

(資料 原体-14)

2) 催奇形性

① ラットを用いた催奇形性試験

試験機関:

報告書作成年: 2000年 [GLP対応]

検体純度:

供試動物: CD系 (Sprague Dawley Cr1:CD(SD)BR)妊娠ラット、1群25匹

投与期間: 妊娠期間中の15日間 (1999年5月31日~1999年6月14日)

投与方法: 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して、3、10、30 mg/kgの用量で妊娠6日目から20日目までの15日間、各動物の最新の体重に基づき、10ml/kgの容量で毎日1回強制経口投与した。投与液は試験期間中3回調製した。  
対照群の動物には0.5%メチルセルロース水溶液のみを同様に投与した。  
精子または臍栓の認められた日を妊娠0日目とした。

観察・検査項目:

親動物; 一般状態および生死を毎日観察し、体重を妊娠0、6、8、10、12、14、16、18および21日に測定した。摂餌量は妊娠1~6、6~8、8~10、10~12、12~14、14~16、16~18および18~21日目に測定した。

妊娠21日目に動物を屠殺し内臓の肉眼的検査および肝臓の重量測定をした。

妊娠子宮重量を測定し、黄体数、着床数、早期および後期吸収胚数、生存および死亡胎児数を検査した。

生存胎児; 体重を測定し、性別および外表異常を検査した。各腹の半数の胎児をブアン固定して内臓検査を行い、残りの半数は骨格標本作製して、骨格異常の検査を行った。

胎児の変化は以下のように定義した。

奇形: 極めて稀で致死的な変化。

異常: 軽度で、比較的稀な構造の変化で明確な傷害は認められない。

変異: 対照群の約5%以上の動物で認められる構造の変化

試験結果: 概要を次頁に示した。

試験結果：

投与群 (mg/kg/日)		0	3	10	30	
親	1群当たり動物数	25	25	25	25	
	死亡動物数	0	0	0	0	
	不妊動物数	0	2	2	0	
	妊娠動物数 (%)	25(100)	23(92)	23(92)	25(100)	
	一般状態	投与による影響は認められなかった				
	体重増加量 (g)		投与による影響は認められなかった	6~8日有意に減少		
	摂餌量 (g/日)		投与による影響は認められなかった	6~8日、8~10日、10~12日有意に減少		
	剖検所見		投与による影響は認められなかった	肝小葉の明瞭化(5例)		
	臓器重量：肝臓			↑115	↑132	
	妊娠子宮重量(g)	106.1	108.3	109.8	106.0	
動物	着床検査親動物数	25	23	23	25	
	着1	黄体数	16.9	17.2	17.0	17.0
		着床数	15.6	16.1	16.1	15.5
	床腹	着床前胚損失率	7.6	5.4	4.9	8.4
		着床後胚損失率	6.6	6.0	6.5	5.2
	所当見り	早期吸収数	0.7	1.0	1.0	0.8
		後期吸収数	0.1	0.0	0.0	0.1
		生存胎児数	14.8	15.1	15.0	14.7
死亡胎児数		0.0	0.0	0.0	0.0	

肝臓重量の数値は対照群の値に対するパーセント

↑:p<0.001

Dunnettの検定

投与群 (mg/kg/日)		0	3	10	30	
総胎児数		369(25)	348(23)	346(23)	367(25)	
胎児体重(g) 雄+雌		5.38	5.33	5.40	5.35	
雄		5.52	5.48	5.47	5.51	
雌		5.24	5.19	5.33	5.22	
性 比 (%雄)		50.1	49.7	51.2	46.3	
外表検査; 検査動物数		369	348	346	367	
矮小児 (4.0g未満)		2	5	1	1	
胎 児	検査胎児数	180(24)	168(23)	169(23)	176(25)	
	内 臓 変 異	胸腺肥大	7	2	6	16
		尿管蛇行	66	46	47	59
		尿管拡張	54	33	39	48
		腎盂拡張	24	8	18	15
	検 査 異 常	食道拡張	4	3	3	2
		腎乳頭腫大	1	2	1	2
		腎乳頭欠損	0	2	1	0
	奇 形	心室中隔欠損および食道、肺、腎臓形態異常	0	1	0	0
		大動脈弁欠損および右心室拡張	0	0	1	0
	動 物 骨 格 変 異 検 査	検査胎児数	189(25)	180(23)	177(23)	191(25)
		頭頂骨不完全骨化/頭頂骨間骨分離/ 前泉門拡張	2	4	2	3
		第7頸椎体の未骨化	6	4	14	13
		第2、第3、第4、第5胸骨分節異常、 第2胸骨不完全骨化	6	8	7	6
第5、第6胸骨分節不完全骨化		21	27	16	27	
第5、第6胸骨分節未骨化		1	2	1	3	
第13肋骨短小		1	1	0	0	
第14肋骨		0	0	0	1	
第14肋骨短小		5	0	0	7	
第14胸骨の過剰化骨		11	10	5	10	
胸椎体ダンベル状		6 (4)	6	12	18 (14)**	
第1中足骨未骨化		11 (6)	25	24	55 (19)***	
前足第3、4基節骨未骨化		1	2	3	4	
仙尾椎体数8以下		1	3	0	3	
異 常	胸椎分枝/ダンベル状	2	1	2	5	
	13肋骨短小/軟骨欠損	4	1	3	9	
奇 形	頸肋、第3、第4、頸椎短小、二分軟骨/癒合	0	0	0	1	
	第1、第2肋軟骨癒合、第2肋軟骨分離、 第1、第2胸骨分節癒合	0	0	4	1	

( ) の数字は腹数

\*\* : P<0.01 \*\*\* : P<0.01 Fisherの直接確率検定

親動物；

死 亡：死亡は認められなかった。

一般症状：いずれの投与群も対照群と同様で、投与に関連した影響は認められなかった。

体 重：体重増加量は、30mg/kg群で妊娠6～8日目に有意に減少した。10mg/kg群では妊娠6～8日目に対照群より低下したが、有意差は認められなかった。  
3mg/kg群では影響は認められなかった。

摂 餌 量：30mg/kg群で妊娠6日目から12日目の間に有意に減少した。10および3mg/kg群では影響は認められなかった。

剖 検：30および10mg/kg群で、肝臓重量が有意に増加した。30mg/kg群では、肝小葉の明瞭化が認められた。  
黄体数、着床前および着床後死胚数には投与と関連した影響は認められなかった。

胎 児；1腹当たりの胎児数、性比、平均胎児重量に影響は認められなかった。

外表検査：いずれの投与群でも投与に関連した所見は認められなかった。

内臓検査：いずれの投与群でも奇形の増加は認められなかった。

30mg/kg群で胸腺の肥大(対照群の3.8%に対して9.3%)が認められたが、背景対照値の範囲内( )であった。

10および3mg/kg群では投与と関連した影響は認められなかった。

骨格検査：いずれの投与群でも奇形の増加は認められなかった。

30mg/kg群で第13肋骨短小/軟骨欠損、第7頸椎体および第1中足骨に軽度の遅延、ダンベル状胸椎体の発生数が多かった。

10および3mg/kg群では投与と関連した影響は認められなかった。

以上の結果、30mg/kg群で親動物に体重増加抑制、摂餌量の減少、肝臓重量の増加、剖検所見として、肝小葉の明瞭化が認められた。同群児動物では、軽度の化骨遅延が認められた。

10mg/kg群の親動物で肝臓重量の増加が認められたことから、親動物に対する無毒性量は3mg/kg/日、児動物の無毒性量は10mg/kg/日であった。

胎児に形態学的影響は認められないことから、最高投与量の30mg/kgにおいても催奇形性を及ぼさないと判断される。

(資料 原体-15)

② ウサギを用いた催奇形性試験

試験機関：

報告書作成年：2000年 [GLP対応]

検体純度：

供試動物：New Zealand White種ウサギ(Crl:Kbl/BR)、1群雌30匹 (性成熟未経産)  
体重 2.48~3.69kg

投与期間：23日間 (妊娠6日~28日) (a:1999年8月29日~9月20日、b:11月8日~11月30日)

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して、(a)：0、0.5、2.0および4.0 mg/kg、(b)：0、0.25mg/kgの投与量で妊娠6日から28日まで毎日1回強制経口投与した。

対照群の動物には0.5%メチルセルロース水溶液のみを同様に投与した。

人工授精を行った日を妊娠0日とした。

投与用量設定根拠

観察・検査項目：

親動物；一般状態、生死および妊娠状態を毎日観察し、体重を妊娠0、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26および29日目に、摂餌量は妊娠1日目から毎日測定した。妊娠29日目に母動物を屠殺剖検した。胎児を摘出し子宮重量、黄体数、着床数、早期および後期吸収胚数、生存および死亡胎児数を検査した。

生存胎児；体重を測定し、性別および外表異常の観察を行った。頸部を検査した後、各腹の半数の胎児の頭部をブアン固定して内部構造を検査した。全胎児の胴体を切開し、軟組織の異常を検査した。骨格標本を作成し骨格検査を行った。

試験結果：概要を次頁に示した。

試験結果：

投与群 (mg/kg/日)		0		0.25	0.5	2	4
		(a)	(b)				
1群当たり動物数		30	30	30	30	30	30
親	死亡動物数 (%)	1(3.3)	2(6.6)	2(6.6)	0(0)	0(0)	0(0)
	妊娠動物数 (%)	26(87)	27(90)	29(97)	26(87)	24(80)	28(93)
	不妊動物数	4	3	1	4	6	2
	流産した動物数	0	0	0	0	2	11
動物	一般状態	投与による影響は認められなかった					
	体重変化			投与による影響は認められなかった	全期間中有意に減少*	全期間中有意に減少***	
	摂餌量			投与による影響は認められなかった	10~14日、14~18日有意に減少**	全期間中有意に減少***	
	剖検所見	投与による影響は認められなかった					
妊娠子宮重量 (g)		456		443	433	390	370
着床所当見り	検査動物数	50		27	26	22	17
	黄体数	10.0		10.3	9.3	9.5	9.4
	着床数	8.0		7.6	7.4	7.0	6.3
	着床前胚損失率 (%)	22.2		26.2	19.8	27.8	35.1
	着床後胚損失率 (%)	17.1		9.8	17.9	16.9	38.7
	早期吸収胚数	0.340		0.519	0.423	0.182	0.294
	後期吸収胚数	0.020		0.000	0.017	0.000	0.176
	生存胎児数	6.9		7.1	6.6	6.2	4.7
死亡胎児数	0.2		0.0	0.1	0.3	0.6	

対照群(a)は、0.5、2および4mg/kg群の対照で、対照群(b)は、0.25mg/kg群の対照。

\* : p<0.05、\*\* : p<0.01、\*\*\* : p<0.001 Dunnettの検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

投与群(mg/kg/日)		0		0.25	0.5	2	4	
		(a)	(b)					
総胎児数		359		191	174	143	90	
死亡胎児数		12		0	3	7	10	
胎児体重(g) 雄+雌		39.7		39.8	40.5	37.4	38.3	
雄		40.5		40.7	41.6	36.8	38.7	
雌		39.1		39.0	39.5	38.0	37.9	
性 比(雄/雌雄)		0.45		0.46	0.46	0.53	0.51	
検査動物数		178(23)	169(23)	191(26)	171(24)	136(20)	80(13)	
胎 外 表 検 査	矮小児 28.0g未満	7	3	4	1	7	4	
	前肢異常回転(内側)	0	1	0	0	1	1	
	短鼻/舌突出	0	0	0	0	1	0	
	臍帯ヘルニア	0	1	0	0	0	1	
胎 児 内 臓 動 物 検 査	変 異	胸腺肥大	17	15	17	25	2	2
		腕頭動脈短小	10	4	3	4	4	2
		肺尾状葉欠損	15	9	4	7	7	3
		腎盂拡張	0	0	0	1	0	0
	異 常	網膜皺壁	2	0	1	0	3	1
		腕頭動脈欠損	0	0	2	0	0	0
		大動脈弓拡張/肺動脈狭窄	1	2	0	0	0	0
		肺小型化	0	1	0	0	0	2
	奇 形	騎乗大動脈	0	0	0	0	2	0
		大動脈弓および肺動脈位置異常	0	0	0	0	1	0
心臓肥大症		0	1	0	0	0	0	
横隔膜ヘルニア		0	0	0	0	0	2(2)	
心房室中隔欠損		1	2	1	0	3	0	
骨 格 異 常 検 査	変 異	舌骨核不完全骨化	16	6	14	17	19	11
		第5,6胸骨分節不完全骨化/分枝	13	8	11	9	10	8
		第5,6胸骨分節未骨化	34	21	16	21	25	16
		第13肋骨短小	31	31	33	33	24	11
		第13肋骨分離	19	13	12	18	10	11
		第1中手骨不完全骨化/未骨化、 前肢第4,5中節骨未骨化	18(6)	19(12)	20(13)	17(11)	39(13)*	31(8)*
		恥骨不完全骨化	4(3)	3(2)	4(4)	2(1)	14(6)	11(4)
	第7頸椎余剰化骨	3	3	5	5	3	1	
	異 常	鼻骨癒合	1	0	0	0	0	0
		頸肋骨	3	1	5	8	5	0
		第1頸椎体未骨化	1	0	1	0	5	0
		胸骨分節非対称/癒合	0(0)	6(5)	3(3)	8(6)*	8(7)**	5(3)*
		第5胸椎欠損	0	1	4	3	6	1
		第7~9肋骨ノブ状	0	0	1	0	0	0
		第13肋骨不連続	0	0	2	2	0	0
尾骨変形(1尾骨)		3	1	0	1	1	3	
奇 形	第6頸椎癒合	0	0	0	0	0	1	
	胸部肋骨、胸椎、胸椎弓癒合/未骨化	1	1	3	0	3	0	
	第4腰椎欠損/第3,4腰椎癒合	0	0	0	1	0	0	

対照群(a)は、0.5、2および4mg/kg群の対照で、対照群(b)は、0.25mg/kg群の対照。

( )の数字は腹数

\* : p<0.05 \*\* : p<0.01 Fisherの直接確率検定

親動物；

一般状態および死亡：対照群および0.25mg/kg投与群で死亡が認められたが、剖検の結果いずれも誤投与によるものであった。一般状態は全て通常認められるものであった。

妊娠率：妊娠率は全群で80～97%の範囲であった。4mg/kg投与群では、11例に妊娠21～27日目に、2mg/kg投与群では2例に妊娠25および28日目に流産が認められた。これらの動物の剖検では11例中10例に肝臓の蒼白化および/または肝小葉の明瞭化が認められた。いずれも摂餌量および体重減少が認められた。

体重変化：4および2mg/kg投与群では、投与期間中有意な体重増加抑制が認められた。0.25および0.5mg/kg群では投与の影響は認められなかった。

摂餌量：4mg/kg投与群では、妊娠6～22日に有意な減少が認められた。2mg/kg投与群では妊娠10～14日および14～18日で有意に減少した。

肉眼的病理検査：剖検では投与に関連した所見は認められなかった。

同腹児データ：4mg/kg投与群において、平均着床後胚損失率の増加が認められ、これは後期吸収胚数の増加および死亡胎児数の増加と関連していると考えられたが、いずれも統計学的有意差は認められなかった。

胎児；

体重：投与の影響は認められなかった。

外表検査：奇形の増加は認められず、認められた異常は全て自然発生的なもので、投与の影響は認められなかった。

内臓検査：頭部においては投与に関連した影響は認められなかった。奇形は4mg/kg群2例に横隔膜ヘルニアが認められた。変異および異常は、対照群と同様の発生率であり投与に関連した増加は認められなかった。

骨格検査：奇形の増加は認められなかった。4および2mg/kg群において恥骨および中手骨の不完全骨化の増加が認められた。4、2および0.5mg/kg群において胸骨分節非対称が統計学的に有意に増加したが、用量に関連性はなく、対照群(b)にもほぼ同等に認められていることから、投与に関連のない変化と考えられた。その他の骨格変異/異常に投与による影響は認められなかった。

以上の結果、親動物では4および2mg/kg群で体重増加抑制、摂餌量の減少が認められ、流産の発生頻度の増加が認められた。

胎児動物では4mg/kg群で横隔膜ヘルニアが認められ、4および2mg/kg群で不完全骨化の増加が認められた。

これらのことから、親動物および胎児動物に対する無毒性量は0.5mg/kgと判断された。

また、最高用量の4mg/kgでも催奇形性は認められなかった。

申請者注：



(資料 原体-16)

(11) 変異原性

1) ①細菌を用いた復帰変異性試験

試験機関:

報告書作成年: 1998年 [GLP対応]

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* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解した。

陽性対照として、2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、9-アミノアクリジン (AAC)、4-ニトロキノリン 1-オキシド (NQO) および2-アミノアントラセン (AAN) を用いた。

S-9 Mix+においてプレインキュベーションを行った。

試験1

全株 (S-9 Mix +/-)

溶媒対照、8、40、200、1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレート

試験2

全株 (S-9 Mix +/-)

溶媒対照、156.25、312.5、625、1250、2500および5000  $\mu\text{g}$ /プレート

変異原性の陽性判定基準

1) 有意水準1%のDunnett検定で、有意 ( $P \leq 0.01$ ) かつ用量相関性を示した場合。

2) 1) で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

試験結果: 結果は次頁の表に示した。

いずれの試験においても、検体はS-9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。なお、S-9 mixの有無にかかわらず、TA98、TA100およびTA1537で、S-9 mix -においてTA1535に毒性の影響が認められた。

一方陽性の2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、4-ニトロキノリン 1-オキシドおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は陰性と考えられた。

試験 1

乗物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix 有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		108	15	15	29	7
検体	8	-	100	13	16	30	8
	40		112	12	15	32	11
	200		116	11	18	24	9
	1000		122	12	19	26	9
	5000		115	13	15	26(S)	6
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		133	21	23	44	12
検体	8	+	137	16	27	42	13
	40		110	17	31*	43	5
	200		126	18	19	61*	10
	1000		130	19	19	47	10
	5000		121(S)	17	21	49	8(S)
陽性 対照	2NF					460	
	NaN <sub>3</sub>		661	433			
	AAC						497
	NQO			1020			
	AAN		1518		165	1170	

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

\*:  $p \leq 0.05$  Dunnett検定

5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で沈殿が認められた。

(S) : 背景細菌叢の生育阻害

試験 2

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9	復帰変異コロニー数/プレート					
		Mix	塩基置換型			フレームシフト型		
		有無	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$	-	121	20	24	26	10	
検体	312.5		118	22	26	26	6	
	625		119	18	24	26	9	
	1250		117	17	26	33	8	
	2500		107(S)	20(S)	27	29(S)	5(S)	
	5000		122(S)	16(S)	20	28(S)	6(S)	
溶媒対照	50 $\mu\text{l}$	+	151	23	24	49	15	
検体	156.25		142	19	23	39	15	
	312.5		141	20	30	47	16	
	625		158(S)	20	25	41(S)	13	
	1250		138(S)	28	23	32(S)	9(S)	
	2500		145(S)	22	26	38(S)	10(S)	
	5000		145(S)	17	23	36(S)	11(S)	
陽性対照	2NF	-				850		
	NaN <sub>3</sub>		637	462				
	AAC						621	
	NQO				817			
	AAN	5	+				1651	
		10				30		
20					40			

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

Dunnett検定

-S9では、2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿が認められた。

+S9では、625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿が認められた。

(S) : 背景細菌叢の生育阻害

1) ②細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 原体-16-1 )

試験機関:

報告書作成年: 2004年 [GLP対応]

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* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA/pKM101) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。再現性を確認するため、試験は2回実施した。

検体はDMSOに溶解した。

陽性対照として、フリルフラマイド (AF-2)、アジ化ナトリウム (NaN<sub>3</sub>)、9-アミノアクリジン (9-AA) および2-アミノアントラセン (2-AA) を用いた。

試験濃度

全株 (S-9 Mix +/-)

溶媒対照、39、78、156、313、625、1250 および 2500  $\mu$ g/プレート

変異原性の陽性判定基準

復帰変異コロニー数が溶媒対照の2倍以上でかつ用量相関性を示した場合。

試験結果: 結果は次頁の表に示した。

いずれの試験においても、検体はS-9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。なお、各菌株とも、高濃度で生育阻害が認められ、1250  $\mu$ g/プレート以上の濃度で結晶の析出が認められた。一方陽性のフリルフラマイド、ナトリウムアジド、9-アミノアクリジンおよび2-アミノアントラセンでは明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は陰性と考えられた。

試験1

代謝活性化系の有無	被験物質の用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異コロニー数/ $\text{プレート}$					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA /pKM101	TA98	TA1537	
-S9mix	溶媒対照	107	9	87	20	11	
	39	113	7	87	18	9	
	78	111	9	91	16	8	
	156	99	8	82	16	8	
	313	102	10	89	20	10	
	625	94	9*	89	18	7*	
	1250 †	84*	5*	80	13*	5*	
	2500 †	74*	7*	62*	19*	6*	
+S9mix	溶媒対照	130	10	120	34	11	
	39	124	7	119	36	11	
	78	120	8	128	33	10	
	156	112	7	116	33	11	
	313	133	11	125	37	11	
	625	129	6*	129	41	11	
	1250 †	100*	8*	91*	22*	10*	
	2500 †	77*	7*	79*	13*	9*	
陽性対照	S9mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		コロニー数/ $\text{プレート}$	509	251	1190	379	528
	S9mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/ $\text{プレート}$	503	161	417	189	146

注) 陽性対照化合物:

- AF-2 : フリルフラマイド
- NaN<sub>3</sub> : ナジウム
- 9-AA : 9-アミノアクリジン
- 2-AA : 2-アミノアントラセン

\* : 被験物質による生育阻害作用が認められた。

† : 被験物質の析出が認められた。

( ) 内の数字はプレートの平均を示す。

試験2

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異コロニー数/ $\text{プレート}$					
		塩基対置換型			フレームソフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA / $\mu\text{KM101}$	TA98	TA1537	
-S9mix	溶媒対照	121	12	84	20	10	
	39	137	10	82	17	7	
	78	123	11	74	16	8	
	156	123	15	94	14	8	
	313	124	11	78	15	8	
	625	105	8*	87	12	5*	
	1250	80*	6*	66*	7*	5*	
	2500	60*	9*	67*	6*	8*	
+S9mix	溶媒対照	143	14	103	27	11	
	39	134	10	112	22	10	
	78	136	12	104	23	10	
	156	135	11	112	23	9	
	313	133	9	101	23	8	
	625	148	10	107	21	9	
	1250	116*	6*	83*	17*	5*	
	2500	77*	7*	70*	11*	3*	
陽性対照	S9mixを必要としないもの	名称	AF-2	$\text{NaN}_3$	AF-2	AF-2	9-AA
		用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	S9mixを必要とするもの	コロニー数/ $\text{プレート}$	652	386	1119	446	539
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/ $\text{プレート}$	518	243	662	394	286

注) 陽性対照化合物:

AF-2 : フリルフラマイド\*

$\text{NaN}_3$  : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

\* : 被験物質による生育阻害作用が認められた。

† : 被験物質の析出が認められた。

( ) 内の数字はプレートの平均を示す。

(資料 原体-17)

2) 培養ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

試験機関:

報告書作成年: 1998年 [GLP対応]

検体純度:

試験方法: ヒトリンパ球培養細胞を用い、代謝活性(S-9 Mix+)および非活性化(S-9 Mix-)において染色体異常誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシドに溶解して用いた。各処理に従って細胞採取後標本を作製した。観察は1濃度あたり100個の分裂中期像について行い、染色体の構造異常および数的異常について調べた。試験は2回行った。陽性対照には4-ニトロキノリン 1-オキシド(NQO)またはシクロホスファミド(CPA)を用いた。

本試験の濃度を次のとおりとした。

- [試験1] S-9 Mix- 処理20 + 回復 0 時間: 253.1、450、600、800  $\mu$ g/ml  
S-9 Mix+ 処理 3 + 回復17時間: 450、600、800  $\mu$ g/ml  
[試験2] S-9 Mix- 処理20 + 回復 0 時間: 253.1、450、600、800  $\mu$ g/ml  
処理44 + 回復 0 時間: 800  $\mu$ g/ml  
S-9 Mix+ 処理 3 + 回復17時間: 450、600、800  $\mu$ g/ml  
処理 3 + 回復41時間: 800  $\mu$ g/ml

陽性判定基準

- 1) 染色体構造異常(ギャップを除く)細胞の割合が1つ以上の用量で統計学的有意に増加し、
- 2) その濃度における染色体構造異常の割合が正常範囲を超え、
- 3) 2回目の実験で結果が確認された。

試験結果: 結果は次頁の表に示した。

構造異常

実験2において、S-9 Mix-の800  $\mu$ g/mlで染色体異常細胞数に統計学的有意差が認められた。しかし、実験1において有意差は認められなかったこと、用量相関性が認められなかったこと、陰性対照の背景値範囲内(0~6)であったことから、生物学的意義はないと考えられた。これ以外の処理群では、代謝活性化の有無に係わらず、染色体異常細胞数の増加を示さなかった。

数的異常

いずれの処理群でも数的染色体異常細胞の発生頻度は同等であった。

一方、陽性対照として用いたNQOおよびCPAについては、統計学的に有意な染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加が認められた。

以上の結果より、代謝活性化を含む本試験条件下で培養ヒト末梢血リンパ球に染色体異常誘発性は陰性と考えられた。

試験 1

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	処理 時間 + 回復 時間	観 察 細 胞 数	S-9 Mix の 有 無	染色体構造異常の数					ギ ャ ッ プ を 含 め た 異 常 細 胞 の 総 数	ギ ャ ッ プ を 除 い た 異 常 細 胞 の 総 数	倍 数 体、 核 内 倍 加 お よ び 高 二 倍 の 細 胞 数	
					ギ ャ ッ プ	染 色 体 型		染 色 分 体 型					そ の 他
						欠 失	交 換	欠 失	交 換				
溶媒対照			200		2	0	0	0	0	0	1	0	2
検 体	253.1	20+0	200	-	1	0	0	2	0	0	3	2	1
	450		200		2	0	0	2	0	0	4	2	0
	600		200		0	1	0	3	0	0	3	3	0
	800		200		3	0	0	3	0	0	6	3	1
陽性対照 NQO	2.5		200		3	3	0	11	10	0	17	14***	0
溶媒対照			200		1	0	0	0	0	0	1	0	1
検 体	450	3+17	200	+	2	0	0	1	0	0	3	1	4
	600		200		1	0	0	0	1	0	2	1	2
	800		200		1	1	0	0	0	0	2	1	1
陽性対照 CPA	12.5		200		9	8	0	50	8	0	52	48***	0

\*\*\* :  $p \leq 0.001$  Fisherの直接確率検定

溶媒対照 : DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 : NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

CPA : シクロホスファミド



試験 2

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	処理 時間 + 回復 時間	観 察 細 胞 数	S-9 Mix の 有 無	染色体構造異常の数					ギ・ヤッ プを含 めた異 常細胞 の総数	ギ・ヤッ プを除 いた異 常細胞 の総数	倍数体、 核内倍加 および 高二倍 の細胞数	
					ギ ャ ッ プ	染色体型		染色分体型					そ の 他
						欠 失	交 換	欠 失	交 換				
溶媒対照			200	-	1	0	0	0	0	0	1	0	0
検 体	253.1	20+0	200	-	1	0	0	1	0	0	2	1	1
	450		200		3	0	0	0	0	0	3	0	2
	600		200		3	1	0	0	0	0	4	1	2
	800		200		3	1	0	4	0	0	7	5*	0
陽性対照 NQO	1.25		200		12	3	0	18	3	0	25	19***	2
溶媒対照			200		2	0	0	0	0	0	2	0	0
検 体	450	3+17	200	+	2	0	0	1	0	0	3	1	2
	600		200		2	0	0	1	0	0	3	1	1
	800		200		1	2	0	0	0	0	2	1	2
陽性対照 CPA	12.5		200		19	6	0	28	2	0	37	26***	0
溶媒対照			200		0	1	0	0	0	0	1	1	1
検 体	800	44+0	200	-	1	0	0	3	0	0	4	3	0
溶媒対照			200		1	0	0	1	1	0	3	2	1
検 体	800	3+41	200	+	0	2	0	1	0	0	3	3	1

\* :  $p \leq 0.05$       \*\*\* :  $p \leq 0.001$       Fisherの直接確率検定

溶媒対照 : DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 : NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

CPA : シクロホスファミド

(資料 原体-18)

### 3) マウスを用いた小核試験

試験機関：

報告書作成年：1998年 [GLP対応]

検体純度：

試験動物：CD-1系マウス、4～8週齢、1群雌雄各5匹、体重 雄 25～32 g、雌 21～27 g

試験方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、500、1000、2000mg/kgの用量でマウスに1回強制経口投与した。

投与後24、48及び72時間に各群雌雄各5匹を屠殺し、大腿骨を摘出して骨髓細胞の塗抹標本を作製した。

溶媒対照として0.5%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

陽性対照としてシクロホスファミドを40mg/kgの用量で同様に投与し、24時間後に雌雄各5匹を屠殺した。

塗抹標本はギムザを用いて染色し、以下の検査をした。

1000個の赤血球を観察し、多染性赤血球(PCE)と正染性赤血球(NCE)の相対比を調べた。

2000個の多染性赤血球(PCE)のうち小核を有する多染性赤血球(MNPCE)を計数し、多染性赤血球(PCE)1000個当たりの小核を有するPCE(MNPCE)の頻度を求めた。

陽性判定基準

- 1) 1試料採取時点で、少なくとも1用量で小核を有するPCE頻度が統計学的に有意に増加し、
- 2) その時点で小核を有するPCE頻度が溶媒対照の背景値を超える場合。

用量設定根拠：

試験結果：骨髓標本の観察結果を表に示した。

1000mg/kg投与群の雌雄各1匹、2000mg/kg投与群の雌3匹に死亡が認められた。

生存動物の一般状態には異常は認められなかった。

検体投与群の小核を有する多染性赤血球数(MNPCE)の発現頻度は溶媒対照群と同様で、統計学的に有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では雌雄において小核を有する多染性赤血球数(MNPCE)の出現頻度に有意な増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において、検体は骨髓多染性赤血球に小核の増加を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と考えられた。

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	性	動物数	MNPCE 頻度 /1000細胞		PCE/NCE 比	
24	溶媒対照		雄	5	0.30	0.50	1.21	
			雌	5	0.70		0.99	
	検体	500	雄	5	0.69	0.64	0.96	
			雌	5	0.60		1.14	
		1000	雄	5	0.30	0.22	1.15	
			雌	4	0.12		1.14	
		2000	雄	5	0.10	0.17	1.38	
			雌	4	0.25		0.98	
	陽性対照 CPA	40	雄	5	12.50	12.34***	0.98	
			雌	5	12.18		0.80	
48	溶媒対照		雄	4	0.00	0.44	0.79	
			雌	5	0.79		0.81	
	検体	500	雄	5	0.30	0.50	0.65	
			雌	5	0.70		0.98	
		1000	雄	4	0.25	0.22	0.61	
			雌	5	0.20		0.80	
		2000	雄	5	0.20	0.17	0.71	
			雌	4	0.12		0.76	
	72	溶媒対照		雄	4	0.25	0.39	1.16
				雌	5	0.50		0.89
検体		500	雄	5	0.20	0.15	0.96	
			雌	5	0.10		0.90	
		1000	雄	5	0.30	0.25	0.80	
			雌	5	0.20		1.04	
		2000	雄	5	0.10	0.17	0.97	
			雌	4	0.25		0.82	

溶媒対照：0.5%メチルセルロース水溶液

陽性対照：CPA：シクロホスファミド

\*\*\*:  $P \leq 0.001$   $\chi^2$ 検定

(資料 原体-19)

#### 4) ラット肝培養細胞を用いた不定期DNA合成試験

試験機関：

報告書作成年：2001年 [GLP対応]

検体純度：

試験動物：Wister系ラット、7～8週齢、1群雄各4匹、体重 雄 205～240 g

試験方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、800および2000mg/kgの用量でラットに単回強制経口投与した。

試験1では投与後12～14時間に、試験2では投与後2～4時間に屠殺し、各群4匹のうち3匹を選んで肝細胞を調整した。

溶媒対照として0.5%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

陽性対照として、試験1ではコーンオイルに懸濁した2-アセトアミドフルオレン(2-AAF)を75mg/kgの用量で、試験2では純水に溶解したジメチルニトロソアミン(DMN)を10mg/kgの用量で同様に投与した。

肝細胞は、4時間培養したあと、 $^3\text{H}$ チミジン0.25mMで3回洗浄した。

固定された細胞を用いて各動物からスライドを6枚作成し、3枚を写真用乳剤に浸漬してオートラジオグラムを作成した。現像および染色した後、検鏡下で核上銀粒子数および細胞質上銀粒子数を計測し、正味銀粒子数(NNG)を求めた。各動物についてスライドを2枚(50細胞/スライド)、合計100細胞について分析した。

正味銀粒子数(NNG) = 核上銀粒子数 - 核面積に相当する細胞質領域3カ所の平均銀粒子数

陽性判定基準

- 1) 検体投与群の群平均の正味銀粒子数が0よりも大きく、20%以上の細胞が反応した場合(NNGの平均値 $\geq 5$ )。
- 2) 正味銀粒子数および細胞修復率に、溶媒対照値のレベルを超える増加が認められた場合。

用量設定根拠：

試験結果：2000mg/kg群で、体重減少が認められた。これ以外にはいずれの投与群でも一般状態の変化は認められなかった。

2000および800mg/kg群で、試験1および試験2においても、正味銀粒子数(NNG)は0以下で、その平均値は-2.0～-7.0であった。

以上の結果より、本試験条件下において検体は不定期DNA合成を誘発せず、陰性と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

	薬物	濃度 (mg/kg)	核上粒子数	細胞質上粒子数	正味粒子数	細胞修復率%
試験 1	溶媒対照	0	2.71	4.13	-1.42	—
	検体	800	4.43	6.41	-1.99	1.0
		2000	3.68	5.90	-2.22	0.7
	陽性対照 2-AAF	75	23.17	3.63	19.54	96.3
試験 2	溶媒対照	0	5.67	8.88	-3.21	1.0
	検体	800	6.35	10.71	-4.36	0.3
		2000	8.10	15.09	-6.99	1.0
	陽性対照 DMN	10	36.63	8.67	27.96	96.0

溶媒対照 : 0.5%メチルセルロース水溶液

陽性対照 : 2-AAF : 2-アセトアミドフルオレン

DMN : ジメチルニトロソアミン

(資料 原体-20)

(12) 生体機能への影響に関する試験  
エチプロールにおける薬理試験

試験機関：

報告書作成年：2002年 [GLP対応]

検体純度：

用量設定根拠：

1. マウスの中樞神経系に対する作用

1) マウスにおける一般状態観察

試験動物：CD-1(ICR)系、5週齢、体重 雄 26.3~31.6g、1群雄3匹

投与方法：検体を0.5%CMC液に懸濁して、50、120、500および2000mg/kgを強制経口投与し、投与0.5、1、2、4、6時間後および投与翌日にIrwinの多次元観察法に準じて一般状態と行動を観察した。

結果：2000mg/kg群で、痙攣が投与0.5時間後からみられ、投与6時間後までその程度が増強した。投与2~6時間後に探索行動の抑制、投与6時間後に自発運動と身づくろい行動の抑制、体姿勢と歩行の異常、驚き反応の亢進、挙尾、振戦、散瞳がみられた。投与翌日に3匹中2匹は回復したが1匹死亡した。

500mg/kg群で、投与1時間後から6時間後まで痙攣がみられ、投与2時間後に探索行動の抑制、投与6時間後に自発運動の抑制がみられた。

120mg/kg群では投与4時間後から痙攣がみられ、6時間後には挙尾もみられた。

いずれの所見も痙攣を除き軽度または中等度で、2000mg/kg群の死亡の1例を除き、投与翌日にはすべて回復した。

50mg/kg群では影響は認められなかった。

## 2) マウスにおける自発運動量に及ぼす影響

### [実験1]

試験動物：CD-1(ICR)系、5週齢、体重 雄 27.6～34.5g、1群雄6例(3匹/1例)

投与方法：検体を0.5%CMC液に懸濁して、50、120、500および2000mg/kgを強制経口投与し、投与後6時間まで自発運動量測定装置を用いて測定し、0.5時間単位で集計した。

[実験2] 実験1の50mg/kg群において有意な自発運動量の低下が認められたため、10、25および50mg/kgの用量で実験1と同様に投与し、追加実験を実施した。

試験動物：CD-1(ICR)系、5週齢、体重 雄 25.5～33.9g、1群雄6例(3匹/1例)

結果：[実験1]では、すべての投与群で対照群と比較して、投与0.5～1時間後に有意に減少した。

[実験2]では、50mg/kgで投与5.5～6時間後に有意な高値が認められた。25および10mg/kgでは変化は認められなかった。

## 3) マウスにおける痙攣誘発作用

試験動物：CD-1(ICR)系、5週齢、体重 雄 28.1～35.7g、1群雄10匹

投与方法：検体を0.5%CMC液に懸濁して、50、120、500および2000mg/kgを強制経口投与した。

投与1時間後に電撃痙攣装置を用いて閾値下最大電流を角膜に通電し、強直性屈曲痙攣および強直性伸展痙攣の発現の有無を通電直後に観察した。

結果：2000、500および120mg/kg群で、強直性屈曲痙攣および強直性伸展痙攣がみられたが、対照群と比較して有意な差は認められなかった。50mg/kg群では痙攣はみられなかった。

## 2. ウサギの呼吸および循環器系に対する作用

試験動物：日本白色種、12～13週齢、体重 雄 2.1～2.7kg、1群雄4匹

投与方法：検体を0.5%CMC液に懸濁して、500、1000および2000mg/kgをカニューレを用いて十二指腸内に投与した。

投与前、投与後0.5、1、2および4時間後に呼吸数、血圧および心拍数を測定し、心電図を記録した。

動物は腹腔内投与により麻酔した。

結果：いずれの投与群でも麻酔ウサギに対して、呼吸数、平均血圧および心拍数において影響は認められなかった。また、心電図波形においてもいずれの投与群でも有意な減少が認められなかった。

### 3. ラットの腎機能に対する作用

試験動物：Wistar系、5週齢、体重 雄 162.7～197.3g、1群雄6匹

投与方法：検体を0.5%CMC液に懸濁して、50、120、500および2000mg/kgを強制経口投与した。

投与直後に生理食塩水20ml/kgを経口投与し、6時間の尿を採取して尿重量、比重、尿中の電解質および浸透圧を測定し、尿量および体重100g当たりの6時間の電解質排出量を算出した。

結果：尿量において、2000、500および120mg/kg投与群で対照群と比較して、有意な増加が認められた。50mg/kg投与群では対照群との差は認められなかった。

尿中の電解質排泄( $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Cl^-$ ) および浸透圧においては、投与群では $K^+$ の排泄量に増加傾向がみられたが、明らかな変化ではなかったことから、腎機能に対して軽微な影響しか及ぼさないと考えられた。

以上の結果から、検体は50mg/kg以上の投与量で自発運動量の減少を、120mg/kg以上の投与量で痙攣の発現と利尿を、500mg/kg以上の投与量で探索行動の抑制を引き起こした。2000mg/kg群では、さらに体姿勢や歩行の異常、振せん、散瞳などが認められ、翌日には死亡も認められた。

呼吸、循環器系や電撃の痙攣誘発作用に対しては2000mg/kgまでの用量で影響は認められなかった。



エチプロールの「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	マウス	経口	0、50、120、500、2000	雄 3	120	50	120mg/kg群以上で痙攣、500mg/kg群以上で探索行動、自発運動の抑制、2000mg/kg群以上で体姿勢、歩行の異常、振戦、散瞳などが認められ、1/3例が死亡した。生存動物の症状は翌日には消失した。	
	自発運動量	マウス		(0.5% CMC)	0、10、25、50、120、500、2000	雄 6	50	25	50mg/kg群以上で投与後30分～1時間に抑制が認められた。
	痙攣誘発 (電撃痙攣)	マウス		0、50、120、500、2000	雄 10	>2000	2000	120mg/kg群以上で電撃刺激後、痙攣の誘発がみられたが、対照群との比較で統計学的有意差は認められなかった。	
循環器系 呼吸 血圧 心拍数 心電図	ウサギ (麻酔下)	十二指腸 内投与 (0.5% CMC)	0、500、1000、2000	雄 4	>2000	2000	いずれの検体投与群でも影響は認められなかった。		
腎機能 尿量 電解質排泄 浸透圧	ラット	経口 (0.5% CMC)	0、50、120、500、2000	雄 6	120	50	120mg/kg群以上で尿量が有意に増加したが、電解質排泄および浸透圧に影響は認められなかった。		

(資料 原体-21)

(13) その他  
1)

試験機関：  
報告書作成年：2001年 [GLP対応]

試験目的：

検体純度：

試験動物：Wistar(AF)系ラットRJ:WI(IOPS AF)、1群 雄各8匹  
開始時6週齢、体重 雄177～221g

投与期間：14日間 (1999年10月28日～1999年11月10日)

投与方法：

処 理	投与経路	投与量 (mg/kg/日)	投与容量 (ml/kg)
対照(0.5%メチルセルロース水溶液)	強制経口	0	5
エチプロール	強制経口	20	5
	腹腔内	80	2.5

投与量設定根拠：

試験項目および結果：

一般状態および死亡率；一般状態および生死を毎日2回観察した。

エチプロール投与群では死亡および投与に関連したと思われる一般状態の変化は認められなかった。

投与群では、行動低下、閉眼、伏臥および歩行異常が認められたが、翌日投与前に回復していた。

体重変化；投与後1、5、8、12および14日目に測定した。

エチプロール投与群および 投与群とも影響は認められなかった。

摂餌量；エチプロール投与群および

投与群とも影響は認められなかった。

薬物動態；

	C <sub>0</sub> (%用量/ml)	AUC (%用量・h/ml)	半減期 (時間)	クリアランス (ml/h)	V <sub>ss</sub> (ml)
対照					
エチプロール					

\* : p<0.05、\*\* : p<0.01 (対照群との比較)

↑↓ : p<0.01 (群との比較)

Studentのt検定またはWilcoxonの順位検定

C<sub>0</sub> : 0時の濃度      AUC : 血中濃度/時間曲線下面積 (0~∞)

(資料 原体-22)

2)

試験機関：

報告書作成年：2001年 [GLP対応]

試験目的：

検体純度：

試験動物：Wistar(AF)系ラットRJ:WI(IOPS AF)、1群 雄各24匹  
開始時6週齢、体重 雄173～245g

投与期間：14日間 (1999年10月28日～1999年11月10日)

投与方法：

処 理	投与経路	投与量 (mg/kg/日)	投与容量 (ml/kg)
対照(0.5%メチルセルロース水溶液)	強制経口	0	5
エチプロール	強制経口	20	5
	強制経口	200	5

投与量設定根拠：

試験項目及び結果：結果の概要を次頁の表に示した。

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日2回観察した。

死亡および投与に関連したと思われる一般状態の変化は認められなかった。

では、流涎、異常歩行、半閉眼および体調低下が認められた。

体重変化；投与後1、5、8、12および14日目に測定した。

体重増加量はエチプロール投与群では影響は認められなかった。

対照群と比較して有意な減少が認められた。

摂餌量；エチプロール投与群では影響は認められなかった。

では対照群と比較して有意に減少した。

放射能分析；

試験結果の概要

試験項目	投与群				投与群 全平均
			10mg/kg	20mg/kg	

↑↓ : P<0.01      ↓↑ : P<0.001      Studentのt検定 (対照群との比較)  
 \* : P<0.05、\*\* : P<0.01      Studentのt検定 (生理食塩水との比較)

(資料 原体-23)

3)

試験機関:

報告書作成年: 2001年 [GLP対応]

試験目的:

検体純度:

試験動物: Wistar(AF)系ラットRJ:WI(IOPS AF)、1群 雄各7匹

開始時約6週齢、体重 雄158~264g

投与期間: 14日間 (1999年11月16日~1999年12月3日)

投与方法:

処 理	投与経路	投与量 (mg/kg/日)	投与容量 (ml/kg)
対照(0.5%メチルセルロース水溶液)	強制経口	0	5
エチプロール	強制経口	20	5

投与量設定根拠:

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率; 一般状態及び生死を毎日2回観察した。

エチプロール投与群では、死亡および投与に関連したと思われる一般状態の変化は認められなかった。

投与群では、行動の変化、異常歩行およびうずくまりなどが投与1時間後から認められたが、翌日には全動物が回復した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

体重変化；投与後1、5(対照群では4)、8、12(対照群では11)、14日に測定した。

エチプロール投与群では投与の影響は認められなかった。

では、体重増加量が有意に減少したが、代謝試験を考慮して各群の投与開始日をずらしたことにより日齢数が高かったため、重要性はないと思われた。

摂餌量；投与の影響は認められなかった。

；表-1


\*:p<0.05    \*\*\*:p<0.001    Studentのt検定 (対照群との比較)

肝臓；表-2


\*\*\*:p<0.001    Studentのt検定 (対照群との比較)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

申請者注：

総合考察



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(資料 原体-24①)

(資料 原体-24②)

4)

試験機関：

報告書作成年：2002年 [GLP対応]

試験目的：

検体純度：

試験動物：C57BL/6マウス、1群 雌15匹、中間屠殺群：1群雌15匹

開始時約9週齢、体重 17.4～20.8g

投与後7(または8)日目に各群15匹の中間屠殺群の動物を屠殺した。

投与期間：28日間 (2002年2月14日～2002年3月14日)

投与方法：検体を100、300および1000ppmの濃度で飼料に混入し、28日間にわたって随時  
摂食させた。対照群には無処理の飼料を与えた。 0.5%メ

チルセルローズ水溶液に懸濁し、80mg/kg/日の用量で28日間強制経口投与した。

投与量設定根拠：

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日2回観察した。

1000ppm群に1匹死亡が認められたが、投与との関連は不明であった。

投与に関連する一般状態の変化は認められなかった。

体重変化；投与開始日、その後は毎週1回および剖検前に測定した。

いずれの投与群にも投与による影響は認められなかった。

摂餌量；投与による影響は認められなかった。

検体摂取量；平均検体摂取量(mg/kg/日)は以下のとおりであった。

投与群(ppm)	100	300	1000
雌(mg/kg/日)	23.37	67.48	234.54

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

細胞増殖評価；

飲水量；

臓器重量；中間屠殺(8日)および最終屠殺時(29日)の全生存動物から、脳および肝臓を摘出し重量を測定した。

有意差の認められた項目を下表に示す。

検査時期		中間屠殺(8日)				最終屠殺(29日)			
投与群(ppm)									
肝臓	絶対重量								
	対体重比								
	対脳比								

↑ ↓ : p<0.05    ↑↓ : p<0.01 (エフ・ブール: Dunnett検定またはMann-Whitney検定)  
( : t-検定または修正t-検定)

数値は対照群の値に対するパーセント

肉眼的病理検査；中間屠殺(8日)および最終屠殺時(29日)の全生存動物について剖検を行った。

発生数を下表に示す。

検査時期		最終屠殺				
投与群(ppm)						
		0				
検査動物数						

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

病理組織学的検査；

主な病変が認められた動物数を下表に示す。

検査時期	中間屠殺(8日)				最終屠殺(29日)				
投与群(ppm)									
検査動物数									
肝臓									

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(資料 混・代-1)

2. 原体中混在物および代謝物の毒性

(1) 急性毒性

1) 代謝物のラットを用いた急性経口毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 1999年 [GLP対応]

検体純度:

試験動物: Wister (AF)系ラットRJ:WI (IOPS. AF)、8週齢、1群雌雄各5匹  
 体重: 雄 239~277g、雌 167~188g (試験開始時)

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、投与前日から絶食させた動物に体重1kg当たり、10mlの容量で単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は投与日およびその後は週1回測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 > 2000
死亡開始および終了時間	死亡例は認められなかった
症状発現および消失時間	症状は認められなかった
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (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

死亡および症状は認められなかった。

体重については、投与に関連した影響は認められなかった。

剖検所見では、投与に関連した影響は認められなかった。

(資料 混・代-2)

2) 代謝物のラットを用いた  
急性経口毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 1999年 [GLP対応]

検体純度:

試験動物: Wister(AF)系ラットRJ:WI(IOPS,AF)、8週齢、1群雌雄各5匹

体重: 雄 238~271g、雌 172~182g (試験開始時)

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、投与前日から絶食させた動物に体重1kg当たり、10mlの容量で単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は投与日およびその後週1回測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 > 2000
死亡開始および 終了時間	死亡例は認められなかった
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (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

死亡および症状は認められなかった。

体重については、投与に関連した影響は認められなかった。

剖検所見では、投与に関連した影響は認められなかった。

(資料 混・代-3)

3) 代謝物 のラットを用いた  
急性経口毒性試験

試験機関：  
報告書作成年：2001年 [GLP対応]

検体純度：

試験動物：Wister(AF)系ラットRJ:WI(IOPS HAN)、8週齢、1群雌雄各5匹  
体重：雄 262～287g、雌 176～189g (試験開始時)

試験期間：14日間観察

試験方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、投与前日から絶食させた動物に体重1kg当たり、10mlの容量で単回強制経口投与した。

試験項目：中毒症状および生死を14日間観察した。体重は投与日およびその後は週1回測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000、5000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 > 5000
死亡開始および 終了時間	死亡例は認められなかった
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000

死亡および症状は認められなかった。

体重については、投与に関連した影響は認められなかった。

剖検所見では、投与に関連した影響は認められなかった。



(資料 混・代-4)

4) 代謝物 のラットを用いた  
急性経口毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 2001年 [GLP対応]

検体純度:

試験動物: Wister(AF)系ラットRJ:WI(IOPS HAN)、8週齢、1群雌雄各5匹  
体重: 雄 272~287g、雌 175~185g (試験開始時)

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、投与前日から絶食させた動物に体重1kg当たり、10mlの容量で単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は投与日およびその後は週1回測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000、5000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 > 5000
死亡開始および 終了時間	死亡例は認められなかった
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000

死亡および症状は認められなかった。

体重については、投与に関連した影響は認められなかった。

剖検所見では、投与に関連した影響は認められなかった。

(資料 混・代-5)

5) 代謝物 のラットを用いた急性経口毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 2001年 [GLP対応]

検体純度:

試験動物: Wister(AF)系ラットRJ:WI(IOPS HAN)、8週齢、1群雌雄各5匹

体重: 雄 267~293g、雌 177~197g (試験開始時)

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、投与前日から絶食させた動物に体重1kg当たり、10mlの容量で単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は投与日およびその後は週1回測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000、5000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 > 5000
死亡開始および 終了時間	死亡例は認められなかった
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000

死亡および症状は認められなかった。

体重については、投与に関連した影響は認められなかった。

剖検所見では、投与に関連した影響は認められなかった。

(資料 混・代-6)

6) 代謝物 のラットを用いた  
急性経口毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 2002年 [GLP対応]

検体純度:

試験動物: Sprague-Dawley系ラット (Crj:CD(SD)IGS)、6週齢、1群雌雄各5匹  
体重: 雄 153~170g、雌 118~135g (試験開始時)

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体をオリーブ油に懸濁し、投与前日から絶食させた動物に体重1kg当たり、10mlの容量で単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は投与日および投与後1、3、7および14日に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 100、200、300、500、800
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 439 (329~584) 雌 423 (349~513)
死亡開始および 終了時間	投与後4時間から開始 投与後1日目に終了
症状発現および 消失時間	投与後2時間から開始 投与後1日目に終了
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	雄 200 雌 300
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	雄 200 雌 300

中毒症状としては、雌雄に自発運動の減少、腹臥、呼吸促拍、強直性痙攣およびチアノーゼが認められた。

体重については、投与群雌雄に投与1日目に体重増加抑制が見られ、300mg/kg群の雄では、投与1および3日後に有意な低値が認められた。それ以外の群では、順調な体重増加が認められた。

剖検所見では、投与に関連した影響は認められなかった。

(資料 混・代-7)

7) 代謝物 のラットを用いた  
急性経口毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 2002年 [GLP対応]

検体純度:

試験動物: Sprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)、7週齢、1群雌雄各5匹

体重: 雄 222~236g、雌 155~165g (試験開始時)

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を0.5w/v%メチルセルロース水溶液に懸濁し、投与前日から絶食させた動物に体重1kg当たり、20mlの容量で単回強制経口投与した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は投与日および投与後1、3、7および14日に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 > 2000
死亡開始および 終了時間	死亡例は認められなかった
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (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

死亡および症状は認められなかった。

体重については、投与に関連した影響は認められなかった。

剖検所見では、投与に関連した影響は認められなかった。

8) 代謝物 のラットを用いた  
急性経口毒性試験

試験機関：  
報告書作成年：1993年[GLP対応]

検体純度：

試験動物：SPRAUGUE DAWLEY系ラット(試験開始時9～10週齢) 1群雌雄各5匹

試験開始時の平均体重：雄 274～301g、雌 199～222g

試験期間：14日間観察

試験方法：検体をコーソイル中に懸濁調製し10mL/kgの容量でカテテルにより試験開始前夜から絶食した動物に単回強制経口投与した。

試験項目：臨床兆候及び生死を投与後1時間から14日間毎日観察した。投与当日、8及び15日後に体重を測定した。投与後15日に全例を剖検し肉眼的病理検査を実施した。

試験結果：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	雌雄 2000
LD <sub>50</sub> 値(mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 > 2000
死亡開始および 終了時間	死亡例が認められなかった
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (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

死亡例はなかった。有意な臨床徴候も認められなかった。投与に対する体重への影響も認められなかった。解剖所見では肉眼的に認められる異常はなかった。

急性経口致死量中央値(LD<sub>50</sub>)は2000mg/kg以上と判断された。

(資料 混・代-9)

(2) 変異原性

- 1) 代謝物 の細菌を用いた  
復帰突然変異性試験

試験機関:

報告書作成年: 1999年 [GLP対応]

検体純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下および非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解した。

陽性対照として、2-ニトロフルオレン(2NF)、アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ )、9-アミノアクリジン(AAC)、4-ニトロキノリン 1-オキシド(NQO)および2-アミノアントラセン(AAN)を用いた。

投与量設定のために、TA100株を用いて、8、40、200、1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレート の用量で用量設定試験を行った。1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレートで毒性の影響が観察されたので、試験1および試験2の用量を次のように設定した。用量設定試験の結果は試験1のデータとして使用した。また、試験2では、S-9 Mix+においてブレインキュベーションを行った。

試験1 全株(S-9 Mix +/-):

溶媒対照、8、40、200、1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレート

試験2 TA1535、WP2 uvrA、TA98およびTA1537(S-9 Mix +/-):

溶媒対照、20.48、51.2、128、320、800、2000および5000  $\mu\text{g}$ /プレート

TA100(S-9 Mix +/-):

溶媒対照、4.096、10.24、25.6、64、160、400および1000  $\mu\text{g}$ /プレート

変異原性の陽性判定基準

- 1) 有意水準1%のDunnnett検定で、有意( $P \leq 0.01$ )かつ用量相関性を示した場合。
- 2) 1)で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

結果: 結果は次頁の表に示した。

2回の試験において、S-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。なお、TA1535およびWP2 uvrAに対し生育阻害を認めなかったが、TA100の1000  $\mu\text{g}$ /プレート、TA98の5000  $\mu\text{g}$ /プレートおよびTA1537の2000  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量でS-9 Mixの有無にかかわらず毒性の影響が認められた。

一方、陽性の2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、4-ニトロキノリン 1-オキシドおよび2-アミノアントラセンでは、復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

試験 1

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		95	19	15	28	9
検体	8	-	106	23	15	31	8
	40		98	20	15	35	12
	200		103	14	13	33	7
	1000		114(S)*	12	8	25	6
	5000		107(S)	12	10	16(S)	3(A)
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		117	15	21	35	9
検体	8	+	112	17	22	34	8
	40		115	17	24	36	9
	200		107	15	18	26	7
	1000		125(S)	13	22	30	7
	5000		121(S)	11	14	24	4(S)
陽性対照	2NF	-				944	
	NaN <sub>3</sub>		560	500			
	AAC						503
	NQO				784		
	AAN		5	1354			1087
	10	+			316		

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

\*:  $p \leq 0.05$  Dunnett検定

1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿が認められた。

(S) : 背景細菌叢の軽度の生育阻害が認められた。(A) : 背景細菌叢が認められなかった

試験 2

乗物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		117	13	9	28	8
検体	20.48 (4.096)	-	125	21	10	22	9
	51.2 (10.24)		133	17	9	27	9
	128 (25.6)		128	12	9	19	10
	320 (64)		126	16	10	24	6
	800 (160)		131	13	8	28	9
	2000 (400)		123	18	12	27	6
	5000 (1000)		126(S)	19	9	20(S)	3(S)
(対照) DMSO	50 $\mu\text{l}$		147	19	16	37	8
検体	20.48 (4.096)	+	170*	19	17	37	13
	51.2 (10.24)		159	23	10	40	9
	128 (25.6)		144	24	17	33	9
	320 (64)		154	21	15	38	7
	800 (160)		139	27*	18	31	13
	2000 (400)		141	18	13	26	6(S)
	5000 (1000)		167	15	12	33(S)	4(S)
陽性対照	2NF	5				972	
	NaN <sub>3</sub>	2	758	573			
	AAC	50					741
	NQO	2			976		
	AAN	5	+				1746
20					98		

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

\*:  $p \leq 0.05$  Dunnett検定

800  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿が認められた。

(S) : 背景細菌叢の軽度の生育阻害が認められた。

( )の濃度は、TA100で実施した。



2) 代謝物 の細菌を用いた (資料 混・代-10)  
復帰突然変異性試験

試験機関：  
報告書作成年：1999年 [GLP対応]

検体純度：

方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。  
検体はDMSOに溶解した。

陽性対照として、2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (NaN<sub>3</sub>)、9-アミノアクリジン (AAC)、4-ニトロキノリン 1-オキシド (NQO) および2-アミノアントラセン (AAN) を用いた。

投与量設定のために、TA100株を用いて、8、40、200、1000および5000 μg/プレートの用量で用量設定試験を行った。1000および5000 μg/プレートで毒性の影響が観察されたので、試験1および試験2の用量を次のように設定した。用量設定試験の結果は試験1のデータとして使用した。また、試験2ではS-9+においてプレインキュベーションを行った。

試験1

全株 (S-9 Mix +/-) :

溶媒対照、8、40、200、1000および5000 μg/プレート

TA98 (S-9 Mix +/-) およびTA1537 (S-9 Mix -) において1000および5000 μg/プレートで毒性の影響が認められ、変異原性を十分に評価したものとは考えられなかったため、最高用量を500 μg/プレートとして以下の用量で再度行った。

TA98 (S-9 Mix +/-) およびTA1537 (S-9 Mix -) :

溶媒対照、0.16、0.8、4、20、100および500 μg/プレート

試験2

TA1535およびWP2 uvrA (S-9 Mix +/-) :

溶媒対照、20.48、51.2、128、320、800、2000および5000 μg/プレート

上記以外の菌株に対しては、毒性の影響を考慮して最高濃度を下げて、以下のように設定した。

TA100 (S-9 Mix +/-) およびTA1537 (S-9 Mix +) :

溶媒対照、4.096、10.24、25.6、64、160、400および1000 μg/プレート

TA98 (S-9 Mix -) およびTA1537 (S-9 Mix -) :

溶媒対照、0.5、2.048、5.12、12.8、32、80、200および500 μg/プレート

TA98 (S-9 Mix +) :

溶媒対照、1、4.096、10.24、25.6、64、160、400および1000 μg/プレート

変異原性の陽性判定基準

- 1) 有意水準1%のDunnett検定で、有意 ( $P \leq 0.01$ ) かつ用量相関性を示した場合。
- 2) 1) で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

結果：結果は次頁の表に示した。

2回の試験において、S-9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。なお、TA1535およびWP2 uvrAに対し生育阻害を認めなかったが、TA98、TA100およびTA1537に対し上位の濃度で毒性の影響が認められた。一方、陽性の2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、4-ニトロキノリン 1-オキシドおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

試験1(1)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		105	15	13	26	6
検体	8	-	94	14	11	31	10
	40		96	15	14	25	5
	200		106	15	12	15(S)	4(S)
	1000		108(S)	11	10	10(S)	2(S)
	5000		107(S)	11	7	14(S)	5(S)
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		112	19	19	36	7
検体	8	+	112	10	19	49	8
	40		113	20	22	45	8
	200		108	17	18	37(S)	7
	1000		119(S)	13	19	25(S)	5(S)
	5000		103(S)	11	20	27(S)	3(S)
陽性対照	2NF	-				1105	
	NaN <sub>3</sub>		621	518			
	AAC						446
	NQO				969		
	AAN		5	+	1474		402
10							

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

Dunnett検定

1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で沈殿が認められた。

(S) : 背景細菌濃の軽度の生育阻害が認められた。

試験1 (2)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート	
			フレームシフト型	
			TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		30	9
検体	0.16	-	36	9
	0.8		32	12
	4		31	13
	20		37	10
	100		32	7
	500		26(S)	7(S)
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		30	
検体	0.16	+	32	
	0.8		28	
	4		34	
	20		28	
	100		29	
	500		34(S)	
陽性対照	2NF	-	762	
	AAC			245
	AAN	+	1256	

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

AAC : 9-アミノアクリジン

AAN : 2-アミノアントラセン

Dunnett検定

500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で沈殿が認められた。

(S) : 背景細菌叢の軽度の生育阻害が認められた。

試験2 (1)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		119	12	10	26	10
検体	0.5					17	8
	2.048					31	8
	4.096		119				
	5.12					19	11
	10.24		116				
	12.8					29	5
	20.48			11	11		
	25.6		127				
	32					29	6
	51.2			13	9		
	64		133				
	80					27	8
	128			16	11		
	160		130				
	200					25	7
	320			15	9		
	400		108				
	500					13(S)	4(S)
	800			14	9		
	1000		111(S)				
2000			14	7			
5000			16	8			
陽性対照	2NF	5				1139	
	NaN <sub>3</sub>	2	602	551			
	AAC	50					607
	NQO	2			889		

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

Dunnett検定

400  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿が認められた。

(S) : 背景細菌叢の軽度の生育阻害が認められた。

試験2 (2)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照	50 $\mu\text{l}$		151	22	14	31	12
検体	1	+				37	
	4.096		144			27	13
	10.24		137			26	13
	20.48			21	17		
	25.6		139			30	12
	51.2			20	15		
	64		154			29	12
	128			25	19		
	160		155			24	9
	320			24	20		
	400		143(S)			29(S)	6(S)
	800			19	16		
	1000		141(S)			19(S)	8(S)
	2000			13	15		
5000		17	13				
陽性対照	AAN				2002		
				81			

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; AAN : 2-アミノアントラセン

Dunnett検定

400  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿が認められた。

(S) : 背景細菌叢の軽度の生育阻害が認められた。

(資料 混・代-11)

3) 代謝物の細菌を用いた  
復帰突然変異性試験

試験機関:

報告書作成年: 2001年 [GLP対応]

検体純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* pKM101, WP2 pKM101) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下および非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体はDMSOに溶解した。

陽性対照として、2-ニトロフルオレン(2NF)、アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ )、9-アミノアクリジン(AAC)、4-ニトロキノリン 1-オキシド(NQO)および2-アミノアントラセン(AAN)を用いた。

投与量設定のために、TA100株を用いて1.6、8、40、200、1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で用量設定試験を行った。この試験の結果、毒性の影響は認められなかったため、試験1および試験2の用量を次のように設定した。

試験2では、S-9 Mix+においてプレインキュベーションを行った。

試験1 溶媒対照、1.6、8、40、200、1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレート

試験2 溶媒対照、156.25、312.5、625、1250、2500および5000  $\mu\text{g}$ /プレート

変異原性の陽性判定基準

- 1) 有意水準1%のDunnett検定で、有意( $P \leq 0.01$ )かつ用量相関性を示した場合。
- 2) 1)で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

結果: 結果は次頁の表に示した。

TA100において、用量定試験(S-9 Mix -)および試験2(S-9 Mix +)で復帰変異コロニー数が統計学的に有意に増加した。しかしながら、用量との関連が認められなかったこと、および試験1では認められなかったことから、検体の変異原性によるものではないと考えられた。

TA100以外では、2回の試験において、S-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。なお、TA1535を除く、TA100、TA98、TA1537、WP2 pKM101およびWP2 *uvrA* pKM101に対しS-9 Mix +で2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で毒性の影響が認められた。

一方陽性の2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、4-ニトロキノリン 1-オキシド、ベンゾ[a]ピレンおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

試験 1

乗物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型				フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$	-	93	20	62	166	31	15
検体	1.6		95	20	61	174	33	20
	8		99	24	58	167	34	12
	40		100	20	59	166	33	18
	200		89	19	48	151	29	8
	1000		95	20	58	145	21	11
	5000		91	21	65	158	27	11
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$	+	101	20	67	289	30	15
検体	1.6		114	18	77	322	32	13
	8		114	17	80	317	40*	17
	40		117	24	77	293	34	17
	200		109	18	77	290	27	16
	1000		118	27	79	286	34	18
	5000		126	20	79	263	30	16
陽性 対照	2NF	5					935	
	NaN <sub>3</sub>	2	847	714				
	AAC	50						152
	NQO	2				2063		
		10			616			
	AAN	5	+	3056	262		1017	490
	B[a]P	10					359	

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\*:  $p \leq 0.05$  Dunnett検定

試験 2

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型				フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$	-	112	18	40	209	21	15
検体	156.25		116	19	45	214	19	15
	312.5		103	16	47	177	19	20
	625		118	17	43	172	23	13
	1250		111	19	43	195	20	12
	2500		106	16	47	193	23	12
	5000		115	14	44	207	23	14
溶媒対照	50 $\mu\text{l}$		+	128	15	80	258	35
検体	156.25	117		20	90	246	38	21
	312.5	118		16	75	259	37	18
	625	117		16	82	262	36	19
	1250	191***		17	73	243	32	18
	2500	72(S)		15	30	128	19(S)	-
	5000	87(S)		17	25	102	12(V)	-
陽性 対照	2NF	5					919	
	NaN <sub>3</sub>	2	694	640				
	AAC	50					165	
	NQO	2				2075		
		10						
	AAN	5	2199	148		726	354	
	B[a]P	10				242		

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

S-9 +で、2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿が認められた。

(-) : 毒性の影響のため、復帰変異コロニーは生育できなかった。

(V) : 背景細菌叢の重度の生育阻害が認められた。

(S) : 背景細菌叢の軽度の生育阻害が認められた。

\*\*\*:  $p \leq 0.005$  Dunnett検定



4) 代謝物 の細菌を用いた  
復帰突然変異性試験

試験機関:

報告書作成年: 2001年 [GLP対応]

検体純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537)及び要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 pKM101、WP2 uvrA pKM101) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体はDMSOに溶解した。

投与量設定のために、TA100株を用いて、1.6、8、40、200、1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレート  
の用量で用量設定試験を行った。この試験の結果、最高用量で毒性の影響は認められ  
たので、試験1および試験2の用量を次のように設定した。用量設定試験のデータは試験  
1のデータとして使用した。試験2では、S-9 Mix+においてプレインキュベーションを  
行った。

試験1

溶媒対照、1.6、8、40、200、1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレート

試験2

溶媒対照、156.25、312.5、625、1250、2500および5000  $\mu\text{g}$ /プレート

変異原性の陽性判定基準

- 1) 有意水準1%のDunnett検定で、有意( $P \leq 0.01$ )かつ用量相関性を示した場合。
- 2) 1)で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

結果: 結果は次頁の表に示した。

TA98において、試験1 (S-9 Mix -) で復帰変異コロニー数が統計学的に有意に増加した。  
しかしながら、用量との関連が認められなかったこと、および試験2では認められな  
かったことから、検体の変異原性によるものではないと考えられた。

TA98以外では、2回の試験において、S-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株におい  
ても復帰変異コロニー数を増加させなかった。なお、TA1535、WP2 pKM101およびWP2  
uvrA pKM101に対し生育阻害は認めなかったが、TA98、TA100およびTA1537のS-9 Mix +  
で2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で毒性の影響が認められた。

一方陽性の2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、4-ニトロキ  
ノリン 1-オキシド、ベンゾ[a]ピレンおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニ  
ー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断され  
る。

試験1

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate						
			塩基置換型				フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101	TA98	TA1537	
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		87	23	66	193	29	15	
検体	1.6	-	93	19	64	206	45**	12	
	8		85	18	61	198	44*	14	
	40		91	21	64	208	40	9	
	200		97	17	54	168	41*	10	
	1000		99	21	61	163	41*	13	
	5000		83(S)	22	56	146	45**	7	
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		99	23	90	309	34	15	
検体	1.6	+	108	18	92	341	32	11	
	8		118*	20	96	318	34	10	
	40		122*	19	76	302	32	17	
	200		113	16	82	306	27	10	
	1000		104	18	84	288	33	10	
	5000		107	19	90	244	34	11	
陽性 対照	2NF	5					1123		
	NaN <sub>3</sub>	2	797	721					
	AAC	50						309	
	NQO	2				2153			
		10			643				
	AAN	5	+	2299	247		986		371
	B[a]P	10					381		

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$  Dunnett検定

(S) : 背景細菌叢の軽度の生育阻害が認められた。

試験2

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型				フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		109	17	50	201	22	19
検体	156.25	-	124	12	56	168	23	12
	312.5		120	13	52	193	28	18
	625		109	14	51	157	20	37
	1250		102	15	43	146	20	16
	2500		106	13	34	153	21	20
	5000		102	16	36	165	23	18
溶媒対照	50 $\mu\text{l}$		142	20	76	191	37	24
検体	156.25	+	126	14	88	194	33	14
	312.5		132	27	87	197	31	17
	625		127	27	79	199	39	24
	1250		119	30	79	197	28	20
	2500		77(S)	23	72	246	19(S)	-
	5000		33(V)	16	58	260*	-	-
陽性 対照	2NF	5					1037	
	NaN <sub>3</sub>	2	593	436				
	AAC	50						405
	NQO	2				1990		
		10			1362			
	AAN	5	2340	133		498		377
	B[a]P	10					276	

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

- : 毒性の影響のため、復帰変異コロニーは生育できなかった。

(V) : 背景細菌叢の重度の生育阻害が認められた。

(S) : 背景細菌叢の軽度の生育阻害が認められた。

(資料 混・代-13)

5) 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異性試験

試験機関:

報告書作成年: 2001年 [GLP対応]

検体純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537)及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 pKM101、WP2 uvrA pKM101) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はDMSOに溶解した。

投与量設定のために、TA100株を用いて、1.6、8、40、200、1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレート の用量で用量設定試験を行った。この試験の結果、1000  $\mu\text{g}$ /プレート以上で毒性の影響および検体の析出が認められたことから、試験1および試験2の用量を次のように設定した。

試験2では、S-9 Mix+においてプレインキュベーションを行った。

試験1

溶媒対照、1.6、8、40、200、1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレート

試験2

溶媒対照、31.25、62.5、125、250、500および1000  $\mu\text{g}$ /プレート

変異原性の陽性判定基準

- 1) 有意水準1%のDunnett検定で、有意( $P \leq 0.01$ )かつ用量相関性を示した場合。
- 2) 1)で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

結果: 結果は次頁の表に示した。

2回の試験において、S-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。なお、ほとんどの菌株に対しS-9 Mix +では、1000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で復帰変異数の減少がみられたが、明らかな毒性の影響は認められなかった。

一方陽性の2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、4-ニトロキノリン 1-オキシド、ベンゾ[a]ピレンおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

試験 1

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型				フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$	-	110	21	46	108	37	10
検 体	1.6		108	21	49	131	38	15
	8		109	20	49	134	43	14
	40		121	26	51	103	35	12
	200		138*	20	46	109	29	11
	1000		112	16	50	92	42	4
	5000		98	15	25	70	31	5
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		+	129	31	88	262	38
検 体	1.6	129		22	101	286	41	16
	8	130		28	112	317*	42	15
	40	122		29	105	299	44	15
	200	111		25	70	212	45	9
	1000	135		19	82	241	43	10
	5000	110		16	69	166	34	7
陽 性 対 照	2NF	5					1082	
	NaN <sub>3</sub>	2	724	764				
	AAC	50					146	
	NQO	2				1522		
		10			921			
	AAN	5	2966	237		1620	346	
	B[a]P	10				291		

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\*:  $p \leq 0.05$  Dunnett検定

1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿が認められた。

試験 2

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型				フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$	-	105	16	39	157	20	17
検体	31.25		108	16	38	188	27	16
	62.5		123	12	37	181	31*	17
	125		102	17	43	205*	27	15
	250		108	15	41	155	25	8
	500		104	12	38	171	26	15
	1000		109	13	36	182	24	16
溶媒対照	50 $\mu\text{l}$	+	109	21	66	190	33	17
検体	31.25		88	17	73	203	31	16
	62.5		113	22	60	203	30	16
	125		122	23	84*	203	37	21
	250		120	25	78	212	33	19
	500		126	18	76	220	33	16
	1000		100	16	44	116	24	10
陽性 対照	2NF	5				876		
	NaN <sub>3</sub>	2	721	621				
	AAC	50					264	
	NQO	2				2082		
		10			868			
	AAN	5	2187	187		595	380	
	B[a]P	10					289	

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\*:  $p \leq 0.05$  Dunnett検定

-S9では500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿が認められた。

+S9では250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿が認められた。

(資料 混・代-14)

6) 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異性試験

試験機関:

報告書作成年: 2001年 [GLP対応]

検体純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 pKM101, WP2 uvrA pKM101) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体はDMSOに溶解した。

投与量設定のために、TA100株を用いて1.6、8、40、200、1000および5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で用量設定試験を行った。この試験の結果、1000および5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で毒性の影響が認められたので、試験1および試験2の用量を次のように設定した。試験2では、S-9 Mix+においてプレインキュベーションを行った。

試験1

溶媒対照、0.32、1.6、8、40、200および1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$

試験2

TA98, TA100, TA1535およびTA1537 (S-9 Mix +) 並びに

WP2 pKM101およびWP2 uvrA pKM101 (S-9 Mix +/-)

溶媒対照、25、50、100、200、400および800  $\mu\text{g}/\text{プレート}$

TA98, TA100, TA1535およびTA1537 (S-9 Mix -)

溶媒対照、6.25、12.5、25、50、100および200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$

変異原性の陽性判定基準

- 1) 有意水準1%のDunnnett検定で、有意 ( $P \leq 0.01$ ) かつ用量相関性を示した場合。
- 2) 1) で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

結果: 結果は次頁の表に示した。

試験1のWP2 pKM101およびWP2 uvrA pKM101 (S-9 Mix -) において、復帰変異コロニー数が統計学的に有意に増加した。しかしながら、その増加の程度はこの菌株の変動の範囲内と考えられ、用量との関連も認められなかったこと、および試験2では認められなかったことから、検体の変異原性によるものではないと考えられた。

上記以外では、2回の試験において、S-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。なお、全ての菌株に対して上位濃度で毒性の影響が認められた。

一方陽性の2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、4-ニトロキノリン 1-オキシド、ベンゾ[a]ピレンおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

試験 1

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型				フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$	-	81	15	37	141	36	10
検体	0.32		87	14	44	168***	36	10
	1.6		101*	13	55*	169***	31	16*
	8		91	14	49	164**	35	10
	40		90	11	58**	153	34	11(S)
	200		70(S)	12	49	131	19(S)	4(V)
	1000		-	14(S)	19(S)	63(S)	-	-
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$	+	110	8	100	286	36	17
検体	0.32		113	8	108	264	37	18
	1.6		119	8	115	272	32	20
	8		104	6	108	277	28	18
	40		106	11	110	280	40	16
	200		117	8	96	236	35	15
	1000		23(V)	14(S)*	57(S)	175	20(V)	-
陽性 対照	2NF	5	-				923	
	NaN <sub>3</sub>	2	-	601	443			
	AAC	50	-					198
	NQO	2	-				1622	
		10	-			1179		
	AAN	5	+	1455	34		700	68
	B[a]P	10	+				340	

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド

AAN : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

- : 毒性の影響のため、復帰変異コロニーは生育できなかった。

(V) : 背景細菌叢の重度の生育阻害が認められた。

(S) : 背景細菌叢の軽度の生育阻害が認められた。

\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.005$  Dunnett検定



試験 2

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型				フレームシフト	
			TA100	TA1535	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101	TA98	TA1537
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		80	18	38	127	27	13
検体	6.25	-	91	17			28	15
	12.5		91	13			24	13
	25		97	18	44	123	24	11
	50		92	20	39	110	27	10
	100		81	17	40	107	22	7(S)
	200		75(S)	20	25	88(S)	15(S)	7(V)
	400				17(S)	56(S)		
	800				10(S)	23(S)		
溶媒対照	50 $\mu\text{l}$		112	18	45	144	30	22
検体	25	+	107	18	47	109	36	21
	50		109	21	51	140	34	17
	100		118	16	47	139	39	21
	200		124	18	53	108	35	16
	400		100	26	48	120	28(S)	7(V)
	800		17(V)	22(S)	49(S)	98(S)	-	-
陽性 対照	2NF	5					721	
	NaN <sub>3</sub>	2	665	502				
	AAC	50						206
	NQO	2				1780		
		10			824			
	AAN	5	357	117		1428		201
	B[a]P	10					243	

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド  
 陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン  
           ; NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム  
           ; AAC : 9-アミノアクリジン  
           ; NQO : 4-ニトロキノリン 1-オキシド  
           ; AAN : 2-アミノアントラセン  
           ; B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

- : 毒性の影響のため、復帰変異コロニーは生育できなかった。

(V) : 背景細菌叢の重度の生育阻害が認められた。

(S) : 背景細菌叢の軽度の生育阻害が認められた。

空欄は試験せず

(資料 混・代-15)

7) 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異性試験

試験機関:

報告書作成年: 2002年 [GLP対応]

検体純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA/pKM101) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体はDMSOに溶解した。

投与量設定のために、5、15、50、150、500、1500および5000  $\mu$ g/プレートの用量で試験1(用量設定試験)を行った。この試験の結果、5000  $\mu$ g/プレートの用量で沈殿が認められたので、試験2の用量を次のように設定した。試験2では、プレインキュベーションを行った。

試験2: 溶媒対照、50、150、500、1500および5000  $\mu$ g/プレート

変異原性の陽性判定基準

- 1) 溶媒対照と比較して少なくとも2倍増加し、かつ正の用量相関性を示した場合。
- 2) 1) で示した陽性反応に再現性が認められる場合。

結果: 結果は次頁の表に示した。

2回の試験において、S-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。なおいずれの濃度でも肉眼的な背景細菌叢の減少は認められなかった。全ての菌株に対してS-9 Mixの有無にかかわらず最高濃度で沈殿が認められた。

一方陽性の2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(AF-2)、ベンゾ[a]ピレンおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

試験 1(用量設定試験)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 uvrA pKM101	TA98	TA1537	
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		142	29	199	42	16	
検体	5	-	140	21	225	42	15	
	15		129	22	208	44	17	
	50		123	20	204	48	7	
	150		123	22	192	41	7	
	500		127	20	161	50	8	
	1500		128	20	156	38	7	
	5000		84	16	102	32	4	
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$		119	26	226	56	20	
検体	5	+	160	17	214	56	18	
	15		153	16	183	49	18	
	50		171	17	156	52	17	
	150		142	20	177	43	19	
	500		146	12	199	44	16	
	1500		146	11	172	40	14	
	5000		138	11	156	34	5	
陽性 対照	2NF	1	-			2406		
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	512	448			
	AAC	50	-				252	
	AF-2	0.05	-			2078		
	AAN	2	+		92			
		10	+			731		
B[a]P	5	+	739			606	306	

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

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

AAN : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

空欄は試験せず

試験 2

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト		
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> pKM101	TA98	TA1537	
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$	-	137	19	110	46	12	
検 体	50		143	21	94	53	15	
	150		165	17	103	41	12	
	500		139	16	112	40	11	
	1500		141	9	88	49	10	
	5000		125	16	75	41	5	
溶媒対照	100 $\mu\text{l}$	+	150	23	94	44	30	
検 体	50		162	17	94	40	19	
	150		138	21	114	37	28	
	500		148	22	99	41	25	
	1500		135	20	103	37	20	
	5000		129	18	85	41	10	
陽 性 対 照	2NF	1				1597		
	NaN <sub>3</sub>	0.5	449	298				
	AAC	50					1698	
	AF-2	0.005			1037			
	AAN	2		116				
		10			844			
B[a]P	5	+	739			514	385	

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

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

AAN : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

空欄は試験せず

(資料 混・代-16)

8) 代謝物の細菌を用いた  
復帰変異性試験

試験機関:

報告書作成年: 1993年[GLP対応]

検体純度:

方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella tryphimurium*、5菌株(TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538)を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体を溶解させるため、ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。TA100を用いた用量設定試験の結果、最大用量の5000  $\mu$ g/plateにて沈澱も細胞毒性も認められなかったため、本試験では5000  $\mu$ g/plateを最大用量とし250, 500, 1000, 2500及び5000  $\mu$ g/plateに設定した。試験は3連制とし、2回実施した。

結果: 結果は次頁の表に示す。

2回の試験に於いて検体はS-9 Mixの有無に関わらず、何れの用量、菌株に於いても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対象として用いたアジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン及び2-アミノアントラセンは全ての検定菌株で顕著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S-9 Mixの有無に関わらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと考えられた。

	薬物	濃度 ( $\mu$ g/ plate)	S-9 Mix 有無	復帰変異コロニー数/plate					
				塩基置換型		フレームシフト型			
				TA100	TA1535	TA98	TA1537	TA1538	
試験 1	検体	DMSO	-	128	19	35	13	14	
		250	-	124	18	37	14	16	
		500	-	126	20	30	16	18	
		1000	-	119	22	39	17	18	
		2500	-	113	19	34	13	19	
		5000	-	125	18	37	16	19	
	検体	DMSO	+	135	16	37	20	22	
		250	+	122	15	32	22	25	
		500	+	132	15	44	17	26	
		1000	+	107	14	36	17	20	
		2500	+	120	17	43	16	28	
		5000	+	108	15	41	17	27	
	陽性 対照	アジ化ナトリウム	1	-	773	525			
		9-アミノアクリジン	50	-				228	
2-ニトロフルオレン		1	-			417		427	
2-アミノアントラセン		2	+	2928	308	2212	242	2044	
試験 2	検体	DMSO	-	124	18	31	11	16	
		250	-	115	19	29	9	10	
		500	-	107	23	29	15	15	
		1000	-	118	20	32	11	13	
		2500	-	115	19	35	12	21	
		5000	-	112	19	39	16	17	
	検体	DMSO	+	98	16	41	17	24	
		250	+	113	20	35	17	24	
		500	+	114	13	36	14	26	
		1000	+	110	15	36	13	25	
		2500	+	108	12	42	13	30	
		5000	+	111	20	36	21	24	
	陽性 対照	アジ化ナトリウム	1	-	765	514			
		9-アミノアクリジン	50	-				313	
2-ニトロフルオレン		1	-			363		452	
2-アミノアントラセン		2	+	1934	289	2566	335	2174	

陰性対照は溶媒であるDMSOによって処理したものとした。

(資料 混・代-17)

9) の細菌を用いた復帰突然変異性試験

試験機関:

報告書作成年: 1997年

検体純度:

方法: サルモネラ菌 Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537およびTA102) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。検体はDMSOに溶解した。

投与量設定のために、1、5、10、25、50、100、250、500、1000、2500、5000  $\mu\text{g}$ /プレート の用量で用量設定試験を行った。この試験の結果、250  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で沈殿、500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で背景菌叢の減少が認められたので、本試験の用量を次のように設定し、プレート法で実施した。  
溶媒対照、10、25、50、100および250  $\mu\text{g}$ /プレート

結果: 結果は次頁の表に示した。

S-9 Mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。S-9 Mix+では、TA98およびTA102以外の菌株に対して背景細菌叢の減少が認められた。全ての菌株に対してS-9 Mixの有無にかかわらず最高濃度で沈殿が認められた。

一方陽性の2-ニトロフルオレン、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジンおよびクメンヒドロペルオキシドでは復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

用量設定試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/plate	
			塩基置換型	フレームシフト型
			TA100	TA98
溶媒対照	0	-	104	31
検体	1		108	30
	5		110	30
	10		106	33
	25		84	28
	50		111	28
	100		99	35
	250		100 d	19 d
	500		106 bd	17 bd
	1000		55 bd	14 bd
	2500		U be	U be
5000	U be	U be		
溶媒対照	0	+	127	33
検体	1		105	33
	5		116	22
	10		106	20
	25		108	25
	50		86	33
	100		114	31
	250		111 d	26 d
	500		114 d	30 ad
	1000		91 bd	U be
	2500		U be	U be
5000	U be	U be		

- a - 軽度から中等度の背景細菌叢の減少
- b - 重度の背景細菌叢の減少
- d - プレート上に肉眼的な沈殿の存在
- e - プレートの判別を困難にさせる多量の沈殿
- U - 判別不能



本試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	
溶媒対照	0	-	97	10	270	24	9	
検体	10		96	9	249	30	7	
	25		89	7	248	26	5	
	50		105	7	238	28	6	
	100		102	11	250	22	10	
	250		100 d	7 d	246 d	20 d	6 d	
溶媒対照	0	+	109	11	338	28	8	
検体	10		101	8	338	26	7	
	25		105	10	347	27	7	
	50		108	12	366	26	8	
	100		103	10	344	23	5	
	250		93 ad	8 ad	342 d	26 d	6 ad	
陽性対照	2NF	1	-			225		
	2NF	2	+	2272	289		2271	208
		5	+			1280		
対照	NaN <sub>3</sub>	1	-	618	403			
	AAC	50	-				213	
	CHPO	150	-			734		

溶媒対照 ; DMSO : ジメチルスルホキシド

陽性対照 ; 2NF : 2-ニトロフルオレン

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

AAC : 9-アミノアクリジン

CHPO : クメンヒドロペルオキシド

空欄は試験せず

- a - 軽度から中等度の背景細菌叢の減少
- b - 重度の背景細菌叢の減少
- d - プレート上に肉眼的な沈殿の存在

(資料 製剤-1)

### 3. 製剤の毒性

#### (1) エチプロール0.5%粉剤

ラットを用いた急性経口毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 2002年 [GLP対応]

検体純度: エチプロール0.5%粉剤

試験動物: Crj:CD(SD) IGSラット、5週齢、1群雌雄各5匹

体重: 雄 124~134g、雌 110~117g

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を注射用水に懸濁し、投与前日から絶食させた動物に体重1kg当たり、10mlの容量で単回経口投与した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は投与日、投与後7および14日に測定した。試験終了時の全生存動物について剖検を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 > 2000
死亡開始および 終了時間	死亡例は認められなかった
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (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

死亡および一般状態の異常は認められなかった。

体重については、全動物に体重の増加が認められた。

剖検所見では、いずれの動物にも異常は認められなかった。

(資料 製剤-2)

### ラットにおける急性経皮毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 2002年 [GLP対応]

検体純度: エチプロール0.5%粉剤

試験動物: Crj:CD(SD) IGSラット、雄7週齢、雌10週齢、1群雌雄各5匹

体重: 雄 257~269g、雌 227~238g、

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を注射用水で湿らせて、刈毛した背部皮膚に24時間閉塞塗布した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は、投与前日、投与後7および14日に測定した。試験終了時に全生存動物について剖検を行った。

試験結果:

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	雌雄 > 2000
死亡開始および終了時間	死亡例は認められなかった
症状発現および消失時間	投与後4日から開始 投与後11日目に終了
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄 2000 雌 2000

症状として、一部の雌の投与部位の皮膚に軽度の紅斑および鱗屑が認められ、その後1例に痂皮が認められた。皮膚の変化を除いて一般状態の異常は認められなかった。

体重については、全動物に増加が認められた。

剖検では、いずれの動物にも異常は認められなかった。

(資料 製剤-3)

ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

試験機関:

報告書作成年: 2002年 [GLP対応]

検体純度: エチプロール0.5%粉剤

組成 エチプロール原体 0.5%

鋳物質微粉、凝集剤等 99.5%

試験動物: 日本白色種(Kb1:JW,SPF)ウサギ、11週齢、1群雌3匹

体重; 2.2~ 2.6kg

観察期間: 72時間

投与方法: 検体0.5gを注射用水で湿らせ、刈毛した動物の体幹背部の皮膚(約2.5×2.5cm、約6cm<sup>2</sup>)に4時間半閉塞貼布した。皮膚に残った検体は微温水で除去した。

観察項目: 暴露終了後1、24、48および72時間後に投与部位の刺激性変化(紅斑・痂皮および浮腫)の有無等を観察して、農水省ガイドラインに従って採点した。

試験結果: 観察した刺激性変化の採点は以下の表の通りである。

変化	最高評点	経過時間			
		1時間	24時間	48時間	72時間
紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
浮腫	4	0	0	0	0
合計	8	0	0	0	0

投与後、いずれの動物の投与部位でも皮膚反応は認められなかった。

以上の結果から、エチプロール0.5%粉剤はウサギの皮膚に対して刺激性を示さないと考えられた。

(資料 製剤-4)

ウサギを用いた眼一次刺激性試験

試験機関：

報告書作成年：2001年 [GLP対応]

検体純度：エチプロール0.5%粉剤

組成 エチプロール原体 ; 0.5%

鉍物質微粉、凝集剤等 ; 99.5%

試験動物：日本白色種 (Kbl: JW, SPF) ウサギ、11週齢、1群雌6匹

体重 2.2~2.5kg

観察期間：4日間

試験方法：検体 0.1gを非洗眼群3匹は右眼の、洗眼群3匹は左眼の結膜嚢内に適用した。

洗眼群は点眼約30秒後に30秒間精製水を用いて洗眼した。

観察項目：投与後 1、24、48および72時間および4日後に角膜、虹彩および結膜に対する刺激性変化を観察した。角膜の混濁程度、虹彩の損傷程度、結膜の発赤および浮腫の程度は農水省ガイドラインに従い、角膜の混濁範囲および分泌物については、Draizeの方法に従って採点した。

試験結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表の通りである。

項目			最高 評点	適用後時間					
				1時間	24時間	48時間	72時間	4日間	
非 洗 眼 群	動物 番号 80101	角膜混濁	程 度 (A)	4	0	0	0	0	0
			面 積 (B)	4	0	0	0	0	0
			合計 AxBx5	80	0	0	0	0	0
		虹 彩	虹 彩 (A)	2	0	0	0	0	0
			合計 Ax5	10	0	0	0	0	0
		結 膜	発 赤 (A)	3	1	1	0	0	0
			浮 腫 (B)	4	1	0	0	0	0
			分泌物 (C)	3	1	0	0	0	0
			合計 (A+B+C) x2	20	6	2	0	0	0
	合 計			110	6	2	0	0	0
	動物 番号 80102	角膜混濁	程 度 (A)	4	0	0	0	0	0
			面 積 (B)	4	0	0	0	0	0
			合計 AxBx5	80	0	0	0	0	0
		虹 彩	虹 彩 (A)	2	0	0	0	0	0
合計 Ax5			10	0	0	0	0	0	
結 膜		発 赤 (A)	3	1	1	1	1	0	
		浮 腫 (B)	4	1	0	0	0	0	
		分泌物 (C)	3	1	0	0	0	0	
		合計 (A+B+C) x2	20	6	2	2	2	0	
合 計			110	6	2	2	2	0	

項 目				最高 評点	適用後時間					
					1時間	24時間	48時間	72時間	4日間	
非 洗 眼 群	動物 番号 80103	角膜混濁	程 度(A)	4	0	0	0	0	0	
			面 積(B)	4	0	0	0	0	0	
			合計 AxBx5	80	0	0	0	0	0	
		虹 彩	虹 彩(A)	2	0	0	0	0	0	
			合計 Ax5	10	0	0	0	0	0	
		結 膜	発 赤(A)	3	1	1	0	0	0	
			浮 腫(B)	4	1	0	0	0	0	
			分泌物(C)	3	1	0	0	0	0	
			合計(A+B+C)x2	20	6	2	0	0	0	
		合 計			110	6	2	0	0	0
		総 計			660	18	6	2	2	0
平 均			110	6	2	0.7	0.7	0		
洗 眼 群 (3匹平均)	角膜混濁	程 度(A)	4	0	0	0	0	0		
		面 積(B)	4	0	0	0	0	0		
		合計 AxBx5	80	0	0	0	0	0		
	虹 彩	虹 彩(A)	2	0	0	0	0	0		
		合計 Ax5	10	0	0	0	0	0		
	結 膜	発 赤(A)	3	1	0.33	0	0	0		
		浮 腫(B)	4	1	0	0	0	0		
		分泌物(C)	3	0	0	0	0	0		
		合計(A+B+C)x2	20	4	0.7	0	0	0		
	合 計			110	4	0.7	0	0	0	

角膜および虹彩の刺激性変化は、洗眼群および非洗眼群ともに認められなかった。  
 結膜の刺激性変化は、非洗眼群では投与後1時間に全例に軽度の発赤、浮腫および分泌物が認められたが、投与後48時間に2例、4日には1例が消失した。  
 洗眼群では、投与後1時間に全例に軽度の発赤および浮腫が認められたが、投与後24時間に2例、48時間には1例が消失した。

以上の結果から、エチプロール0.5%粉剤はウサギの眼粘膜に対して可逆性の弱い刺激性を示すものと考えられた。

(資料 製剤-5)

モルモットを用いた皮膚感作性試験

試験機関:

報告書作成年: 2002年 [GLP対応]

検体純度: エチプロール0.5%粉剤

組成 エチプロール原体 0.5%

鉍物質微粉、凝集剤等 99.5%

試験動物: Hartley系(Std:Hartley、クリーン)モルモット、6週齢、

検体投与群 雌20匹、検体対照群 雌10匹

体重 329~369g

試験期間: 48時間観察

試験操作: [Buehler法]

投与量設定根拠:

感作; 左側腹部を剃毛し、検体の60w/v%懸濁液0.4mlを6時間閉塞貼布した。

この操作を1週間間隔で3回行った。

陽性対照群には、DNCBの0.1w/v%溶液0.4mlを6時間閉塞貼布し、この操作を1週間間隔で3回行った。

惹起; 最終感作の2週間後に剃毛した右腹に検体の60w/v%懸濁液0.4mlを6時間閉塞貼布した。

陽性対照群には、DNCBの0.1w/v%溶液0.4mlを6時間閉塞貼布した。

観察項目: 惹起24時間および48時間後に適用部位の皮膚を観察し、農水省ガイドラインの採点基準に従って採点した。

平均評価点; 各観察時ごとに以下の式により求めた。

$$\text{平均評価点} = \frac{\text{皮膚反応の評価点の合計}}{\text{動物数}}$$

陽性率; 評価点1以上を陽性とし、以下の式により求めた。

$$\text{陽性率} = \frac{\text{陽性動物数}}{\text{動物数}} \times 100$$

試験結果：各観察時間における感作変化が認められた動物数を下表に示す。

	感 作	惹 起	供試 動物 数	感作反応動物数										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	平均	0	1	2	3	平均		
検 体	60w/v% 検体	60w/v% 検体	20匹	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
	注射用水	60w/v% 検体	10匹	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
陽 性 対 照	0.1w/v% DNCB	0.1w/v% DNCB	5匹	0	0	4	1	2.2	0	0	3	2	2.4	100	100
	アセトン	0.1w/v% DNCB	5匹	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0

注：陽性対照は同時期に同一手順で実施した試験を用いた。

検体投与群および検体対照群いずれも感作処置後および惹起後に皮膚反応は認められなかった。

以上の結果からエチプロール0.5%粉剤の皮膚感作性は陰性であると考えられた。



(資料 製剤-6)

(2) エチプロール10%水和剤 (フロアブル)

ラットを用いた急性経口毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 2002年 [GLP対応]

検体純度: エチプロール10%水和剤 (フロアブル)

試験動物: Crj:CD(SD) IGSラット、7週齢、1群雌雄各5匹

体重: 雄 212~229g、雌 159~180g

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を投与前日から絶食させた動物に体重1kg当たり、10mlの容量で単回経口投与した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は投与日、投与後1、3、7および14日に測定した。試験終了時の全生存動物について剖検を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000、1000、500
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 2000と推定された。
死亡開始および 終了時間	雄 投与後約6時間に認められた。 雌 投与後約2時間から開始、6時間まで認められた。
症状発現および 消失時間	雄 投与後約6時間に認められた 雌 投与後約2時間から開始、6時間まで認められた。
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	雄 1000 雌 1000
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	雄 1000 雌 1000

症状として、雌雄に振戦、間代性痙攣および強直性痙攣が死亡した動物に認められた。

体重では、1000mg/kg以上の投与群雄と各投与群雌で投与翌日に増加抑制あるいは減少が認められたが、その後はほぼ順調な増加を示した。

剖検所見では、いずれの動物にも異常は認められなかった。

(資料 製剤-7)

ラットにおける急性経皮毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 2002年 [GLP対応]

検体純度: エチプロール10%水和剤 (フロアブル)

試験動物: Crj:CD(SD) IGSラット、7週齢、1群雌雄各5匹

体重: 雄 242~261g、雌 172~201g、

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を、2mL/kg(比重:1) の用量で刈毛した背部皮膚に24時間閉塞塗布した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は、投与前日、投与後1、3、7および14日に測定した。試験終了時に全生存動物について剖検を行った。

試験結果:

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	雌雄 > 2000
死亡開始および終了時間	死亡例は認められなかった。
症状発現および消失時間	症状は認められなかった。
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄 2000 雌 2000

体重については、雌雄で推移に異常は認められなかった。

剖検では、いずれの動物にも異常は認められなかった。

(資料 製剤-8)

ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

試験機関：

報告書作成年：2003年 [GLP対応]

検体純度：エチプロール10%水和剤（フロアブル）

組成 エチプロール原体 10%  
水、界面活性剤等 90%

試験動物：日本白色種ウサギ、17週齢、1群雌3匹

体重；2.70～3.01kg

観察期間：6日間観察

投与方法：検体0.5mLを、刈毛した動物の体幹背部の皮膚(約2.5×2.5cm)に4時間閉塞貼布した。皮膚に残った検体は注射用水で湿らせた脱脂綿で清拭した。

観察項目：投与1、4および5時間後に、投与翌日以降は投与6日後まで1日1回、投与部位の刺激性変化（紅斑・痂皮および浮腫）の有無等を観察して、Draize法に従って採点、評価した。

試験結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表の通りである。

動物番号	項目	経過時間						
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日	5日	6日
1101	紅斑・痂皮	0	0	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0
1102	紅斑・痂皮	1	1	1	1	1	1	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0
1103	紅斑・痂皮	1	1	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	2	2	1	1	1	1	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	0.7	0.7	0.3	0.3	0.3	0.3	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0
皮膚一次刺激指数		0.5						

評点1の紅斑が2/3例に認められたが、投与後6日までに全例で消失した。

以上の結果から、被験物質はウサギの皮膚に対して「軽度刺激物」と考えられた。

ウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料 製剤-9)

試験機関：

報告書作成年：2003年 [GLP対応]

検体純度：エチプロール10%水和剤（フロアブル）

組成 エチプロール原体 ; 10%

水、界面活性剤等 ; 90%

試験動物：日本白色種ウサギ、14週齢、1群雌3匹

体重 2.75~3.11kg

観察期間：72時間

試験方法：検体 0.1mLを非洗眼群および洗眼群各3匹の左眼の結膜嚢内に適用した。洗眼群は点眼約30秒後に100mLの注射用水を用いて30秒間洗眼した。

観察項目：投与後 1、24、48および72時間後に角膜、虹彩および結膜に対する刺激性変化を観察した。刺激性は、Kay and Calandraの方法を参考にして評価した。

試験結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表の通りである。

項	目	最高 評点	適用後時間					
			1時間	24時間	48時間	72時間		
非 洗 眼 群	動物 番号 1101	角膜混濁	程 度(A)	4	0	0	0	0
			面 積(B)	4	0	0	0	0
			合計 AxBx5	80	0	0	0	0
	虹 彩	虹 彩(A)	2	0	0	0	0	
		合計 Ax5	10	0	0	0	0	
	結 膜	発 赤(A)	3	1	1	0	0	
		浮 腫(B)	4	0	0	0	0	
		分泌物(C)	3	1	0	0	0	
		合計 (A+B+C) x2	20	4	2	0	0	
	合 計			110	4	2	0	0
	動物 番号 1102	角膜混濁	程 度(A)	4	0	0	0	0
			面 積(B)	4	0	0	0	0
			合計 AxBx5	80	0	0	0	0
		虹 彩	虹 彩(A)	2	0	0	0	0
			合計 Ax5	10	0	0	0	0
結 膜		発 赤(A)	3	1	1	0	0	
		浮 腫(B)	4	0	0	0	0	
		分泌物(C)	3	1	0	0	0	
		合計 (A+B+C) x2	20	4	2	0	0	
合 計			110	4	2	0	0	
動物 番号 1103	角膜混濁	程 度(A)	4	0	0	0	0	
		面 積(B)	4	0	0	0	0	
		合計 AxBx5	80	0	0	0	0	
	虹 彩	虹 彩(A)	2	0	0	0	0	
		合計 Ax5	10	0	0	0	0	
	結 膜	発 赤(A)	3	1	1	0	0	
		浮 腫(B)	4	0	0	0	0	
		分泌物(C)	3	1	0	0	0	
		合計 (A+B+C) x2	20	4	2	0	0	
	合 計			110	4	2	0	0

項 目		最高 評点	適用後時間				
			1時間	24時間	48時間	72時間	
非洗 眼群	合 計	660	12	6	0	0	
	平 均	110	4	2	0	0	
洗眼群 (3匹平均)	角膜混濁	程 度(A)	4	0	0	0	0
		面 積(B)	4	0	0	0	0
		合計 AxBx5	80	0	0	0	0
	虹 彩	虹 彩(A)	2	0	0	0	0
		合計 Ax5	10	0	0	0	0
	結 膜	発 赤(A)	3	0.7	0	0	0
		浮 腫(B)	4	0	0	0	0
		分泌物(C)	3	0.7	0	0	0
		合計 (A+B+C)x2	20	2.7	0	0	0
	合 計		110	2.7	0	0	0

角膜および虹彩の刺激性変化は、洗眼群および非洗眼群ともに認められなかった。結膜の刺激性変化は、非洗眼群では投与後1時間に全例に評点1の発赤および分泌物が認められたが、投与後24時間には発赤のみ認められ、投与後48時間には刺激反応が全例ですべて消失した。

洗眼群では、投与後1時間に2/3例に評点1の発赤および浮腫が認められたが、投与後24時間にはすべて消失した。

以上の結果から、被験物質はウサギの眼粘膜に対して「極く軽度の刺激性あり」と考えられた。

(資料 製剤-10)

モルモットを用いた皮膚感作性試験

試験機関:

報告書作成年: 2002年 [GLP対応]

検体純度: エチプロール10%水和剤 (フロアブル)

組成 エチプロール原体 10%  
水、界面活性剤等 90%

試験動物: ハートレー系白色モルモット、6週齢、

検体投与群 雌20匹、陰性対照群 雌10匹

陽性対照物質感作群 雌10匹、陽性対照物質非感作群 雌10匹

体重 329~403g

試験期間: 48時間観察

試験操作: [Buehler法]

投与量設定根拠;

感作; 左側腹部を剃毛し、検体の原液0.2mlを6時間閉塞貼付した。

この操作を1週間間隔で3回行った。

陽性対照群には、DNCBの1%溶液0.2mlを6時間閉塞貼付し、この操作を1週間間隔で3回行った。陰性対照群は注射用水を、陽性対照物質非感作群はエタノール0.2mlを同様に閉塞貼付した。

惹起; 最終感作の2週間後に剃毛した左腹に25%被験液0.2mlを6時間閉塞貼付した。

陽性対照群には、DNCBの0.25%溶液0.2mlを6時間閉塞貼付した。

観察項目: 惹起24時間および48時間後に適用部位の皮膚を観察し、Magnusson & Kligmanの基準に従って採点した。

平均評価点; 各観察時ごとに以下の式により求めた。

$$\text{平均評価点} = \frac{\text{皮膚反応の評価点の合計}}{\text{動物数}}$$

陽性率; 評価点1以上を陽性とし、以下の式により求めた。

$$\text{陽性率} = \frac{\text{陽性動物数}}{\text{動物数}} \times 100$$

試験結果：各観察時間における感作変化が認められた動物数を下表に示す。

	感 作	惹 起	供試 動物 数	感作反応動物数										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	平均	0	1	2	3	平均		
検 体	原液	25% 検体	20匹	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
	注射用水	25% 検体	10匹	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
陽 性 対 照	1% DNCB	0.25% DNCB	10匹	0	0	1	9	2.9	0	0	3	7	2.7	100	100
	エタノール	0.25% DNCB	10匹	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0

検体投与群および陰性対照群いずれも惹起後に皮膚反応は認められなかった。

以上の結果から被験物質の皮膚感作性は陰性であると考えられた。

(資料 製剤-11)

(3) エチプロール1.5%粒剤

ラットを用いた急性経口毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 2005年 [GLP対応]

検体純度: エチプロール粒剤

組成	エチプロール原体	1.5 %
	界面活性剤及び鉱物質微粉他	98.5 %

試験動物: SD(Crj:CD(SD)IGS)ラット、8週齢、1群雌3匹

体重: 初回投与群 175~185g、二回目投与群 178~189g

試験期間: 14日間観察

試験方法: 検体を乳鉢内で摩砕しつつ蒸留水を加えて懸濁液を調製し、投与前日から絶食させた動物に体重100g当たり、1mlの容量で単回経口投与した。

試験項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。体重は投与直前、投与後7および14日に測定した。試験終了時の全生存動物について剖検を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	初回 2000 二回目 2000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	> 2000
死亡開始および 終了時間	死亡例は認められなかった。
症状発現および 消失時間	症状は認められなかった。
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000
死亡例の認められなかった最 高投与量 (mg/kg)	2000

死亡および一般状態の異常は認められなかった。

体重については、全動物に体重の増加が認められた。

剖検所見では、いずれの動物にも異常は認められなかった。



(資料 製剤-12)

ラットにおける急性経皮毒性試験

試験機関：

報告書作成年：2005年 [GLP対応]

検体純度：エチプロール 粒剤

組成 エチプロール原体 1.5 %  
界面活性剤及び鉱物質微粉他 98.5%

試験動物：SD(Crj:CD(SD)IGS)ラット、8週齢、1群雌雄各5匹

体重：雄 295～311g、雌 192～210g、8週齢、

試験期間：14日間観察

試験方法：検体を乳鉢で摩砕しつつ、蒸留水を加えて懸濁液を調製し、剪毛した背部皮膚に24時間塗布した。

試験項目：中毒症状および生死を14日間観察した。体重は、投与前日、投与後7および14日に測定した。試験終了時に全生存動物について剖検を行った。

試験結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	雌雄 2000
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	雌雄 > 2000
死亡開始および終了時間	死亡例は認められなかった。
症状発現および消失時間	中毒症状は認められなかった。
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄 2000 雌 2000

死亡および中毒症状は認められなかった。

体重については、全動物に増加が認められた。

剖検では、いずれの動物にも異常は認められなかった。

(資料 製剤-13)

ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

試験機関：

報告書作成年：2005年 [GLP対応]

検体純度：エチプロール粒剤

組成 エチプロール原体 1.5 %  
界面活性剤及び鉱物質微粉他 98.5 %

試験動物：日本白色種ウサギ、18週齢、1群雌3匹  
体重；3.12～3.45kg

観察期間：3日間観察

投与方法：検体0.5gを、刈毛した動物の体幹背部の皮膚(約2.5×2.5cm)に4時間閉塞貼布した。皮膚に残った検体は注射用水で湿らせた脱脂綿で清拭した。

観察項目：投与1、4および5時間後に、投与翌日以降は投与3日後まで1日1回、投与部位の刺激性変化(紅斑・痂皮および浮腫)の有無等を観察して、Draize法に従って採点、評価した。

試験結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表の通りである。

変化	経過時間			
	1時間	24時間	48時間	72時間
紅斑・痂皮	0	0	0	0
浮腫	0	0	0	0
合計	0	0	0	0
平均	0	0	0	0
皮膚一次刺激指数	0			

いずれの観察時期においても、3/3全例に皮膚反応は認められなかった。

以上の結果から、被験物質はウサギの皮膚に対して「無刺激物」と考えられた。

(資料 製剤-14)

ウサギを用いた眼一次刺激性試験

試験機関：

報告書作成年：2005年 [GLP対応]

検体純度：エチプロール粒剤

組成 エチプロール原体 1.5 %  
界面活性剤及び鉱物質微粉他 98.5%

試験動物：日本白色種ウサギ、15週齢、1群雌3匹

体重 2.42~3.10kg

観察期間：72時間

試験方法：検体 0.1g を非洗眼群および洗眼群各3匹の左眼の結膜嚢内に適用した。洗眼群は投与約30秒後に100mLの注射用水を用いて30秒間洗眼した。

観察項目：投与直後及び1時間後から6時間後まで1時間ごとに、投与翌日以降は3日後まで1日1回、角膜、虹彩および結膜に対する刺激性変化をDraize法に従って採点し、Kay and Calandraの方法を参考にして評価した。

試験結果：観察した刺激性変化の採点は以下の表の通りである。

項目		最高 評点	適用後時間					
			1時間	24時間	48時間	72時間		
非 洗 眼 群	動物 番号 1101	角膜混濁	程 度(A)	4	0	0	0	0
			面 積(B)	4	0	0	0	0
			合計 AxBx5	80	0	0	0	0
	虹 彩	虹 彩(A)	2	0	0	0	0	
		合計 A x 5	10	0	0	0	0	
	結 膜	発 赤(A)	3	1	0	0	0	
		浮 腫(B)	4	0	0	0	0	
		分泌物(C)	3	1	0	0	0	
	合計(A+B+C) x 2	20	4	0	0	0		
	合 計		110	4	0	0	0	
	動物 番号 1102	角膜混濁	程 度(A)	4	0	0	0	0
			面 積(B)	4	0	0	0	0
			合計 AxBx5	80	0	0	0	0
		虹 彩	虹 彩(A)	2	0	0	0	0
合計 A x 5			10	0	0	0	0	
結 膜		発 赤(A)	3	1	0	0	0	
		浮 腫(B)	4	0	0	0	0	
		分泌物(C)	3	1	0	0	0	
合計(A+B+C) x 2	20	4	0	0	0			
合 計		110	4	0	0	0		

項 目			最高 評点	適用後時間				
				1時間	24時間	48時間	72時間	
非 洗 眼 群	動物 番号 1103	角膜混濁	程 度(A)	4	0	0	0	0
			面 積(B)	4	0	0	0	0
			合計 AxBx5	80	0	0	0	0
		虹 彩	虹 彩(A)	2	0	0	0	0
			合計 Ax5	10	0	0	0	0
		結 膜	発 赤(A)	3	1	0	0	0
			浮 腫(B)	4	0	0	0	0
			分泌物(C)	3	1	0	0	0
		合計(A+B+C)x2	20	4	0	0	0	
		合 計	110	4	0	0	0	
合 計	660	12	0	0	0			
平 均	110	4	0	0	0			
洗 眼 群 (3匹平均)	角膜混濁	程 度(A)	4	0	0	0	0	
		面 積(B)	4	0	0	0	0	
		合計 AxBx5	80	0	0	0	0	
	虹 彩	虹 彩(A)	2	0	0	0	0	
		合計 Ax5	10	0	0	0	0	
	結 膜	発 赤(A)	3	0.3	0	0	0	
		浮 腫(B)	4	0	0	0	0	
		分泌物(C)	3	0	0	0	0	
	合計(A+B+C)x2	20	0.7	0	0	0		
	合 計	110	0.7	0	0	0		

非洗眼群では、投与後1時間に結膜発赤および分泌物が認められたが、投与後24時間には刺激反応が全例ですべて消失した。

洗眼群では、投与後1時間に結膜発赤が認められたが、投与後24時間にはすべて消失した。

以上の結果から、被験物質はウサギの眼粘膜に対して「極く軽度の刺激性あり」と考えられた。

(資料 製剤-15)

モルモットを用いた皮膚感作性試験

試験機関：

報告書作成年：2005年 [GLP対応]

検体純度：エチプロール粒剤

組成	エチプロール原体	1.5 %
	界面活性剤及び鉱物質微粉他	98.5 %

試験動物：ハートレー系白色モルモット、5または6週齢、  
検体感作群 雌20匹、検体非感作群 雌10匹  
体重 293～344g

試験期間：48時間観察

試験操作：[Buehler法]

投与量設定根拠：

感作；左側腹部を剃毛し、50%被験液0.2mlを6時間閉塞貼付した。

この操作を1週間間隔で3回行った。

検体非感作群は注射用水0.2mlを同様に閉塞貼付した。

惹起；最終感作の2週間後に剃毛した右腹に25%被験液0.2mlを6時間閉塞貼付した。

観察項目：惹起24時間および48時間後に適用部位の皮膚を観察し、Magnusson & Kligmanの基準に従って採点した。

平均評価点；各観察時ごとに以下の式により求めた。

$$\text{平均評価点} = \frac{\text{皮膚反応の評価点の合計}}{\text{動物数}}$$

陽性率；評価点1以上を陽性とし、以下の式により求めた。

$$\text{陽性率} = \frac{\text{陽性動物数}}{\text{動物数}} \times 100$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験結果：各観察時間における感作変化が認められた動物数を下表に示す。

	感 作	惹 起	供試 動物 数	感作反応動物数										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	平均	0	1	2	3	平均			
検 体	50%検体	25%検体	20匹	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
	注射用水	25%検体	10匹	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0

検体投与群および陰性対照群いずれも惹起後に皮膚反応は認められなかった。

以上の結果から被験物質の皮膚感作性は陰性であると考えられた。

#### 4. 参 考

##### (1) 原体のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 参考-1)

試験機関:

報告書作成年: 2004年

試験目的:

検体純度:

供試動物: Wistar系ラット、1群雌雄各5匹

7週齢、体重: 雄 200~237g、雌 146~177g

観察期間: 7日間

投与方法: 検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁させ投与前日から絶食させた動物に体重1kg当たり、10mlの容量で単回強制経口投与した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を7日間観察した。投与1および7日に体重を測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結 果:

投与方法	経口	経口
投与量 (mg/kg)	2000	5000
死亡開始および終了時間	投与2日後に開始 投与2日後に終了	投与3日後に開始 投与5日後に終了
症状発現および消失時間	投与後3時間に発現 投与5日後に消失	投与後3時間に発現 投与6日後に消失
死亡動物数	雄 1 雌 1	雄 2 雌 2

中毒症状として、5000mg/kg群では雌雄全例に鎮静、筋緊張、円背位および過敏、雌雄数例に半閉眼、呼吸異常および鼻周囲の汚れが認められた。2000mg/kg群の雌雄全例に筋緊張および円背位、雄数例および雌全例に過敏、雌雄数例に鎮静および鼻周囲の汚れが認められた。また、両群雌一匹に突発的な痙攣が認められた。

5000mg/kg群の雌雄各2匹、2000mg/kg群の雌雄各1匹が死亡した。

剖検所見では投与に関連する変化は認められなかった。

(資料 参考-2)

(2) 28日間反復経口投与毒性

ラットを用いた混餌投与による28日間反復経口投与毒性試験

試験機関:

報告書作成年: 2001年 [GLP対応]

参考とした理由:

検体純度:

供試動物: Wistar (AF)系ラットRJ:WI (IOPS AF)、1群雌雄各10匹

開始時 6週齢、体重 雄 158~203g、雌 151~171g

投与期間: 28日間 (1999年9月7日~1999年10月4日)

投与方法: 検体を微粉末に粉碎して、0、20、100、500および2500ppmの濃度で飼料に混入し、28日間にわたって随時摂食させた。

用量設定根拠:

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡率; 一般状態および生死を毎日2回観察した。

2500ppm群雄2匹に切迫屠殺または死亡が認められた。これらの動物は、死亡前に全身蒼白が認められ、出血傾向を呈し、肝臓に病変が認められた。5ppm群雄1匹は、採血のための麻酔中に死亡した。

その他の群では、死亡は認められず、投与に関連する一般状態の変化も認められなかった。

神経毒性評価; 順化期間中および投与後3週時に各群全動物を対象として、以下の検査を実施した。

握り反射、正向反射、角膜反射、瞳孔反射、聴覚性驚愕反応、頭部反転反応。投与による影響は認められなかった。

体重変化; 投与開始日、投与期間中毎週1回および剖検前に測定した。

2500ppm群雄では、体重増加量に対照群と比較して有意な減少が認められた。同群雌では、第1週目の体重増加量に有意な減少が認められたが、試験終了時の体重は対照群とほぼ同等であった。

500、100および20ppm群では影響が認められなかった。

摂餌量; 毎週測定した。

2500ppm群雄で対照群と比較して第1および2週目に、雌で第1週目に有意な減少が認められた。500、100および20ppm群では対照群と同様であった。

検体摂取量; 投与期間中の平均検体摂取量(mg/kg/日)は以下のとおりであった。

投与群 (ppm)	20	100	500	2500
雄	1.8	9.2	46.1	219.3
雌	2.0	9.6	46.3	220.2



血液学的検査；投与後23、24または25日目に全群の全生存動物について一晩絶食後、眼窩後方静脈叢から採血し、以下の項目を検査した。

赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、白血球数、白血球百分率、血小板数、プロトロンビン時間。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

性別	雄				雌			
	20	100	500	2500	20	100	500	2500
ヘモグロビン				↓94				
MCV						↑104		
MCH					↑104	↑104		
MCHC				↓97				↓96
好中球(%)				↑143				↑160
好中球数				↑142				
リンパ球(%)				↓89				↓89
リンパ球								↓74
血小板数				↑124				↑117
プロトロンビン時間			↑144	↑220		↓89	↓89	

↑↓: P<0.05、↑↓: P<0.01、↑↓: P<0.001  
Dunnettの検定またはMann-Whitney Uの検定

表中の数字は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものの。

2500ppm群雌雄に血小板数の増加、雄にプロトロンビン時間の延長が認められた。500ppm群雌にプロトロンビン時間の延長が認められた。これらの変化は2500ppm群雌の死亡動物の肉眼的病理検査で認められた出血に関連しているものと考えられた。500ppm群および100ppm群雌にプロトロンビン時間の減少が認められたが、用量との関連性はなく、個々の値が同系統、同齡のラットの正常範囲内にあることから、毒性学的に有意であるとは考えられなかった。赤血球パラメータにいくつかの統計学的有意差が認められたが、対照群と比較してその程度が小さいことから、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。2500ppm群で認められた白血球系に関する変動は肝臓に見られる病変(炎症反応)に関連すると考えられた。

血液生化学検査；投与後23、24または25日目に全群の全生存動物について一晩絶食後、眼窩後方静脈叢から採血し、以下の項目の検査をした。

総ビリルビン、血糖、尿素、クレアチニン、総タンパク、アルブミン、総コレステロール、トリグリセリド、塩素、ナトリウム、カリウム、カルシウム、無機リン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、アルカリホスファターゼ(AP)。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

性 別	雄				雌			
	20	100	500	2500	20	100	500	2500
投与群 (ppm)								
総タンパク				↑107		↑ 107	↑116	↑113
アルブミン				↓91				
血糖				↓75				
総コレステロール				↑212			↑169	↑247
トリグリセリド							↑184	↑349
総ビリルビン		↓65	↓65			↓69	↓59	↓63
ALAT				↑464			↑152	↑159
ASAT				(206)				
塩素							↓98	↓97
カルシウム								↑106

↑ ↓ : P<0.05、↑ ↓ : P<0.01、↑ ↓ : P<0.001 ( )は統計学的有意差なし  
Dunnettの検定またはMann-Whitneyの検定  
表中の数字は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものの。

2500ppm群雌雄に総コレステロールの増加、雄にアラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの増加傾向、雌に総タンパクおよびトリグリセリドの増加が認められた。

500ppm群雌に総タンパク、総コレステロールおよびトリグリセリドの増加が認められた。

2500ppm群雌、500ppm群および100ppm群雌雄に総ビリルビンの減少が認められたが、用量との関連性は認められないことから、生物学的有意性はないと考えられた。

その他、散見された有意差は偶発的なもので投与による影響とは考えられなかった。

尿 検 査 : 投与後29、30、31または32日目に全群の全生存動物から一夜尿を採取し、以下の項目について検査した。

外観、尿量、pH、屈折率、グルコース、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、タンパク、尿沈査。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

性 別	雄				雌			
	20	100	500	2500	20	100	500	2500
投与群 (ppm)								
尿量		↓55		↓59	↓43			
pH				↓88				

↑ ↓ : P<0.05、↑ ↓ : P<0.01 Dunnettの検定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

2500、500および20ppm群雄に尿量の減少が認められた。しかしながら、血液生化学的検査において、腎機能障害に関連する項目に変化は認められず、病理組織学的検査においても腎臓に機質的な病変が認められていない。また、用量との関連性が認められず、さらに同系統のラットを用いた90日間反復経口投与毒性試験では尿量の変化が認められなかったことから、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。2500ppm群雄にpHの軽度の低下が認められたが、90日間反復経口投与毒性試験ではpHの変化が認められなかったことから、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。その他の項目では全投与群に影響は認められなかった。

ホルモン検査；投与後23、24または25日目に全群の全生存動物について一晩絶食後、眼窩後方静脈叢から採血し、以下の項目の検査をした。

トリヨードサイロニン(T3)、サイロキシン(T4)および甲状腺刺激ホルモン(TSH)。

性別	雄				雌			
	20	100	500	2500	20	100	500	2500
投与群(ppm)								
T3				↑138				↑149
T4			↓71	↓48				
TSH			↑252	↑359			↑439	↑382

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

↑↓：P<0.05、↑↓：P<0.01 ↑↓：P<0.001

Dunnettの検定またはMann-Whitneyの検定

表中の数字は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

2500ppm群および500ppm群雌雄にTSHの増加、2500および500ppm群雄にT4の減少が認められた。2500ppm群雌雄にT3の軽度であるが有意な増加が認められた。100および20ppm群ではいずれの検査時期にも影響は認められなかった。

眼科検査；投与開始前に全群、3週目に対照群と2500ppm群の全生存動物を検査した。投与に関連した変化は認められなかった。

臓器重量；投与後29、30、31または32日目に全生存動物の以下の臓器重量を測定し、対体重比および対脳比も算出した。

副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、前立腺、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺（上皮体を含む）、子宮。対の臓器は併せて計測した。

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を下表に示す。

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		20	100	500	2500	20	100	500	2500
肝 臓	絶対重量			↑135	↑198		↑120	↑196	↑262
	対体重比			↑137	↑217		↑118	↑186	↑260
	対脳重比			↑135	↑205		↑120	↑195	↑264
甲 状 腺	絶対重量			↑141	↑153			↑140	↑160
	対体重比			↑149	↑171			↑132	↑157
	対脳重比			↑146	↑161			↑140	↑161
副 腎	絶対重量			↑116	↑123		↑123		↑135
	対体重比			↑118	↑129		↑121		↑134
	対脳重比			↑116	↑126		↑121		↑135
下 垂 体	絶対重量				↓77				
	対体重比								
	対脳重比								
脾 臓	絶対重量							↓85	↓83
	対体重比							↓81	↓83
	対脳重比								
前立腺	絶対重量				↓63				
	対体重比				↓69				
	対脳重比				↓65				
精 巢	絶対重量								
	対体重比				↑113				
	対脳重比								

↑↓: P<0.05, ↑↓: P<0.01    ↑↓: P<0.001  
Dunnettの検定またはMann-WhitneyのU検定

表中の数字は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものの。

2500ppmおよび500ppm群の雌雄で、肝臓および甲状腺の絶対、対体重比および対脳重比に増加が認められ、投与に関連した変化と考えられた。2500ppm群雌雄に副腎の絶対、対体重比および対脳重比の増加が認められた。

2500ppm群の雄で前立腺の有意な重量減少が認められたが、病理組織学的変化は認められず、また、最終体重が減少していたことから、毒性学的意義は疑わしいと考えられた。2500ppmおよび500ppm群雌に脾臓の重量減少が認められたが、病理組織学的変化が認められなかったことから、毒性学的に意義があるとは考えられなかった。500ppm群雄および100ppm群雌に副腎の絶対、対体重比及び脳重比の有意な増加が認められたが、用量との関連が認められず、病理組織学的変化も認められなかったことから、毒性学的に意義があるとは考えられなかった。その他散見された有意差は偶発的なもので投与による影響とは考えられなかった。

肉眼的病理検査；途中死亡および投与終了時の全生存動物について剖検を行った。

主な病変が認められた動物数を下表に示す。

性別		雄					雌				
投与群 (ppm)		0	20	100	500	2500	0	20	100	500	2500
検査動物数		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
肝臓	肥大				10	9				10	10
	暗色化		1		10	9				9	10
甲状腺	肥大					2					2
腎臓	暗色化					9					10

2500および500ppm群雌雄に肝臓肥大および暗色化が認められた。2500ppm群雌雄に腎臓の暗色化および甲状腺の肥大が認められた。その他投与に関連した肉眼的変化は認められなかった。

病理組織学的検査；全動物から以下の臓器および組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン中に固定し、パラフィン包埋した。

副腎、脾臓、大動脈、下垂体、脳、前立腺、十二指腸、盲腸、直腸、結腸、回腸、空腸、唾液腺(顎下腺)、坐骨神経、精囊、骨格筋、関節面(大腿骨-頸骨)、皮膚、脊髄(頸部、胸部、腰部)、心臓、脾臓、胸骨および骨髄、胃、腎臓、肝臓、胸腺、肺、甲状腺(上皮小体を含む)、喉頭、舌、リンパ節、気管、乳腺、膀胱、食道、子宮、卵巣、陰および肉眼的病部。

眼、視神経、ハーダー腺、精巣上体および精巣はDavidson液で固定した。

また大腿骨骨髄塗抹標本を作成したが、検査はしなかった。

対照群および2500ppm群の全動物および死亡動物について、全臓器の病理組織学的検査を行った。500ppm、100ppmおよび20ppm群では肝臓、肺、副腎、甲状腺、腎臓および異常組織について検査した。

主な病変が認められた動物数を下表に示す。

性別		雄					雌				
投与群 (ppm)		0	20	100	500	2500	0	20	100	500	2500
検査動物数		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
肝臓	肝細胞肥大	0	0	0	10 <sup>***</sup>	10 <sup>***</sup>	0	0	0	9 <sup>***</sup>	10 <sup>***</sup>
	肝細胞壊死	0	0	0	3	7 <sup>**</sup>	2	1	0	1	6
	黄色色素沈着	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9 <sup>***</sup>
甲状腺	濾胞上皮細胞肥大	0	0	0	10 <sup>***</sup>	10 <sup>***</sup>	0	0	0	10 <sup>***</sup>	10 <sup>***</sup>
腎臓	黄色色素沈着	0	0	0	0	9 <sup>***</sup>	0	0	0	0	9 <sup>***</sup>
副腎皮質	空胞化	0	0	0	3	9 <sup>***</sup>	0	0	1	3	10 <sup>***</sup>

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001 Fisherの直接確率検定

2500および500ppm群雌雄に肝細胞肥大、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が認められた。また、2500ppm群雌雄の腎臓に黄色色素沈着、副腎皮質の束状帯および球状帯に空胞化、同群雄に肝細胞壊死、同群雌の肝臓に黄色色素沈着の増加が認められた。

その他に認められた病変は、偶発的なものであり、投与に関連はないと考えられた。

以上の結果、2500ppm群雄に死亡、体重増加抑制、摂餌量減少、血液学的には雌雄に血小板数の増加、雄にプロトロンビン時間の延長、血液生化学的には雌雄に総コレステロールの増加、雄にアラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの増加、雌に総タンパク、トリグリセリドの増加、甲状腺ホルモンでは雌雄にTSHの増加、雄にT4の減少、雌雄に肝臓、甲状腺および副腎の重量増加が認められ、病理組織学的に肝細胞肥大、甲状腺濾胞上皮細胞肥大および副腎皮質の束状帯および球状帯に空胞化が認められた。

500ppm群雄にプロトロンビン時間の増加、雌に総タンパク、総コレステロールおよびトリグリセリドの増加、雌雄にTSHの増加、雄にT4の減少、雌雄に肝臓および甲状腺の重量増加、病理組織学的に肝細胞肥大、甲状腺濾胞上皮細胞肥大が認められた。100ppm群では、雌に肝臓の重量増加が認められた。20ppm群では投与の影響は認められなかったことから、無毒性量は雌雄とも20ppm（雄 2mg/kg/日、雌 1.8mg/kg/日）と判断された。