

(9) 繁殖毒性及び催奇形性

① ラットを用いた3世代繁殖毒性試験

(資料No. 7)

試験機関 :

報告書作成年 : 1979 年

検体の純度 : %

供試動物 : SD (CD) ラット、1 群雄 10 (11*) 匹 雌 20 (21*) 匹、開始時 22 日齢、
開始時平均体重 : 雄 45g、雌 43g

* 死亡・逃亡による補充

投与期間 : F₀ 世代 ; 投与開始から F₁ 児離乳時までの約 32 週間 (交配まで 79 日間投与)
F₁ 世代 ; 離乳時から F₂ 児離乳時までの約 32 週間 (交配まで 80 日間投与)
F₂ 世代 ; 離乳時から F₃ 児離乳時までの約 32 週間 (交配まで 80 日間投与)
ただし、各世代で初産児の離乳から次産児を得るための交配までの 10 日間は投与を休止した。

(1976 年 9 月 28 日-1978 年 5 月 10 日)

投与方法 : 検体を 0、300、1000 及び 3000ppm の濃度で飼料に混入し、自由に摂食させた。飼料は毎週調製した。各親世代は 100 日齢より交配し、初産児はすべて離乳時に屠殺した。離乳後、次世代の親動物を得るため再度交配させ、次産児を得た。次産児の離乳後、親動物は屠殺した。初産児を得られなかった雌は次産児を得る交配には用いなかった。各世代の次産児は各群雄 10 匹、雌 20 匹を残し、離乳後 2 週目に屠殺した。F₂ 世代の次産児はすべて離乳時に屠殺した。

投与量設定根拠 :

観察・検査項目 : 概要を表 1 にまとめた。

一般状態及び死亡率 ; 各世代について毎日観察した。

体重変化 ; 投与開始時及び解剖時 (あるいは死亡時) に加え、各親世代は交配開始まで毎週 1 回測定した。

摂餌量 ; 各親世代について交配開始まで毎週 1 回測定した。

交配及び交尾・妊娠の確認 ; 雄 1 匹、雌 2 匹を 10 日間同居させ、交尾が確認されない場合は最高 3 回まで雄動物を交換して最大 30 日間同居させた。膣栓の存在により交尾を確認した (交尾確認日 = 妊娠 0 日)。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

繁殖性に関する指標；繁殖能力を確認する目的で、妊娠の成立、妊娠期間及び哺育状態を観察し、以下の数値を算出した。

$$\text{交尾率} = (\text{交尾動物数} / \text{交配動物数}) \times 100$$

$$\text{受胎率} = (\text{妊娠動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100$$

$$\text{出産率} = (\text{出生児のいる腹数} / \text{妊娠動物数}) \times 100$$

分娩時観察；分娩母体数、出産児数、生存産児数、死産児数、親動物による損傷児数及び外表異常を観察した。外表異常については哺育期間中及び離乳時にも観察した。

児動物の観察；各児世代について、一般状態及び死亡率は毎日観察した。体重測定は投与開始時、生後 21 日及び解剖時に実施した。性別は生後 21 日に確認した。生後 4 日に、1 腹 10 匹となるように児動物数を調整し、10 匹以下の場合には調整は行わなかった。申請者が以下の指標を算出した。

$$\text{性比} = (\text{雌動物数} / \text{雄動物数}) \times 100$$

$$\text{出生率} = (\text{出產生存児数} / \text{産児数}) \times 100$$

$$\text{4日生存率} = (\text{生後4日 [調整前] 生存児数} / \text{出產生存児数}) \times 100$$

$$\text{離乳率} = (\text{離乳児数} / \text{生後4日 [調整後] 生存児数}) \times 100$$

離乳は生後21日に行い、次親世代動物の選抜も行った。

肉眼的病理検査；各親世代について、次産児の離乳後に原則として雌雄各 8 匹を選択し屠殺した後、肉眼的に詳細な検査を実施した。親世代として選抜されなかった動物は体重測定のみを行い屠殺した。死亡動物については検査を実施した。

各児世代については、F₂ 世代の次産児 (F₃ 世代) の雌雄各 10 匹についてのみ肉眼的に詳細な検査を実施した。なお、一般症状並びに外表異常が認められた動物は全て検査を実施した。

臓器重量；肉眼的病理検査を実施した各親世代の雌雄各 8 匹について、以下の臓器重量を測定し、体重比及び脳比 (相対) を算出した。各児世代については測定しなかった。

肝臓、腎臓、脾臓、生殖腺、心臓及び脳

病理組織学的検査；肉眼的病理検査を実施した各親世代の雌雄各 8 匹及び F₂ 世代の次産児 (F₃ 世代) の雌雄各 10 匹を対象として、以下の組織について病理標本を作製し鏡検した。各親世代の死亡動物についても、可能な限り検査した。

脳 (大脳、小脳)、脊髄、骨髄、脾臓、リンパ節、心臓、肺、気管、唾液腺、食道、胃、十二指腸、空・回腸、盲腸、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、精巢、精巢上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、皮膚、筋肉

統計学的処理；体重及び臓器絶対重量については、一元配置分散分析を用い、有意差が認められ各群の例数が等しい場合は Turkey の多重比較を、例数が異なる場合には Scheffe の多重比較を行った。臓器重量の体重比及び脳重量比については、Kruskal-Wallis の多重比較を行った。

結果 : 結果の概要を表 2 に示す。

親世代 ; 各世代ともに、一般状態、死亡率及び摂餌量に検体投与による影響は認められなかった。平均体重は F_1 世代の雄全群及び雌 300ppm 群、 F_2 世代の雌 1000 及び 3000ppm 群において対照群に比較して有意な高値を示したが、いずれも体重増加量に有意な変化は認められなかった。臓器重量測定では、脳、肝臓、心臓、卵巣に有意な変化が認められたが、投与量、世代、性別等に一定の傾向が示されず、検体投与による影響とは考えられなかった。病理組織学的検査では、検体投与による影響は認められなかった。

繁殖能力については、交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間等に検体投与による影響は認められなかった。

児世代 ; 各世代ともに、産児数、出生率、外観、生存率、離乳率及び性比に検体投与による影響は認められなかった。離乳時の体重は対照群と比較して高値あるいは低値を示す群が認められたが、投与量、世代、性別等に一定の傾向が示されず、偶発的な変化と考えられた。

以上、本剤のラットを用いた混餌投与による 3 世代繁殖毒性試験において、親動物の繁殖能及び出生児の生育に検体投与による影響は認められなかった。

従って、本試験における親及び児動物並びに繁殖能に対する無毒性量はいずれも 3000ppm (F_0 雄 : 315mg/kg/日、 F_1 雄 : 298mg/kg/日、 F_2 雄 : 326mg/kg/日、 F_0 雌 : 333mg/kg/日、 F_1 雌 : 301mg/kg/日、 F_2 雌 : 340mg/kg/日) と判断される。

表1 試験項目概要

世代		期間 (日/週)	作業手順	観察・検査項目
親	児			
F ₀		生育 (22-100 日齢)	雄 1 雌 2 で交配 交尾は臏栓の存在で確認	一般症状、生死観察：毎日 体重、摂餌量測定：毎週 1 回測定 交配状況の観察
		交配 (10-30 日)		
		妊娠 (3 週)		
	F _{1a}	F _{1a} 出産	出産後 4 日目に同腹児数を 10 匹に調整 全例屠殺	妊娠状況の観察 出産状況の観察 分娩母体数、産児数、生存児数、死産児数、 親動物による損傷児数、外表異常 一般症状、生死観察：毎日
		F _{1a} 哺育 (3 週)		
		F _{1a} 離乳		
		休止 (10 日)	雄 1 雌 2 で交配 交尾は臏栓の存在で確認	交配状況の観察 妊娠状況の観察
		交配 (10-30 日)		
		妊娠 (3 週)		
	F _{1b}	F _{1b} 出産	出産後 4 日目に同腹児数を 10 匹に調整 継代用の雄 10、雌 20 を選択 残余動物の屠殺 親動物の屠殺	出産状況の観察 分娩母体数、産児数、生存児数、死産児数、 親動物による損傷児数、外表異常 一般症状、生死観察：毎日 体重測定、生存児数及び性別確認 残余動物は離乳後 2 週目まで屠殺を延期し、 選抜動物死亡時に補充 各群の F ₀ 親動物雌雄各 8 匹について肉眼的病理検査、臓器重量測定、病理組織学的検査
F _{1b} 哺育 (3 週)				
F _{1b} 離乳				
F _{1b}		生育 (21-100 日齢)	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)
		交配 (10-30 日)		
		妊娠 (3 週)		
	F _{2a}	F _{2a} 出産	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)
		F _{2a} 哺育 (3 週)		
		F _{2a} 離乳		
		休止 (10 日)	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)
		交配 (10-30 日)		
		妊娠 (3 週)		
	F _{2b}	F _{2b} 出産	(F ₁ 世代に準ずる)	(F ₀ /F ₁ 世代に準ずる)
F _{2b} 哺育 (3 週)				
F _{2b} 離乳				
F _{2b}		生育 (21-100 日齢)	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)
		交配 (10-30 日)		
		妊娠 (3 週)		
	F _{3a}	F _{3a} 出産	(F ₁ 世代に準ずる)	(F ₀ /F ₁ 世代に準ずる)
		F _{3a} 哺育 (3 週)		
		F _{3a} 離乳		
		休止 (10 日)	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)
		交配 (10-30 日)		
		妊娠 (3 週)		
	F _{3b}	F _{3b} 出産	(F ₁ 世代に準ずる)	(F ₀ /F ₁ 世代に準ずる)
F _{3b} 哺育 (3 週)				
F _{3b} 離乳				
			全例屠殺 親動物の屠殺	体重測定、生存児数及び性別確認 各群雌雄各 10 匹について肉眼的病理検査、病理組織学的検査 (F ₀ 世代に準ずる)

表2 試験結果

世代		親 : F ₀ 児 : F ₁				親 : F _{1b} 児 : F _{2b}				親 : F _{2b} 児 : F _{3b}				
投与量 (ppm)		0	300	1000	3000	0	300	1000	3000	0	300	1000	3000	
供試動物数	雄	10	10	10	10	11	10	10	10	11	10	10	11	
	雌	20	20	20	20	21	20	20	20	20	21	20	20	
生育期間中の平均 検体摂取量 (mg/kg/日)*	雄	—	32	96	315	—	28	101	298	—	35	113	326	
	雌	—	34	117	333	—	29	93	301	—	36	113	340	
一般状態		異常なし												
死亡率 (%)	雄	0	20	10	0	55	0	10	40	18	30	10	9	
	雌	20	5	5	20	38	30	25	15	5	19	20	10	
生育期間中の 体重増加量 (g)	雄	357	355	354	361	311	360#	360#	352#	307	284	309	315	
	雌	201	203	203	200	190	200#	194	189	172	180	182#	187#	
生育期間中の 平均摂餌量 (g/rat/日)*	雄	25	26	24	25	19	22	22	23	24	21	24	22	
	雌	19	19	20	19	16	16	14	15	16	17	17	17	
親動物 第1回交配	交尾率 (%) *	雄	100 10/10	80 8/10	90 9/10	100 10/10	88 7/8	90 9/10	90 9/10	70 7/10	60 6/10	60 6/10	100 10/10	90 9/10
		雌	100 19/19	100 20/20	100 20/20	100 20/20	100 18/18	100 19/19	100 17/17	95 19/20	79 15/19	84 16/19	100 20/20	100 20/20
	受胎率 (%) *	雌	100 19/19	100 20/20	100 20/20	100 20/20	100 18/18	100 19/19	94 16/17	95 18/19	93 14/15	94 15/16	100 20/20	100 20/20
	出産率 (%) *	雌	95 18/19	100 20/20	100 20/20	100 20/20	83 15/18	100 19/19	94 15/16	94 17/18	100 14/14	93 14/15	95 19/20	100 20/20
	妊娠期間日数*		22.1	21.8	21.9	21.9	21.8	21.7	21.9	21.6	21.4	21.4	21.1	21.0
親動物 第2回交配	交尾率 (%) *	雄	80 8/10	100 8/8	90 9/10	90 9/10	67 4/6	70 7/10	70 7/10	75 6/8	75 6/8	56 5/9	89 8/9	80 8/10
		雌	100 18/18	100 20/20	90 18/20	100 18/18	86 12/14	83 15/18	100 14/14	88 15/17	93 13/14	93 14/15	100 19/19	95 19/20
	受胎率 (%) *	雌	100 18/18	100 20/20	100 18/18	100 18/18	100 12/12	100 15/15	100 14/14	100 15/15	100 13/13	100 14/14	100 19/19	100 19/19
	出産率 (%) *	雌	89 16/18	95 19/20	94 17/18	100 18/18	83 10/12	100 15/15	100 14/14	100 15/15	100 13/13	93 13/14	100 19/19	100 19/19
	妊娠期間日数*		21.5	21.9	21.9	21.6	21.6	22.0	21.6	21.5	22.1	21.8	21.8	21.8

: 実体重に統計学的に有意な高値が認められた。

* : 報告書個別表より申請者が算出した。

表-2 試験結果 (続き)

世代		親:F0 児:F1				親:F1b 児:F2b				親:F2b 児:F3b					
投与量 (ppm)		0	300	1000	3000	0	300	1000	3000	0	300	1000	3000		
親動物	雄	最終体重 (g)	522	489	509	508	439	519	↑576	472	465	453	496	482	
		脳 絶対	2.005	↑2.135 (106)	↑2.144 (107)	2.121									
	雌	最終体重 (g)	313	322	322	304	309	309	318	301	277	275	↑311	300	
		肝臓 絶対	13.818	12.706	↓10.979 (79)	↓10.661 (77)									
		心臓	絶対					1.016	1.026	↑1.203 (118)	1.075				
			脳比					0.5341	0.5296	↑0.6343 (119)	0.5803				
		脳 絶対									1.823	↑1.962 (108)	↑1.965 (108)	↑1.971 (108)	
		卵巣	絶対					0.080	0.090	↑0.101 (126)	0.084				
	体重比		0.0322	0.0345	↑0.0412 (128)	0.0381									
	肉眼的病理 検査	雄	異常なし												
		雌	異常なし												
	病理組織学的 検査	雄	異常なし												
		雌	異常なし												
	初産児	産児数		12.8	11.9	13.4	13.1	8.6	9.8	10.8	9.1	8.3	10.3	10.8	8.2
生存児数		12.7	11.5	13.1	13.1	8.3	9.5	10.7	8.6	7.9	9.6	10.3	7.6		
死産児数		0.1	0.4	0.3	0.0	0.3	0.3	0.1	0.5	0.3	0.6	0.5	0.6		
出生率 (%)		99.6	96.6	97.8	100	96.1	96.8	98.8	94.8	95.7	93.8	94.7	92.1		
外表異常		異常なし													
4日生存児数		12.3	10.4	12.6	12.0	8.1	8.4	9.5	7.9	7.1	8.1	8.9	6.1		
4日生存率 (%)		96.5	90.4	96.2	91.6	98.4	88.9	89.4	91.2	89.2	84.4	86.7	80.8		
離乳時生存児数		8.4	7.3	9.2	7.8	7.5	7.1	8.3	6.9	4.9	4.8	4.2	4.2		
離乳率 (%)		87.4	81.1	94.8	82.1	94.9	93.7	96.9	93.7	68.7	63.8	50.6	71.8		
性比(雌/雄)*		0.97	0.97	0.92	1.05	1.24	1.20	1.00	0.76	1.43	1.03	1.03	1.05		
離乳児体重 (g)		雄	39	41	41	37	38	41	38	40	35	32	31	32	
		雌	39	38	39	↓36 (92)	38	38	36	40	33	↓29 (91)	30	↓29 (91)	

Turkey, Scheffe, Kruskal-Wallis 検定 ↑ ↓ : p<0.05, ↑ ↓ : p<0.01

() 内の数値は対照群に対する変動率 (%) を表す。

* : 報告書個別別表より申請者が算出した。

表-2 試験結果 (続き)

世代		親 : F0 児 : F1				親 : F1b 児 : F2b				親 : F2b 児 : F3b				
投与量 (ppm)		0	300	1000	3000	0	300	1000	3000	0	300	1000	3000	
次産児	産児数	12.5	13.5	13.4	13.2	10.0	11.3	11.9	11.3	9.0	10.2	11.7	9.2	
	生存児数	12.3	13.2	12.8	13.2	9.6	11.3	↑11.7	11.1	8.8	10.1	10.6	9.1	
	死産児数	0.3	0.3	0.6	0	0.4	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	1.0	0.1	
	出生率 (%)	98	97.3	95.2	100	96	99.4	98.8	98.8	98.3	99.2	90.1	98.9	
	外表異常	異常なし												
	4日生存児数	11.9	12.9	13.1	12.5	8.3	10.9	↑11.6 (140)	10.8	6.8	8.9	10.1	7.8	
	4日生存率 (%)	96.9	98.4	96.3	94.5	86.5	97	98.8	97	77.4	88.5	95	86.6	
	離乳時生存児数	7.7	7.0	8.1	6.4	6.1	8.1	8.1	7.5	6.1	6.8	5.9	5.8	
	離乳率 (%)	85.4	72.3	82.2	67.4	74.4	89.6	81.9	78.9	91.9	84	70.4	78	
	性比(雌/雄)*	1.46	0.87	1.05	0.78	0.85	1.24	1.13	0.93	1.32	0.98	0.75	0.96	
	離乳児体重 (g)	雄	43	40	40	↓39 (91)	34	37	39	38	38	34	37	38
		雌	39	39	39	39	31	↑36 (116)	↕37 (119)	↕38 (123)	35	33	35	36

Turkey、Scheffe、Kruskal-Wallis 検定 ↑ ↓ : p<0.05、 ↕ ↓ : p<0.01

() 内の数値は対照群に対する変動率 (%) を表す。

* : 報告書個別表より申請者が算出した。

② ラットを用いた催奇形性試験

(資料No. 8)

試験機関 :

報告書作成年 : 1978 年

検体の純度 : %

供試動物 : SD (Jcl:SD) ラット、1 群雌 36 匹、12 週齢、体重 ; 225-293g

投与期間 : 器官形成期 11 日間 (1977 年 11 月-1978 年 5 月)

投与方法 : 検体を 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、0、32、100、320 及び 1000mg/kg/日の投与量で、妊娠 7 日-17 日の 11 日間、毎日 1 回強制経口投与した。投与容量は 5ml/kg とした。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液のみを同様に与えた。膣栓が認められた日を妊娠 0 日とした。

用量設定根拠 :

観察・検査項目 : 概要を表 1 にまとめた。

各群の約 2/3 は妊娠 21 日に回復する催奇形性試験群、残り約 1/3 は次世代動物の発育及び生殖能を調べるために、自然分娩させて F₁ 動物を生後 70 日後に交配させる次世代交配試験群とした。

妊娠期間中、F₀ 母動物の死亡及び症状は毎日観察し、体重及び摂餌量は一定間隔で測定した。妊娠 21 日に催奇形性試験群を屠殺開腹し、黄体数、着床数、死亡胎児数、生存胎児数並びに生存胎児の性別、体重、外表及び内臓検査を実施した。外表及び内臓異常のない胎児については骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査した。次世代交配試験群は自然分娩させ、妊娠期間、産児数、生存胎児数並びに生存胎児の性別、体重を記録した。また、離乳後に屠殺開腹し着床数を調べた。

哺育期間中、F₁ 児動物の死亡及び症状は毎日観察し、体重は哺育 4、12 及び 21 日に測定した。また、発育状況 (耳介の開展及び眼瞼の開裂) を調べ、21 日に行動異常、感覚異常 (視覚、聴覚、痛覚) 及び外表異常の有無を検査した。離乳は 21 日に行い、生後 70 日まで育成した。その間、死亡及び症状は毎日、体重は毎週測定し、生殖能発達状況 (精巣下降及び膣開口) についても観察した。生後 70 日に各群より雌雄各 20-24 匹を無作為に選び、同腹を避けて雌雄 1 対 1 で 2 週間交配させた。交尾成立後、雌は個別に飼育し、死亡、症状、体重及び摂餌量を測定した。妊娠 21 日に屠殺開腹し、黄体数、着床数、死亡胎児数、生存胎児数並びに生存胎児の性別、体重、外表及び内臓検査を実施した。外表及び内臓異常のない胎児については骨格標本を作製し、骨格異常の有無を検査した。

表1 試験項目概要

世代	期間	作業手順	観察・検査項目
F ₀	交配	雌雄1対1で交配、 膣栓及び膣垢中の 精子で確認 (妊娠0日)	
	妊娠(3週間)		症状、生死観察：毎日 体重、摂餌量測定：妊娠0、3、7、10、14、17、21日
F ₁	出産 A. 催奇形性試験群 (各試験群の約 2/3 母動物) B. 次世代交配試験群 (各試験群の約 1/3 母動物)	帝王切開 自然分娩	子宮内状況：黄体数、着床数、死亡胎児数、生存胎児数 F ₁ 動物：体重、性別、外表／内臓／骨格検査 妊娠期間算出 子宮内状況：産児数、生存胎児数 F ₁ 動物：体重、性別
	哺育(3週間)	全例哺育	F ₀ F _{1b} 動物の症状、生死観察：毎日 F ₀ 動物の体重測定：哺育0、4、12、21日 F ₀ 動物の摂餌量測定：哺育4、12、21日 F ₁ 動物の体重測定：哺育4、12、21日 発育状況観察：耳介開展(4-5日) 眼瞼開裂(14-16日)
	離乳		F ₀ 動物の屠殺、着床数確認 F ₁ 動物の行動、感覚(視覚、聴覚、痛覚)、外表検査
	育成 (生後70日まで)	全例育成	F ₁ 動物の症状、生死観察：毎日 F ₁ 動物の体重測定：毎週 F ₁ 動物の生殖能発達状況観察：精巣下降(23-25日) 膣開口(38-39日) F ₁ 動物の外表検査：70日 交配用以外のF ₁ 動物の内臓検査
	交配(2週間)	雌雄1対1で交配、 膣栓及び膣垢中の 精子で確認 (妊娠0日)	
	妊娠(3週間)		一般症状、生死、体重、摂餌量測定 F ₁ 雄親動物屠殺
F ₂	出産	全例帝王切開	子宮内状況：黄体数、着床数、死亡胎児数、生存胎児数 F ₂ 動物：体重、性別、外表／内臓／骨格検査

結果 :

催奇形性試験群；概要を次頁の表 2 に示す。

母動物では、1000mg/kg/日群で流涎、立毛などの症状が認められ、このうち半数例近くが死亡した。また、妊娠期間中の体重増加量及び最終体重は対照群に比べ有意に低く、摂餌量はやや少なかった。32、100 及び 320mg/kg/日群では一般症状に異常は認められず、検体に起因した死亡もなかった。妊娠 21 日に開腹した母体の観察では、死亡胎児数、生存胎児数のいずれにおいても対照群に比べ有意な差はなかった。

胎児では、体重に有意な差は認められなかった。外表及び内臓検査で対照群を含む各群の少数例に異常が認められたが、その発生率に有意な差は認められなかった。骨格検査では、1000mg/kg/日群で第 5、第 6 胸骨核未骨化の発生頻度が有意に増加し、発育遅延による骨化の遅れと考えられた。100 及び 320mg/kg/日群では腰椎数の軽度な増加が認められたが、用量に対応した変化ではなかったことから偶発的変化と考えられた。その他、検体に起因すると思われる異常は認められなかった。

次世代交配試験群；概要を表 3、4 に示す。

自然分娩させた母動物の観察では、いずれの群においても妊娠期間の延長や出産時の異常は認められず、授乳及び育成期間中の F₁ 動物の死亡率、体重、一般分化 (耳介の開展、眼瞼の開裂)、行動、感覚、性器の発達、外表及び内臓検査に対照群との差は認められなかった。さらに、出生児を生後 70 日まで成熟させて交配したが、生殖能に異常はなく、F₂ 胎児への影響も認められなかった。

以上、本剤のラットを用いた器官形成期強制経口投与による催奇形性試験において、32、100 及び 320 mg/kg/日の用量では母動物及び胎児に異常は認められなかった。1000 mg/kg/日の用量では、母動物で流涎、立毛などの症状、体重増加抑制、摂餌量減少及び死亡が認められ、胎児*では骨化遅延が認められたことから、無毒性量は母動物及び胎児*共に 320 mg/kg/日と判断された。また、最高用量の 1000mg/kg/日でも催奇形性は認められず、次世代の発育及び生殖能に影響は認められなかった。

申請者注*)

報告書では、母動物が多数死亡した 1000 mg/kg/日群における胎児の骨化遅延を発育遅延によるものと考え、胎児の無毒性量を 1000 mg/kg/日と判断したが、胎児の骨化あるいは発育に対する検体の直接的影響を否定できないことから、申請者は胎児の無毒性量を母動物と同じ 320 mg/kg/日と判断した。

表2 催奇形性試験群

投与量 (mg/kg/日)		0	32	100	320	1000	
1群当りの動物数		24	24	24	24	24	
母動物	死亡動物数		1 (誤投)			10	
	非妊娠動物数	2	1	2	2		
	流・早産動物数				1	2	
	全吸収胚の動物数						
	妊娠 21 日生存胎児腹数	22	22	22	21	12	
	一般症状	特記すべき症状なし				立毛、流涎	
	体重	17 日	354	↓ 338	351	346	342
		21 日	416	400	413	406	↓ 384
	体重増加量 (g)		160	149	159	153	↓ 132
	摂餌量		著変なし				減少
	着床所見	検査動物数	22	22	22	21	12
		黄体数	16.2	15.6	16.5	16.0	16.3
		着床数	15.5	↓ 13.8	14.6	14.6	14.7
		早期吸収胚数	1.0	0.5	0.7	1.1	1.3
		後期吸収胚数					
総吸収胚数		1.0	0.5	0.7	1.1	1.3	
生存胎児数		14.5	13.2	13.9	13.5	13.3	
着床前死亡胚率 (%)		4.2	11.5	↑ 10.8	9.6	9.8	
着床後死亡胚率 (%)	6.8	5.4	4.7	7.7	9.0		

t 検定、 χ^2 検定、Mann-Whitney U 検定 ↑ ↓ : p<0.05、⇕ ⇓ : p<0.01
空欄は「0」を示す。

表2 催奇形性試験群 (続き)

投与量 (mg/kg/日)		0	32	100	320	1000		
検査母動物数		22	22	22	21	12		
胎児	平均生存胎児体重 (g)	雄	5.31	5.17	5.27	5.25	4.99	
		雌	5.08	4.97	4.96	5.08	4.72	
	生存胎児の性比 (雌/雄)		0.93	0.80	1.24	1.09	1.13	
	外表・内臓検査動物数 (腹)		318 (22)	291 (22)	306 (22)	283 (21)	160 (12)	
	奇形	奇形胎児数 (腹)		2 (1)	3 (3)	3 (3)	2 (2)	1 (1)
		外表	下唇裂		2 [0.7]			
			水頭症		1 [0.3]			
			欠指			1 [0.3]		
			尾形成不全			1 [0.3]		
			鎖肛			1 [0.3]		
全身浮腫					1 [0.3]	1 [0.3]		
小眼球						1 [0.3]	1 [0.6]	
内臓	水腎症	2 [0.6]	2 [0.7]	1 [0.3]				
骨格検査動物数 (腹)		316 (22)	288 (22)	303 (22)	281 (21)	159 (12)		
変異	内訳	胸椎椎体分離	1 [0.3]	1 [0.3]	1 [0.3]	2 [0.7]	3 [1.9]	
		腰椎数増加		1 [0.3]	↑14 [4.6]	↑11 [3.9]		
		腰椎椎体分離					1 [0.6]	
		第14肋骨	81 [25.6]	83 [28.8]	88 [29.0]	83 [29.5]	39 [24.5]	
		胸骨核左右非対象		1 [0.3]				
		胸骨核軟骨分離				1 [0.4]		
骨化	遅延	第7胸骨核	1 [0.3]			1 [0.4]		
		第5胸骨核未骨化	12 [3.8]	9 [3.1]	13 [4.3]	3 [1.1]	6 [3.8]	
		第5/6胸骨核未骨化	1 [0.3]				↑13 [8.2]	

t検定、 χ^2 検定、Mann-Whitney U検定 ↑ ↓ : p<0.05、 ↑ ↓ : p<0.01

空欄は「0」を示す。

[] 内の数値は検査動物数に対する変動率 (%) を表す。

表3 次世代交配試験群：F₁生育

世代	投与量 (mg/kg/日)	妊娠期間					哺育期間					
		0	32	100	320	1000	0	32	100	320	1000	
親動物 F ₀	妊娠母動物数	12	12	12	12	12						
	死亡動物数		1 (誤投)			5						
	非妊娠動物数			1	1							
	全吸収胚の動物数		1									
	分娩母動物数	12	10	11	11	7	12	10	10 ^a	11	7	
	一般症状	特記すべき症状なし					立毛、 流涎、 鼻出血	特記すべき症状なし				
	体重	妊娠 17 日	363	↓342	359	356	↓337	—	—	—	—	—
		妊娠 21 日	421	↓395	412	407	↓385	—	—	—	—	—
		哺育 4 日	—	—	—	—	—	328	↓305	326	320	↓304
	体重増加量 (g)	171	↓144	161	154	↓132	22	21	24	↓6	29	
	摂餌量	著変なし					減少	著変なし				
	妊娠期間 (日)	21.8	21.7	21.9	21.7	21.6	—	—	—	—	—	
着床数 ^b	—	—	—	—	—	15.1	13.9	14.1	13.1	14.6		
児動物 F ₁	出産生存児数	—	—	—	—	—	13.6	12.1	11.5	11.1	13.6	
	哺育 4 日生存児数	—	—	—	—	—	13.2	12.0	11.1	10.7	13.0	
	哺育 12 日生存児数	—	—	—	—	—	13.0	12.0	11.0	10.6	12.4	
	哺育 21 日生存児数	—	—	—	—	—	12.9	12.0	10.9	10.5	12.4	
	累積死亡率 (%)	—	—	—	—	—	7.7	2.7	12.9	4.2	8.1	

t 検定、 χ^2 検定、Mann-Whitney U 検定 ↑ ↓ : p<0.05、↑ ↓ : p<0.01

空欄は「0」を示す。

a : 哺育中に全ての児を失ったため 1 母動物を屠殺した。

b : 離乳後に母動物を屠殺解剖して検査した。

表3 次世代交配試験群：F₁生育（続き）

世代	投与量 (mg/kg/日)		0	32	100	320	1000	
F ₁ 生育状況	哺育期間	体重 (g)	出生時	5.83	6.14	6.14	6.33	5.50
			哺育4日	9.08	10.00	9.88	10.34	8.93
			哺育12日	22.96	23.57	23.94	25.78	23.61
			哺育21日	43.17	45.11	46.02	48.15	43.71
			増加量	37.33	38.97	39.88	41.83	38.21
		耳介開展 (%)	4日目	96	100	100	100	99
			5日目	100	—	—	—	100
		眼瞼開裂 (%)	14日目	56	51	60	68	41
			15日目	98	89	93	95	84
			16日目	100	100	100	100	100
		行動異常 (%)						
		対光瞳孔反射異常 (%)						
		音叉音耳介反射異常 (%)						
		痛覚反応異常 (%)						
		外表検査動物数		168	124	141	123	95
		奇形	無尾・鎖肛	1 [0.6]				
			水頭症			1 [0.7]		
変異	白内障					1 [1.1]		

t検定、 χ^2 検定、Mann-Whitney U検定

空欄は「0」を示す。

[] 内の数値は検査動物数に対する変動率 (%) を表す。

表3 次世代交配試験群：F₁生育（続き）

世代	投与量 (mg/kg/日)		0	32	100	320	1000		
F ₁ 生育状況	育成期間	70日死亡率 (%)		雄			3.8		
				雌					
	体重 (g)	生後70日目		雄	373	374	379	390	365
				雌	222	230	228	232	224
		増加量		雄	329	328	332	340	321
				雌	180	185	183	186	180
	発達状況	精巣下降 (%)		23日目	82	85	100	93	90
				24日目	90	97	—	98	97
				25日目	100	100	—	100	100
		膈開口 (%)		38日目	97	100	97	100	96
				39日目	100	—	100	—	100
		外表検査動物数			155	120	120	116	87
		奇形	水頭症				2 [1.7]		
		変異	白内障						1 [1.2]
		内臓検査動物数\$			107	80	78	72	47
		奇形	水腎		1 [0.9]				
		変異	両側性精巣萎縮				1 [1.25]		
			一側性精巣肥大				1 [1.25]		
	一側性精巣軟化					1 [1.3]			

t 検定、 χ^2 検定、Mann-Whitney U 検定

空欄は「0」を示す。

\$: 交配に供しなかった F₁ 動物について検査した。

[] 内の数値は検査動物数に対する変動率 (%) を表す。

表4 次世代交配試験群：F₁ 交配成績

世代	投与量 (mg/kg/日)	0	32	100	320	1000		
F ₁	交配動物数	雄	24	20	20	22	20	
		雌	24	20	20	22	20	
	非妊娠動物数		0	1	3	1	1	
	妊娠率 (%)		100	95	85	96	95	
	妊娠動物数		24	19	17	21	19	
	一般症状		特記すべき症状なし					
	体重 (g)	妊娠 21 日	415	419	427	433	407	
		増加量	177	178	177	184	171	
	着床所見	検査動物数		24	19	17	21	19
		黄体数		16.2	16.5	15.9	17.3	16.4
		着床数		14.3	15.3	13.9	15.3	15.1
		早期吸収胚数		0.9	1.3	0.6	1.5	0.8
		後期吸収胚数		0.0	0.0	0.0	0.1	0.1
		総吸収胚数		0.9	1.3	0.6	↑ 1.6	0.9
		生存胎児数		13.4	14.0	13.2	13.7	14.2
		着床前死亡胚率 (%)		10.6	7.1	12.5	11.4	7.4
		着床後死亡胚率 (%)		6.6	8.3	4.5	↑ 12.5	6.3
		平均生存胎児体重 (g)	雄	5.37	5.31	5.46	5.48	5.36
	雌		5.09	5.05	5.14	5.09	5.10	
	生存胎児の性比 (雌/雄)		0.86	0.92	0.80	0.99	0.95	

t 検定、 χ^2 検定、Mann-Whitney U 検定 ↑ ↓ : p < 0.05
 空欄は「0」を示す。

表4 次世代交配試験群：F₁交配成績（続き）

世代	投与量 (mg/kg/日)		0	32	100	320	1000	
F ₂	外表・内臓検査動物数 (腹)		322 (24)	266 (19)	225 (17)	287 (21)	270 (19)	
	奇形	外表	水頭症					1 [0.4]
		内臓	水腎症		1 [0.4]	2 [0.9]		
	骨格検査動物数 (腹)		322 (24)	265 (19)	223 (17)	287 (21)	269 (19)	
	変異	内訳	第6頸椎椎弓欠損合併					1 [0.4]
			胸椎椎体分離			1 [0.1]	1 [0.3]	
			胸椎椎弓欠損・癒着・椎体分離合併				1 [0.3]	
			腰椎椎体数増加	7 [2.2]	4 [1.5]	2 [0.9]	3 [1.0]	5 [1.9]
			第14肋骨	157 [48.8]	↓55 [20.8]	↓69 [30.9]	132 [46.0]	121 [45.0]
			肋骨癒着				1 [0.3]	
	骨化	遅延	第4、5頸椎椎弓骨化不全					1 [0.4]
			第6胸骨骨化不全				1 [0.3]	
			第13肋骨骨化不全				1 [0.3]	
			第5胸骨核未骨化	5 [1.6]	6 [2.3]	5 [2.2]	12 [4.2]	1 [0.4]
			第6胸骨核未骨化					1 [0.4]

t検定、 χ^2 検定、Mann-Whitney U検定 ↑ ↓ : p<0.05、⇕ ⇓ : p<0.01

空欄は「0」を示す。

[] 内の数値は検査動物数に対する変動率 (%) を表す。

③ ウサギを用いた催奇形性試験

(資料No. 補遺7)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1991 年

検体の純度 : %

供試動物 : 日本白色種ウサギ (Kbs:JW)、1群雌 18 匹、開始時 18 週齢、体重 : 3503-4360g

投与期間 : 器官形成期 (妊娠 6-18 日) 13 日間 [1990 年 11 月 5 日-11 月 24 日]

投与方法 : 検体を 1%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し、0、30、100 及び 300mg/kg/日の用量で妊娠 6-18 日の 13 日間、毎日 1 回強制経口投与した。投与容量は 5ml/kg とした。対照群には 1%CMC 水溶液のみを同様に投与した。交配は人工授精法により行い、交配の翌日を妊娠 0 日とした。

投与量設定根拠 :

観察・検査項目 :

親動物 ; 一般状態及び死亡の有無は毎日観察した。体重は妊娠 0、6-18 日までの毎日、24 及び 27 日に測定した。摂餌量は妊娠 0-27 日まで 2 日ごとに測定した。妊娠 27 日にペントバルビタールナトリウムの耳静脈内注射によって屠殺し、帝王切開及び肉眼的病理検査を行い、卵巣及び子宮の重量、黄体数、着床数、生存胎児数及び死亡吸収胚を測定し、妊娠子宮重量を除いた補正体重を算出した。

生存胎児 ; 性別、体重、胎盤重量、外表異常を検査した。内臓検査は Stuckhardt と Poppe の未固定内臓検査法に従って観察した。内臓検査後、胸腔及び腹腔内の臓器を摘出し、骨格標本作製し、骨格の異常を観察した。

結果 : 概要を次頁の表に示す。

- 親動物 ; 30mg/kg/日群で流産及び早産が各1例、100mg/kg/日群で流産が2例認められた。死亡は対照群で1例認められたが、誤投与によるものと考えられた。症状及び体重に検体投与による影響は認められなかった。摂餌量は300mg/kg/日群で妊娠16-20日にかけて低下し、妊娠16-18日は対照群と比較して統計学的有意差が認められた。肉眼的病理検査及び子宮内状況に検体投与による影響は認められなかった。
- 胎児 ; 生存胎児数、死亡率、体重及び胎盤重量に検体投与による影響は認められなかった。性比は300mg/kg/日群で、対照群と比較して統計学的に有意な低値が認められたが、生存胎児数の低下や胎児死亡率の上昇は認められず、さらに、予備試験においてこの傾向は認められなかったことから、偶発的なものと考えられた。外表、内臓、骨格検査においても検体投与による影響は認められなかった。

以上、本剤のウサギを用いた器官形成期強制経口投与による催奇形性試験において、検体投与による摂餌量への影響が300mg/kg/日群の親動物で認められたが、胎児では変化は認められなかった。

従って、本試験における無毒性量は親動物で100mg/kg/日、胎児で300mg/kg/日と判断した。また、最高投与量の300mg/kg/日でも催奇形性は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		0	30	100	300	
1群当たりの動物数		18	18	18	18	
親動物	死亡動物数	1 (誤投)				
	非妊娠動物数					
	妊娠動物数	17	18	18	18	
	妊娠率 (%)	100	100	100	100	
	流産・早産動物数		2	2		
	全吸収胚動物数	2	1	1	1	
	妊娠27日生存胎児腹数	15	15	15	17	
	一般状態	特記すべき症状なし				
	体重増加量 (g)	(0-27日)	285	215 [75]	242 [85]	271 [95]
	平均補正体重 (g)	(27日)	3784	3618 [96]	3717 [98]	3741 [99]
	摂餌量 (g/匹/日)	(16-18日)	159	131 [82]	140 [88]	↓ 107 [67]
		(18-20日)	146	131 [90]	131 [90]	113 [77]
		(26-27日)	62	65 [105]	73 [118]	89 [144]
	剖検所見		検体投与に起因する所見なし			
着床所見	検査親動物数	15	15	15	17	
	妊娠子宮重量 (g)	442	466	465	452	
	黄体数	11.1	12.3	11.1	11.1	
	着床数	9.3	10.6	10.1	8.9	
	死亡・吸収胚率 (%)	8.7	8.2	9.2	7.6	
	生存胎児数	8.5	9.7	9.1	8.1	
	胎盤重量 (mg)	5181	4358	4792	5109	

Dunnett あるいは Scheffe 法、Fisher 直接確率法、Mann-Whitney U 検定

↑ ↓ : p < 0.05

[]内の数値は対照群に対する変動率 (%) を表す。空欄は「0」を示す。

結果の概要 - 続き -

投与量 (mg/kg/日)		0	30	100	300	
検査親動物数		15	15	15	17	
平均生存胎児体重 (g)	雄	36.4	34.3 [94]	36.4 [100]	39.2 [108]	
	雌	36.0	33.6 [93]	34.2 [95]	36.6 [102]	
生存胎児の雄性比 (%)		54.3	55.9	47.4	39.9 ↓	
検査胎児数 (腹)		127 (15)	145 (15)	137 (15)	138 (17)	
奇形胎児数 (腹)		6 (4)	3 (3)	10 (7)	3 (3)	
胎児	内臓	左総頸動脈の低形成	1		1	
		心室中隔欠損を伴う肺動脈低形成				1
	骨格	鼻骨または頭頂骨の分離	1	1	2	1
		頸椎椎弓分離		1		
		胸椎椎体または椎弓分離	3			
		腰椎椎弓分離	1			
		胸椎癒合		1	3	
		肋骨非対称、低形成、及び分離	1		4	
		肋骨分岐	2			
	過剰肋骨形成				1	
内臓変異胎児数 (腹)		6 (5)	10 (6)	4 (4)	4 (4)	
内臓	胸腺頸部残留	6	9	4	4	
	腎盂拡張		1			
骨格変異胎児数 (腹)		44 (12)	45 (12)	36 (14)	43 (13)	
変異	内臓	仙椎前骨化数25				2
		仙椎前骨化数27	9	16	11	14
		胸骨非対称	3	1	1	
		胸骨分離	3	1	1	1
		第12肋骨短縮				1
		頸肋	2	1	1	
		腰肋	29	27	23	27

Dunnett あるいは Scheffe 法、Fisher 直接確率法、Mann-Whitney U 検定
 []内の数値は対照群に対する変動率 (%) を表す。空欄は「0」を示す。

↑ ↓ : p < 0.05

(10) 変異原性

① 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料No. 9-1)

試験機関 :

報告書作成年 : 1979 年

検体の純度 : %

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2hcr 株を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体はジメチルスルホオキシド (DMSO) に溶解し、0、1、5、10、50、100、500、1000 及び 5000 μ g/プレート の用量で処理した。試験は各濃度 2 枚のプレートを用いた。

陽性対照として 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (AF-2)、 β -プロピオラクトン (BPL)、9-アミノアクリジン (9AA)、2-ニトロフルオレン (2NF)、2-アミノアントラセン (2AA) を用いた。

結果 : 結果を次表に示した。

検体は S-9Mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、またいずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照では溶媒対照と比較して著明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、本試験条件下において検体は代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			WP2 hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
溶媒対照 (DMSO)	—	—	12	20	104	2	10	28
			17	25	115	2	9	30
検体	1	—	11	18	126	6	8	27
			12	24	105	8	10	22
	5	—	14	26	112	5	5	21
			20	15	150	5	11	30
	10	—	21	17	130	9	19	17
			22	23	147	6	7	19
	50	—	20	16	119	5	10	15
			15	16	139	5	11	18
	100	—	17	13	134	5	10	21
			17	32	134	5	7	27
	500	—	10	24	126	4	9	28
			18	22	137	6	11	36
	1000	—	10	14	106	2	16	19
			11	21	101	2	10	22
5000	—	8	*	*	*	*	*	
		8	*	*	*	*	*	
溶媒対照 (DMSO)	—	+	14	12	126	5	9	15
			10	19	115	5	14	15
検体	1	+	18	14	114	1	5	19
			19	8	109	6	14	18
	5	+	15	16	127	7	13	17
			14	18	—	8	10	21
	10	+	9	19	115	9	14	24
			10	12	120	8	10	18
	50	+	14	17	117	10	13	16
			18	19	97	6	10	23
	100	+	7	11	119	5	11	13
			12	14	—	7	8	15
500	+	21	12	121	8	14	16	
		12	11	113	4	12	21	
1000	+	11	13	125	8	13	15	
		—	17	107	6	9	18	
5000	+	1	*	*	*	*	*	
		3	*	*	*	*	*	
陽性 対照	AF-2	—			802			
					796			
								256 228
	BPL	50	—		365			
					342			
	9AA	200	—			>10000 >10000		
	2NF	50	—				>3000 >3000	
	2AA	10	—	12	16	209	17	12
			13	19	226	15	19	51
		+	99	304	>3000	218	>3000	>3000
			105	274	>3000	229	>3000	>3000

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド BPL: β -プロピオラクトン
 9AA: 9-アミノアクリジン 2NF: 2-ニトロフルオレン 2AA: 2-アミノアントラセン *: 生育阻止

② 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料No. 9-2)

試験機関 :

報告書作成年 : 1977 年

検体の純度 : %

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100 株及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2^{hcr} 株を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、0、10、100、500 及び 1000 (代謝活性化系の非存在下のみ) $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で処理した。最高用量は予備試験結果から生育阻止の認められる用量とした。試験は各濃度 2 枚のプレートを用いた。

陽性対照として 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (AF-2)、 β -プロピオラクトン (BPL)、9-アミノアクリジン (9AA)、2-ニトロフルオレン (2NF)、2-アミノアントラセン (2AA) を用いた。

結果 : 結果を次表に示した。

検体は S-9Mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、またいずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照では溶媒対照と比較して著明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、本試験条件下において検体は代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート							
			塩基対置換型			フレームシフト型				
			WP2 hcr-	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98		
溶媒対照 (DMSO)	-	-	17	12	89	12	14	37		
			15	6	98	9	15	27		
検体	10	-	17	15	101	5	7	32		
			14	4	92	8	6	22		
	100	-	13	15	106	10	10	35		
			11	16	118	15	13	26		
	500	-	17	12	46	5	12	23		
			25	13	56	14	13	25		
	1000	-	13	3	-	-	5	-		
			8	4	-	-	6	-		
溶媒対照 (DMSO)	-	+	24	8	138	8	14	29		
			22	9	124	8	26	27		
検体	10	+	30	8	117	8	13	30		
			15	13	132	10	16	20		
	100	+	24	20	127	10	13	21		
			28	10	112	7	23	27		
	500	+	27	14	97	8	21	26		
			34	7	104	5	21	27		
陽性 対照	AF-2	-			1248 1650					
			0.1					445 410		
			0.25	1004 934						
	BPL	50	-		1562 1640					
	9AA	200	-			>10000 >10000				
	2NF	50	-				6296 6112			
	2AA	10	-			75 94	3 2			
			+			3936 3692	329 337			
		20	-			10 14			11 11	41 36
			+			402 462			2014 1958	4820 5104

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド BPL: β -プロピオラクトン
 9AA: 9-アミノアクリジン 2NF: 2-ニトロフルオレン 2AA: 2-アミノアントラセン

③ 細菌を用いたDNA修復試験

(資料No. 9-1)

試験機関 :

報告書作成年 : 1979年

検体の純度 : %

試験方法 : 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復機能保有株 (H-17 Rec⁺) と欠損株 (M-45 Rec⁻) を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の非存在下で、ストリーク法により DNA 損傷の誘発性を検定した。検体はジメチルスルホオキシド (DMSO) を用いて溶解した。2000 μ g/disk を最高用量とし、以下 1000、500、200、100、20 μ g/disk の計 6 用量を設定した。陰性対照としてカナマイシン、陽性対照としてマイトマイシン C を用いた。結果の判定は M45^{rec-} と H17^{rec+} の生育阻止帯の差が 5mm 以上を陽性とした。

結果 :

薬物	濃度 (μ g/disk)	阻止帯の径 (mm)		差 (mm)	判定
		M45	H17		
溶媒対照 (DMSO)	—	0	0	0	—
検体	20	0	0	0	—
	100	0	0	0	
	200	<1	<1		
	500	1.5	1	0.5	
	1000	2.5	2	0.5	
	2000	2.5	2	0.5	
陰性対照 (カナマイシン)	10	4	3	1	—
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.1	6	0.5	5.5	+

検体は、陰性対照として用いたカナマイシンと同様に、両株に同程度の生育阻止帯を示した。一方、陽性対照では、両株の間に著明な生育阻止帯の差が生じた。

以上の結果より、本試験条件下において検体は DNA 損傷誘発性を有しないものと判断される。

④ 細菌を用いたDNA修復試験

(資料No. 9-2)

試験機関 :

報告書作成年 : 1977 年

検体の純度 : %

試験方法 : 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復機能保有株 (H-17 Rec⁺) と欠損株 (M-45 Rec⁻) を用い、ストリーク法により DNA 損傷の誘発性を検定した。検体はジメチルスルホオキシド (DMSO) を用いて溶解した。2000 μ g/disk を最高用量とし、以下 1000、500、200、100、20 μ g/disk の計 6 用量を設定した。陰性対照としてカナマイシン、陽性対照としてマイトマイシン C を用いた。結果の判定は M45^{rec-} と H17^{rec+} の生育阻止帯の差が 5mm 以上を陽性とした。

結果 :

薬 物	濃 度 (μ g/disk)	阻止帯の径 (mm)		差 (mm)	判定
		M-45	H-17		
溶媒対照 (DMSO)	—	0	0	0	—
検 体	20	0	0	0	—
	100	0	0	0	
	200	0	0	0	
	500	0	0	0	
	1000	1	0.5	0.5	
	2000	1.5	1.5	0	
陰性対照 (カナマイシン)	10	8	7	1	—
陽性対照 (マイトマイシン C)	0.1	7	0	7	+

検体は、陰性対照として用いたカナマイシンと同様に、両株に同程度の生育阻止帯を示した。一方、陽性対照では、両株の間に著明な生育阻止帯の差が生じた。

以上の結果より、本試験条件下において検体は DNA 損傷誘発性を有しないものと判断される。

⑤ 細菌を用いた宿主経路試験

(資料No. 9-2)

試験機関 :

報告書作成年 : 1977 年

検体の純度 : %

試験方法 : 検体を 10%アラビアゴムに懸濁し、5 週齢の ICR (Jcl) 雄マウスに 24 時間間隔で 750 及び 1500mg/kg の用量を 2 回経口投与した。投与容量は 0.2ml/10g を超えない量とした。2 回目の薬物投与直後、対数生育期にあるヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) G46 株 (1.54×10^8 個/ml) 2ml をマウス腹腔内に注入し、3 時間後に頸椎脱臼で屠殺し、腹腔内の菌液を回収した。回収した菌株は 37°C で 2 日間培養後、復帰変異菌数及び生存菌数を計測した。各用量 3 枚のプレートを用いた。溶媒対照群には 10%アラビアゴム、陽性対照群にはジメチルニトロソアミン (DMN) 50mg/kg を単回投与した。

また、G46 株を用い、0、10、100 及び 1000 μ g/プレートの用量で *in vitro* における復帰変異試験を行なった。陽性対照として β -プロピオラクトン (BPL) を用いた。

用量設定根拠 :

結果 : 結果を次表に示した。

G46 株を用いた *in vitro* における復帰変異試験で、検体処理による復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、陽性対照では著明な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

さらに宿主経路試験においても、検体処理による復帰変異菌数の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照では復帰変異菌数の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復帰変異誘発性を有しないものと判断される。

<G46株を用いた *in vitro* における復帰変異試験>

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数/プレート	
		G-46	
検体	0	2	
		3	
	10	4	
		4	
	100	2	
		5	
	1000	1	
		1	
	陽性対照 (BPL)	1000	129 150

BPL : β - D -ガラクトシダーゼ

<宿主経路試験>

群	総投与量 (mg/kg)	復帰変異 菌数/ ml	生存菌数 $\times 10^{-8}/\text{ml}$	復帰変異菌数/ 生存菌数 $\times 10^8$	平均値 \pm S. D.
溶媒対照 (10%アラビノース)	—	15.00	50.3	0.30	0.74 ± 0.36
		25.83	36.1	0.72	
		20.83	35.6	0.59	
		37.50	47.2	0.79	
		38.33	29.8	1.29	
検体	750×2	18.33	39.7	0.46	0.52 ± 0.17
		18.33	62.1	0.30	
		21.67	42.4	0.51	
		41.67	54.6	0.76	
		27.50	47.1	0.58	
	1500×2	23.33	39.7	0.57	0.66 ± 0.33
		44.17	38.6	1.14	
		17.25	48.2	0.36	
		43.75	51.9	0.84	
		19.17	48.6	0.39	
陽性対照 (DMN)	50	6883.33	56.1	121.70	$101.89 \pm 15.59 \uparrow$
		5230.00	49.4	105.87	
		3923.33	44.2	88.76	
		4746.67	41.8	113.56	
		3236.67	40.6	79.58	

$\uparrow\downarrow$: $p < 0.001$

表中の数値は各個体別の値

DMN : ジメチルニトロアミン

⑥ ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料No. 補遺8)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1987 年

検体の純度 : %

試験方法 : ヒト末梢血リンパ球を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下において、*in vitro* における染色体異常誘発性を調べた。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて溶解し、S-9Mix 存在下及び非存在下において 0、31.25、62.5、125 及び 250 μ g/ml の濃度で培地中に処理した。処理 3 時間後に新鮮な培地に交換してさらに 21 時間培養した後、細胞の染色体標本作製した。各濃度あたり 200 個 (陽性対照は 50 個) の分裂中期細胞を観察した。陽性対照としてメチルメタンサルホネート (MMS) 及びシクロフォスファミド (CPA) を用いた。結果については、染色体異常総数及び染色体異常を有する細胞の割合が陰性対照群に比べ、統計学的に有意に増加 (1 濃度以上) し、かつ用量相関性が認められた場合を陽性と判定した。なお、統計学的分析はギャップを除いた染色体異常について実施した。

用量設定根拠 :

結果 : 結果を次表に示す。

S-9Mix 存在下では、62.5 及び 250 μ g/ml で染色体異常総数が有意に増加したが、用量相関性は認められず、また染色体異常細胞数に有意な増加は認められなかった。S-9Mix 非存在下では、125 及び 250 μ g/ml で染色体異常総数が、250 μ g/ml で染色体異常を有する細胞の割合が有意に増加し、いずれも用量相関性が認められた。一方、陽性対照については、染色体異常総数及び染色体異常を有する細胞数が統計学的に有意に増加した。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、S-9Mix 非存在下で染色体異常誘発性を有すると判断される。

薬物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S-9 Mix の有無	処理時間 ¹⁾		観察 細胞 数	有糸 分裂 頻度 ²⁾ (%)	構造異常の種類 (/100 cells)						染色体 異常総数 (/100 cells)		染色体異常 を有する 細胞数 (%)					
			検体 処理	標本 作製			g	染色体型		染色分体型		ID	oth ³⁾	+g	-g	+g	-g			
								del	exch	del	exch									
溶媒対照 (DMSO)	—	—	3	24	200	4.99 [-]	2	0.5		0.5					3	1	3	1		
検体	31.25					4.45 [89]	1								1		1			
	62.5					6.98 [140]	1.5					0.5		2	0.5	2	0.5			
	125					6.44 [129]	1		3.0		1.5	0.5	6	5↑	4.5	4.5				
	250					3.16 [63]	2.5	1.5	3.5	0.5	0.5	1	9.5	7⇕	7.5	5.5↑				
陽性対照 (MMS)	25	+	3	24	50	—	2	4	2	10	2		20	18↑	12	12↑				
溶媒対照 (DMSO)	—				200	2.49 [-]	1.5						1.5		1.5					
検体	31.25				4.02 [161]	1		1		0.5	1	3.5	2.5	3.5	2.5					
	62.5				6.53 [262]	0.5	0.5	1.5	1	0.5	0.5	4.5	4↑	3	2.5					
	125				3.88 [156]	1.5		1	0.5		3	1.5	2.5	1.5						
250	3.39 [136]	0.5	1	0.5		1	0.5	3.5	3↑	3	2.5									
陽性対照 (CPA)	20	50	—	6			16		2		24	18↑	20	18↑						

χ^2 検定 ↑↓: $p < 0.05$, ⇕: $p < 0.01$, ↑↓: $p < 0.001$

空欄は「0」を示す。

構造異常の種類: g; ギャップ、del; 欠失、exch; 交換、ID; Isolocus deletion、oth; その他

陽性対照物質: MMS: メチルメタンスルホネート CPA: シクロホスファミド

1) 処理時間: 検体処理時間及び検体処理開始後標本作製までの時間

2) [] 内の数字は対照群に対する変動率 (%) を示す。

3) 断片化 (fragmentation) が観察された細胞は細胞 100 個当りの構造異常数の計算から除外したが、染色体異常を有する細胞数には含めた。

⑦ マウスを用いた小核試験

(資料No. 補遺9)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1991 年

検体の純度 : %

供試動物 : BDF1 (CrI) マウス、1 群雌雄各 5 匹、投与時 7 週齢、
体重 : 雄 22.1-27.3g 雌 16.6-21.3g

試験方法 : 骨髄中の小核を有する多染性赤血球数の出現頻度を指標として小核誘発性を調べた。
試験は 2 回行い、1 回目試験は小核誘発性を経時的に検索するために、2 回目試験は小核誘発性の用量依存性を検索するために実施した。検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し、1 回目試験は 5000mg/kg の用量を、2 回目試験は 1250、2500 及び 5000mg/kg の用量を単回強制経口投与した。同様に溶媒対照として 0.5% CMC 水溶液を、陽性対照としてマイトマイシン C 溶液を単回強制経口投与した。投与容量は 20ml/kg とした。投与後 24 時間目に検体、溶媒対照群及び陽性対照群の雌雄各 5 匹を、投与後 48 及び 72 時間目に検体、溶媒対照群の雌雄各 5 匹を屠殺し、大腿骨を摘出して牛胎児血清を用いて骨髄を洗い出し、骨髄標本作製した。

骨髄標本は、メタノール固定後、ギムザ染色を施し、顕微鏡下で、1 動物当たり 1000 個の多染性赤血球について小核の有無を検査した。また、1 動物あたり 1000 個の赤血球を観察し、全赤血球中の多染性赤血球の割合についても調べた。

結果は、Kastenbaum-Bowman の数表による検定、Wilcoxon の順位和検定及び Jonckheere の傾向検定を用いて判断した。

用量設定根拠 :

結果 : 骨髄標本の観察結果を次表に示した。

いずれの検体投与群においても、小核を有する多染性赤血球数の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。2500 及び 5000mg/kg 群で全赤血球中の多染性赤血球の割合に有意な減少が認められ、検体投与による骨髄抑制作用と考えられた。

一方、陽性対照群では、小核を有する多染赤血球数の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性を有しないものと判断される。

骨髓標本観察結果

【1回目】

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察動物数	MNPCE (平均値±SD)	PCE/(PCE+NCE) (%) (平均値±SD)
24	溶媒対照 (0.5% CMC)	0	雄	5	0.30±0.25	64.7±8.4
			雌	5	0.28±0.19	
	検体	5000	雄	5	0.34±0.11	52.1±17.6↓
			雌	5	0.22±0.18	
	陽性対照 (MMC)	10	雄	5	4.56±1.20↑	46.4±6.3↓
			雌	5	3.38±0.77↑	
48	溶媒対照 (0.5% CMC)	0	雄	5	0.20±0.21	64.4±6.1
			雌	5	0.18±0.04	
	検体	5000	雄	5	0.24±0.13	48.0±15.7↓
			雌	5	0.10±0.07	
72	溶媒対照 (0.5% CMC)	0	雄	5	0.08±0.04	61.3±5.3
			雌	5	0.08±0.04	
	検体	5000	雄	5	0.14±0.17	56.3±6.9
			雌	5	0.16±0.13	

Kastenbaum-Bowman の数表による検定、Wilcoxon 順位和検定

↑↓ : p≤0.05、↑↓ : p≤0.01、↑↓ : p≤0.001

CMC : カルボキシメチルセルロース水溶液 MMC : マイトマイシン C

PCE : 多染性赤血球数 NCE : 正染性赤血球数

MNPCE : 多染性赤血球 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

【2回目】

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察動物数	MNPCE (平均値±SD)	PCE/(PCE+NCE) (%) (平均値±SD)
24	溶媒対照 (0.5% CMC)	0	雄	5	0.34±0.23	60.7±8.2
			雌	5	0.12±0.11	
	検体	1250	雄	5	0.04±0.05	54.9±7.8
			雌	5	0.14±0.11	
		2500	雄	5	0.20±0.07	51.6±9.5↓
			雌	5	0.12±0.13	
		5000	雄	5	0.08±0.13	46.4±11.3↓
			雌	5	0.12±0.08	
	陽性対照 (MMC)	10	雄	5	2.72±0.54↑	48.2±4.4↓
			雌	5	3.70±1.26↑	

Kastenbaum-Bowman の数表による検定、Wilcoxon 順位和検定、Jonckheere 傾向検定

↑↓ : p≤0.05、↑↓ : p≤0.01、↑↓ : p≤0.001

CMC : カルボキシメチルセルロース水溶液 MMC : マイトマイシン C

PCE : 多染性赤血球数 NCE : 正染性赤血球数

MNPCE : 多染性赤血球 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

(11) 生体機能影響

① 一般薬理試験

(資料No. 10)

試験機関 :

報告書作成年 : 1979 年

検体の純度 : %

1 中枢神経系に対する作用

(1) ラット体温に及ぼす影響

供試動物 : SD (Jcl) ラット、6 週齢、体重 200-239g、1 群雄 10 匹

投与方法 : 検体を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、0、10、100 及び 1000mg/kg の用量で経口投与した。投与前、投与後 0.5、1、2、4、6 時間に直腸温を測定した。

結果 :

投与量 (mg/kg)	直前	0.5 時間	1 時間	2 時間	4 時間	6 時間
0	37.5	37.5	37.3	36.9	37.0	36.8
10	37.5	37.7	37.6	37.3	37.3	37.1 [↑]
100	37.5	37.7	37.7	37.3 [↑]	37.1	37.1
1000	37.5	37.6	37.6	37.2	37.1	37.0

t 検定 ^{↑↓} : p<0.01

体温はいずれの測定時点においても生理的変化の範囲内であり、また用量に依存した一定の傾向も認められなかった。

(2) マウス自発運動量に及ぼす影響

供試動物 : ICR (Jcl) マウス、6 週齢、体重 25.0-32.0g、1 群雄 3 匹

投与方法 : 検体を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、0、10、32、100、320 及び 1000mg/kg の用量で経口投与した。30 分間の総運動量を動物が赤外線ビームをさえぎる回数としてパルスカウンターで測定した。測定は 6 回繰り返し行い、1 回につき各群 3 匹を用いた。

結果 :

投与量 (mg/kg)	運動量
0	757
10	653 (86.3)
32	833 (110.0)
100	996 (131.6)
320	860 (113.5)
1000	723 (95.5)

()内の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

検体投与による影響は認められなかった。

2 呼吸・循環器系に対する作用

(1) 摘出心房標本の自動運動に及ぼす影響

① モルモット心房標本に対する作用

供試動物：Hartley系モルモット、体重 500-600g、1 群雄 6 匹

投与方法：放血死させ心臓を摘出し、栄養液中で心房標本を作製した。標本は酸素 95%、炭酸ガス 5%で飽和した栄養液 50mlを満たした試験槽 (30℃) 中に懸垂した。すなわち、心房標本的一端は試験槽の底部に固定し、他端はストレーンゲージに接続し、0.4-0.6gの初期負荷を加えた後、収縮力を等尺性に記録した。また収縮張力の変化から心拍タコメーターを介して心拍数を記録した。検体は 50%エタノールに溶解して試験槽の栄養液に最終濃度が $0-1.0 \times 10^{-4}$ g/ml となるよう添加したが、濃度の如何にかかわらず添加用量は 0.1mlとし、添加後 30 分間にわたって各測定項目の記録を行なった。

結果：

処理濃度 (g/ml)	収縮力		拍動数	
	5 分	30 分	5 分	30 分
0	94.9	100	99.0	94.6
3.2×10^{-7}	94.1	99.5	99.7	98.8 ↓
1.0×10^{-6}	90.9 ↓	98.0	99.7	99.3 ↓
3.2×10^{-6}	84.6	91.5 ◻	99.6	98.6
1.0×10^{-5}	66.2 ◻	66.1 ◻	96.9	94.2
3.2×10^{-5}	36.7 ◻	27.1	92.3 ◻	91.4
1.0×10^{-4}	20.0 ◻	—	71.0 ◻	—

t 検定 ↑ ↓ : p < 0.05, ◻ ◻ : p < 0.01

表中の数値は処理前値に対する変動率 (%) を表す。

- : 記録なし

収縮力について、 3.2×10^{-6} 以上の群では用量依存性の有意な抑制作用を示した。 1.0×10^{-4} 群では 5 分後に 20%まで低下し、それ以降 4/6 例に不整脈及び心停止が認められた。その他の群に対照群との差はほとんど認められなかった。対照群は初期に極軽度の抑制作用を示した。

拍動数について、 1.0×10^{-5} 及び 3.2×10^{-5} 群では極軽度の抑制傾向が認められ、 1.0×10^{-4} 群では 5 分後に 71%まで低下した。その他の群に変化は認められなかった。対照群は時間経過とともに極軽度の抑制作用を示した。

② ウサギ心房標本に対する作用

供試動物：日本白色種ウサギ、体重約 2kg、1 群 4 匹

投与方法：放血死後直ちに心臓を摘出し、右心房標本を作製した。標本は 20mlの栄養液 (pH7.4、30℃) を満たしたマグナス槽に懸垂し、0.5gの張力を負荷し、モルモット心房標本の場合と同様にして収縮力及び心拍数の記録を行なった。検体は 30%エタノールに溶解した。

結果 :

処理濃度 (g/ml)	収縮力		拍動数	
	5分	30分	5分	30分
0	86.2	91.4	102.0	102.0
1.0×10^{-6}	83.3	86.4 ↓	101.6	101.6
3.0×10^{-6}	73.8 ◻	78.6 ◻	103.1	103.5
1.0×10^{-5}	58.9 ◻	64.4 ◻	102.8	107.9
3.0×10^{-5}	46.6 ◻	45.1 ◻	105.3	112.4
1.0×10^{-4}	19.6	—	95.9	—

t検定 ↑ ↓ : p<0.05, ◻ ◻ : p<0.01

表中の数値は処理前値に対する変動率(%)を表す。

— : 記録なし

収縮力について、 3.0×10^{-6} 以上の群では用量依存性の有意な抑制作用を示した。

1.0×10^{-4} 群では5分後に20%まで低下し、それ以降は心停止が認められた。 1.0×10^{-6} 群に対照群との差はほとんど認められなかった。対照群は初期に約14%の抑制効果を示したが、時間の経過とともに回復した。

拍動数について、 1.0×10^{-4} 群では5分後までは特に明らかな影響は認められなかったが、それ以降に心停止が認められた。その他の群に変化は認められなかった。

(2) イヌの呼吸、血圧、心拍数及び心電図に及ぼす影響

供試動物 : 雑犬、体重8-14kg、1群5匹

投与方法 : ペントバルビタールナトリウム (35mg/kg 腹腔内) 麻酔下で背位に固定し、血圧は左側の大動脈に挿入した動脈カニューレから圧トランスデューサーを介して、心拍数は動脈脈波からタコメーターを介して、呼吸は気管カニューレから圧トランスデューサーを介してそれぞれペン書オシログラフによって連続的に記録した。心電図は第II誘導により心電計に記録した。

検体は0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、静脈内投与の場合は股静脈より0、3.2、10及び32mg/kgを、十二指腸内投与の場合は開腹後十二指腸に装着したカニューレを通じて十二指腸内腔に0、100及び1000mg/kgを投与し、各測定項目につき投与前及び投与後120分までの測定値を比較した。

結果 :

① 静脈内投与の場合

投与量 (mg/kg)	血圧 (mmHg)		心拍数 (beat/min)		心電図 T波増高
	投与前	投与後	投与前	投与後	
0	134	140 (104) ↑	191	186 (97)	5/5
3.2	137	143 (104)	156	144 (92)	3/5
10	138	126 (91)	161	147 (91) ↓	5/5
32	127	84 (66) ◻	163	139 (85)	5/5

t検定 ↑ ↓ : p<0.05, ◻ ◻ : p<0.01

()内の数値は投与前値に対する変動率(%)を表す。

心電図は、異常を示した動物数/検査動物数を示す。

32mg/kg 群では投与直後に一過性の血圧下降及び心拍数減少が認められたが、10-20分後には回復した。呼吸数は一過性の増加を示した。3.2及び10mg/kg 群では血圧、心拍数及び呼吸数に検体投与による影響は認められなかった。心電図は対照群を含めた全投与群に軽度のT波増高が認められたが、その他異常所見は認められなかった。

②十二指腸内投与の場合

投与量 (mg/kg)	血圧 (mmHg)		心拍数 (beat/min)		心電図	
	投与前	投与後	投与前	投与後	T波増高	S-Tパル 上昇
0	134	120 (90)	168	183 (109)	1/5	1/5
100	135	127 (94) ↓	163	161 (99)		
1000	124	116 (94) ↓	156	163 (104) ↑	3/5	

t検定 ↑ ↓ : p<0.05

()内の数値は投与前値に対する変動率 (%) を表す。

心電図は、異常を示した動物数/検査動物数を示す。空欄は「0」を示す。

血圧及び心拍数に軽微な変動が認められたが、検体投与による明らかな影響とは考えられなかった。

3 腎機能に対する作用

(1) 麻酔犬の尿排泄に及ぼす影響

供試動物：雑犬、体重 8-12kg、1群 5匹

投与方法：動物はペントバルビタールナトリウム 20mg/kg の静脈内投与及び 10mg/kg の皮下投与により麻酔して背位に固定した。導尿は開腹後左右の尿管に挿入したポリエチレン管を通じて行ない、15分間隔で排泄尿を連続的に採集した。左側の股静脈内には生理食塩水 0.2ml/kg/分の条件で持続的に負荷し、1-2時間後に尿の排泄速度がほぼ一定していることを確認してから、0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した検体 100あるいは1000mg/kgの投与を行なった。投与は、十二指腸に装置したカニユーレを通じて十二指腸内腔に行なった。対照群には0.5%メチルセルロース溶液のみを投与した。採尿は投与後180分まで15分間隔で行ない、各尿量を測定するとともに、Na⁺、K⁺及びCl⁻濃度を定量し、各項目について投与前後の値を比較した。

結果：

投与量 (mg/kg)	総尿量 (ml/匹)	総排泄量 (μEq/匹)		
		Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
0	49.8	10108	6227	7712
100	35.7	8676 (86)	4993 (80)	5935 (77)
1000	62.9	12982 (128)	7424 (119)	9988 (130)

()内の数値は対照群に対する変動率 (%) を表す。

検体投与による影響は認められなかった。

4 消化器系に対する作用

(1) 麻酔犬生体位胃幽門部自動運動に及ぼす影響

供試動物：雑犬、体重 8-13kg、平均血圧 70-120mmHg、1 群 5 匹

投与方法：動物はあらかじめ約 1 日絶食させ、塩酸モルヒネ 10mg/kg 及びウレタン 1.5g/kg の皮下投与により麻酔した後、背位に固定した。腹部切開後水を満たしたゴム製のバルーンを胃幽門内部に装着し、その内圧変化を圧トランスデューサーを介して記録した。胃運動の指標として、胃の収縮時と拡張時の内圧 (mmH₂O) を求め、その差を自動運動の大きさとして示した。なお薬物投与前に胃拡張時の内圧が、80-120mmH₂O の範囲となるようバルーン内に満たす水の容量を調節した。検体は 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、静脈内投与の場合は 0、1、3.2 及び 10mg/kg を、十二指腸内投与の場合は十二指腸内腔へ 0、0.1、1、10、100 及び 1000mg/kg を投与し、その効果が消失するまで、あるいは最高 120 分後までその影響を観察し、投与前後の自動運動の大きさを比較した。

結果：

① 静脈内投与の場合

投与量 (mg/kg)	胃運動振幅 (mmH ₂ O)			
	投与前	投与 5 分後	投与 10 分後	投与 30 分後
0	147	149 (101)	137 (93)	190 (129)
1	192	183 (95)	189 (98)	188 (98)
3.2	225	188 (84)	168 (75)	233 (104)
10	212	94 (44) ↓	53 (25) ⇓	208 (98)

t 検定 ↑ ↓ : p<0.05、⇓ : p<0.01

() 内の数値は投与前値に対する変動率 (%) を表す。

3.2mg/kg 群では投与直後から軽度の、10mg/kg 群では明らかな運動振幅の抑制が認められたが、いずれも 30 分以内に回復した。1mg/kg 群に影響は認められなかった。対照群は多少の変動を示したが、その変動に一定の傾向は認められなかった。

② 十二指腸内投与の場合

投与量 (mg/kg)	胃運動振幅 (mmH ₂ O)			
	投与前	投与 5 分後	投与 30 分後	投与 60 分後
0	185	138 (75) ↓	179 (97)	179 (97)
0.1	176	141 (80)	167 (95)	—
1	165	118 (72)	175 (106)	—
10	161	89 (55) ↓	178 (111)	186 (116)
100	188	66 (35)	145 (77) ↓	192 (44)
1000	167	38 (23) ⇓	30 (18) ⇓	55 (33) ⇓

t 検定 ↑ ↓ : p<0.05、⇓ : p<0.01

() 内の数値は投与前値に対する変動率 (%) を表す。

1mg/kg 群では対照群に比べやや強い抑制が認められたが、30 分後には回復した。10mg/kg 以上の群では運動振幅の抑制と効果の持続性は用量依存的に強くなり、1000mg/kg 群では 2 時間にわたって著明な抑制が認められた。0.1mg/kg 群に影響は認められなかった。対照群は溶媒の刺激により軽度抑制が認められたが、20-30 分後にはほぼ回復した。

(2) ウサギ摘出回腸標本自動運動に及ぼす影響

供試動物：日本白色種ウサギ、体重 1.7-2.4kg、1 群雄 6 匹

投与方法：放血死後直ちに回腸を摘出し、回腸の末端より約 20cm を除いた残りの部位より長さ約 2cm の回腸標本を作製した。標本は 50ml の栄養液 (37℃) を満たしたマグヌス槽に懸垂し、約 1.0g の張力を負荷し自動運動の収縮力を等尺性に記録した。

検体は 50%エタノールに溶解し、標本の自動運動が安定した時点で最終濃度が $0-1.0 \times 10^{-4}$ g/ml となるよう槽内に添加したが、用量の如何にかかわらず添加容量は 0.1ml とし、添加後 30 分間にわたってその効果を観察した。

結果：

処理濃度 (g/ml)	回腸運動振幅	
	5 分	30 分
0	99.1	112.2
1.0×10^{-7}	99.6	118.9
1.0×10^{-6}	85.1 \downarrow	109.7
1.0×10^{-5}	26.7 \downarrow	62.0 \downarrow
1.0×10^{-4}	0.4 \downarrow	1.1 \downarrow

† 検定 \downarrow : $p < 0.01$

表中の数値は処理前値に対する変動率 (%) を表す。

1.0×10^{-6} 群では、5 分後に約 15% の有意な運動振幅の抑制が認められたが、15 分以降回復した。 1.0×10^{-5} 及び 1.0×10^{-4} 群では 30 分後でも抑制が認められた。対照群は 5 分には影響が認められなかったが、30 分後には約 12% の抑制が認められた。

5 刺激性試験

(1) ウサギ皮膚刺激性試験

供試動物：ニュージーランド白色ウサギ、体重 2.4-3.3kg、1 群雄 10 匹

投与方法：試験前日に腹部の毛を完全除毛して背位に固定し、腹部正中線を境に左側に検体の 0.01 及び 0.02% 水溶液 0.25ml を、右側には対照として生理食塩水 0.25ml を浸した 1 インチ四方のろ紙をそれぞれ貼付し、パラフィルムで固定した。暴露時間は 1 時間とした。暴露終了後 1、3、6、24、48 及び 72 時間に皮膚局所の発赤及び浮腫を主症状とした障害を肉眼観察し、その程度を Draize 法に従って採点し、評価した。

結果：いずれの観察時点及び動物においても刺激性変化は認められなかった。

(2) ウサギ眼刺激性試験

供試動物：ニュージーランド白色ウサギ、体重 2.5-3.3kg、1 群雄 10 匹

投与方法：検体の 0.01 及び 0.02% の水溶液 0.1ml をウサギの右眼結膜嚢内に点眼し、直ちに閉眼させて 30 秒間閉眼状態で、内眦部鼻涙管開口部を圧迫した。点眼後の洗眼は行なわなかった。対照として左眼に生理食塩水を同様に点眼した。点眼後 1、6、24、48 及び 72 時間に各ウサギの左右両眼を肉眼観察し、角膜、虹彩、結膜の障害度を Draize 法に従って採点し、評価した。

結果：いずれの観察時点及び動物においても刺激性変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

以上、本検体の急性毒性は弱く、また皮膚及び眼に対する刺激性は認められないことから、本検体が散布作業に伴って摂取された場合や誤って摂取された場合に、重大な急性中毒が発現する可能性は低いと推察される。

[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 (麻酔の有無)	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	体温	ラット	経口 (MC)	0, 10, 100, 1000	10	—	1000	変化なし
	自発運動	マウス	経口 (MC)	0, 10, 32, 100, 320, 1000	3	—	1000	変化なし
呼吸・循環器系	摘出心房 自動運動	モルモット	<i>in vitro</i> (エタノール)	3.2×10^{-7} , $(1.0, 3.2) \times 10^{-6}$, $(1.0, 3.2) \times 10^{-5}$, 1.0×10^{-4} (g/ml)	6	3.2×10^{-6} (g/ml)	1.0×10^{-6} (g/ml)	収縮力・拍動数 抑制、不整脈、 心停止
		ウサギ	<i>in vitro</i> (エタノール)	$(1.0, 3.0) \times 10^{-6}$, $(1.0, 3.0) \times 10^{-5}$, 1.0×10^{-4} (g/ml)	4	3.0×10^{-6} (g/ml)	1.0×10^{-6} (g/ml)	収縮力抑制 心停止
	呼吸 血圧 心拍数 心電図	イヌ (麻酔)	静脈内 (MC)	0, 3.2, 10, 32	5	32	10	一過性の血圧低下、 心拍数減少、 呼吸数増加
			十二指腸内 (MC)	0, 100, 1000	5	—	1000	変化なし
腎機能	尿排泄	イヌ (麻酔)	十二指腸内 (MC)	0, 100, 1000	5	—	1000	変化なし
消化器系	胃幽門部 自動運動	イヌ (麻酔)	静脈内 (MC)	0, 1, 3.2, 10	5	3.2	1.0	自動運動の抑制
			十二指腸内 (MC)	0, 0.1, 1, 10, 100, 1000	5	1.0	0.1	自動運動の抑制
	摘出回腸 標本 自動運動	ウサギ	<i>in vitro</i> (エタノール)	1.0×10^{-7} , 1.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} , 1.0×10^{-4} (g/ml)	6	1.0×10^{-6} (g/ml)	1.0×10^{-7} (g/ml)	自動運動の抑制
刺激性	皮膚刺激	ウサギ	塗布 (蒸留水)	0.01及び0.02%液 0.25ml/匹	10	—	—	刺激性なし
	眼刺激	ウサギ	点眼 (蒸留水)	0.01及び0.02%液 0.1ml/眼	10	—	—	刺激性なし

MC：メチルセルロース溶液

2. 製剤

2-1. 20%乳剤

(1) 急性毒性

① 20%乳剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 1)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 2000 年

検体の純度 : 20%乳剤

〔組成〕 エチクロゼート原体 20.0%
有機溶剤・界面活性剤等 80.0%

供試動物 : SD (Crj:CD IGS) ラット、1 群雌雄各 5 匹、6 週齢、
投与時体重 ; 雄 179-201g 雌 139-163g

観察期間 : 14 日間観察 (投与日を 1 日として起算)

投与方法 : 検体を注射用水に懸濁し、単回強制経口投与した。投与容量は 10 ml/kg とした。
動物は投与前に約 18 時間絶食させた。

観察・検査項目 : 症状及び生死を投与当日は投与後 15、30 分及び 1、3、6 時間に、その後は 1 日 1 回、14 日間観察した。体重は投与 1 日 (投与直前)、投与 2、3、4、8 及び 15 日に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0、1490、1907、2441、 3125、4000	0、1164、1490、1907、 2441、3125
LD50 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	2635.4 (2219.3-3116.6)	2260.0 (1919.0-2690.7)
死亡開始時間及び終了時間	投与 2 日/3 日	投与 2 日/2 日
症状発現時間及び消失時間	投与後 15 分/投与 4 日	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1907	1490

死亡 ; 投与 2-3 日に、1907mg/kg 群で雌 1 例、2441mg/kg 群で雄 2 例及び雌 3 例、3125mg/kg 群で雄 4 例及び雌全例、4000mg/kg 群で雄全例が死亡した。

症状 ; 流涎、自発運動低下、歩行異常、呼吸不整及び鎮静などが認められ、重篤例は死に至ったが、生存例は投与 3 日にはほぼ回復した。

体重 ; 検体投与群で増加抑制が認められ、雄で投与 8 日、雌で投与 4 日まで持続した。1907mg/kg 以上の投与群では有意な減少または増加抑制も認められた。

肉眼的病理検査 ; 死亡例で胃 (腺胃) の暗赤色斑、小腸の拡張が認められた。生存例で異常は認められなかった。

② 20%乳剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料No. 2)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 2000 年

検体の純度 : 20%乳剤

〔組成〕 エチクロゼート原体 20.0%
有機溶剤・界面活性剤等 80.0%

供試動物 : ICR (Crj:CD-1) マウス、6 週齢、1 群雌雄各 5 匹
投与時体重 ; 雄 29.2-34.5g 雌 23.0-27.3g

観察期間 : 14 日間観察 (投与日を 1 日として起算)

投与方法 : 検体を注射用水に懸濁し、単回強制経口投与した。投与容量は 10ml/kg とした。動物は投与前に約 3 時間絶食させた。

観察・検査項目 : 症状及び生死を投与当日は投与後 15、30 分及び 1、3、6 時間に、その後は 1 日 1 回、14 日間観察した。体重は投与 1 日 (投与直前)、投与 2、3、4、8 及び 15 日に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 2048, 2560, 3200, 4000, 5000	
LD50 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	3577.7 (3071.4-4167.4)	2862.2 (2457.5-3332.5)
死亡開始時間及び終了時間	投与後 3 時間 / 投与 2 日	投与後 1 時間 / 投与 2 日
症状発現時間及び消失時間	投与後 15 分 / 投与 2 日	投与後 15 分 / 投与 3 日
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2560	2048

死亡 ; 投与後 1 時間-投与 2 日に、2560mg/kg 群で雌 1 例、3200mg/kg 群で雄 1 例及び雌 4 例、4000mg/kg 群で雄 4 例及び雌全例、5000mg/kg 群で雌雄全例が死亡した。

症状 ; 自発運動低下、歩行異常、呼吸不整、鎮静、腹臥位及び流涙などが認められ、重篤例は死に至ったが、生存例は投与 3 日以降特記すべき症状は認められなかった。

体重 ; 雄では、全投与群で観察期間中増加抑制傾向にあり、3200mg/kg 群では投与 4 日まで、投与日の体重を下回った。雌では、2048mg/kg 群の観察期間中及び 2560mg/kg 群の投与 2、3 日で増加抑制傾向にあった。3200mg/kg 群では投与 2 日に投与日の体重を下回った。

肉眼的病理検査 ; 死亡例で小腸の拡張が認められた。生存例で異常は認められなかった。

③ 20%乳剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料No. 3)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 2000 年

検体の純度 : 20%乳剤

〔組成〕 エチクロゼート原体 20.0%
有機溶剤・界面活性剤等 80.0%

供試動物 : SD (Crj:CD IGS) ラット、1群雌雄各5匹、7週齢、
投与時体重; 雄 282-309g 雌 198-223g

観察期間 : 14日間観察 (投与日を1日として起算)

投与方法 : 検体を4×5cmのリント布に載せた後、投与約24時間前に剪毛した背部皮膚に直接塗布した。塗布部位は油紙で覆い、さらに粘着性伸縮包帯 (シルキーテックス) で固定した。塗布24時間後、被覆物を取り除き、残余検体を注射用水で洗浄した。

観察・検査項目: 症状及び生死を投与当日は投与後15、30分及び1、3、6時間に、その後は1日1回、14日間観察した。体重は投与1日 (投与直前)、投与2、3、4、8及び15日に測定した。死亡動物及び観察期間終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与方法	経口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	0, 2000	
LD50 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	>2000	
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間及び消失時間	症状発現例なし	
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	

死亡; 死亡は認められなかった。

症状; 特記すべき異常は認められなかった。

体重; 異常は認められなかった。

肉眼的病理検査; 異常は認められなかった。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

① 20%乳剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料No. 4)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 2000 年

検体の純度 : 20%乳剤

〔組成〕 エチクロゼート原体 20.0%
有機溶剤・界面活性剤等 80.0%

供試動物 : 日本白色種 (Kbs: JW Healthy) ウサギ、投与時 8-9 週齢、雄 6 匹、
投与時体重 ; 1.91-2.25kg

観察期間 : 7 日間観察 (暴露日を 0 日として起算)

投与方法 : 投与約 24 時間前に各動物の背部皮膚を剪毛し、検体投与部位には検体 0.5ml を均一に湿らせた 2.5×2.5cm のリント布を、対照部位にはリント布のみを貼付し、粘着性伸縮包帯 (シルキーテックス) で固定した。暴露時間は 4 時間とし、残余検体は注射用水で洗浄した。

観察項目 : 暴露終了後 1、24、48 及び 72 時間、4、5 及び 7 日に適用部位の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無を観察し、日本農林水産省ガイドラインに従って採点した。また、暴露後 72 時間までの評点より皮膚一次刺激指数 (Primary Cutaneous Irritation Index, P. C. I.) を算出し、Association Francaise de Normalization (A. F. N. O. R.) の基準に従って刺激性強度を分類した。一般状態は毎日観察し、体重は投与日及び皮膚反応消失日に測定した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点を次表に示す。

暴露後 1 時間から紅斑及び浮腫が認められ、暴露後 48 時間で評点が最高となった。その後は次第に減弱し、暴露後 7 日には全ての皮膚反応が消失した。皮膚一次刺激指数は 3.17 であり、中等度刺激物と分類された。
一般状態及び体重に異常は認められなかった。

以上の結果から、検体はウサギの皮膚に対して中等度の刺激性を有すると判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

動物 番号	項目	最高 評点	暴 露 後 時 間						
			1h	24h	48h	72h	4日	5日	7日
1	紅斑・痂皮	4	2	3	4	4	3	2	0
	浮腫	4	2	3	3	2	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	1	2	3	4	3	2	0
	浮腫	4	1	2	2	2	1	0	0
3	紅斑・痂皮	4	1	1	2	2	1	1	0
	浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮	4	1	1	2	2	1	0	0
	浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮	4	2	2	2	2	1	0	0
	浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	1	1	1	1	0	0	0
	浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	24	8	10	14	15	9	5	0
	浮腫	24	7	9	9	4	1	0	0
平均*	紅斑・痂皮	4	1.33	1.67	2.33	2.50	1.50	0.83	0
	浮腫	4	1.17	1.50	1.50	0.67	0.17	0	0
皮膚一次刺激性指数 (P. I. I.)		8	3.17						

*: 申請者が算出した。

② 20%乳剤のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料No. 5)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 2000 年

検体の純度 : 20%乳剤

〔組成〕 エチクロゼート原体 20.0%
有機溶剤・界面活性剤等 80.0%

供試動物 : 日本白色種 (Kbs: JW Healthy) ウサギ、投与時 8-9 週齢、

非洗眼群 ; 6 匹、洗眼群 ; 3 匹、投与時体重 ; 1.91-2.02kg

観察期間 : 非洗眼群 ; 21 日間観察、洗眼群 ; 14 日間観察 (暴露日を 0 日として起算)

投与方法 : 検体 0.1ml を直接右眼の下眼瞼結膜嚢内に適用し、1 秒間眼瞼を閉じあわせた。左眼は無処理対照眼とした。洗眼群は投与後 30 秒に注射用水で洗眼した。

観察項目 : 非洗眼群では適用後 1、24、48 及び 72 時間、4、5、7、10、14、18 及び 21 日に、洗眼群では適用後 1、24、48、72 時間、4、5、7、10 及び 14 日に角膜、虹彩及び結膜の刺激性変化を観察し、日本農林水産省ガイドライン及び Draize 法に従って採点した。また、各観察時における平均合計スコアを算出し、Kay & Calandra の方法に従って刺激性強度を分類した。一般状態は毎日観察し、体重は投与日及び眼反応消失日に測定した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点を次表に示す。

非洗眼群では、適用後 1 時間から虹彩及び結膜に刺激性変化が認められ、適用後 24 時間からは角膜混濁が発現した。これらの変化は適用後 5 日までほぼ同程度の変化で推移したが、適用後 7 日には角膜混濁が悪化した。適用後 10 日以降、角膜の混濁面積は縮小したが、適用後 21 日までに回復しなかった。その他、角膜の血管新生が適用後 4-21 日に認められた。

洗眼群では、適用後 1 時間から結膜に刺激性変化が認められ、適用後 24 時間からは角膜の混濁が出現した。これらの変化は適用後 5 日以降次第に減弱し、適用後 14 日までに全て消失した。その他、角膜の血管新生が適用後 4-7 日で認められた。

平均合計スコアの最高値は非洗眼群で適用後 7 日の 41.50、洗眼群で適用後 24 及び 48 時間の 27.33 であり、非洗眼群で強度刺激物、洗眼群で中等度刺激物と分類された。また、洗眼群では非洗眼群に比べ回復が早かった。

一般状態及び体重に異常は認められなかった。

以上の結果から、検体はウサギの眼に対して強度の刺激性を有すると判断した。また、洗眼効果が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

群	動物番号	項目	最高評点	適用後時間											
				1h	24h	48h	72h	4d	5d	7d	10d	14d	18d	21d	
非洗眼群	1	角膜	程度	4	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
			面積*	4	0	4	4	4	4	4	4	2	2	2	0
		虹彩		2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
			浮腫	4	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
	2	角膜	程度	4	0	1	1	1	1	1	2	2	1	0	0
			面積*	4	0	4	4	4	4	4	4	3	2	0	0
		虹彩		2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
			浮腫	4	2	1	1	1	2	2	2		1	0	0
			分泌物*	3	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
	3	角膜	程度	4	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1
			面積*	4	0	4	4	4	4	4	4	3	2	2	1
		虹彩		2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
			浮腫	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			分泌物*	3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	4	角膜	程度	4	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
			面積*	4	0	4	4	4	4	4	4	2	1	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
			浮腫	4	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5	角膜	程度	4	0	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	
		面積*	4	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	虹彩		2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	結膜	発赤	3	1	2	2	3	2	2	3	3	3	3	2	
		浮腫	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		分泌物*	3	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
6	角膜	程度	4	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	
		面積*	4	0	4	4	4	4	4	4	2	2	2	1	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		浮腫	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		分泌物*	3	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
合計			660	41	180	178	180	180	172	249	286	166	149	112	
平均			110	6.83	30.00	29.67	30.00	30.00	28.67	41.50	31.00	27.67	24.83	18.67	

*：農水省ガイドラインには記載なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

群	項目		最高 評点	適用後時間								
				1h	24h	48h	72h	4d	5d	7d	10d	14d
洗眼群 (3匹平均)	角膜	程度	4	0	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	0.33	0	0
		面積*	4	0	4.00	4.00	4.00	4.00	2.67	0.67	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1.00	2.00	2.00	1.67	1.67	1.67	1.33	0.33	0
		浮腫	4	2.00	1.33	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	0	0
		分泌物*	3	0	0.33	0.67	0.33	0.33	0	0	0	0
	合計		110	6.00	27.33	27.33	26.00	26.00	18.67	7.33	0.67	0

*: 農水省ガイドラインには記載なし

③ 20%乳剤 (1000倍希釈液) のウサギを用いた眼刺激性試験

(資料No. 6)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 2000 年

検体の純度 : 20%乳剤

〔組成〕 エチクロゼート原体 20.0%
有機溶剤・界面活性剤等 80.0%

供試動物 : 日本白色種 (Kbs:JW Healthy) ウサギ、投与時 8-9 週齢、
非洗眼群 ; 6 匹、洗眼群 ; 3 匹、投与時体重 ; 2.00-2.32kg

観察期間 : 72 時間観察 (暴露日を 0 日として起算)

投与方法 : 検体の 1000 倍希釈液 0.1ml を右眼の下眼瞼結膜嚢内に適用し、1 秒間眼瞼を閉じあ
わせた。左眼は無処理対照眼とした。洗眼群は投与後 30 秒に注射用水で洗眼した。

観察項目 : 適用後 1、24、48 及び 72 時間に角膜、虹彩及び結膜の刺激性変化を観察し、日本
農林水産省ガイドライン及び Draize 法に従って採点した。また、各観察時におけ
る平均合計スコアを算出し、Kay & Calandra の方法に従って刺激性強度を分類した。
一般状態は毎日観察し、体重は投与日及び観察終了日に測定した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点を次表に示す。

非洗眼群及び洗眼群ともに、角膜、虹彩及び結膜に刺激性変化は認められず、無刺
激物と分類された。一般状態及び体重に異常は認められなかった。

以上の結果から、検体の 1000 倍希釈液はウサギの眼に対して刺激性はないと判断した。

群	動物番号	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	1	角膜	程度	4	0	0	0	0
			面積*	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0
	2	角膜	程度	4	0	0	0	0
			面積*	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0
	3	角膜	程度	4	0	0	0	0
			面積*	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0
	4	角膜	程度	4	0	0	0	0
			面積*	4	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0
5	角膜	程度	4	0	0	0	0	
		面積*	4	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	
		分泌物*	3	0	0	0	0	
6	角膜	程度	4	0	0	0	0	
		面積*	4	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	
		分泌物*	3	0	0	0	0	
合計		660	0	0	0	0		
平均		110	0	0	0	0		

*：農水省ガイドラインには記載なし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

群	項目		最高 評点	適用後時間			
				1時間	24時間	48時間	72時間
洗眼群 (3匹平均)	角膜	程度	4	0	0	0	0
		面積*	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0
		分泌物*	3	0	0	0	0
	合計		110	0	0	0	0

*：農水省ガイドラインには記載なし

(3) 皮膚感作性

① 20%乳剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料No. 7)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 2000 年

検体の純度 : 20%乳剤

〔組成〕 エチクロゼート原体 20.0%
有機溶剤・界面活性剤等 80.0%

供試動物 : ハートレーモルモット、投与時 5-6 週齢、投与時体重 ; 356-436g

検体感作群 ; 雌 20 匹、検体非感作群及び陽性対照群 ; 雌 10 匹

観察期間 : 感作開始から惹起終了後 48 時間観察まで (30 日間)

試験操作 : [Buehler 法]

投与濃度設定根拠 ;

感作 ; 検体原液 0.2ml を 2×2cm のリント布に塗布し、剪毛した左腹側部に適用し 6 時間閉塞貼付した。検体非感作群には注射用水を、陽性物質感作群には 1.0%DNCB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) エタノール水溶液を、陽性物質非感作群には 80% エタノール水溶液を同様に適用した。この操作を 7 日間毎に計 3 回行った。

惹起 ; 3 回目感作後 14 日 (投与 28 日) に全動物の右腹側部 (約 5×5cm) を剪毛し、検体投与群には検体の 20%注射用水懸濁液、陽性対照群には 0.1%DNCB アセトン溶液のそれぞれ 0.2ml を 2×2cm のリント布に塗布し、各動物の腹側部に 6 時間閉塞貼付した。

群	感作	惹起
検体感作群	検体原液	20%検体注射用水懸濁液
検体非感作群	注射用水	20%検体注射用水懸濁液
陽性物質感作群	1.0%DNCB エタノール水溶液	0.1%DNCB アセトン溶液
陽性物質非感作群	80%エタノール水溶液	0.1%DNCB アセトン溶液

観察項目 : 惹起経皮貼付除去後 24 及び 48 時間に適用部位の紅斑及び浮腫の有無などを肉眼的に観察し、採点した。症状は毎日観察し、体重は 1 回目感作日 (投与 0 日) 及び観察終了日 (投与 30 日) に測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

採点及び評価方法；各観察時に Magnusson & Kligman の基準に従い採点した。評点 1 以上を陽性として感作率 (%) を算出し、EEC の基準に従い感作率が 15% 以上の場合、検体の皮膚感作性を陽性と判定した。

Magnusson & Kligman の基準

皮膚反応の程度	評価
肉眼的に変化なし	0
軽度またはまばらな紅斑	1
中等度の紅斑	2
強度の紅斑及び浮腫	3

結果：各観察時における感作性変化が認められた動物数を下表に示す。

群	処理		匹数	感作反応動物数								陽性動物数	感作率 (%)
	感作 (3 回)	惹起		皮膚反応評点									
				24 時間後				48 時間後					
				0	1	2	3	0	1	2	3		
検体感作群	検体原液	20%検体注射用水懸濁液	20	14	5	1	0	9	9	2	0	11	55
検体非感作群	注射用水	20%検体注射用水懸濁液	10	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
陽性物質感作群	1.0%DNCB エタノール水溶液	0.1%DNCB アセトン溶液	10	0	2	5	3	0	3	6	1	10	100
陽性物質非感作群	80% エタノール水溶液	0.1%DNCB アセトン溶液	10	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0

検体感作群では、惹起貼付除去後 24 時間で皮膚反応評点 1-2 の紅斑が 6 例に、48 時間で皮膚反応評点 1-2 の紅斑が 11 例に認められた。陽性物質感作群では、惹起貼付除去後 24 及び 48 時間の観察で全例に明らかな陽性反応が認められた。検体非感作群及び陽性物質非感作群で皮膚反応は認められなかった。

一般状態及び体重に異常は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下において検体は皮膚感作性を有すると判断した。

2-2. 1%乳剤

(1) 皮膚感作性

① 1%乳剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料No. 補遺3)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1987 年

検体の純度 : 1%乳剤

〔組成〕 エチクロゼート原体 1.0%
有機溶剤、界面活性剤等 99.0%

供試動物 : Dunkin Hartley モルモット、1群雌 20 匹、開始時体重 : 393-490g

観察期間 : 感作開始から誘発終了後 48 時間観察まで (24 日間)

試験操作 : [Maximization 法]

投与量設定根拠 :

感作皮内投与 : 肩の間の背部を剪毛し、正中線両側の区画 (6×4cm) に、感作皮内投与液①、②及び③を各々0.1ml ずつ投与した。

感作経皮投与 : 感作皮内投与後 7 日に、同部位に感作経皮投与液を十分に浸透させたパッチ (4×2cm) を 48 時間閉塞貼付した。

惹起経皮投与 : 感作経皮投与後 14 日 (感作皮内投与後 21 日) に、背中及び脇腹を剪毛し、右脇腹には惹起経皮投与液 (1) を、左脇腹には惹起経皮投与液 (2) をパッチ (2×2cm) に浸透させ 24 時間閉塞貼付した。

群	匹数	処理		
		感作		惹起
		皮内投与	経皮投与	経皮投与
検体投与群	20	①FCA* ②12.5%検体流動ハ ^o ラフィン溶液 ③12.5%検体流動ハ ^o ラフィン溶液/FCA 等量混合液	100%検体流動ハ ^o ラフィン溶液	(1) 50%検体流動ハ ^o ラフィン溶液 (2) 100%検体流動ハ ^o ラフィン溶液
陰性対照群	20	①FCA* ②流動ハ ^o ラフィン液 ③流動ハ ^o ラフィン液/FCA 等量混合液	流動ハ ^o ラフィン液	(1) 50%検体流動ハ ^o ラフィン溶液 (2) 100%検体流動ハ ^o ラフィン溶液

* FCA : フロイント完全アジュバンド

観察・検査項目：惹起経皮貼付除去後 24 及び 48 時間に適用部位の紅斑及び浮腫の有無を肉眼的に観察し、採点した。

採点及び評価方法：各観察時に下記に示した基準に従い採点し、評価した。

Magnusson & Kligman の基準

皮膚反応の程度	評点
反応なし	0
散在性又は斑状の軽度の紅斑	1
中等度の紅斑	2
強度の紅斑と浮腫	3

感作率 (%)	過敏性の程度	分類
0 - 8	1	非常に弱い過敏性
9 - 28	2	弱い過敏性
29 - 64	3	中等度の過敏性
65 - 80	4	強い過敏性
81 - 100	5	非常に強い過敏性

結果 :

群	処理			匹数	感作反応動物数								陽性動物数	感作率 (%)	
	感作		惹起		皮膚反応評点										
	皮内投与	経皮投与	経皮投与		24 時間後				48 時間後						
					0	1	2	3	0	1	2	3			
検体投与群	①FCA*	100%検体	50%検体	20	20	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
	②12.5%検体流動ハ ^o ラフィン溶液 ③12.5%検体流動ハ ^o ラフィン溶液/FCA 等量混合液		100%検体		20	0	0	0	20	0	0	0	0		
陰性対照群	①FCA*	流動ハ ^o ラフィン液	50%検体	20	20	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
	②流動ハ ^o ラフィン液 ③流動ハ ^o ラフィン液/FCA 等量混合液		100%検体		20	0	0	0	20	0	0	0	0		

* : FCA ; フロイント完全アジュバンド

検体投与群及び陰性対照群のいずれにおいても感作反応は認められなかった。

なお、陽性対照物質 DNCB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) を用いた感受性確認試験は 1986 年 11 月 11 日-1986 年 12 月 5 日に別途実施され、感作率は 90%であった。

以上の結果から、本剤の皮膚感作性は陰性と判断した。

3. 参考

① マウスを用いた1ヵ月間亜急性経口毒性試験

(資料No. 4)

試験機関 :

報告書作成年 : 1976 年

検体の純度 : %

供試動物 : ICR マウス (Jcl:ICR)、1 群雌雄各 10 匹、開始時 5 週齢、
開始時体重 ; 雄 : 18-27g、雌 : 17-23g

投与期間 : 1 ヶ月間 (1976 年 7 月 1 日-1976 年 8 月 5 日)

投与方法 : 0、2、10、50、250、1250 及び 6250mg/kg/日の用量になるように検体を 0、10、50、
250、1250、6250、31250ppm 濃度で飼料に混入し、1 ヶ月間随時摂食させた。

投与量設定根拠 :

観察・検査項目及び結果 :

一般状態及び死亡率 : 一般状態及び死亡の有無を毎日観察した。

6250mg/kg/日群の雌雄で、投与後 7 日より軽度の自発運動の低下が認められ、投与終了時まで継続した。同群の死亡例では、自発運動の低下に加え、立毛、被毛粗剛、削瘦、蹲り姿勢等が認められた。その他の群で異常は認められなかった。

投与期間終了時の死亡率を下表に示す。

投与量 (mg/kg/日)		0	2	10	50	250	1250	6250
死亡率 (%)	雄	0	0	0	0	0	0	20
	雌	0	0	0	0	0	0	50

6250mg/kg/日群で雄 2 匹、雌 5 匹の死亡が認められ、検体投与に起因した衰弱死と考えられた。

体重変化 : 毎週 2 回、全動物について測定した。平均体重の変化を下表に示す。

投与量 (mg/kg/日)	雄						雌					
	2	10	50	250	1250	6250	2	10	50	250	1250	6250
1 週						↓79						↓66
2 週						↓78						↓60
3 週						↓77						↓65
4 週						↓77						↓72
5 週						↓77						↓72
0-5 週						80						70

t 検定 ↑↓ : p<0.001

表中の数値は対照群に対する変動率 (%) を表す (各週の数値は週後半の数値)。

6250mg/kg 群の雌雄で、投与期間を通じて有意な体重増加抑制が認められた。その他の群で体重増加抑制は認められなかった。

摂餌量及び食餌効率：全動物の摂餌量を毎週2回測定し、食餌効率も算出した。

摂餌量の変化を下表に示す。

投与量 (mg/kg/日)	雄						雌					
	2	10	50	250	1250	6250	2	10	50	250	1250	6250
1週						71						48
2週						65						63
3週						69						65
4週						79						80
5週						77						86
0-5週						72						65

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

6250mg/kg群の雌雄で投与期間を通じて摂餌量の低下が認められた。その他の群に著明な変化は認められなかった。

食餌効率の変化を下表に示す。

投与量 (mg/kg/日)	雄						雌					
	2	10	50	250	1250	6250	2	10	50	250	1250	6250
0-5週						58						15

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

6250mg/kg群の雌雄で食餌効率の低下が認められた。

検体摂取量：体重、摂餌量及び飼料中検体濃度から算出した1日あたりの平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (mg/kg/日)	2	10	50	250	1250	6250	
検体摂取量							
(mg/kg/日)	雄	2	9	47	232	1156	5208
	雌	2	10	50	249	1232	5561

6250mg/kg/日群では設定値に達しなかったが、その他の群ではほぼ設定された量が摂取された。

飲水量：毎週1回、ケージ毎の飲水量を測定した。

平均飲水量の変化を下表に示す。

投与量 (mg/kg/日)	雄						雌					
	2	10	50	250	1250	6250	2	10	50	250	1250	6250
0-5週						84						93

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

6250mg/kg/日群の雄では、投与期間を通じて飲水量の減少が認められた。同群の雌では、投与後7日に飲水量の減少が認められたが以後回復した。その他の群に変化は認められなかった。

血液学的検査：投与期間終了時に全生存動物を対象として、尾静脈から採血し、以下の検査項目について測定した。

赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数、白血球数、白血球百分比、網状赤血球数

検体投与による影響は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日産化学工業株式会社にある。

血液生化学的検査：投与期間終了時に全生存動物を対象として、エーテル麻酔下で開胸し、心臓採血により得た血清を用いて、以下の検査項目について測定した。

アルカリフォスファターゼ、GOT、GPT、A/G比、血糖、総蛋白、尿素窒素、コレステロール、クレアチニン、Na、K及びCl、血清コリンエステラーゼ
対照群と比べ統計学的有意差のみられた項目を下表に示す。

投与量 (mg/kg/日)	雄						雌					
	2	10	50	250	1250	6250	2	10	50	250	1250	6250
アルカリフォスファターゼ						↑180						↑173
GOT											↑146	↑172
GPT												↑164

t検定 ↑↓: p<0.01, ↑↓: p<0.001

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

1250mg/kg/日群の雌及び6250mg/kg/日群の雌雄で、肝機能パラメーター(アルカリフォスファターゼ、GOT、GPT)の上昇が認められた。その他の群に変化は認められなかった。

尿検査：投与期間終了時に全生存動物を対象として、下腹圧迫法により新鮮尿を採取して、以下の検査項目について測定した。

潜血反応、ケトン体、糖、蛋白、pH、ビリルビン及びウロビリノーゲン
検体投与による影響は認められなかった。

臓器重量：投与期間終了時に全生存動物を対象として、放血殺後解剖を行い、以下の臓器重量を測定し、対体重比も算出した。

脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、胸腺、副腎、甲状腺、下垂体、膵臓、精巣、精嚢、前立腺、卵巣及び子宮

対照群と比べ統計学的に有意差の認められた項目を次表に示す。

投与量 (mg/kg/日)		雄						雌					
		2	10	50	250	1250	6250	2	10	50	250	1250	6250
脳	絶対												↓90
	相対						↑125						↑125
心臓	絶対						↓75						↓83
	相対												
肺	絶対						↓90						↓89
	相対						↑114						↑121
肝臓	絶対						↓79						↓85
	相対												↑118
脾臓	絶対												
	相対						↑137						
腎臓	右	絶対					↓67						↓74
		相対					↓87						
	左	絶対					↓67						↓68
		相対					↓84						
胸腺	絶対												
	相対						↑137						
副腎	右	絶対											
		相対											
	左	絶対											↑132
		相対											
甲状腺	絶対						↓68					↓65	
	相対												
膵臓	絶対						↓63					↓67	
	相対						↓83						
精巣	右	絶対					↓76	-	-	-	-	-	-
		相対							-	-	-	-	-
	左	絶対					↓87	-	-	-	-	-	-
		相対							-	-	-	-	-
精囊	絶対					↓56	-	-	-	-	-	-	
	相対					↓71	-	-	-	-	-	-	
前立腺	絶対					↓61	-	-	-	-	-	-	
	相対							-	-	-	-	-	
卵巣	右	絶対	-	-	-	-	-						↓66
		相対	-	-	-	-	-	-					
	左	絶対	-	-	-	-	-	-					↓68
		相対	-	-	-	-	-	-					
子宮	絶対	-	-	-	-	-	-					↓56	
	相対	-	-	-	-	-	-						

↑ 検定 ↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01、↑↓ : p<0.001

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

- : 測定対象外

6250mg/kg/日群の雌雄で多数の臓器に絶対重量の減少と相対重量の増加あるいは減少が認められたが、組織学的変化を伴わないことから、いずれも検体の直接的な影響ではなく、体重増加抑制による二次的变化と考えられた。

肉眼的病理検査：全動物を対象として検査した。

死亡動物 (6250mg/kg/日群) では、雄 2 匹中 1 匹に肺のうっ血、他の動物に肺の赤色肝様変化と肝臓及び腎臓のうっ血が認められた。雌では、全動物に肺のうっ血が認められ、3 匹に腎臓のうっ血が認められた。

生存動物では、いずれの群においても特記すべき変化は認められなかった。

以上、いずれの群においても検体投与による影響は認められなかった。

病理組織学的検査：肉眼的病理検査を実施した動物を対象として、重量測定臓器を含め、以下の臓器について病理標本を作成し、鏡検した。

脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、胸腺、副腎、甲状腺、下垂体、膵臓、精巣、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、胃、腸管、腸間膜リンパ節、皮膚、骨格筋 (大腿筋)、坐骨神経、骨髄 (大腿骨)

下表に所見を示す。

投与量 (mg/kg/日)		雄						雌							
		0	2	10	50	250	1250	6250	0	2	10	50	250	1250	6250
肺	うっ血							(2)							(4)
	細胞壁の肥厚	2	1		1	3	2	2	4	2	2	1	1	3	1
	気管支周囲炎		1												
	気管支肺炎							(1)							
肝臓	うっ血							(1)							
腎臓	うっ血							(1)							(3)

枠内の数字は所見例数を示す。

() は死亡動物の所見例数を示す。空欄は「0」を示す。

検体投与による影響は認められなかった。

以上、本剤のマウスを用いた 1 ヶ月間亜急性毒性試験における影響として、最高用量の 31250ppm (6250mg/kg/日) 群の雌雄で死亡率、一般状態、体重、摂餌量、食餌効率、血液生化学的検査値及び臓器重量に有意な変化等が認められたが、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査においては投与に関連する特異な所見は認められなかった。6250ppm (1250mg/kg/日) 群では、雌で肝機能障害を示唆する変化が認められた。

従って、確実中毒量は雌雄ともに 31250ppm (雄 5208mg/kg/日、雌 5561mg/kg/日)、最小中毒量は雌の 6250ppm (1232mg/kg/日)、無毒性量は雄 6250ppm (1156mg/kg/日)、雌 1250ppm (249mg/kg/日) であると判断される。