（10mg/kg）を同様に投与した。

結 果：平均区画移動数は、滅菌水のみを投与した動物で 13.67 回であり、検体  
投与動物で 10.00 回であった。クロルジアゼポキシドは 16.50 回であっ  
た。また、検体投与動物で頻繁な身づくろい動作が認められた。この自  
発運動量のわずかな低下は身づくろい動作が亢進したためと考えられ、  
検体により誘発されたものではないと判断された。検体及び標準物質共  
に、マウスの自発運動量に統計学的有意な影響は認められなかった。

③ 抗痙攣作用

供試動物：CD-1 系マウス（4～5 週齢）、1 群雄 6 匹、開始時体重範囲：20.0～22.6g

方法：自発運動の測定実験と同様の方法で検体 100mg/kg 及びクロルジアゼポキシド 10mg/kg を投与した。検体投与 2 時間後に、10mL/kg の 0.8% レプタゾール溶液を静脈内投与して動物の痙攣の有無を観察した。

結果：検体を投与した動物の全例で痙攣が認められたことから、検体はマウスにおいて抗痙攣作用を有しないとものと判断された。

#### ④ヘキソバルビタール睡眠時間に対する作用

供試動物：CD-1 系マウス (4~5 週齢)、1 群雄 6 匹、開始時体重範囲：19.8~24.1g

方法：自発運動の測定実験と同様の方法で検体 100mg/kg 及びクロルジアゼポキシド 10mg/kg を投与した。検体投与 2 時間後に、ペントバルビトンナトリウム 60mg/kg を腹腔内投与し、正向反射の消失から回復までの時間を睡眠時間として測定した。

結果：

群	投与処置	睡眠時間(分)		
		平均値	±標準偏差	±標準誤差
1	滅菌水(溶媒対照) 10mL/kg	103.83	40.97	16.72
2	クロルジアゼポキシド 10mg/kg	187.17*	73.06	29.83
3	検体 100mg/kg	257.00**	60.44	24.67

溶媒対照群と比較した場合の有意差：\* P<0.05、\*\* P<0.001

100mg/kg の検体投与により、マウスのペントバルビトンによる睡眠時間の統計学的に有意な延長が認められた。これは、レプタゾールによる痙攣に対する検体投与の影響が見られなかったことと合わせて次のように考えられた。即ち、肝ミクロソーム酵素による代謝において、検体とペントバルビトンとの競合代謝が起こったため、ペントバルビトンの代謝速度が低下し、睡眠時間が延長したものと判断された。また、クロルジアゼポキシドも睡眠時間を有意に延長した。

#### ⑤鎮痛作用

供試動物：CD-1 系マウス (4~5 週齢)、1 群雄 6 匹、開始時体重範囲：20.5~22.8g

方法：一般症状の観察実験と同様の方法で検体 100mg/kg 及びアセチルサリチル酸 30mg/kg を投与した。投与 1 時間後に、マウスの尾の付け根から約 1cm の部位を動脈クリップで挟み、動物が尾を振ってクリップを除去しようとする迄の時間を測定した。

結果：尾を振るまでの平均時間は検体及び溶媒対照とも 0.17 秒、アセチルサリ



チル酸 1.5 秒であり、検体の鎮痛作用は認められなかった。

#### ⑥体温に対する作用

供試動物：CD-1 系マウス(約 4 週齢)、1 群雄 6 匹、開始時体重範囲：18.2~19.6g

方 法：一般症状の観察実験と同様の方法で検体 100mg/kg を投与した。検体の投与前ならびに投与 60、120 及び 240 分後に、各マウスの直腸温度をデジタル温度計を用いて測定した。

結 果：マウスの体温に対して何ら影響を及ぼさなかった。

#### (2) モルモットの末梢神経系に対する作用(局所麻酔作用)

供試動物：Dunkin Hartley 系モルモット(5~7 週齢)、1 群雄 6 匹、開始時体重範囲：251.0~391.9g

方 法：検体を溶媒(50%滅菌水/50%ジメチルホルムアミド混合液)に溶解して 1%溶液とし、その 0.1mL をモルモットの剃毛した背部に皮内投与した。また、同様に 1%塩酸リグノカインを投与した。投与 5 分後に投与部位を針で刺激して、疼痛刺激に対する皮膚の収縮反応を 0~5 の採点基準に従って採点した。

結 果：

皮膚収縮反応の採点の平均値

群	投与処置	平均値	±標準偏差	±標準誤差
1	溶媒	1.50	0.55	0.22
2	塩酸リグノカイン 1.0%	0.00 <sup>○</sup>	0.00	0.00
3	検体 1.0%	2.17	0.75	0.31

統計学的方法：Student-t 検定 <sup>○</sup> ; P<0.001

検体投与群における皮膚収縮反応は、溶媒対照群と比較して若干大きかったが、その差は統計学的に有意でなかった。塩酸リグノカイン投与群では、疼痛刺激に対する反応は全く認められず、局所麻酔作用があることを示していた。

以上のことから、検体は局所麻酔作用を示さないと判断される。

#### (3) ウサギの前脛骨筋収縮に対する作用(筋弛緩作用)\*

供試動物：日本白色種ウサギ、体重範囲：3.1~3.6kg、1 群雄 6 匹

**方 法：**ウサギの総腓骨神経と前脛骨筋を露出させた。間接刺激は総腓骨神経に接触させた双極白金電極を介して、また直接刺激は筋に接触させた白金電極によって両刺激を交互に行った。

検体を 1%CMC 水溶液に懸濁し、1000 あるいは 1500mg/kg 用量で各 2 匹に経口投与した。さらに別の動物には検体を DMSO に溶解し、約 30 分間隔で 1 例には 15、30 及び 50mg/kg を、他の 1 例には 30 及び 40mg/kg を耳介静脈内に累積投与を行った。

**結 果：**検体のウサギの前脛骨筋収縮に対する作用として、1000 あるいは 1500mg/kg を経口投与した結果、投与後約 90 分で間接刺激による軽度の収縮増強が 1000mg/kg を投与した 2 例中 1 例、1500mg/kg 投与した 2 例とも一定の大きさで持続した。

静脈内投与の場合は 15、30 及び 50mg/kg を累積投与した 1 例はいずれの投与後にも変化は認められなかったが、50mg/kg 投与後まもなく死亡した。他の 1 例は 30mg/kg 投与では変化はみられなかったが、その後に 40mg/kg を投与した結果、収縮の増強が認められた。

#### (4) 麻酔ネコの呼吸、循環器系に対する作用

**供試動物：**ネコ、開始時体重範囲 2.32~2.42kg、雌 3 匹

**方 法：**検体はジメチルホルムアミドに溶解し、滅菌水で希釈して所定の濃度とした。ネコを 1 夜絶食させ、クロラローゼ 75mg/kg を腹腔内投与して麻酔した。各動物に、各投与液の投与間隔を 5 分間としてノルアドレナリン及びアセチルコリン各々 0.1  $\mu$ g/kg を静脈内投与した後、検体 10、30、100  $\mu$ g/kg 及び 10% ジメチルホルムアミド(溶媒) 1.0mL/kg を静脈内に反復投与した。各用量の検体及び溶媒の投与前後にノルアドレナリン及びアセチルコリンを投与した。

大腿動脈にカテーテルを挿入して、血圧(収縮期及び拡張期)及び心拍数を圧カトランスデューサーで電氣的に測定した。気管カニューレを挿入して、呼吸数及び呼吸深度を空気圧トランスデューサーで電氣的に測定した。心電図は、四肢及び胸部に電極を挿入して、QRS 波の振幅及び PQ 時間を測定した。

**結 果：**

- (1) 血 圧：用量依存的な上昇が認められたが、溶媒のみ(10%ジメチルホルムアミド)を投与した場合と同様であった。
- (2) 心拍数：用量依存的な上昇が認められたが、100  $\mu$ g/kg を投与した場合にのみ溶媒のみの投与に比べて僅かに高かった。

- (3)心電図：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。
- (4)呼吸：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。
- (5)ノルアドレナリン及びアセチルコリンに対する反応に及ぼす影響：  
ノルアドレナリンによる血圧上昇、アセチルコリンによる血圧低下及び心拍数の減少に対しては検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、検体は、血圧、呼吸及び心電図に対して影響を及ぼさなかったが、100  $\mu$ g/kg で溶媒と比べて心拍数をわずかに増加させた。

## (5)ネコ、ラット、ウサギ及びモルモットの自律神経系及び平滑筋に対する作用

### ①ネコの瞬膜に対する作用

供試動物：ネコ、開始時体重範囲 2.32~2.42kg、雌3匹

方法：麻酔ネコの呼吸、循環器系に対する作用の実験と同様の方法で処置及び投与を行った後、交感神経を露出させて尾側で切断し、白金電極を交感神経幹に取り付けて求心性刺激を加え、瞬膜の収縮反応を記録した。

結果：検体のネコの瞬膜に対する直接の影響については、1例でわずかな弛緩が認められたが、他の2例では認められなかった。電気刺激による瞬膜の収縮に対する再現性のある変化は認められなかった。また、ノルアドレナリン及びアセチルコリンに対する反応は、検体投与後も変化しなかった。

以上により、ネコの瞬膜の収縮に対する検体の影響はないと判断される。

### ②ラットの子宮運動に対する作用

供試動物：Cr1：SD(CD)BR(VAF Plus)系ラット(6~7週齢)、開始時体重範囲 149~174g、1群雌ラット6匹

方法：ラットにスチルベストロール 0.1mg/kg を皮下注射して発情させ、頸椎脱臼により屠殺して子宮を摘出し、Magunus 法(37°Cの Tyrode 液を、95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> 混合ガスを通気)により等張性トランスデューサーを介して、その自動運動を記録した。

5 標本に、アセチルコリン 20  $\mu$ g/mL 及びアドレナリン 0.1  $\mu$ g/mL を投与した後、ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解した検体 3、10 及び 30  $\mu$ g/mL を投与し、さらにその後アセチルコリン及びアドレナリンを投与した。また、各濃度中の DMF 濃度に相当する濃度の DMF (0.3、1.0 及び 3.0%) を、検体処理を行なった

2 標本及び無処理の 1 標本に投与して、DMF の影響についても検討した。薬液投与に対する反応は、サイクル時間 3 分、接触時間 1 分の条件で測定した。

結 果：検体は、ラットの子宮平滑筋運動に対して直接的な作用を示さず、また、アセチルコリン及びアドレナリン作動性の受容体に影響を及ぼさなかった。

### ③ウサギの摘出回腸の自発運動に対する作用

供試動物：ニュージーランド白色種ウサギ、開始時体重範囲 雄 2.4~3.0kg、雌 2.4~3.0kg、1 群雌雄各 5 匹

方 法：ウサギに過剰量のペントバルビトンナトリウムを腹腔内投与して屠殺し、回腸を摘出し、Magunus 法(37°Cの Tyrode 液を、95%O<sup>2</sup>-5%CO<sup>2</sup> 混合ガスを通気)により等張性トランスデューサーを介して、その自動運動を記録した。雄各 5 標本に、0.001~0.3 μg/mL のアセチルコリン及びアドレナリンを漸増投与した後、DMF に溶解した検体 3、10 及び 30 μg/mL を投与し、さらにアセチルコリン及びアドレナリンを漸増投与した。また、雌雄各 3 標本に、各濃度各濃度中の DMF 濃度に相当する濃度の DMF (0.3、1.0 及び 3.0%) を投与した後、検体 3、10 及び 30 μg/mL を投与した。一連の濃度の DMF 及び検体の投与前後にアセチルコリン及びアドレナリンを漸増投与した。アセチルコリン及びアドレナリン投与による反応は、サイクル時間 3 分、接触時間 30 秒の条件で、検体及び DMF 投与に対する反応は、サイクル時間 4 分、接触時間 30 秒の条件で評価した。

結 果：検体は、ウサギの回腸の自発運動に対して直接的な影響を示さず、また、アセチルコリン及びアドレナリンによる反応に影響を及ぼさなかった。

### ④モルモットの摘出回腸のアゴニストによる収縮に対する作用

供試動物：Dunkin Hartley モルモット(11~13 週齢)、開始時体重範囲 雄 640~740g、雌 550~752g、1 群雌雄各 10 匹

方 法：モルモットを頸椎脱臼により屠殺し、回腸を摘出し、Magunus 法(37°Cの Tyrode 液を、95%O<sup>2</sup>-5%CO<sup>2</sup> 混合ガスを通気)により等張性トランスデューサーを介して、その自動運動を記録した。

検体を DMF に溶解し、3、10、30 μg/mL を雌雄各 10 標本に投与した。最大下用量のアセチルコリン、ヒスタミン、5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)及び BaCl<sub>2</sub> を投与し、これら 4 種類のアゴニストに対する反応を測定した後、ヘキサメトニウム、アトロピン及び被験物質(3、10、30 μg/mL)の存在下で 4 種類

のアゴニストに対する反応を測定した。次いで、選択した雌雄の標本に、各濃度中の DMF 濃度に相当する濃度の DMF (0.3、1.0 及び 3.0%) 存在下で 4 種類のアゴニストに対する反応を測定した。

結 果：結果を次表に示す。

4 種類のアゴニストによる回腸の収縮は、検体存在下で用量依存的に抑制された。この抑制の程度は DMF 存在下と比べて大きかった。このことは、DMF 投与が検体投与後であり、アゴニストに対する組織の感受性が高くなっていたためと考えられた。従って、検体投与によるアゴニストの作用の抑制は、溶媒により惹起されたものであり、検体により惹起されたものではないと判断された。また、検体はモルモット摘出回腸に対して直接的な影響を及ぼさなかった。

アゴニストに対する反応に及ぼすアンタゴニスト及び被験物質の影響

投与物質	アゴニスト	収縮反応 (g)	
		雄	雌
(アゴニストのみ)	アセチルコリン	3.28±1.29	4.24±0.53
	ヒスタミン	3.89±1.52	5.10±0.64
	5-HT <sup>+</sup> ロキトリプタミン	1.94±0.45	3.19±0.59
	BaCl <sub>2</sub>	2.29±1.20	2.40±0.43
ヘキサメトニウム (1 μg/mL)	アセチルコリン	3.66±1.31	4.40±0.67
	ヒスタミン	4.07±1.64	4.94±0.63
	5-HT <sup>+</sup> ロキトリプタミン	2.14±0.55	2.31±0.42
	BaCl <sub>2</sub>	1.87±1.06	1.81±0.28
アトロピン (1 μg/mL)	アセチルコリン	0.11±0.09↓	0.00±0.00 <sup>o</sup>
	ヒスタミン	3.37±1.49	3.47±0.53
	5-HT <sup>+</sup> ロキトリプタミン	0.97±0.63	0.18±0.07 <sup>o</sup>
	BaCl <sub>2</sub>	0.16±0.11	0.67±0.34↓
検体 (3 μg/mL)	アセチルコリン	2.80±1.14	2.74±0.37
	ヒスタミン	3.69±1.35	4.00±0.60
	5-HT <sup>+</sup> ロキトリプタミン	1.08±0.42	1.72±0.47
	BaCl <sub>2</sub>	2.85±1.88	2.23±0.63
検体 (10 μg/mL)	アセチルコリン	1.60±0.68	1.48±0.25 <sup>o</sup>
	ヒスタミン	2.51±1.14	2.23±0.31 <sup>o</sup>
	5-HT <sup>+</sup> ロキトリプタミン	1.02±0.32	1.10±0.39↓
	BaCl <sub>2</sub>	1.81±1.26	1.40±0.34
検体 (30 μg/mL)	アセチルコリン	0.16±0.06↓	0.17±0.07 <sup>o</sup>
	ヒスタミン	0.19±0.06↓	0.08±0.04 <sup>o</sup>
	5-HT <sup>+</sup> ロキトリプタミン	0.07±0.05 <sup>o</sup>	0.00±0.00 <sup>o</sup>
	BaCl <sub>2</sub>	0.09±0.05	0.10±0.04 <sup>o</sup>

統計学的方法： Student-t 検定 ↓ : P<0.05、↓ : P<0.01、<sup>o</sup> : P<0.001

アゴニストに対する反応に及ぼす溶媒(DMF)の影響

投与物質	アゴニスト	収縮反応(g)	
		雄	雌
(アゴニストのみ)	アセチルコリン	5.87±3.24 a)	2.93±0.47 c)
	ヒスタミン	7.50±3.84 a)	3.80±0.59 c)
	5-HT <sup>*</sup> 0x9777 <sup>*</sup> タミン	3.23±1.43 a)	1.01±0.32 c)
	BaCl <sub>2</sub>	3.82±1.18 a)	4.90±1.38 c)
DMF (0.3%)	アセチルコリン	6.40 b)	4.22±1.35 a)
	ヒスタミン	8.00 b)	4.15±1.35 a)
	5-HT <sup>*</sup> 0x9777 <sup>*</sup> タミン	4.60 b)	0.55±0.28 a)
	BaCl <sub>2</sub>	4.80 b)	6.12±3.01 a)
DMF (1.0%)	アセチルコリン	5.40 b)	2.10 b)
	ヒスタミン	6.80 b)	2.10 b)
	5-HT <sup>*</sup> 0x9777 <sup>*</sup> タミン	3.10 b)	0.90 b)
	BaCl <sub>2</sub>	3.30 b)	0.60 b)
DMF (3.0%)	アセチルコリン	4.15±2.99 a)	0.80 d)
	ヒスタミン	3.70±2.31 a)	1.55 d)
	5-HT <sup>*</sup> 0x9777 <sup>*</sup> タミン	0.33±0.33 a)	0.00 d)
	BaCl <sub>2</sub>	4.93±3.79 a)	1.40 d)

a) : 3 標本の平均値、b) : 1 標本の値、c) : 4 標本の平均値、d) : 2 標本の平均値

(6) ラットの消化器に対する作用

供試動物 : Cr1:SD(CD)BR(VAF Plus)系ラット(7~10 週齢)、開始時体重範囲 雄 :

207~222g 雌 : 200~213g、1 群雌雄ラット各 6 匹

方 法 : ラットは検体投与前に 24 時間絶食させた。検体を滅菌水に懸濁し、容量 5mL/kg で 30、100 及び 300mg/kg の用量を経口投与した。検体投与 60 分後に炭末懸濁液(2%w/v)1mL を経口投与した。炭末投与 30 分後に動物を頸椎脱臼により屠殺し、小腸を摘出して、炭末が小腸を移動した距離を測定し、その小腸全体の長さに対する比率を求めた。

結 果 :

投与物質	投与量 mg/kg	炭末移動距離(小腸全体に対する%)	
		雄	雌
滅菌水	—	61.3±3.41	53.9±0.88
検体	30	58.5±3.18	60.5±1.00↑
	100	65.0±4.09	61.8±1.43↑
	300	58.2±4.82	66.7±4.06↑

統計学的方法 : Mann Whitney-U 検定 ↑ : P<0.01

検体のラットにおける腸管輸送能に対する作用は、雄においては影響が認められなかったが、雌においては、統計学的有意かつ用量依存的に腸管炭末輸送能を促進した。

(7) その他の作用

①ラットにおける抗炎症作用

供試動物：Cr1：SD (CD) BR (VAF Plus)系ラット(7~10週齢)、開始時体重範囲 雄：269~329g 雌：205~245g、1群雌雄ラット各8匹

方法：ラットは検体投与前に24時間絶食させた。検体を1%w/vカルボキシメチルセルロースに懸濁し、容量2mL/kgで30、100及び300mg/kgの用量を経口投与した。また、同様にインドメタシン10mg/kgを投与した。投与1時間後に、動物の足趾の腱膜に1%w/vカッパカラゲニン0.1mLを注射して浮腫を誘発させ、0、1、2.5及び4時間に足趾容積を測定した。足趾容積の測定は、圧カトランスデューサーに接続した水銀置換マンオメータを用いて行った。

結果：結果を次表に示す。

検体のラットにおけるカラゲニン足趾浮腫に対する作用は、雄において、低用量で炎症反応を促進し、高用量で炎症作用を抑制した。しかしながら、用量反応関係が見られなかったことから、低用量での結果の関連性は明確ではない。雌においては、浮腫に対して影響が認められなかった。

性別	投与物質	投与量 mg/kg	足趾容積変化率(%) (0時間基準)			
			0時間	1時間	2.5時間	4時間
雄	1%CMC	—	0.00	12.99 ±2.69	18.15 ±3.84	22.83 ±4.82
	インドメタシン	10	0.00	17.37 ±3.79	17.02 ±4.12	11.58 ±3.76
	検体	30	0.00	24.11↑ ±3.68	28.44 ±4.34	26.04 ±3.94
		100	0.00	11.80 ±5.15	15.82 ±2.63	17.13 ±4.10
		300	0.00	4.88 <sup>a)</sup> ±2.65	6.26 <sup>a)</sup> ±3.04	3.69 <sup>a)</sup> ±2.80
雌	1%CMC	—	0.00	5.22 ±3.87	24.76 ±5.36	22.84 ±2.91
	インドメタシン	10	0.00	8.57 ±5.48	5.69↓ ±2.86	10.32 ±5.74
	検体	30	0.00	8.18 ±3.54	22.97 ±6.59	22.60 ±5.53
		100	0.00	12.25 ±4.77	20.24 ±5.41	18.53 ±6.35
		300	0.00	12.94 ±1.96	22.65 ±4.47	21.56 ±4.90

統計学的方法：Mann-Whitney-U検定 ↑↓：P<0.05、↑↓：P<0.01

<sup>a)</sup>：誤投与のため動物1匹を試験途中で屠殺。7匹例の平均値。

②ウサギの血液を用いた溶血性試験 \*

供試動物：日本白色種ウサギ、体重範囲：3.1～3.6kg

方 法：ペパリン処理した注射筒でウサギの心臓から採血した血液を分離し、赤血球を10倍量の生理食塩水に浮遊させた。検体は生理食塩水に懸濁し、最終濃度 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 及び $10^{-8}$ g/mLとなるように希釈し、その9.5mLに赤血球浮遊液0.5mLを加えて、38°Cで2時間インキュベーションした。2時間後遠心して上清の溶血度を肉眼的観察によって判定した。

陽性対照としてサポニン $10^{-4}$ g/mLを用いて同様に行った。

結 果：検体を $10^{-3}$ ～ $10^{-8}$ g/mLの濃度で添加した例では、いずれも溶血は観察されなかった。陽性対照として行ったサポニン $10^{-4}$ g/mLでは強度の溶血が認められた。

以上より、生体機能に及ぼす影響として、一般症状の観察で、100及び300mg/kg投与群で生理系に対して有意な影響ではないが、軽度の分散状態の増大、感情鈍麻及びあえぎ呼吸が認められた。100mg/kgの経口投与で、ペントバルビトンによる睡眠時間の有意な延長、1000及び、1500mg/kgの投与で間接刺激による収縮増強が認められた。雌では30mg/kgの経口投与で用量依存的に腸管運動を亢進させたが、雄では影響はなかった。

これらの結果から、本剤が摂取された場合に重篤な中毒症状が発現する可能性は非常に低いものと推察される。



〈生体機能に及ぼす影響に関する試験の総括表〉

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要	
中 枢 神 経 系	一般症状 [Irwin 法] (マウス)	強制経口投与 (滅菌水)	30, 100, 300	♂ 5 ♀ 5	30	—	全ての投与群で、立毛及び皮膚血流量の増加、100 及び 300mg/kg 投与群でケージ内の分散状態の増大、感情鈍麻及びあえぎ呼吸が認められたが、その程度は小さく生理系に対して有意な影響は認められなかった。
	自発運動 (マウス)	強制経口投与 (滅菌水)	100 標準薬物としてクロルジアゼポキッド 10mg/kg	♂ 6	—	100	100mg/kg の経口投与で、身づくろい動作の亢進によると思われる自発運動量のわずかな低下が認められたが、マウスにおける自発運動量に統計学的に有意な影響は認められなかった。
	抗痙攣作用 (マウス)	強制経口投与 (滅菌水)	100 標準薬物としてクロルジアゼポキッド 10mg/kg	♂ 6	—	100	100mg/kg の経口投与で、全例で痙攣が認められ、抗痙攣作用はなかった。
	ペンタバルビトン睡眠時間に及ぼす影響 (マウス)	強制経口投与 (滅菌水)	100 標準薬物としてクロルジアゼポキッド 10mg/kg	♂ 6	100	—	100mg/kg の経口投与で、ペンタバルビトンによる睡眠時間の有意な延長が認められた。その影響は肝ミトコンドリア酵素によるペンタバルビトナトリウムとの競合代謝に起因するものであると思われる。
	鎮痛作用 (マウス)	強制経口投与 (滅菌水)	100 標準薬物としてアセチルサリチル酸 30 mg/kg	♂ 6	—	100	鎮痛作用はなかった。
	体温 (マウス)	強制経口投与 (滅菌水)	100	♂ 6	—	100	体温に対して影響はなかった。
知 覚 神 経 系	局所麻酔作用 (モルモット)	背部の皮内投与 (滅菌水 50% ジメチルメチルジメチル 50%)	1%水溶液を 0.1mL 標準薬物として 1%塩酸リゲカイン	♂ 6	—	1%溶液 0.1mL	局所麻酔作用は示さなかった。
	筋弛緩作用 (ウサギ)	強制経口投与 (1%CMC 水溶液)	1000, 1500	♂ 2	1000	—	投与後、約 90 分間で間接刺激による収縮増強が 1000mg/kg を投与した 2 例中 1 例、1500mg/kg 投与では 2 例ともに認められた。
		耳静脈内投与 (DMSO)	15, 30, 50 及び 30, 40 の累積投与	♂ 1	40	—	40mg/kg では収縮増強が認められ、50mg/kg では死亡した。

試験項目 (試験動物)		投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
呼吸・循環器系	呼吸・循環器系に対する作用 (麻醉ネコ)	静脈内投与 (ジメチルスルファミド 10%)	10, 30, 100	♀ 3	100	30	血圧、呼吸及び心電図に対して影響を及ぼさなかったが、100mg/kg で溶媒に比べて心拍数をわずかに増加させた。
自律神経系・平滑筋	瞬膜に対する作用 (麻醉ネコ)	静脈内投与 (ジメチルスルファミド 10%)	10, 30, 100	♀ 3	—	100	この瞬膜に対して影響はなかった。
	子宮運動 (ラット)	摘出子宮を Magnus 法で灌流	3, 10, 30 $\mu$ g/mL	♀ 6	—	30 $\mu$ g/mL	摘出子宮平滑筋の運動に対して直接的な影響はなく、アセチルコリン及びアドレナリンによる反応に影響しなかった。
	摘出回腸の自発運動 (ウサギ)	摘出回腸を Magnus 法で灌流	3, 10, 30 $\mu$ g/mL	♂ 5 ♀ 5	—	30 $\mu$ g/mL	回腸の自発運動に直接的な影響はなく、また、アセチルコリン及びアドレナリンによる反応に影響しなかった。
	摘出回腸 (モルモット)	摘出回腸を Magnus 法で灌流	3, 10, 30 $\mu$ g/mL	♂ 10 ♀ 10	—	30 $\mu$ g/mL	4種のアゴニストによる回腸の収縮は検体存在下で用量依存的に抑制されたが、これは溶媒により惹起されたものであると判断された。摘出回腸に対して直接的な影響を及ぼさなかった。
消化器系	小腸輸送能 (ラット)	強制経口投与 (滅菌水)	30, 100, 300mg/kg	♂ 6 ♀ 6	♂ — ♀ 30		雄では影響はなかった。雌では有意かつ用量依存的に腸管運動を亢進させた。
その他	抗炎症作用 (ラット)	強制経口投与	30, 100, 300mg/mL	♂ 8 ♀ 8	♂ 30 ♀ —		雄では、低用量でのみ炎症作用を促進し、高用量では抑制した。雌では、浮腫に対して影響はなかった。
	溶血性 (ウサギ)	— (生理食塩水)	最終濃度: 10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-5</sup> , 10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-7</sup> , 10 <sup>-8</sup> g/mL	♂ 3	—	10 <sup>-3</sup> g/mL	溶血作用はなかった。

## 2. 原体混在物及び代謝物の毒性

### 2-1 原体混在物及び植物代謝物の毒性試験

2-1-1 代謝物[J] のラットにおける急性経口毒性試験 (資料 32)  
試験機関: Research 及び Consulting Company (スイス)  
報告書作成年: 1987 年 [GLP 対応]

検体の純度:

試験動物: Sprague-Dawley 系 CD ラット (4~6 週齢)、投与開始時体重範囲

雄: 183~199g、雌: 158~180g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間: 15 日間観察

方法: 検体を 0.1% Tween80 水溶液に溶解して強制経口投与した。投与前 12~18 時間及び投与後 1 時間絶食させた。

試験項目: 中毒症状及び生死を 15 日間観察した。投与直前、投与後 8 日目、15 日目に体重を測定した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物については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)	雄: 5000 雌: 5000
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄: >5000 雌: >5000
死亡開始時間及び終了時間	雄: 死亡例なし 雌: 死亡例なし
症状発現及び消失時間	雄: 1 時間後から 24 時間 雌: 1 時間後から 24 時間

一般症状としては、鎮静、呼吸困難、硬直(雄のみ)、うずくまり姿勢及び粗毛が認められた。

肉眼的剖検で、雌雄各 1 例の肺に暗赤色巣(直径 1 mm)が認められたのみであった。

2-1-2 代謝物[J] の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 33)

試験機関 : Cytotest Cell Research GmbH & Co. KG. (英国)

[OECD GLP 対応]

報告書作成年 : 1988 年

検体の純度 :

方法 : ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100) 及びトリプトファン要求性大腸菌 (WP2 *uvrA* pKM101 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9) の存在下及び非存在下で Ames らの方法で変異原性を検定した。

結果 : 結果を次頁の表に示す。

検体は、代謝活性化系の存在下及び非存在下にかかわらず全ての菌株及び全ての用量において、復帰変異コロニー数の増加を認めなかった。2 回の本試験において、最高用量で自然復帰変異体数の減少が認められた。

一方、本試験に供した陽性対照では全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は代謝活性化系を含む本試験条件下で復帰突然変異誘発性は有しないものと判断される。

表-1. 実験 I

S9 Mix の有無	薬剤	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	復帰変異コロニー数/plate (平均 $\pm$ SD)					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2	TA98	TA1537	
-	陰性対照		104 $\pm$ 20.2	14 $\pm$ 2.6	30 $\pm$ 3.6	18 $\pm$ 0.6	11 $\pm$ 1.0	
	溶媒対照	(DMSO)	92 $\pm$ 14.5	12 $\pm$ 1.0	34 $\pm$ 2.1	18 $\pm$ 4.2	14 $\pm$ 2.1	
	Z7	1.0	100 $\pm$ 5.9	10 $\pm$ 3.1	31 $\pm$ 9.2	16 $\pm$ 0.6	11 $\pm$ 1.2	
		10.0	81 $\pm$ 8.7	11 $\pm$ 1.0	34 $\pm$ 7.5	17 $\pm$ 2.5	13 $\pm$ 5.3	
		33.3	75 $\pm$ 15.6	10 $\pm$ 1.5	36 $\pm$ 4.2	14 $\pm$ 5.1	17 $\pm$ 1.0	
		100.0	88 $\pm$ 19.7	12 $\pm$ 0.6	40 $\pm$ 3.6	15 $\pm$ 5.7	16 $\pm$ 2.5	
		333.3	83 $\pm$ 26.7	9 $\pm$ 4.4	32 $\pm$ 4.2	16 $\pm$ 5.1	15 $\pm$ 4.4	
		1000.0 <sup>c</sup>	—	15 $\pm$ 8.7	27 $\pm$ 4.6	—	10 $\pm$ 3.5	
	陽性対照	名称	NaN <sub>3</sub>	NaN <sub>3</sub>	MMS	4-NOPD	4-NOPD	
		濃度 <sup>b</sup>	10	10	10	50	50	
		コロニー数/plate	827* $\pm$ 11.8	612* $\pm$ 520.3	765* $\pm$ 19.3	1083* $\pm$ 157.1	221* $\pm$ 14.5	
	+	陰性対照		115 $\pm$ 6.7	12 $\pm$ 3.8	41 $\pm$ 4.2	20 $\pm$ 0.0	18 $\pm$ 4.9
		溶媒対照	(DMSO)	90 $\pm$ 11.0	16 $\pm$ 3.5	34 $\pm$ 2.0	21 $\pm$ 5.8	22 $\pm$ 1.2
Z7		1.0	102 $\pm$ 4.4	16 $\pm$ 3.5	35 $\pm$ 5.9	21 $\pm$ 6.7	16 $\pm$ 5.6	
		10.0	98 $\pm$ 31.0	13 $\pm$ 3.5	38 $\pm$ 6.6	18 $\pm$ 3.0	17 $\pm$ 4.0	
		33.3	102 $\pm$ 13.5	15 $\pm$ 3.2	38 $\pm$ 9.5	19 $\pm$ 4.9	13 $\pm$ 3.5	
		100.0	93 $\pm$ 10.3	14 $\pm$ 1.0	36 $\pm$ 6.1	18 $\pm$ 5.5	14 $\pm$ 4.4	
		333.3	91 $\pm$ 8.5	9 $\pm$ 4.4	32 $\pm$ 0.0	15 $\pm$ 2.1	21 $\pm$ 9.0	
		1000.0 <sup>c</sup>	—	19 $\pm$ 2.5	39 $\pm$ 4.0	17 $\pm$ 8.0	7 $\pm$ 3.8	
陽性対照		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
		濃度 <sup>b</sup>	10	10	10	10	10	
		コロニー数/plate	1993* $\pm$ 162.2	188* $\pm$ 11.0	383* $\pm$ 57.3	1503* $\pm$ 126.8	304* $\pm$ 38.6	

<sup>a</sup> : 3 プレートの平均値

<sup>b</sup> :  $\mu\text{g}/\text{plate}$

<sup>\*</sup> : 明らかな陽性である

<sup>c</sup> : 残留農薬安全性評価委員会で「1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で生育阻害がない場合があるが、これ以上の用量で試験しなかった理由を述べる」と要求があり、以下のように回答しています(資料 33 に添付)。

全ての菌株について、10.0、33.3、100.0、333.3、1000.0、5000.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で予備試験をした結果、S-9 の有無に係わらず全ての菌株において、1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の濃度で生育阻害が認められたので、本試験の最高濃度を 1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とした。

— : バックグラウンド菌叢の生育阻害あり、自然復帰変異コロニーなし。

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

4-NOPD : 4-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン

MMS : メチルメタンサルフォネート

2-AA : 2-アミノアントラセン

表-2. 実験 II

S9 Mix の有無	薬剤	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	復帰変異コロニー数/plate (平均 <sup>a</sup> ±SD)				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100 <sup>c</sup>	TA1535	WP2	TA98	TA1537
-	陰性対照		84±7.1	11±1.2	31±3.1	22±1.5	5±2.3
	溶媒対照	(DMSO)	82±2.1	12±2.6	33±5.0	17±3.8	7±2.3
	Z7	1.0	86±2.9	10±2.1	37±7.2	16±4.5	6±1.5
		10.0	81±4.9	11±3.5	34±4.6	16±3.0	7±2.6
		33.3	82±2.5	12±3.6	37±6.0	16±1.2	6±1.7
		100.0	85±4.0	11±2.5	35±3.5	16±2.6	4±2.5
		333.3	84±5.3	14±5.9	38±6.7	12±6.7	6±2.3
		1000.0 <sup>c</sup>	89±6.8	3±0.0	27±10.1	3±1.5	-
	陽性対照	名称	NaN <sub>3</sub>	NaN <sub>3</sub>	MMS	4-NOPD	4-NOPD
		濃度 <sup>b</sup>	10	10	10	50	50
コロニー数/plate		630* ±56.0	504* ±70.1	815* ±82.9	1019* ±89.5	167* ±35.1	
+	陰性対照		81±5.3	14±2.5	37±5.9	20±3.5	6±1.0
	溶媒対照	(DMSO)	81±10.1	15±4.0	38±6.1	16±5.0	8±0.6
	Z7	1.0	94±3.8	15±4.0	43±4.6	21±5.5	7±1.5
		10.0	92±8.1	16±0.6	34±1.0	15±3.5	7±1.0
		33.3	94±2.6	15±4.7	30±8.0	19±7.1	6±4.4
		100.0	94±3.0	16±0.6	40±4.6	12±2.1	6±1.2
		333.3	90±7.6	15±0.6	39±2.6	14±4.4	5±3.8
		1000.0 <sup>c</sup>	94±6.5	13±1.2	32±5.1	17±3.5	7±1.2
	陽性対照	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		濃度 <sup>b</sup>	10	10	10	10	10
コロニー数/plate		1295* ±23.7	215* ±23.2	458* ±6.4	1265* ±180.5	470* ±47.2	

<sup>a</sup> : 3 プレーットの平均値      <sup>b</sup> :  $\mu\text{g}/\text{plate}$       \* : 明らかな陽性である

<sup>c</sup> : 残留農薬安全性評価委員会で「1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で生育阻害がない場合があるが、これ以上の用量で試験しなかった理由を述べる」と要求され、以下のように回答しています(資料 33 に予備試験成績を添付)。

全ての菌株について、10.0、33.3、100.0、333.3、1000.0、5000.0  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で予備試験をした結果、S-9 の有無に係わらず全ての菌株において、1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の濃度で生育阻害が認められたので、本試験の最高濃度を 1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とした。

- : バックグランド菌叢の生育阻害あり、自然復帰変異コロニーなし。

NaN<sub>3</sub> ; アジ化ナトリウム      4-NOPD ; 4-ニトロ-o-フェニレンジアミン  
MMS ; メチルメタンサルフォネート      2-AA ; 2-アミノアントラセン

### 3. 製剤を用いた毒性試験

#### 3-1 急性毒性試験

##### 3-1-1 50%水和剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 34)

試験機関：(株)三菱化成安全科学研究所(日本)

[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検体の純度：50%水和剤

〔組成〕 検体

界面活性剤、鉱物質微粉等

試験動物：SD 系ラット(5 週齢)、投与開始時体重範囲 雄：124～137g、雌：100～115g、1 群  
雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

方法：検体を精製水に懸濁して、経口投与した。投与前日の夕方から絶食し、投与後 3 時間に給餌を再開した。

試験項目：一般症状及び生死を 14 日間観察した。体重は投与直前、投与後 3、7 及び 14 日目と死亡時に測定した。死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	雄：2500、3500、5000、7100、10000 雌：2500、3500、5000、7100、10000
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄：6000(4500～7800) 雌：3600(3300～4000)
死亡開始時間及び終了時間	投与後 1 日目から開始 投与後 2 日目に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後 30 分から発現 投与後、雄では 4 日 雌では 3 日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雄：3500 雌：2500

主な一般症状としては、雌雄共に自発運動量の減少、流涎、赤色鼻汁及び赤色流涙が認められた。

剖検所見では、死亡動物の全例に心房の拡張、多数例に胃腸管への検体残留及び腺胃部粘膜の出血等が、又、観察終了後の生存動物では、5000mg/kg 以上の群の雄で精巢の小型化が認められた。

3-1-2 50%水和剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 35)

試験機関：(株)三菱化成安全科学研究所(日本)

[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検体の純度：50%水和剤

[組成] 検体

界面活性剤、鉱物質微粉等

試験動物：ICR 系マウス(Crj:CD-1)(5 週齢)、投与開始時体重範囲 雄：28.9~30.5g 雌：  
21.8~23.0g、1 群雌雄各 5 匹

試験期間：14 日間観察

方法：検体を精製水に懸濁して投与した。投与日に約 5 時間絶食し、投与後 3 時間に給餌を再開した。

試験項目：一般症状及び生死を 14 日間観察した。体重は投与直前、投与後 3、7 及び 14 日目と死亡時に測定した。死亡動物及び観察終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	雄：5000 雌：5000
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄：>5000 雌：>5000
死亡開始及び終了時間	死亡例は認められなかった。
症状発現時間及び消失時間	雄：投与後 6 時間に開始 投与後 1 日に消失 雌：投与後 0.5 時間に開始 投与後 2 日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雄：>5000 雌：>5000

一般症状としては、雄で立毛、雌で自発運動の減少、横たわり、反転運動、不整呼吸、流涎、流涙及び着色軟便が認められた。

剖検所見では雌雄共に異常は認められなかった。



3-1-3 50%水和剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 36)

試験機関：(株)三菱化成安全科学研究所(日本)  
[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検体の純度：50%水和剤

〔組成〕 検体

界面活性剤、鉱物質微粉等

試験動物：SD系ラット(Crj:CD)、雄6週齢 雌9週齢、投与開始時体重範囲 雄：221 ~242g、  
雌：248~271g、1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：投与直前の体重を基に2000mg/kgとなる量の検体を秤量し、1gあたり1mLの注射用蒸留水で湿らせたものを、背部に24時間塗布した。

試験項目：一般症状、生死及び投与部位を14日間観察した。体重は投与直前、投与後3、7及び14日目に測定した。観察終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経皮
投与量(mg/kg)	雄：2000 雌：2000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雄：>2000 雌：>2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例は認められなかった。
症状発現及び消失時間	一般症状及び投与部位に異常は認められなかった。
最大無作用量(mg/kg)	雄：2000 雌：2000
死亡例の認められなかった最高投与量(mg/kg)	雄：2000 雌：2000

一般症状は投与部位を含め、異常は認められなかった。

剖検所見においても投与部位を含め、異常は認められなかった。

### 3-2 皮膚及び眼に対する刺激性試験

#### 3-2-1 50%水和剤のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 37)

試験機関：(株)三菱化成安全科学研究所(日本)  
[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検体の純度：50%水和剤

〔組成〕 検体

界面活性剤、鉱物質微粉等

試験動物：日本白色種ウサギ(11 週齢)、投与開始時体重範囲 2.2~2.7kg、1 群雄 6 匹

試験期間：72 時間観察

方法：検体 0.5g を注射用蒸留水 0.25mL で湿らせ、刈毛した動物の背部皮膚(6cm<sup>2</sup>)に適用し、半閉塞貼付した。塗布時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は水洗により除去した。

結果：

項目	最 高 点 最 評 点	投 与 後 時 間			
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
紅 斑	4	0	0	0	0
浮 腫	4	0	0	0	0

50%検体水和剤はウサギの皮膚に対して刺激性を示さなかった。

3-2-2 50%水和剤のウサギを用いた眼一次刺激性

(資料 38)

試験機関：(株)三菱化成安全科学研究所(日本)  
[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検体の純度：50%水和剤

[組成] 検体

界面活性剤、鉱物質微粉等

試験動物：日本白色種ウサギ(11 週齢)、投与開始時体重範囲 2.2~2.6kg、1 群雄 9 匹

試験期間：7 日間観察

方法：検体 0.1g を右眼に投与し、非洗眼群 6 匹は投与後 24 時間無処理とし、洗眼群 3 匹は投与 2 分後から 30 秒間洗眼を行った。

観察項目：投与後 1、24、48、72 時間及び 4、7 日後に、角膜、虹彩及び結膜の刺激性変化を観察し、農水省ガイドライン及び Draize 法に従って採点した。

結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

項目		最高 評点	投 与 後 時 間						
			1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	4 日	7 日	
非洗 眼群 (6 匹 平均)	角膜 汚濁 範囲	4	1.0 2.0	0.5 0.5	0.3 0.3	0 0	0 0	0 0	
	虹 彩	2	0.2	0	0	0	0	0	
	結 膜	発 赤	3	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0	0
		浮 腫	4	1.0	1.0	0	0	0	0
		分泌物	3	1.7	1.0	0	0	0	0
	合 計*	110	18.5	8.5	3.7	2.0	2.0	0	
洗眼 群 (3 匹 平均)	角膜 汚濁 範囲	4	1.0 2.7	0.7 0.7	0 0	0 0			
	虹 彩	2	0	0	0	0			
	結 膜	発 赤	3	1.0	1.0	0	0		
		浮 腫	4	1.0	0	0	0		
		分泌物	3	0	0	0	0		
	合 計*	110	17.3	5.3	0	0			

\*Draize 法による評価点(最高 110 点)

非洗眼群で適用 1 時間後に角膜混濁、虹彩の充血、結膜の発赤・浮腫が最大で合計評点 18.5 で中等度刺激性が観察された。この刺激は漸減し 7 日以内には完全に消失した。

洗眼群でも適用 1 時間後に最大の刺激(合計評点 17.3)が観察されたが、48 時間以内に刺激は消失した。

以上の結果から、50%検体水和剤はウサギの眼粘膜に対して可逆性の中等度の一次刺激性があった。洗眼効果が認められた。

### 3-3 皮膚感作性試験

#### 3-3-1 50%水和剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 39)

試験機関：(株)三菱化成安全科学研究所(日本)

[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検体の純度：50%水和剤

〔組成〕 検体

界面活性剤、鉍物質微粉等

試験動物：Hartley 系モルモット(6 週齢)、体重範囲 397~461g、検体投与群 20 匹、検体対照群 10 匹、DNCB 投与群及び DNCB 対照群には各 5 匹を用いた。

試験期間：48 時間観察

方法：試験は Buehler 法の変法によって行った。本試験に先立って、用量を決定するために予備試験を行った。予備試験において、塗布可能な最大量であった検体 0.4g と注射用蒸留水 0.2mL の混合物、10%及び 1%(w/v)の懸濁液のそれぞれについて調べた結果、いずれも皮膚一次刺激性は認められなかった。よって本試験では、検体 0.4g と注射用蒸留水 0.2mL の混合物を投与することとした。

感作：動物の左腹側部を刈毛し、検体 0.4g を注射用蒸留水 0.2mL と混合した投与試料を約 2×2cm パッチに塗布し、これを皮膚に 6 時間閉塞貼布した。以上の処置を 1 週間間隔で 3 回実施した。陽性対照群には、0.1% DNCB 溶液 0.4mL を上記と同様の条件下で閉塞貼布した。

惹起：最終感作暴露後 13 日に行った。動物の右腹側部を刈毛し、検体 0.4g を注射用蒸留水 0.2mL と混合した投与試料を約 2×2cm パッチに塗布し、これを皮膚に 6 時間閉塞貼布した。陽性対照群には、0.1%DNCB 溶液 0.4mL を上記と同様の条件下で閉塞貼布した。

観察項目：誘発 24 時間及び 48 時間後に適用部位の紅斑・浮腫などの有無を肉眼的に観察した。評価基準を次に示す。

皮膚反応	評点
紅斑なし	0
弱い散在性紅斑	1
中程度のび慢性紅斑	2
強度の紅斑および浮腫	3

結果：観察時間における感作陽性率を次表に示す。

検体処理群において惹起暴露終了後 24 時間及び 48 時間のいずれの観察時にも、陽

性の皮膚反応は認められなかった。

一方、陽性対照群においては全動物にいずれの観察時にも評価値 2 の皮膚反応が認められた。

以上の結果から、検体 50%水和剤の皮膚感作性は陰性であると判断する。

投与群	供試動物数	惹起暴露後時間		陽性率 %
		24 時間	48 時間	
検体群	20 匹	0	0	0
検体対照群	10 匹	0	0	0
DNCB 群	5 匹	2.0 (5/5)	2.0 (5/5)	100
DMCB 対照群	5 匹	0	0	0

表中の評点は各投与群のすべての動物の平均値。

( )内の数値は、感作反応を示した動物数/全動物数。

Ⅹ. 動植物及び土壌等における代謝分解

<代謝分解試験一覧表>

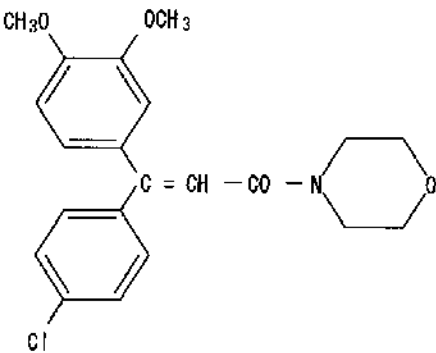
資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	頁																												
M-1 GLP		胆管カニューレシオン ラット (♂♀)  14C-標識体 (カロフェニル環)	<u>胆汁排泄/胆汁代謝物</u> 投与：10, 500 mg/kg 単回	(2日間) 排泄：主排泄経路は胆汁で、低用量で 86~87%、高用量で 32~54%が排泄された。高用量では糞排泄も増加し、胆汁排泄の半減期も長く排泄経路が飽和している。 吸収率：低用量で 92~95%、高用量で 51~72%であった。 代謝物：胆汁から脱メチル体 (B 及び C) がアグリゲーションして同定された。	リサーチ アンド コンサルティング 社 (1990 年)	222																												
M-2 GLP	動物代謝	ラット (♂♀)  14C-標識体 (カロフェニル環) 及び 非標識体	A 群：呼吸排泄 (24 時間) 投与：500 mg/kg 単回  B/D 群：糞排泄、体内分布 (7 日間) 投与：10, 500 mg/kg 単回  C 群：糞排泄、体内分布 (7 日間) 投与：10mg/kg 非標識体 14 回 投与後標識体単回投与  E 群：組織からの経時的消失 (最終投与後 5 日間) 投与：10mg/kg 標識体 7 日間反復投与	呼吸：14C は検出されず  排泄：回収放射能のうち 99.5%以上が糞尿から排泄。低用量では雄で 92~94%が、雌で 83~86%が、又高用量では雄で 93%、雌で 89%が糞に排泄され、尿からの排泄は少なかった。低用量では、雌の尿中排泄量は雄の約 2 倍であった。連投による排泄への影響はなかった。高用量では糞排泄も増加し、吸収経路が飽和に達している。  前投与の影響：排泄、組織中分布共に影響なかった。  組織中分布：組織中の残留は極めて少ない。  組織からの経時的消失：14C 濃度は、最終投与後 1 時間で Cmax に達し、その後速やかに減少した。屠殺 24 時間後の雌の組織中濃度は雄より多かった。 胃腸管の他は肝、腎、脾、副腎、脂肪の残留が多かった。  分解経路：主経路は の脱メチル化 (B/C) で、 の酸化物 (D/E) も同定。	シエル社 (1990 年)	228																												
M-3 GLP		ラット (♂♀)  14C-標識体 (カロフェニル環)	<u>尿代謝物の同定 (上記 B 群の試料を使用)</u> 投与：10 mg/kg 単回投与	代謝物：尿から (H)。他に (E)、(G) 及び (I) を同定。	シエル社 (1991)	234																												
M-4 GLP		ラット (♂♀)  14C-標識体 (カロフェニル環)	<u>糞代謝物の同定</u> 投与：50 mg/kg 単回投与	代謝物：糞からジメチル (A)、(K)、(B/C)、(F) を検出。	サイファミッド社 (1994)	236																												
M-5 GLP		ラット (♂♀)  14C-標識体 (カロフェニル環)	<u>血中濃度推移</u>  投与：10, 500 mg/kg	<table border="1"> <thead> <tr> <th>投与量 (mg/kg)</th> <th>性</th> <th>Tmax (時間)</th> <th>Cmax (μg/g)</th> <th>t<sub>1/2</sub> (時間)</th> <th>AUC<sub>0-∞</sub> (μg·hr/g)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">10</td> <td>雄</td> <td>2.8</td> <td>0.76</td> <td>59.2</td> <td>10.56</td> </tr> <tr> <td>雌</td> <td>1.4</td> <td>0.96</td> <td>68.0</td> <td>14.96</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">500</td> <td>雄</td> <td>11.0</td> <td>25.02</td> <td>65.4</td> <td>673.56</td> </tr> <tr> <td>雌</td> <td>14.7</td> <td>39.46</td> <td>75.8</td> <td>1211.40</td> </tr> </tbody> </table>	投与量 (mg/kg)	性	Tmax (時間)	Cmax (μg/g)	t <sub>1/2</sub> (時間)	AUC <sub>0-∞</sub> (μg·hr/g)	10	雄	2.8	0.76	59.2	10.56	雌	1.4	0.96	68.0	14.96	500	雄	11.0	25.02	65.4	673.56	雌	14.7	39.46	75.8	1211.40	Xeno-Biotic (1995)	240
投与量 (mg/kg)	性	Tmax (時間)	Cmax (μg/g)	t <sub>1/2</sub> (時間)	AUC <sub>0-∞</sub> (μg·hr/g)																													
10	雄	2.8	0.76	59.2	10.56																													
	雌	1.4	0.96	68.0	14.96																													
500	雄	11.0	25.02	65.4	673.56																													
	雌	14.7	39.46	75.8	1211.40																													

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	頁
M-6 GLP	動物代謝	ラット (♂♀)  <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環)	体内分布  投与: 10, 500 mg/kg	(10 mg/kg 投与) 投与 0.5~1.5 時間後で、 <sup>14</sup> C 濃度が血漿より、高い組織は肝 (9~14 μg/g)、脾 (9~14 μg/g)、腎 (2~3 μg/g) 及び脂肪 (1~3 μg/g)。168 時間後には肝 (0.1~0.2 μg/g) を除き、いずれも検出限界以下に減少した。 (500 mg/kg 投与) 投与 8 時間後で、 <sup>14</sup> C 濃度が血漿より、高い組織は肝、脾、腎及び脂肪。168 時間後には肝を除き、いずれも 1.8 μg/g 以下に減少した。	Xeno-Biotic (1995)	242
M-7 GLP	植物代謝	ぶどう  <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環)	処理: 散布 部位: 果実、葉 処理量: 900 a.i mg/L の希釈液を 9~10 日間隔で 4 回処理	(最終散布 35 日後採取) 果実: A (12.6 ppm, 86.5%TRR) 葉: A (74.8 ppm, 83%TRR)、J (1.4 ppm, 1.5%TRR) 放射能の大部分は、表面洗液 (果実 72.5%TRR、葉 95.0%TRR) に回収された。	シエル社 (1990)	248
M-8 GLP		じゃがいも  <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環)	処理: 散布 部位: 茎葉 処理量: 600 a.i mg/L の希釈液を 40 mL/株で、約 10 日間隔で 4 回処理	(最終散布 7 日後採取) 地上部: A (16.0 ppm, 68%TRR)、J (<0.1 ppm, <0.5%TRR) 塊茎: <sup>14</sup> C 濃度は微量であり、皮で 0.011~0.183 ppm 及び剥皮した塊茎で 0.004~0.011 ppm	シエル社 (1990)	253
M-9 GLP		レタス  <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環)	処理: 散布 処理量: 100~128 g ai/10a を 10 日間隔で 4 回処理	(最終散布 4 日後採取) 地上部: A (93.3 ppm, 91.5 %TRR)、B (0.5 ppm, 0.5%TRR)、J (0.5 ppm, 0.5%TRR) 処理時より E 体の存在比が増えていた。	Corning Hazleton (1995)	257
M-10 GLP	土壌代謝	砂壤土 (好氣的畑条件)  <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環)	処理: 添加 (770 ン溶液) 処理量: 5 mg/kg 乾土	(処理 60 日後) A: 42.0%TAR、未同定: 6.1%TAR、CO <sub>2</sub> : 2.0%TAR、非抽出: 41.8%TAR (処理 362 日後) A: 2.9%TAR、未同定: 4.3%TAR、CO <sub>2</sub> : 17.0%TAR、非抽出: 56.9%TAR E/Z 比: 当初、90 日後	シエル社 (1990)	261
M-11 GLP		微砂質堆積土 (好氣的畑条件)  <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環)	処理: 添加 (770 ン溶液) 処理量: 4.9 mg/kg 乾土	(処理 90 日後) A: 47.0%TAR、未同定: 5.2%TAR、CO <sub>2</sub> : 5.3%TAR、非抽出: 31.2%TAR (処理 365 日後) A: 11.9%TAR、未同定: 6.9%TAR、CO <sub>2</sub> : 27.9%TAR、非抽出: 43.2%TAR E/Z 比: 当初、365 日後		
M-12 GLP		砂壤土 (好氣的畑条件で 90 日後、嫌氣的湛水条件)  <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環)	処理: 添加 (770 ン溶液) 処理量: 5.6 mg/kg 乾土	(好氣的、処理 30 日後) A: 52.6%TAR、B/C: <0.5%TAR、未同定 14%TAR、CO <sub>2</sub> : 0.6%TAR、非抽出: 21.2%TAR (嫌氣的、処理 29 日後) A: 4.0%TAR、B/C: 2.5%TAR、未同定 12.2%TAR、CO <sub>2</sub> : 0.9%TAR、非抽出: 67.0%TAR E/Z 比: 当初、好氣的条件で 30 日後		

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	頁
M-13 GLP	土壌代謝	微砂質塩土 (好氣的畑条件、嫌氣的湛水条件) <sup>14</sup> C-標識体 (モルリン環)	処理：添加 (7700 溶液) 処理量：4.9 mg/kg 乾土	(好氣的、処理 61 日後) A：62.1% TAR、未同定：3.5% TAR、 CO <sub>2</sub> ：2.2% TAR、非抽出：20.8% TAR (嫌氣的、処理 60 日後) A：14.3% TAR、未同定：8.1% TAR、 CO <sub>2</sub> ：0.3% TAR、非抽出：72.5% TAR	シエル社 (1990)	273
E-1 GLP	加水分解性	滅菌緩衝液 (pH4、7、9) <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環)	70、90°C	(10 週間) 分解は認められず、安定	RCC (1989)	278
E-2 GLP	水中光分解性	滅菌緩衝液 (pH5) <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環/モルリン環)	処理濃度：約 5ppm/酢酸緩衝液 照度：489 ~ 490 W/m <sup>2</sup> /21.5°C/キセノンランプ	緩衝液中の半減期： クロロフェニル環 <sup>14</sup> C-標識体：107 日 モルリン環 <sup>14</sup> C-標識体：86 日	BASF (2001)	279
E-3 GLP	水中光分解性	滅菌自然水 (pH7.1) <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環)	処理濃度：3ppm 照度：603W/m <sup>2</sup> /25°C キセノンランプ	自然中の半減期：98 日	BASF (2005)	283
E-4	水中光分解性	滅菌蒸留水 自然水 非標識体	処理濃度：0.60 ~ 0.62 mg/L 7700 溶液 照度：950 W/m <sup>2</sup> /25°C /キセノンランプ	t <sub>1/2</sub> (滅菌蒸留水) E 体：>1000 時間 (暗所、照射) Z 体：>1000 時間 (暗所、照射) EZ 体：>1000 時間 (暗所、照射) (自然水) E 体：110 時間 (照射)、740 時間 (暗所) Z 体：170 時間 (照射)、>1000 時間 (暗所) EZ 体：170 時間 (照射)、>820 時間 (暗所)	(財) 化学検査協会 (1993)	286
E-5 GLP	土壌吸着性	微砂質塩土、砂塩土、砂土、微砂質砂土 <sup>14</sup> C-標識体 (クロロフェニル環)	濃度：0.0408、0.212、1.016、4.920 mg/L	k <sub>d</sub> ：2.72~8.51 k <sub>oc</sub> ：316~515	シエル社 (1991)	288
E-6		黒ぼく土 細粒グライ土 褐色火山灰 砂丘未熟土 非標識体	濃度：0.737、1.474、3.685、7.37 mg/L	k <sub>d</sub> ：2.74~22.1 k <sub>oc</sub> ：183~2170	株式会社 化学分析コンサルタント (1993)	291



〈代謝分解物の名称及び構造式一覧表〉

記号 (名称) 由来	コード番号	構造式
<p style="text-align: center;">A ジメトル: 親化合物</p>		<div style="text-align: center;">  <p style="text-align: center;">化学名 : (E, Z) 4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-acryloyl]-morpholine</p> </div>
<p style="text-align: center;">B</p>		
<p style="text-align: center;">C</p>		

記号 (名称) 由来	コード番号	構造式
D		
E		
F		

記号 (名称) 由来	コード番号	構造式
G		
H		
I		

記号 (名称) 由来	コード番号	構造式
J		
K		

1. 動物における代謝分解

1.1 胆管カニキュレーションを施し、単回投与したラットにおける代謝試験 (資料 M-1)

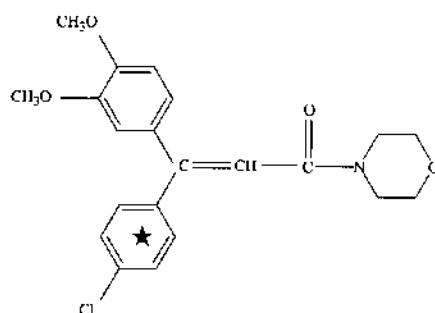
試験機関：リサーチ・アント・コンサルティング・カンパニー(スイス)

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

供試標識化合物：

化学構造：



★：標識位置：クロロフェニル環を  $^{14}\text{C}$  で均一に標識

化学名：(E, Z) 4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxy-phenyl)-acryloyl]  
-morpholine

放射化学的純度：

比放射能：

E/Z 異性体比：

標識位置の設定理由：

供試動物：Sprague Dawley CD ラット(雄約 6 週齢、雌約 9 週齢)、体重範囲  
雄 199~230g、雌 195~230g、1 群雌雄各 6 匹

方 法：

- (1) 投与方法：1 夜絶食させ、胆管カニキュレーションを施した雌雄ラットに  
用いて懸濁した検体を 2 用量(10mg/kg 又は 500mg/kg)で単回強制経口  
投与した。

試験群の構成は次のとおりであった。

群	性別	設定用量 (mg/kg)	実投与量 (mg/kg)	比放射能 (MBq/g)
1	雄	10	10.8	366
2	雌	10	11.2	366
3	雄	500	503	8.14
4	雌	500	402	7.03

(2) 吸収・排泄、体内分布：

- ①胆汁：総胆管からカテーテルにより投与48時間後まで3時間間隔で採取した。
- ②尿・糞：投与24時間及び48時間後に採取し、尿量及び糞重量を記録した。
- ③消化管及び残部体組織：屠殺時に摘出した内容物を含む胃及び腸管ならびに残部体組織を採取した。
- ④ケージ洗液：試験終了時にケージを水及びアセトンで洗浄し、採取した。
- ⑤放射能の測定：胆汁及び尿は直接液体シンチレーションカウンター(LSC)で、糞、消化管、残部体組織及びケージ洗液は均質化して燃焼処理し、発生した<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を捕集し、捕集液の放射能をLSCで計測した。

(3) 代謝物の分布及び代謝物の同定：

胆汁を、放射能測定値に基づいて、性別及び用量別に次の採集時間別にプールした。即ち、低用量群については、0～6、6～15及び15～27時間、高用量群については、0～12及び12～27時間。各胆汁プール中の代謝物をTLCで分離し、代謝物の分布を求めた。更に、代謝物の同定及び特性を明らかにするために、選択した胆汁プールについて塩酸処理及び酵素

処理を行い、TLC分析に供した。代謝物の同定及び定量は、TLC及びHPLCで行った。

結 果：

1) 吸収、排泄、体内分布：放射能の排泄パターン及び回収率を表1に示す。

表1 放射能の排泄率及び回収率(投与放射能に対する%)

検査対象/ 投与後時間	低用量群(雄) (10.8mg/kg) 4匹平均	低用量群(雌) (11.2mg/kg) 3匹平均	高用量群(雄) (503mg/kg) 3匹平均	高用量群(雌) (402mg/kg) 3匹平均
尿				
0-24	6.4	6.3	9.6	7.5
24-48	0.2	0.6	5.2	1.1
計	6.6(6)	6.9(7)	14.8(16)	8.6(9)
糞				
0-24	} 7.6	} 4.0	21.8	3.5
24-48			—	—
計	7.6(7)	4.0(4)	21.8(24)	3.5(4)
胆汁				
0-24	93.9	90.5	44.0	27.6
24-48	1.2	2.1	5.1	3.6
計	95.1(86)	92.6(87)	49.1(54)	31.2(32)
ケージ洗液	0.5	0.3	0.4	0.9
総排泄率	109.8(99)	103.8(98)	86.1(95)	44.2(45)
残部体組織	0.6	1.2	1.6	10.1
消化管	0.4	1.1	3.3	44.1(45)
総回収率	110.8(100)	106.1(100)	91.0(100)	98.4(100)
吸収率	102.3(92)	100.7(95)	65.5(72)	49.9(51)

吸収率：尿、胆汁及び残部体組織の放射能の投与放射能に対する%

( )内の数値：総回収率に対する割合%

総回収率は投与放射能に対し低用量で 106~111%、高用量で 91~98%であった。

吸収率は低用量で総回収放射能の 92~95%、高用量で 51~72%であった。その多くは胆汁経由で、低用量では 86~87%、高用量では 32~54%が排泄された。

尿糞への排泄は低用量ではほぼ同程度で総回収放射能の 4~7%と少なかったが、高用量では糞への排泄(雄 24%)、又は消化管中の滞留(雌 45%)放射能が高く、吸収/排泄経路は飽和状態にあると考えられた。

表 2. 胆汁排泄の半減期

検査対象/ 投与後時間	低用量群(雄) (10.8mg/kg) 4匹平均	低用量群(雌) (11.2mg/kg) 3匹平均	高用量群(雄) (503mg/kg) 3匹平均	高用量群(雌) (402mg/kg) 3匹平均
半減期(時間)	2.9	3.4	11.0	5.7

半減期は投与 6~24 時間に排泄された胆汁の一次反応動態から算出した。

胆汁排泄の半減期は低用量で約 3 時間と短く、高用量では雄で約 11 時間、雌で約 6 時間と長かった。

## (2) 代謝物の分布及び同定

次表のようにプールした胆汁試料を代謝物の分析に供した。これらは胆汁排泄量の 95%以上を占めていた。

プール 試料番号	採取期間 (時間)	低用量群 (雄) (10.8mg/kg)	低用量群 (雌) (11.2mg/kg)	採取期間 (時間)	高用量群 (雄) (503mg/kg)	高用量群 (雌) (402mg/kg)
1	0-6	65.2	64.4	0-12	25.7	21.6
2	6-15	30.9	20.5	12-27	21.3	8.2
3	15-27	3.8	6.2	-	-	-
プール試料 合計*		99.9 (99.4)	91.1 (98.4)		47.0 (95.7)	29.8 (95.5)
胆汁排泄量 合計		100.5	92.6		49.1	31.2

( )内の数値は胆汁経由で排泄された放射能の割合%、その他は投与放射能に対する割合%

\* 代謝物の分析に使用した

### 1) 未処理胆汁中の代謝物の分布：TLCにより分離された代謝物の画分を表3に示す。

低及び高用量群の雌雄で同様な代謝物の分布が認められた。画分 B1 及び B2 は高用量群では認められず、また、B6 は高用量群でのみ認められた。

主要画分は B7 で低用量では投与量の 44~57%、高用量では 13~16%を占めていた。ついで、B9(低用量 11~17%、高用量 1~11%)、B5/B6(低用量 9~14%、高用量 8~11%)、B4(低用量 9~10%、高用量 2~3%)が多く、その他の画分は 5%を越えるものはなかった。

表 3 未処理胆汁中の代謝物の分布 (投与放射能に対する%)

代謝物画分 (コード)	低用量群(雄) (10.8mg/kg)	低用量群(雌) (11.2mg/kg)	高用量群(雄) (503mg/kg)	高用量群(雌) (402mg/kg)
B1	1.2	0.1	—	—
B2	0.5	0.5	—	—
B3	0.2	}	—	0.8
B4	10.1		9.1	3.3
B5	13.6	8.9	}	}
B6	—	—		
B7	44.4	57.2	16.4	12.7
B8	3.8	—	2.2	1.8
B9	17.3	10.7	11.2	1.3
B10	4.6	3.3	2.3	3.1
B11	4.2	1.3	0.7	0.2
計	99.9	91.1	47.0	29.8

(2) 塩酸処理胆汁中の代謝物の分布：

酢酸エチルによる分配：

酸性酢酸エチル相に放射能の大部分が分配された。中性酢酸エチル相及び水相中の放射能は少なく、これ以上の分析はしなかった。

表 4 酢酸エチルによる分配

	低用量群(雄) (10.8mg/kg)	低用量群(雌) (11.2mg/kg)	高用量群(雄) (503mg/kg)	高用量群(雌) (402mg/kg)
有機相				
酸性酢酸エチル	57.6	59.6	21.9	20.0
中性酢酸エチル	1.2	1.6	1.8	0.3
計	58.6	61.2	23.7	20.3
水層	6.4	3.2	2.0	1.3
プールした胆汁の合計	65.2	64.4	25.7	21.6

酸性酢酸エチル相中の代謝物の分布：2 用量群の雌雄とも同様な代謝物の分布が認められた。主要画分は B14 で、低用量では投与量の 23~34%、高用量では約 11~12% を占めていた。ついで、B4 (低用量 9~15%、高用量 3~5%)、B15 (低用量 7~10%、高用量 2~3%) が多く、その他の画分は 5% を越えるものはなかった(表 5)。

表 5 塩酸処理胆汁中の代謝物の分布 (投与放射能に対する%)

代謝物画分 (コード)	同定結果	低用量群(雄) (10.8mg/kg)	低用量群(雌) (11.2mg/kg)	高用量群(雄) (503mg/kg)	高用量群(雌) (402mg/kg)	
B4	未知物質	14.9	8.9	4.8	2.5	
B12*	未知物質	}	}	2.4	2.0	
B13*	未知物質			7.1	5.7	—
B14	Z 67/69			22.7	34.1	11.5
B15	未知物質	9.5	6.6	2.2	3.3	
B16	未知物質	3.2	4.3	1.0	0.9	
計		57.4	59.6	21.9	20.0	

\*：代謝物画分 B1(表 3)に相当



(3) 処理胆汁中の代謝物の分布：

処理、 の放射能は低用量群の 0～15 時間の胆汁で投与放射能の 80～84% (胆汁放射能の>80%)、又高用量群の 0～27 時間の胆汁で、28～43% (胆汁放射能の>90%) が抽出された。

表 6 処理胆汁中の放射能の による分配 (投与放射能に対する%)

画分	低用量群 (雄)			低用量群 (雌)			高用量群 (雄)		高用量群 (雌)	
	10.8mg/kg			11.2mg/kg			503mg/kg		402mg/kg	
	胆汁プール (時間)									
	0-6	6-15	15-27	0-6	6-15	15-27	0-12	12-27	0-12	12-27
有機相：										
酢酸エチル	44.0	19.6	2.4*	50.8	13.7	3.8*	17.1	14.3	17.1	6.0
酢酸エチル**										
-1	11.4	5.7	0.7*	9.5	4.5	1.4*	5.1	4.3	3.1	1.4
-2	2.0*	1.0*	0.1*	1.2*	0.7*	0.3*	0.9*	0.9*	0.5*	0.3*
計	57.4	26.3	3.2	61.5	18.9	5.5	23.1	19.5	20.7	7.7
水相：	7.8	4.6*	0.6*	2.9	1.6*	0.7*	2.6	1.8*	0.9	0.5*
プールした胆汁の合計	65.2	30.9	3.8	64.4	20.5	6.2	25.7	21.3	21.6	8.2

\*：これ以上分析しなかった

\*\*：水相を塩酸性とした後の酢酸エチル相 (2 回抽出)

酢酸エチル相中の代謝物の分布 (低用量群：0～15 時間胆汁；高用量群：0～27 時間胆汁)：2 用量群の雌雄で同様な代謝物の分布が認められ、B14 が主要画分であった。B17～B21 は 処理後に遊離した。(表 7)。

また、 処理後、 で分配後の水相で B9～B11 が検出されたが、B11 が未処理胆汁と同程度であるのに対して他の画分は著しく減少した。

表 7 処理後、胆汁中の代謝物の分布

(投与放射能に対する%)

代謝物画分(コード)	群 1 (10.8mg/kg 雄)			群 2 (11.2mg/kg 雌)			群 3 (503mg/kg 雄)			群 4 (402mg/kg 雌)		
	胆汁プール(時間)											
	0-6	6-15	計	0-6	6-15	計	0-12	12-27	計	0-12	12-27	計
B4/UN	12.0	6.3	18.3	12.3	6.0	18.3	5.0	4.2	9.2	4.8	1.7	6.5
B14*/ID	22.1	5.9	28.0	40.5	6.1	46.6	10.9	10.1	21.0	14.3	5.1	19.4
B17/UN	—	2.1	2.1	—	1.0	1.0	0.9	0.6	1.5	0.4	0.2	0.6
B18/UN	8.9	5.2	14.1	4.6	3.6	8.2	1.9	1.1	3.0	—	—	—
B19/UN	4.4	2.5	6.9	—	—	—	1.2	1.0	2.2	—	—	—
B20/UN	3.8	1.7	5.5	—	0.6	0.6	1.3	1.0	2.3	—	—	—
B21/UN	4.2	1.6	5.8	2.9	0.9	3.8	1.0	0.6	1.6	0.7	0.4	1.1
合計	55.4	25.3	80.7	60.3	18.2	78.5	22.2	18.6	40.8	20.2	7.4	27.6

UN: 未知物質 ID: Z67/69 と同定

B14, B17, B18 は: グルクロニダーゼの非存在下、37°Cでインキュベートによっても生成

(3) 処理胆汁中の代謝物の分布: 低用量群の雄の 0~6 時間プール胆汁を用い、処理した結果、処理 24 時間後に少量(4.5~7.7%)の画分 B14 及び B17 が遊離したのみであった。これは特異的な硫酸抱合体が存在していないことを示唆している。

以上の結果から、検体は低用量(約 10mg/kg)で経口投与したとき、速やかに吸収され吸収率は 90%以上であった。その 85%以上は胆汁経由で排泄された。又、胆汁排泄の半減期は 3 時間と短かった。40~50 倍の高用量では、胆汁への排泄率は低用量の約 1/2~2/3 と少なく、糞への排泄又は消化管中の滞留放射エネルギーが高かった。半減期は雄で約 11 時間、雌で約 6 時間と長く、吸収/排泄経路は飽和状態にあると考えられた。

2 用量群の雌雄で同様な代謝物の分布(画分 B1~11)が未処理胆汁でみられたが、B1 及び B2 は低用量で、B6 は高用量でのみみられた。B4 は抱合体ではなく、塩酸に不安定であった。未処理胆汁中の大部分の代謝物画分(B3~B10)は であり、B11 は を有しない抱合体であると考えられる。画分 B17~21 は 処理後特異的に遊離した。吸収された検体は効率よく代謝され、大部分は となり、主として胆汁中に排泄されることが明らかとなった。主要なアグリコンは であった。

1-2 ラットにおける生体内動態及び代謝

(資料 M-2)

試験機関：シエル・フォルシュク GmbH(ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

供試標識化合物：

化学構造：

★

★：標識位置：クロロフェニル環を  $^{14}\text{C}$  で均一に標識

化学名：(E, Z) 4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxy-phenyl)  
-acryloyl]-morpholine

放射化学的純度：

比放射能：

E/Z 異性体比：

供試動物：Sprague Dawley CD ラット(雄約 40~50 日齢、雌約 50~60 日齢)、体重範囲  
雄 190~230g、雌 175~200g

方 法：

1) 投与方法：14 時間絶食させた雌雄ラットに 懸濁した検体を 2 用量  
(10mg/kg 又は 500mg/kg) で単回又は反復強制経口投与した。

試験群の構成は次のとおりである。

試験群

群	動物数 (雌雄各)	投 与 処 置	投与量 (mg/kg)	比放射能 (MBq/g)	採取試料
A	1 匹	標識体を単回投与	500	8.63	呼気
B	5 匹	標識体を単回投与	10	90.48	尿、糞、組織
C	5 匹	非標識体を 14 日間前投与した 後、24 時間後に標識体を 単回投与	10	85.87	尿、糞、組織
D	5 匹	標識体を単回投与	500	8.6	尿、糞、組織
E	5 匹	標識体を 7 日間反復投与	10	83.43	尿、糞、組織

2) 吸収・排泄及び体内分布：

①呼気：群 A(標識体高用量単回投与)の呼気を投与後 24 時間にわたって捕集し、放射能  
を測定した。

- ②尿：群 B (標識体低用量単回投与)、C (非標識体低用量 14 日間前投与 + 標識体低用量単回投与) 及び D (標識体高用量単回投与) の尿を標識体投与後 8、24、48、72、96、120、144 及び 168 時間に採集し、放射能を測定した。
- ③糞：群 B、C 及び D の糞を標識体投与後 24、48、72、96、120、144 及び 168 時間に採集し、放射能を測定した。
- ④臓器、組織及び血液：群 B、C 及び D については、投与 7 日後に放血により屠殺して、肝臓、腎臓、脂肪及び残部体組織を採取し、放射能を測定した。群 E (標識体低用量 7 日間反復投与) の雌雄各 1 匹を最終投与終了後 1、6、24、48 及び 120 時間に放血により屠殺して、次の臓器及び組織を採取し、放射能を測定した。  
  
肝臓、腎臓、副腎、子宮、心臓、肺、脳、性腺、脾臓、膵臓、甲状腺、筋肉、脂肪、骨、骨髓、血液、胃、腸、残部体組織。
- ⑤ケージ洗液：試験終了後、ケージをアセトン、メタノール及び水で洗浄し、合わせた各洗液の放射能を測定した。
- ⑥放射能の測定：尿及びケージ洗液は直接液体シンチレーションカウンター (LSC) で測定した。糞は凍結乾燥後、抽出処理 \* 又は燃焼処理後 LSC で測定した。血液については、血漿は直接、血球は脱色及び可溶化処理後 LSC で測定した。臓器及び組織は凍結乾燥し、胃及び腸はアセトンで抽出処理して燃焼処理後 LSC で測定した。残部体組織は可溶化処理後 LSC で測定した。

### 3) 代謝物の分布及び同定

#### (1) 尿及び糞中の代謝物の分布：

群 B、C 及び D の尿を試料採集期間及び性別にプールし、分析可能な放射エネルギーを含む試料を TLC 分析に供した。群 B、C 及び D の糞試料の抽出液は性別、試料採取日及び抽出溶媒別にプールし、分析可能な放射エネルギーを含む試料を TLC 分析に供した。

#### (2) 代謝物の同定：

群 D の尿試料は代謝物の同定に用いた。試料は凍結乾燥し、アセトン及びメタノールで抽出し、TLC 及び HPLC により分離を繰り返して、代謝物画分を分離し、精製物を質量分析に供した。

TLC により分離した極性化合物を  $\beta$ -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼで処理し、TLC 及び HPLC で分析した。

結果：

1) 吸収・排泄、体内分布

(1) 吸収・排泄：

呼吸への排泄： 群 A(高用量単回投与)で、呼吸への排泄を検討した結果、呼吸に放射能は検出されなかった。

放射能の収支： 群 B(低用量単回投与)、C(低用量前投与)及び D(高用量単回投与)における投与後 7 日間の放射能の排泄率、投与 7 日後の組織残留及び総回収率を表 1 に示す。

総回収率は低用量で約 95~100%、高用量で 93~100%であった。

表 1 放射能の尿糞への排泄率の経時変化、組織残留及び回収率(投与放射能に対する%)

投与後時間 (日)	群 B(標識体低用量 単回投与)(10mg/kg)		群 C(非標識体低用量 14 日 間前投与 + 標識体低用量 単回投与)(10mg/kg)		群 D(標識体高用量 単回投与)(500mg/kg)		
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
尿	1 日 <sup>a</sup>	4.93 (2.43)	12.66 (6.82)	5.83 (2.60)	12.53 (6.40)	4.57 (0.91)	6.15 (0.92)
	2	0.51	0.75	1.48	3.11	1.45	2.67
	3	0.07	0.13	0.33	0.51	0.13	1.37
	4	0.03	0.04	0.05	0.08	0.04	0.20
	5	0.01	0.02	0.02	0.04	0.02	0.03
	6	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01
	7	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
	計	5.57	13.62	7.74	16.31	6.23	10.44
糞	1 日	75.09	72.41	65.64	52.35	58.91	33.14
	2	13.10	12.40	16.36	22.31	25.44	39.39
	3	1.43	1.16	6.32	5.12	1.98	13.62
	4	0.24	0.21	0.56	0.58	0.27	2.36
	5	0.10	0.10	0.16	0.15	0.09	0.32
	6	0.06	0.06	0.07	0.07	0.06	0.04
	7	0.05	0.04	0.05	0.03	0.03	0.04
	計	90.07	86.37	89.17	80.61	86.79	88.91
ケージ洗液	0.02	0.05	0.03	0.07	0.04	0.06	
排泄量計	95.66	100.04	96.94	96.99	93.06	99.41	
組織 残留 <sup>d</sup>	肝臓	0.088 (0.118)	0.050 (0.095)	0.111 (0.117)	0.064 (0.105)	0.020 (1.083)	0.043 (3.269)
	腎臓	0.002 (0.015)	0.002 (0.017)	0.002 (0.018)	0.002 (0.024)	0.001 (0.490)	0.002 (0.759)
	脂肪 <sup>b</sup>	0.001 (0.001)	0.003 (0.003)	0.002 (0.002)	0.009 (0.010)	0.002 (0.084)	0.014 (0.847)
	全組織 <sup>c</sup>	0.10 (0.007)	0.08 (0.007)	0.43 (0.024)	0.36 (0.029)	0.13 (0.433)	0.19 (0.839)
	総回収率	95.76	100.12	97.36	97.34	93.19	99.60

<sup>a</sup>: 投与後 8 時間までに排泄された量を示した。

<sup>b</sup>: 推定重量に基づく値

<sup>c</sup>: 全組織は肝臓、腎臓及び脂肪も含む全死体

<sup>d</sup>: 組織中の ( ) の値は  $\mu\text{g/g}$

回収放射能のうち 99.5%以上が糞尿から排泄され、組織中の残留は極めて少なかった。投与された放射能は糞及び尿中に速やかに排泄された。低用量では回収放射能のうち雄

では 92~94%が、雌では 83~86%が、又高用量では雄で 93%、雌で 89%が糞に排泄され、尿からの排泄は少なかった(表 2)。

雌雄の排泄に若干の差が見られ、雌の尿中排泄率は雄と比べて高かった。

単回投与に比し、連投による排泄への影響はみられなかった。

表 2 総回収率を 100 としたときの糞尿への放射能の排泄率

投与後時間 (日)	群 B(標識体低用量単回 投与)(10mg/kg)		群 C(非標識体低用量 14 日 間前投与+標識体低用量 単回投与)(10mg/kg)		群 D(標識体高用量単回 投与)(500mg/kg)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
尿	5.8	13.6	7.9	16.8	6.7	10.5
糞	94.1	86.3	91.6	82.8	93.1	89.3
合計	99.9	99.9	99.5	99.6	99.9	99.8

(2)体内分布： 群 E(低用量 7 日間反復投与)の最終投与後の臓器及び組織中における放射能の分布及び経時的消失を表 3 及び 4 に示す。

全ての試料中の放射能は投与後 1 時間に最高値を示した。最も高い放射能は、胃及び腸を除くと、肝臓に認められ雄で 15  $\mu\text{g/g}$ 、雌で 20  $\mu\text{g/g}$  であった。投与 6 時間後には、殆どの試料で放射能は減少し、24 時間後には 70%以上の減少が認められた。放射能は、投与 2 日後には殆どの試料で投与放射能の 0.01%以下に減少したが、肝臓及び腸でのみ投与放射能の 0.1~0.2%の残留が認められた(表 4 及び 5)。従って、検体及びその代謝物の臓器及び組織への蓄積はないと判断される。

表 3 雄における臓器・組織中放射能の分布及び経時変化(濃度  $\mu\text{g/g}$  及び%)

臓器 組織	群 E(10mg/kg を 7 日間反復投与)									
	1 時間		6 時間		24 時間		48 時間		120 時間	
	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
肝臓	15.10	1.44	4.25	0.43	2.73	0.27	1.30	0.15	0.94	0.09
腎臓	2.44	0.04	0.93	0.01	0.33	<0.01	0.15	<0.01	0.11	<0.01
心臓	1.37	0.01	0.34	<0.01	0.11	<0.01	0.06	<0.01	0.04	<0.01
肺	1.60	0.01	0.29	<0.01	0.14	<0.01	0.06	<0.01	0.05	<0.01
脳	0.07	<0.01	0.03	<0.01	0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
性腺	0.25	<0.01	0.13	<0.01	0.04	<0.01	0.02	<0.01	0.01	<0.01
脾臓	1.08	<0.01	0.25	<0.01	0.11	<0.01	0.08	<0.01	0.05	<0.01
膵臓	5.65	0.03	0.74	<0.01	0.34	<0.01	0.03	<0.01	0.02	<0.01
副腎	2.74	<0.01	0.37	<0.01	0.17	<0.01	0.13	<0.01	0.10	<0.01
甲状腺	—	<0.01	—	<0.01	—	<0.01	—	<0.01	—	<0.01
筋肉	0.54	0.39	0.16	0.14	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
脂肪	1.37	0.15	0.50	0.07	0.15	0.02	0.03	<0.01	0.02	<0.01
骨	0.54	—	0.12	—	0.05	—	0.02	—	0.02	—
骨髓	0.84	—	0.14	—	0.04	—	0.15	—	0.02	—
血液	0.69	—	0.40	—	0.22	—	0.11	—	0.12	—
胃*	247.38	4.17	0.58	0.07	0.85	0.05	0.01	<0.01	<0.01	<0.01
腸*	56.30	8.64	54.95	11.47	7.57	1.29	0.40	0.09	0.07	0.01
残部体 組織	0.74	—	0.23	—	0.07	—	0.06	—	0.03	—

各時点とも 1 匹の値

\*: 内容物を含む

表 4 雌における臓器・組織中放射能の分布及び経時変化(濃度  $\mu\text{g/g}$  及び%)

臓器 組織	群 E (10mg/kg を 7 日間反復投与)									
	1 時間		6 時間		24 時間		48 時間		120 時間	
	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
肝臓	19.65	1.26	7.01	0.57	3.00	0.26	1.28	0.10	0.63	0.06
腎臓	4.45	0.06	1.64	0.02	0.44	<0.01	0.20	<0.01	0.11	<0.01
心臓	2.52	0.01	0.60	<0.01	0.16	<0.01	0.07	<0.01	0.05	<0.01
肺	2.50	0.02	0.63	<0.01	0.16	<0.01	0.08	<0.01	0.06	<0.01
脳	0.41	<0.01	0.10	<0.01	0.02	<0.01	0.01	<0.01	0.01	<0.01
性腺	5.22	<0.01	0.21	<0.01	0.52	<0.01	0.13	<0.01	0.13	<0.01
脾臓	2.42	0.01	0.59	<0.01	0.19	<0.01	0.10	<0.01	0.09	<0.01
膵臓	11.09	0.04	0.94	<0.01	0.51	<0.01	0.09	<0.01	0.05	<0.01
副腎	4.11	<0.01	1.22	<0.01	0.26	<0.01	0.23	<0.01	0.13	<0.01
甲状腺	—	<0.01	—	<0.01	—	<0.01	—	<0.01	—	<0.01
子宮	2.91	0.01	1.05	<0.01	0.46	<0.01	0.10	<0.01	0.04	<0.01
筋肉	1.36	0.76	0.43	0.31	0.06	0.04	0.02	0.01	0.02	0.02
脂肪	5.60	0.50	1.03	0.11	0.29	0.03	0.11	0.01	0.08	0.01
骨	0.92	—	0.20	—	0.05	—	0.02	—	0.03	—
骨髓	1.64	—	0.46	—	0.07	—	0.05	—	0.14	—
血液	1.25	—	0.55	—	0.19	—	0.11	—	0.08	—
胃*	387.40	4.23	0.68	0.08	0.09	<0.01	0.02	<0.01	<0.01	<0.01
腸*	104.94	10.58	63.99	12.23	10.95	1.79	1.07	0.16	0.11	0.02
残部体 組織	1.61	—	0.78	—	0.43	—	0.09	—	0.07	—

各時点とも 1 匹の値 \* : 内容物を含む

## 2) 代謝物の分布及び同定

### (1) 代謝物の分布

尿 : 高用量群(群 D)の尿中代謝物の分布(0~8、8~24 及び 24~48 時間試料)に若干の性差が認められた、即ち、対応する試料採集期間における各画分の相対的な割合が若干異なっていた。

低用量群(群 B 及び C)では、最も極性の高い画分(8~24 時間試料)が高用量群と比較して多かった。また、性差及び非標識体前投与による代謝への影響は単回投与に比し差は認められなかった。雌の尿中の

C)の回収率は 10%以上であると推定された。

糞 : 高用量群の糞の抽出物(0~24 及び 24~48 時間試料)中の代謝物の分布は雌雄で同様であった。糞中放射能の大部分は親化合物であった(雄 : 投与放射能の約 48%、雌 : 約 50%)。このことは、高用量投与ではジメトモルフの吸収が限定されたものであることを示している。

(それぞれ B 及び C)が微量検出された。

低用量群の糞の抽出物(0~24 時間試料)中で最も顕著な代謝物画分は非常に極性の高いものであった。低用量で単回及び非標識体前投与した雌雄で、代謝物の分布に

差は認められなかった。これらの試料では、検体の回収率は5%未満であった。また、B/Cの回収率は、単回投与の雄で約6%、雌で約9%、前投与の雄で約5%、雌で約7%であった。

## (2) 代謝物の同定

群Dの尿試料から、ジメトキシフェニル環の脱メチル化によって生成した代謝物—B/C及び によって生成した代謝物D/Eが単離され、質量分析によって同定された。

最も極性の高い尿中代謝物を で処理することにより、B/Cは殆ど として存在することが見いだされた。HPLC分析の結果、Cが尿中の主要代謝物であること、CとBとの比は9:1であった。

上記の代謝物の他、極性の高い代謝物の同定は不可能であった。

以上の結果の概要は以下のとおりである。

呼吸： $^{14}\text{C}$ は検出されなかった。

排泄：回収放射能のうち99.5%以上が糞尿から排泄された。低用量では雄で92~94%が、雌で83~86%が、又高用量では雄で93%、雌で89%が糞に排泄され、尿からの排泄は少なかった。低用量では、雌の尿中排泄量は雄の約2倍であった。連投による排泄への影響はなかった。高用量では糞排泄も増加し、吸収経路が飽和に達していた。

前投与の影響：排泄、組織中分布共に影響なかった。

組織中分布：組織中の残留は極めて少なかった。

組織からの経時的消失： $^{14}\text{C}$ 濃度は、最終投与後1時間で $C_{\text{max}}$ に達し、その後速やかに減少した。屠殺24時間後の雌の組織中濃度は雄より多かった。胃腸管の他は肝、腎、脾、副腎、脂肪の残留が多かった。

分解経路：主経路は (代謝物B/C)であった。

その他の経路として (代謝物D/E)もみられた。



1-3 ラットにおける尿中代謝物の特性

(資料 M-3)

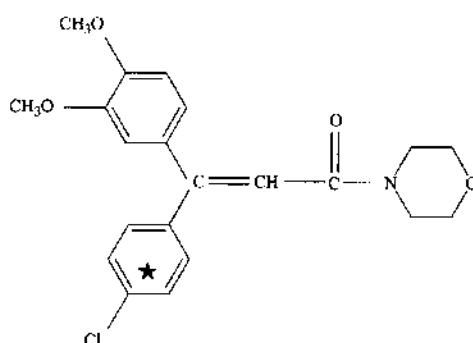
試験機関：シェル・フォルシュンク GmbH (ドイツ)

[EPA 及び OECD の GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

供試標識化合物：

化学構造：



★：標識位置 クロロフェニル環を  $^{14}\text{C}$  で均一に標識

化学名：(E,Z)-4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl]-morpholine

放射化学的純度：

比放射能：

E/Z 異性体比：

供試動物：Sprague Dawley CD ラット、体重範囲 雄 190~230g、雌 175~200g

方法：代謝試験 M-2 における試験群 B (低用量 (10mg/kg) 単回経口投与) の冷凍保存された 0~8 及び 8~24 時間の雌雄別プール尿を試料とし、代謝物の同定及び代謝経路の推定を行った。本試験では、先の試験で示唆された第 2 の代謝経路であるモルホリン環部位の代謝に重点を置いて代謝物の同定を行った。

(1) 予備試験：

(2) 代謝物の同定：

結果：予備試験の結果、得られた代謝物分布が 1989 年の試料採取時に得られたものと同様であり、代謝物は保存条件下で安定であったことが確認された。

酵素処理を行わなかった0~8時間尿試料のTLC分析でH(CUR7117) (構造式は下記の通りである)が非抱合の状態でも存在することを確認した。

#### 代謝物 H

試料の酵素処理後のTLC分析により、Hは0~8時間尿試料で確認されたが、8~24時間尿試料では、極めて微量にすぎなかった。この化合物はHPLCによっても同定された。尿中の含有量は雄で投与量の約0.6%、雌で約2%であった。

酵素処理した0~8時間尿中のHの画分を除去した試料を更にTLCで分離し、標品とのコクロマトグラフィーを行い、目的の領域を抽出して、TLC分析に供した。その結果、G、I及びEの存在が確認された。Eの異性体Dの有無は確認できなかった。

結論として、ジメトモルフの代謝経路は2つ存在する。主経路はののである。それにより生成した代謝物の抱合体が、ラットの尿及び胆汁における主要な化合物である。少量の経路として、がし、続いてによりG、H及びIが生成する(代謝物の構造式はラットにおける推定代謝経路図を参照、239頁)。

1-4 ラットにおける糞中代謝物の特性

(資料 M-4)

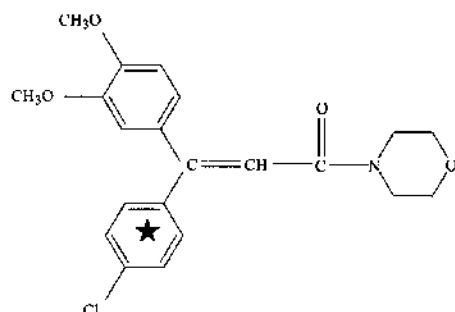
試験機関：(分析)サイアナミッド フォーシュン社(ドイツ)  
(試料の調製) リサーチアンド コンサルティング・カンパニー(スイス)  
[GLP 対応]

報告書作成年：1994 年

目的： 本試験は、糞中残留物の特性に関する追加情報を得ることにあつたので、最も多量の糞中放射能が検出された投与後 0~24 時間の試料に的を絞って行った。

供試標識化合物：

化学構造：



★：標識位置：クロロフェニル環を  $^{14}\text{C}$  で均一に標識

化学名：(E, Z)-4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl]-morpholine

放射化学的純度：

比放射能：

E/Z 異性体比：

供試動物：BRL-HAN、ウイスターラット(雄約 6 週齢、雌約 8 週齢)、1 群雌雄各 10 匹  
体重範囲 雄 147~175g、雌 151~173g、

方法：(1)投与方法：雌雄ラットに 水溶液を用いて懸濁した検体を容量 5mL/kg で 50mg/kg の用量を単回強制経口投与した。

(2)試料の採取：尿は投与後 8、24、48 及び 72 時間に採取し、同時に同じ間隔で代謝ケージを洗浄し、洗液を各採取試料に加えた。糞は 24 時間間隔で 72 時間まで採取した。72 時間後動物は屠殺して、廃棄した。

(3)放射能の測定：尿は蒸留水で希釈後、糞の抽出液は液体シンチレーションカウンター(LSC)で測定した。糞は燃焼処理後 LSC で測定した。

(4)代謝物の同定：

尿試料：投与後 0~8 及び 8~24 時間尿を用い、脱イオン水に溶解した後、TLC(溶

を用い想定代謝物の標品 (9 種) とのコクロマトグラフィーを行い、代謝物の分布を調べた。

糞試料の同定：下記の抽出スキームに従い代謝物の単離、同定を行なった。

結果：(1) 尿・糞中への放射能の排泄：尿から投与放射能の 12~17%、糞から 83~88%が投与後 72 時間までに排泄され、尿・糞への放射能の排泄は既に得られている結果とほぼ同様であった(表 1)。

表 1 投与放射能の排泄(投与放射能に対する回収率%)

採取時期 (投与後時間)	雄		雌	
	糞	尿	糞	尿
0~24	63.0	13.3(3.5)	65.4	11.1(3.4)
24~48	19.4	3.2	31.0	1.8
48~72	2.8	0.6	2.7	0.7
計	85.2(83.3)	17.1(16.7)	99.1(87.9)	13.6(12.1)
合計	102.3(100)		112.7(100)	

( )内の数値は回収率を 100 としたときの割合

(2) 尿中代謝物の分布：TLC を用いて行った 0~24 時間尿の代謝物の分布は、今までに得られたものと同様であると考えられた。

(3) 糞中放射能の分配：採取時期別に糞試料を で分配した結果、放射能の抽出性に差はみられなかった(表 2)。

表 2 による糞中放射能の分配(試料中の放射能に対する分配率%)

採取時期 (投与後 時間)	雄			雌		
0~24	74.02	9.11	16.87	72.95	12.1	14.95
24~48	69.92	10.33	19.75	72.42	10.71	16.86
48~72	68.44	8.75	22.81	75.72	7.34	16.94

(4) 糞中代謝物の同定：雌雄ラットの 0~24 時間に得られた糞中代謝物を同定したところ、表 3 の結果を得た。

表 3 糞中代謝物の同定

			雄		雌	
			投与量比%	試料中の放射能比%	投与量比%	試料中の放射能比%
有機溶媒可溶性	画分 1.1	未同定	4.7	11.8	0.8	1.7
	画分 1.2	未同定	16.5	41.2	16.4	35.5
	画分 1.4	未同定	6.5	16.2	13.5	29.3
	画分 1.3	K	2.7	21.8	0.9*	5.9
		B	—	—	5.6	36.4
		B + F	2.1	17.4	—	—
		C(Z69)	5.9	47.6	8.4	53.9
		未同定	1.6		0.6	
	小計	12.3	30.7	15.5	33.5	
有機溶媒可溶性(酸性)	未同定	3.3	6.3	8.9	15.5	
水溶性	未同定	8.6	16.6	2.2	3.8	
非抽出性		11.0	17.5	8.0	12.3	
合計		63.04	100	65.35	100	

\* 親化合物を含む

画分 1.2 は雄の試料を用いて TLC で分析し、少なくとも 5 代謝物が含まれていることが確認されたが、同定できなかった。

以上により、糞中に有意な量の脱メチル化代謝物 B 及び C が確認されたことから、 の がジメトモルフの主要代謝経路であることが裏付けられた。

又、代謝物 K の同定及び F の存在が示唆されたことから、 を段階的に分解するマイナーな第二の代謝経路が存在することが裏付けられた(次頁、推定代謝経路図参照)。

]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

0120-1000000000

ラットにおける推定代謝経路図

### 1-5 ラットにおける血中動態

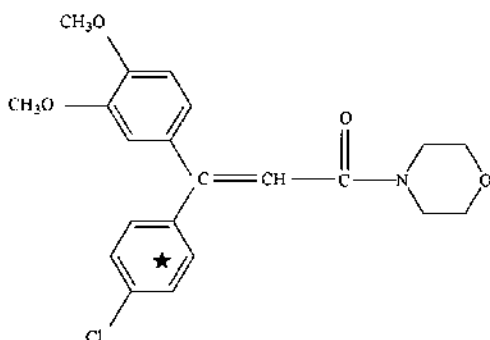
(資料 M-5)

試験機関：XenoBiotic Laboratories 社(米国)

報告書作成年：1995 年

供試標識化合物：

化学構造：



★：標識位置 クロロフェニル環を  $^{14}\text{C}$  で均一に標識

化学名：(E, Z)-4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxy-Phenyl)-acryloyl]-  
-morpholine

放射化学的純度：

比放射能：

E/Z 異性体比：

供試動物：CrI：CD BR 系ラット 1 群雌雄各 4 匹(約 6~10 週齢)、  
体重範囲 雄 193~210g、雌 177~196g

方 法：(1)投与方法：1 夜絶食させた雌雄ラットに 水溶液を用いて懸濁した  
検体を 2 段階の用量(10mg/kg 又は 500 mg/kg)で単回強制経口投与した。

(2)血液採取及び放射能の測定方法：血液は尾静脈から投与後 0.25、0.5、1、2、4、  
8、12、24、48、72、96、120 及び 144 時間に約 0.1~0.2ml ずつ、又 168 時間に  
約 5ml を心穿刺により採取した。

168 時間のサンプルのみ血漿及び赤血球に分離し、それ以外は全血中の放射能を  
測定した。

放射能の測定は、全血及び赤血球は燃焼後、血漿は直接液体シンチレーション  
カウンターを用い、2 反復で測定した。

なお、薬物動態パラメーターはコンパートメントモデルに当てはめず、コ  
ンピューターにより  $T_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $AUC_{0-\infty}$  を算出した。

結果：結果の概要を表 1~3 に示す。

全血中の薬物動態パラメーターは、10 mg/kg 雌雄の Tmax が、1.4 及び 2.8 時間、Cmax が 0.96 及び 0.76 時間、 $t_{1/2}$  が 68.0 及び 59.2 時間、 $AUC_{0-\infty}$  が 14.96 及び 10.56  $\mu\text{g}\cdot\text{hr/g}$  であり、500mg/kg 雌雄の tmax が 14.7 及び 11.0 時間、Cmax が 39.46 及び 25.02  $\mu\text{g/g}$ 、 $t_{1/2}$  が 75.8 及び 65.4 時間、 $AUC_{0-\infty}$  が 1211.40 及び 673.56  $\mu\text{g}\cdot\text{hr/g}$  であった。

以上より、10 mg/kg 投与の場合吸収は速やかであり、いずれのパラメーターにも性差は認められなかった。500mg/kg 投与の場合、Tmax が遅くなったが、これは胃腸管における吸収が長引いたためと考えられる。なお、Cmax 及び AUC は雌において雄よりも有意に高かった。

表 1 全血中放射能濃度の推移 (数値は 4 匹の平均値)

投与後経過 時間(時間)	<sup>14</sup> C-ジメトモルフ当量 $\mu\text{g/g}$			
	10mg/kg		500mg/kg	
	雄	雌	雄	雌
0.25	0.50	0.36	3.35	4.72
0.5	0.66	0.65	5.89	8.80
1	0.51	0.85	9.38	11.42
2	0.43	0.91	15.08	15.95
4	0.38	0.68	16.43	22.90
8	0.37	0.50	22.04	35.49
12	0.26	0.33	24.88	41.12
24	0.11	0.12	6.96	32.71
48	0.03	0.05	1.90	17.97
72	0.02	0.03	1.29	5.79
96	0.01	0.02	0.92	2.40
120	0.01	0.01	0.70	2.43
144	0.01	0.01	0.53	0.90
168	0.01	0.01	0.47	0.65

表 2 全血中薬物動態パラメーター (数値は 4 匹の平均値)

投与量	性	Tmax (時間)	Cmax ( $\mu\text{g/g}$ )	$t_{1/2}$ (時間)	$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{hr/g}$ )
10mg/kg	雄	2.8	0.76	59.2	10.56
	雌	1.4	0.96	68.0	14.96
500mg/kg	雄	11.0	25.02	65.4	673.56
	雌	14.7	39.46	75.8	1211.40

表 3 投与 168 時間後における血漿及び赤血球中放射能濃度 (数値は 4 匹の平均値)

サンプル	<sup>14</sup> C-ジメトモルフ当量 $\mu\text{g/g}$			
	10mg/kg		500mg/kg	
	雄	雌	雄	雌
血漿	<0.022	<0.022	<0.223	<0.270
赤血球	<0.023	<0.029	0.750	0.939



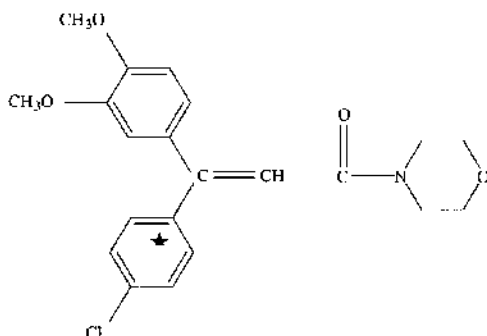
1-6 ラットにおける組織内分布

(資料 M-6)

試験機関：XenoBiotic Laboratories 社(米国)  
報告書作成年：1995 年

供試標識化合物：

化学構造：



★：標識位置 クロロフェニル環を  $^{14}\text{C}$  で均一に標識

化学名：(E, Z)-4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxy-Phenyl)-acryloyl]-morpholine

放射化学的純度：

比放射能：

E/Z 異性体比：

供試動物：CrI：CD BR 系ラット 1 群雌雄各 3 匹(約 7~9 週齢)、  
体重範囲 雄 186~213g、雌 185~207g

方 法：(1)投与方法：1 夜絶食させた雌雄ラットに 水溶液を用いて懸濁した検  
体を 2 段階の用量(10 mg/kg 又は 500mg/kg)で単回強制経口投与した。

(2)組織採取及び放射能の測定方法：低用量群雄は投与後 0.5(Tmax の早い段階)、24  
及び 168 時間に、雌は 1.5(Tmax の平均)、24 及び 168 時間に、高用量群雌雄は投  
与後 8(Tmax の早い段階)、24 及び 168 時間に各時点とも 1 群雌雄各 3 匹を屠殺し、  
以下の組織/臓器を採取した。

血漿、赤血球、副腎、骨、骨髓、脳、脂肪、消化管、消化管内容物、心、腎、肝、  
肺、筋肉、卵巣、膵、下垂体、脾、精巣、胸腺、甲状腺、子宮、残部体組織

放射能の測定は、血漿については直接、副腎、骨髄、甲状腺、下垂体及び卵巣は直  
接燃焼後、その他の組織は 2 : 1(W/W)の割合で純水を加えホモジネート後燃焼し、  
液体シンチレーションカウンターを用いて行った。燃焼は可能な限り 2 反復で行っ  
た。

結 果：結果の概要を表 1~4 に示す。

低用量(10mg/kg)の場合、残留放射能は T<sub>max</sub> 近辺(0.5~1.5時間)で最高であり、消化管、肝、腎、脾、下垂体、甲状腺、副腎及び卵巣に高濃度の残留が認められたが、24時間後までに非常に低濃度まで消失し、168時間後までに肝(0.14~0.16 μg/g)を除き、いずれも検出限界(0.023 μg/g)以下となった。

高用量(500 mg/kg)の場合、残留放射能は、雌の副腎、腎、下垂体等で 24 時間後に最高値を示した以外、ほとんどが 8 時間後に最高値を示し、消化管、肝、腎、脾、肺、副腎、脂肪、下垂体、甲状腺、心、卵巣、子宮、血漿及び骨髄に高濃度の残留が認められたが、168 時間後までに急速に消失し、肝(3.79~6.23 μg/g)を除き、いずれも 1.8 μg/g 以下に減少した。

各用量の雌雄において、蓄積性は認められなかった。

表 1 10mg/kg 単回投与群における組織内濃度

臓器 組織	<sup>14</sup> C-ジメトモルフ当量 $\mu\text{g/g}$ (ppm)					
	雄			雌		
	0.5 時間	24 時間	168 時間	1.5 時間	24 時間	168 時間
血漿	0.990	0.122	ND	1.119	0.118	ND
赤血球	0.483	0.086	ND	0.532	0.074	ND
副腎	1.752	0.034	ND	0.934	ND	ND
骨	0.431	ND	ND	0.421	0.020	ND
骨髓	1.054	ND	ND	0.680	0.022	ND
脳	0.104	ND	ND	0.171	ND	ND
脂肪	1.064	0.024	ND	2.676	0.074	ND
消化管	29.836	0.764	ND	18.543	2.200	ND
消化管内容物	17.112	1.004	ND	22.630	2.829	ND
心	1.210	0.049	ND	1.177	0.052	ND
腎	2.510	0.159	ND	2.228	0.183	ND
肝	14.442	1.483	0.162	9.072	1.486	0.143
肺	1.230	0.043	ND	1.170	0.046	ND
筋肉	0.522	ND	ND	0.764	ND	ND
卵巣	—	—	—	1.291	0.055	ND
膵	3.270	0.042	ND	2.185	0.048	ND
下垂体	1.680	0.029	ND	1.354	ND	ND
脾	1.073	ND	ND	0.871	ND	ND
精巣	0.156	ND	ND	—	—	—
胸腺	0.503	ND	ND	0.668	ND	ND
甲状腺	1.330	0.044	ND	1.288	0.075	ND
子宮	—	—	—	0.798	0.039	ND
残部体組織	1.012	0.041	ND	0.932	0.035	ND

数値は 3 匹の平均値

ND : 検出せず

表 2 10mg/kg 単回投与群における組織内分布率

臓器組織	投与量に対する%					
	雄			雌		
	0.5 時間	24 時間	168 時間	1.5 時間	24 時間	168 時間
血漿	0.06	0.01	0.00	0.10	0.01	0.00
赤血球	0.06	0.01	0.00	0.09	0.01	0.00
副腎	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
骨	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
骨髓	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脳	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
脂肪	0.04	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00
消化管	13.91	0.43	0.00	11.87	1.06	0.00
消化管内容物	67.67	4.68	0.01	67.52	9.03	0.02
心	0.06	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
腎	0.25	0.02	0.00	0.20	0.02	0.00
肝	5.36	0.90	0.10	3.29	0.75	0.07
肺	0.06	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
筋肉	0.03	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
卵巣	—	—	—	0.01	0.00	0.00
膵	0.10	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00
下垂体	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脾	0.02	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
精巣	0.02	0.00	0.00	—	—	—
胸腺	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
甲状腺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
子宮	—	—	—	0.03	0.00	0.00
残部体組織	7.47	0.33	0.04	6.89	0.26	0.01

数値は 3 匹の平均値

ND : 検出せず

表 3 500mg/kg 単回投与群における組織内濃度

臓器 組織	<sup>14</sup> C-ジメトモルフ当量 $\mu\text{g/g}$ (ppm)					
	雄			雌		
	8 時間	24 時間	168 時間	8 時間	24 時間	168 時間
血漿	23.587	11.970	ND	23.844	24.260	ND
赤血球	12.686	7.532	1.310	10.941	11.551	0.858
副腎	32.881	10.582	1.003	24.697	57.869	0.585
骨	7.795	3.131	ND	8.215	8.529	ND
骨髓	16.832	4.772	ND	20.451	18.835	ND
脳	3.201	0.636	ND	7.552	5.358	ND
脂肪	31.478	4.649	0.332	78.463	59.188	1.135
消化管	476.845	205.934	ND	411.649	359.095	ND
消化管内容物	1656.115	561.962	ND	1539.223	599.510	0.318
心	23.306	7.106	0.355	27.595	26.036	0.273
腎	39.041	16.857	0.724	40.048	42.272	0.642
肝	125.560	77.496	6.231	101.448	101.088	3.793
肺	23.651	7.611	0.341	26.246	26.832	0.293
筋肉	14.106	3.523	ND	16.238	16.107	ND
卵巣	—	—	—	30.769	27.389	0.265
睪	32.809	9.104	0.254	40.574	39.771	0.278
下垂体	34.068	6.093	ND	28.151	30.970	1.571
脾	15.140	4.655	0.413	19.630	18.477	0.346
精巣	9.323	2.890	ND	—	—	—
胸腺	12.676	3.322	ND	15.793	15.987	ND
甲状腺	28.220	9.830	ND	29.674	25.861	1.824
子宮	—	—	—	30.102	20.180	0.243
残部体組織	31.043	6.160	ND	24.082	24.564	0.237

数値は 3 匹の平均値

ND : 検出せず

表 4 500mg/kg 単回投与群における組織内分布率

臓器 組織	投与量に対する%					
	雄			雌		
	8 時間	24 時間	168 時間	8 時間	24 時間	168 時間
血漿	0.05	0.04	0.00	0.03	0.04	0.00
赤血球	0.06	0.03	0.01	0.02	0.03	0.00
副腎	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
骨	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
骨髓	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脳	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00
脂肪	0.02	0.00	0.00	0.06	0.04	0.00
消化管	5.30	2.19	0.00	3.87	3.35	0.00
消化管内容物	74.40	22.16	0.01	72.33	21.76	0.01
心	0.02	0.01	0.00	0.02	0.02	0.00
腎	0.08	0.04	0.00	0.07	0.08	0.00
肝	1.14	0.85	0.08	0.82	1.05	0.04
肺	0.03	0.01	0.00	0.03	0.03	0.00
筋肉	0.01	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00
卵巣	—	—	—	0.00	0.00	0.00
睪	0.02	0.01	0.00	0.02	0.03	0.00
下垂体	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脾	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00
精巣	0.02	0.01	0.00	—	—	—
胸腺	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00
甲状腺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
子宮	—	—	—	0.02	0.01	0.00
残部体組織	4.61	0.96	0.04	3.62	3.86	0.04

数値は 3 匹の平均値

ND : 検出せず