

(9) 変異原性

(資料 No. T-25)

エトキサゾール原体の細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames test-1)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

検 体 : エトキサゾール原体 (純度 %)

方 法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA 98, TA 100, TA 1535 および TA 1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA) を用い、ラット肝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討した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。試験菌株を用いた予備試験において、5000 µg/プレートにおいても毒性を示さなかったため、これを最高処理濃度とした。陽性対照物質および処理濃度は結果の表中に示した。試験は3連制とし、同様の試験を2回行った。

結 果 : 結果を次頁の表に示した。

本検体は S-9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの処理濃度においても復帰突然変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照では S-9 mix の存在下および非存在下で、復帰突然変異コロニー数が顕著に増加した。

以上の結果より、本検体は薬物代謝酵素系の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰突然変異誘発性を示さなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

第 1 回試験

供試物質	S-9 mix	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	
			TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
溶媒対照 (DMSO)	-	100*	103	10	12	23	8
検体 (エトキシニール原体)	-	313	122	8	14	20	6
		625	114	8	15	18	7
		1250	115	11	16	24	6
		2500	122	7	13	21	5
		5000	107	8	10	17	4
溶媒対照 (DMSO)	+	100*	94	7	22	31	10
検体 (エトキシニール原体)	+	313	101	10	21	39	10
		625	93	8	19	33	11
		1250	98	9	17	34	9
		2500	114	8	21	27	6
		5000	125	8	20	28	7
陽 性 対 照	AF-2	-	0.01	723			
			0.04			1088	
			0.1				701
	SA			188			
	9-AA		80				4708
	2-AA	+	0.5	586			509
2				319			168
40					703		

数値は 3 連の平均値

* : $\mu\text{L}/\text{プレート}$

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SA : sodium azide

9-AA : 9-aminoacridine 2-AA : 2-aminoanthracene

AF-2 および 2-AA は DMSO に溶解, SA および 9-AA は滅菌蒸留水に溶解して使用

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

第2回試験

供試物質	S-9 mix	濃度 μg/プレート	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	
			TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
溶媒対照 (DMSO)	-	100*	107	9	23	26	7
検体 (エトキシ・ール原体)	-	313	109	8	21	23	5
		625	113	8	25	26	5
		1250	123	6	23	34	8
		2500	127	8	18	24	5
		5000	121	9	17	15	5
溶媒対照 (DMSO)	+	100*	101	10	24	36	14
検体 (エトキシ・ール原体)	+	313	130	8	21	42	12
		625	122	10	20	34	11
		1250	128	11	26	29	11
		2500	126	10	21	28	14
		5000	109	12	26	40	12
陽性 対照	AF-2	-	0.01	696			
			0.04			1157	
			0.1				807
	SA		0.5		251		
	9-AA		80				4327
	2-AA	+	0.5	412			396
			2		239		
		40			617		

数値は3連の平均値

*: μL/プレート

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SA: sodium azide

9-AA: 9-aminoacridine

2-AA: 2-aminoanthracene

AF-2 および 2-AA は DMSO に溶解, SA および 9-AA は滅菌蒸留水に溶解して使用

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 No. T-48)

エトキサゾール原体のサルモネラ菌 TA102 株を用いた復帰突然変異試験 (Ames test-2)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 :

検 体 : エトキサゾール原体 (純度 %)

方 法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA 102) を用い、ラット肝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討した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。試験菌株を用いて最高処理濃度 5000 μg /プレートで実施した用量設定試験において、検体の析出が S9 mix 存在下および非存在下、1250 μg /プレート以上の濃度で認められた。菌に対する毒性は 5000 μg /プレートにおいても認められなかった。以上により、5000 μg /プレートを本試験の最高処理濃度とした。陽性対照物質および処理濃度は結果の表中に示した。試験は 3 連制とし、用量設定試験を兼ねた第 1 回試験および本試験の 2 回行った。

結 果 : 結果を次頁の表に示した。

本検体は S-9 mix の有無にかかわらず、TA102 菌株において、いずれの処理濃度においても復帰変異コロニー数を溶媒対照群の 2 倍以上にかつ濃度依存的に増加させることはなかった。

一方、陽性対照では S-9 mix の存在下および非存在下で、復帰突然変異コロニー数が顕著に増加した。

以上の結果より、本検体は薬物代謝酵素系の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰突然変異誘発性を示さなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

第1回試験（用量設定試験）

供試物質	S-9 mix	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数/プレート	
			塩基置換型	
			TA 102	
溶媒対照 (DMSO)	-	0	311	
検体 (イトキサール原体)	-	4.88	286	
		19.5	276	
		78.1	273	
		313	265	
		1250#	300	
		5000#	261	
溶媒対照 (DMSO)	+	0	353	
検体 (イトキサール原体)	+	4.88	361	
		19.5	353	
		78.1	368	
		313	354	
		1250#	340	
		5000#	326	
陽性 対照	MMC	-	0.05	905
	2-AA	+	5	1002

数値は3連の平均値

MMC : Mitomycin C 2-AA : 2-aminoanthracene

MMCは滅菌精製水に溶解, 2-AAはDMSOに溶解して使用

: 検体の析出が認められた

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

第 2 回試験 (本試験)

供試物質	S-9 mix	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数/プレート	
			塩基置換型	
			TA 102	
溶媒対照 (DMSO)	-	0	291	
検体 (イトキサ ⁺ -ル原体)	-	313	285	
		625#	297	
		1250#	294	
		2500#	302	
		5000#	278	
溶媒対照 (DMSO)	+	0	356	
検体 (イトキサ ⁺ -ル原体)	+	313	346	
		625	345	
		1250#	353	
		2500#	343	
		5000#	329	
陽性 対照	MMC	-	0.05	1093
	2-AA	+	5	895

数値は 3 連の平均値

MMC : Mitomycin C 2-AA : 2aminoanthracene

MMC は滅菌精製水に溶解, 2-AA は DMSO に溶解して使用

: 検体の析出が認められた

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 No. T-49)

エトキサゾール原体のマウスリンパ腫 L5178Y 細胞を用いた遺伝子突然変異試験

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検 体：エトキサゾール原体（純度 %）

方 法：マウスリンパ腫 L5178Y 細胞を用い、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、検体の変異原性の有無を検定した。突然変異の評価は、トリフルオロチミジン (TFT) 存在下でのコロニー増殖を指標とするチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子座の突然変異誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、S-9 mix 存在下および非存在下ともに、検体で 3 時間処理した。陽性対象物質にはメタンスルホン酸メチルおよび 20-メチルコラントレンを使用した。試験は 2 連制とし、2 回実施した。

用量設定根拠：

S-9 mix 非存在下の試験 1 では 10, 35, 50 および 60 $\mu\text{g/mL}$ 、試験 2 では 35, 40, 50, 55 および 60 $\mu\text{g/mL}$ 、S-9 mix 存在下の試験 1 では 0.5, 1, 2.5 および 5 $\mu\text{g/mL}$ 、試験 2 では 1, 2.5, 3, 4 および 10 $\mu\text{g/mL}$ の 4 濃度あるいは 5 濃度について突然変異試験を実施した。

結 果：結果を次表に示した。

S-9 mix 非存在下の 2 回の試験において突然変異頻度の増加が認められたが、これらは強い毒性が認められる濃度であり、変異コロニーの絶対数の増加もほとんど認められなかった。従って、S-9 mix 非存在下では明確な結論を出すことはできなかった。

S-9 mix 存在下の 2 回の試験では、対照群と比較して生存細胞 10^6 個当たり 100 変異体を超える突然変異頻度の増加が認められ、この増加には統計学的有意差および用量相関性も認められた。

なお、陽性対照では突然変異頻度の顕著な増加が認められた。

以上の結果より、本検体は本試験条件下、薬物代謝酵素系 (S-9 mix) 存在下において突然変異誘発性を有するものと結論される。

試験 1

薬物	S-9 mix	濃度 (µg/mL)	相対浮遊細胞増殖率 ^{a)} (%)	相対総増殖率 ^{b)} (%)	突然変異頻度 ^{c)} /10 ⁶ 生存細胞
溶媒対照 (DMSO)	-	10	100	100	183
検体 (イトキサール原体)	-	10	88	77	202
	-	35	51	48	231
	-	50	24	25	218
	-	60	15	9	299**
陽性対照 (MMS)	-	10	78	54	583***
溶媒対照 (DMSO)	+	10	100	100	187
検体 (イトキサール原体)	+	0.5	90	90	196
	+	1	90	102	197
	+	2.5	61	62	230
	+	5	20	18	388***
陽性対照 (MC)	+	2.5	68	44	1030***

数値は相対浮遊細胞増殖率については全群 2 連，相対総増殖率および突然変異頻度/10⁶ 生存細胞については溶媒対照群 4 連（各連 3 プレート），検体および陽性対照群 2 連（各連 3 プレート）の平均値

DMSO：ジメチルスルホキシド

MMS：メタンサルホン酸メチル

MC：20-メチルコラントレン

統計解析には UKEMS（英国環境変異原性学会）のガイドラインに記載の方法を用いた。

対照群と有意差あり **：P < 0.01，***：P < 0.001

a)：相対浮遊細胞増殖率 = (浮遊細胞増殖率 / 溶媒対照群の浮遊細胞増殖率) × 100

(浮遊細胞増殖率 = (処理後 24 時間目細胞数 / 2 × 10⁵) × (処理後 48 時間目細胞数 / 2* × 10⁵), *：但し，処理後 24 時間目細胞数が 2 × 10⁵/mL 未満の場合はその細胞数)

b)：相対総増殖率 = (相対浮遊細胞増殖率 × 発現期間後の相対生存率) / 100

c)：突然変異頻度 / 10⁶ 生存細胞 = (600 / 総生存コロニー数) × (総変異コロニー数 / 3)

試験 2

薬物	S-9 mix	濃度 (µg/mL)	相対浮遊細胞増殖率 ^{a)} (%)	相対総増殖率 ^{b)} (%)	突然変異頻度 ^{c)} /10 ⁶ 生存細胞
溶媒対照 (DMSO)	-	10	100	100	207
検体 (イトキサゲ [®] -ル原体)	-	35	82	86	244
	-	40	59	56	279
	-	50	111	101	237
	-	55	22	11	436**
	-	60	12	3	722**
陽性対照 (MMS)	-	10	188	154	440***
溶媒対照 (DMSO)	+	10	100	100	210
検体 (イトキサゲ [®] -ル原体)	+	1	84	76	240
	+	2.5	61	61	261
	+	3	39	39	309**
	+	4	20	15	473***
	+	10	18	16	465***
陽性対照 (MC)	+	2.5	62	39	769***

数値は相対浮遊細胞増殖率については全群 2 連, 相対総増殖率および突然変異頻度/10⁶ 生存細胞については溶媒対照群 4 連 (各連 3 プレート), 検体および陽性対照群 2 連 (各連 3 プレート) の平均値

DMSO: ジメチルスルホキシド

MMS: メタンスルホン酸メチル

MC: 20-メチルコラントレン

統計解析には UKEMS (英国環境変異原性学会) 推奨の方法を用いた。

対照群と有意差あり ** : P < 0.01, *** : P < 0.001

a) : 相対浮遊細胞増殖率 = (浮遊細胞増殖率 / 溶媒対照群の浮遊細胞増殖率) × 100

(浮遊細胞増殖率 = (処理後 24 時間目細胞数 / 2 × 10⁵) × (処理後 48 時間目細胞数 / 2 × 10⁵), *: 但し, 処理後 24 時間目細胞数が 2 × 10⁵/mL 未満の場合はその細胞数)

b) : 相対総増殖率 = (相対浮遊細胞増殖率 × 発現期間後の相対生存率) / 100

c) : 突然変異頻度 / 10⁶ 生存細胞 = (600 / 総生存コロニー数) × (総変異コロニー数 / 3)

(資料 No. T-26)

エトキサゾール原体のチャイニーズ・ハムスター肺由来細胞株 CHL を用いた *in vitro* 染色体異常試験

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検 体：エトキサゾール原体（純度 %）

方 法：チャイニーズ・ハムスターの肺由来の細胞株 CHL を用い、ラット肝から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下（代謝活性化法）および非存在下（直接法）において、染色体異常誘発性を検討した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、培地中での DMSO の濃度は 0.5% (w/w) とした。試験前に濃度設定のため、検体の最高濃度を培地の溶解限界に近い 250 µg/mL とし、以下公比 2 で 3.9 µg/mL までの 7 濃度を設定し、細胞増殖抑制試験を実施した。細胞増殖率が 50~60%抑制される濃度から、染色体異常誘発試験に用いる最高用量は直接法の場合、24 時間処理で 125 µg/mL、48 時間処理で 100 µg/mL とし、代謝活性化法の場合は 6~18 時間処理および 6~42 時間処理ともに 180 µg/mL とした。

直接法の場合は組織培養用ファルコン 10 cm シャーレに CHL 細胞を 2×10^5 個播種し（培地量 10 mL）、48 時間後に検体溶液を 50 µL 添加した。細胞増殖抑制試験の結果に基づき、24 時間処理の場合は 15.6, 31.3, 62.5 および 125 µg/mL、48 時間処理の場合は 12.5, 25, 50 および 100 µg/mL の 4 用量を用いた。染色体標本は検体添加後 24 および 48 時間後に作製した。

代謝活性化法の場合は、直接法と同様に細胞を播種し、48 時間後に培地を取り除き、S-9 mix を含む新鮮な培地 5 mL と交換し、検体溶液を 25 µL 添加した。細胞増殖抑制試験の結果に基づき、22.5, 45, 90 および 180 µg/mL の 4 用量を用いた。検体溶液添加 6 時間後に処理培地を取り除き、新鮮な培地に交換した。染色体標本は培地交換後 18 および 48 時間後に作製した。直接法および代謝活性化法とも試験は、各濃度あたり 2 枚のシャーレを用い、2 反復で行った。いずれの処理の場合も標本作製の 2 時間前に細胞分裂を中期で止めるためにコルヒチンを 0.5 µg/mL 添加した。

染色体標本作製後、各シャーレあたり 100 個、各濃度あたり 200 個のよく広がった中期分裂像を顕微鏡で観察し、染色体異常の各型について分類し、カウントした。

陽性対照として、直接法の場合はマイトマイシン C (MMC) を 0.1 µg/mL、代謝活性化法の場合はベンツ(a)ピレン[B(a)P]を 40 µg/mL 用いた。また、無処理対照および溶媒対照を設け、いずれも同様に試験した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

結 果：結果を次頁の表に示した。

本検体の処理によって、直接法および代謝活性化法のいずれの方法においても、構造的染色体異常を持つ細胞および倍数性細胞の出現頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いた MMC は直接法で、B(a)P は代謝活性化法でいずれも染色体異常を有する細胞の出現率が統計学的に有意に増加した。また、陰性対照群における異常細胞出現頻度は、試験実施機関の背景値の管理範囲以内であった。

以上の結果より、本検体は薬物代謝酵素系の有無にかかわらず、本試験条件下で染色体異常誘発性を示さなかった。

表-1 直接法 24時間処理

供試物質	処理時間	S-9 mix	濃度 (µg/mL)	観察細胞数	分裂頻度 (%)	倍数性細胞数	染色体異常の出現数									染色体異常細胞数	
							キヤップ ^g	染色分体型		染色体型		断片化 frg	その他 oth	合計		+g	-g
								ctb	cte	csb	cse			+g	-g		
無処理	24	-	0	200	6.9	0	0	3	1	0	0	0	0	4	4	2	2
				200	7.1	0	2	3	0	0	1	0	0	6	4	6	4
溶媒対照 (DMSO)	24	-	0.5%	200	5.2	0	1	1	0	0	0	0	0	2	1	2	1
				200	6.1	0	4	0	0	0	0	0	4	0	4	0	
検体 (イトキサール原体)	24	-	15.6	200	4.9	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
				200	6.5	0	2	2	0	1	0	0	5	3	5	3	
			31.3	200	5.5	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
				200	5.8	2	1	1	1	0	0	0	3	2	3	2	
			62.5	200	4.7	2	1	0	1	6	2	0	0	10	9	4	3
				200	5.2	0	1	1	1	0	0	0	3	2	3	2	
			125.0	200	2.0	1	2	0	0	0	0	0	2	0	2	0	
				200	1.0	1	1	1	0	0	1	0	3	2	3	2	
陽性対照 (MMC)	24	-	0.1	200	3.7	0	6	44	105	9	4	0	2	170	164	103	99***
				200	3.5	1	18	68	61	23	1	0	1	172	154	95	93***

数値： 上段 第1回目試験 下段 第2回目試験

ctb: 染色分体型切断 cte: 染色分体型交換 csb: 染色体型切断 cse: 染色体型交換 +g: キヤップ^gを含める -g: キヤップ^gを含めない

DMSO: ジメチルスルホキシド MMC: マイトマイシンC

***: 溶媒対照群に対し, $p \leq 0.001$ で有意差を示す (χ^2 検定)

表-2 直接法 48時間処理

供試物質	処理時間	S-9 mix	濃度 (µg/mL)	観察細胞数	分裂頻度 (%)	倍数性細胞数	染色体異常の出現数								染色体異常細胞数				
							キヤップ ^g	染色体分体型		染色体型		断片化 frg	その他 oth	合計		+g	-g		
								ctb	cte	csb	cse			+g	-g				
無処理	48	-	0	200	2.0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0		
				200	5.4	1	3	4	0	0	0	0	0	7	4	5	3		
溶媒対照 (DMSO)	48	-	0.5%	200	2.2	0	3	1	0	0	0	0	0	4	1	4	1		
				200	4.9	2	3	0	0	0	0	0	3	0	3	0			
検体 (イトキツ ^g -ル原体)	48	-	12.5	200	2.9	2	0	3	0	1	2	0	0	6	6	3	3		
				200	3.0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
				200	3.2	0	0	1	0	0	1	0	0	2	2	2	2		
				200	2.8	0	0	1	0	0	1	0	0	2	2	2	2		
			50.0	200	2.4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
				200	2.4	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
				200	0.9	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
				200	0.6	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0
陽性対照 (MMC)	48	-	0.1	200	4.0	3	18	203	272	15	9	9	1	527	509	174	171***		
				200	3.6	4	17	84	89	11	0	1	1	203	186	102	95***		

数値： 上段 第1回目試験 下段 第2回目試験

ctb：染色体分体型切断 cte：染色体分体型交換 csb：染色体型切断 cse：染色体型交換 +g：キヤップ^gを含める -g：キヤップ^gを含めない

DMSO：ジメチルスルホキシド MMC：マイトマイシンC

***：溶媒対照群に対し、 $p \leq 0.001$ で有意差を示す (χ^2 検定)

表-3 代謝活性化法 6 - 18 時間処理

供試物質	処理時間	S-9 mix	濃度 (µg/mL)	観察細胞数	分裂頻度 (%)	倍数性細胞数	染色体異常の出現数								染色体異常細胞数		
							キヤップ ^g	染色分体型		染色体型		断片化 frg	その他 oth	合計		+g	-g
								ctb	cte	csb	cse			+g	-g		
無処理	6-18	+	0	200	7.6	0	2	3	0	0	0	0	5	3	4	3	
				200	9.0	2	2	1	0	1	0	0	0	4	2	2	2
溶媒対照 (DMSO)	6-18	+	0.5%	200	6.4	0	2	1	0	0	0	0	3	1	3	1	
				200	8.5	2	1	5	5	1	0	0	0	12	11	5	4
検体 (イトキツ ^g -ル原体)	6-18	+	22.5	200	7.0	1	2	2	1	0	0	0	0	5	3	4	2
				200	7.1	1	3	1	0	0	1	0	0	5	2	5	2
			45.0	200	7.2	1	1	1	0	0	1	0	0	3	2	3	2
				200	7.3	1	2	0	0	0	1	0	1	4	2	4	2
			90.0	200	5.7	1	1	3	7	0	0	0	0	11	10	6	5
				200	6.5	2	0	3	0	0	0	0	1	4	4	4	4
			180.0	200	2.3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
				200	5.0	2	0	4	6	1	0	0	1	12	12	6	6
陽性対照 [B(a)P]	6-18	+	40.0	200	6.9	2	11	53	150	14	10	0	0	238	227	99	96***
				200	3.4	2	9	32	80	6	3	0	0	130	121	68	64***

数値： 上段 第1回目試験 下段 第2回目試験

ctb：染色分体型切断 cte：染色分体型交換 csb：染色体型切断 cse：染色体型交換 +g：キヤップ^gを含める -g：キヤップ^gを含めない

DMSO：ジメチルスルホキシド B(a)P：ベンツ(a)ピレン

***：溶媒対照群に対し、 $p \leq 0.001$ で有意差を示す (χ^2 検定)

表-4 代謝活性化法 6 - 42 時間処理

供試物質	処理時間	S-9 mix	濃度 (µg/mL)	観察細胞数	分裂頻度 (%)	倍数性細胞数	染色体異常の出現数								染色体異常細胞数		
							キヤップ ^g	染色分体型		染色体型		断片化 frg	その他 oth	合計			
								g	ctb	cte	csb			cse	+g	-g	+g
無処理	6-42	+	0	200	5.3	0	2	2	0	1	0	0	0	5	3	5	3
				200	6.2	1	2	0	0	0	0	0	2	0	2	0	
溶媒対照 (DMSO)	6-42	+	0.5%	200	5.6	0	4	2	0	0	0	0	0	6	2	6	2
				200	5.0	2	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
検体 (イトキサゾール原体)	6-42	+	22.5	200	5.9	2	2	0	0	4	0	0	0	6	4	3	1
				200	6.8	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
			45.0	200	6.5	2	2	1	0	0	1	0	1	5	3	5	3
				200	5.0	2	2	1	0	0	0	0	0	3	1	3	1
			90.0	200	6.8	3	1	1	0	4	1	0	1	8	7	5	4
				200	5.9	3	1	2	0	0	1	0	0	4	3	4	3
			180.0	200	0.4	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
				200	6.0	3	3	1	0	0	0	0	0	4	1	4	1
陽性対照 [B(a)P]	6-42	+	40.0	200	6.4	8	11	4	12	17	24	1	0	69	58	37	33***
				200	7.0	1	1	17	2	6	6	1	0	33	32	25	24***

数値：上段 第1回目試験 下段 第2回目試験

ctb：染色分体型切断 cte：染色分体型交換 csb：染色体型切断 cse：染色体型交換 +g：キヤップ^gを含める -g：キヤップ^gを含めない

DMSO：ジメチルスルホキシド B(a)P：ベンツ(a)ピレン

***：溶媒対照群に対し、 $p \leq 0.001$ で有意差を示す (χ^2 検定)

(資料 No. T-27)

エトキサゾール原体の細菌を用いた DNA 修復試験 (Rec Assay)

試験機関 :

[GLP対応]

報告書作成年 :

検 体 : エトキサゾール原体 (純度 %)

方 法 : 枯草菌 *Bacillus subtilis* の DNA 組換修復能保持菌株 (H17) および欠損菌株 (M45) を用い、ラット肝から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下 (代謝活性化法) および非存在下 (直接法) で、DNA 損傷の誘発性を検討した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。検体の溶解限界は 100 mg/mL (2000 µg/disk) であったので、これを最高処理濃度とし、以下、1000, 500, 200, 100 および 50 µg/disk の 6 濃度で試験を行った。陽性対照物質、陰性対照物質およびその処理濃度は結果の表中に示した。
検体溶液は直径 8 mm、厚さ 1 mm のペーパーディスクに 20 µL しみ込ませ、胞子寒天平板培地上に置いた。
試験は 2 連制で実施した。

結 果 : 結果を次頁の表に示した。

すべての試験濃度において、DNA 組換修復能保持菌株 (H17) と DNA 組換修復能欠損菌株 (M45) の間で生育阻止帯の差は認められなかった。
一方、陽性対照の mitomycin C (直接法) および Trp P-1 (代謝活性化法) では、H17 で認められた阻止帯と比較して、M45 でより大きな阻止帯が認められた。また、陰性対照として用いた kanamycin では H17 および M45 間の生育阻止帯に差は認められなかった。

以上の結果より、本検体は薬物代謝酵素系の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性は認められなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

試験結果：

供試物質	S-9 mix	処理濃度 (µg/disk)	阻止帯の直径 (mm) (平均)		差 (mm) (平均)
			M45	H17	
溶媒対照 (DMSO)	-	20*	0, 0 (0)	0, 0 (0)	0, 0 (0)
検体 (イトキゾール原体)	-	50	5, 5 (5)	4, 5 (4.5)	1, 0 (0.5)
		100	6, 5 (5.5)	5, 5 (5)	1, 0 (0.5)
		200	6, 5 (5.5)	5, 5 (5)	1, 0 (0.5)
		500	5, 5 (5)	5, 5 (5)	0, 0 (0)
		1000	5, 5 (5)	5, 5 (5)	0, 0 (0)
		2000	5, 4 (4.5)	5, 4 (4.5)	0, 0 (0)
陰性対照 (kanamycin)	-	0.2	11, 11 (11)	10, 8 (9)	1, 3 (2)
陽性対照 (mitomycin C)	-	0.01	21, 20 (20.5)	2, 2 (2)	19, 18 (18.5)
溶媒対照 (DMSO)	+	20*	0, 0 (0)	0, 0 (0)	0, 0 (0)
検体 (イトキゾール原体)	+	50	3, 1 (2)	2, 1 (1.5)	1, 0 (0.5)
		100	3, 2 (2.5)	2, 1 (1.5)	1, 1 (1)
		200	4, 2 (3)	2, 2 (2)	2, 0 (1)
		500	4, 2 (3)	3, 2 (2.5)	1, 0 (0.5)
		1000	4, 2 (3)	3, 2 (2.5)	1, 0 (0.5)
		2000	4, 2 (3)	2, 2 (2)	2, 0 (1)
陽性対照 (Trp P-1)	+	5	11, 10 (10.5)	0, 0 (0)	11, 10 (10.5)

* : µL/disk

(資料 No. 追毒-1)

エトキサゾール原体のマウスを用いた小核試験

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検 体：エトキサゾール原体（純度 %）

供試動物：CD-1系マウス（8週齢，体重 雄 29.2～36.3 g，雌 24.3～30.1 g）
1群雌雄各5匹

試験方法：検体を1%カルボキシメチルセルロース水溶液に溶解し，1250，2500 および 5000 mg/kg の投与用量で，強制的に1回経口投与した。なお，陽性対照群にシクロホスファミドを同様に投与した。

投与 24，48，72 時間後に，マウス大腿骨を 25 mM EDTA を含む牛の胎仔血清で洗浄し，骨髓細胞を採取した。この細胞懸濁液を遠心分離し，上清を除去後，細胞小塊を残った血清に懸濁しスライドグラス上に骨髓塗沫標本を作製した。乾燥後，メタノール固定およびギムザ染色を施し，乾燥させた。

陽性対照群は，24 時間後に同様の方法で骨髓塗沫標本を作製した。

各標本について，多染性赤血球 1000 個当りの小核を持つ細胞発生数を各動物毎に記録し，多染性赤血球および常染性赤血球から構成される全赤血球に対する多染性赤血球の比率を調べた。

用量設定根拠：試験ガイドラインに従って，5000 mg/kg を最高用量として，1250，2500 および 5000 mg/kg とした。

結 果：骨髓塗沫標本の観察結果を次頁の表に示した。

5000 mg/kg 群の雄マウスには立毛が観察された。

雌雄いずれの標本採取時間においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に，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。

陽性対照であるシクロホスファミドでは，小核を有する多染性赤血球の出現頻度に，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。

以上の結果より，本試験条件下において，本検体はマウス骨髓細胞において小核を誘発する可能性はないと判断される。

観察結果

採取時間	供試物質	投与量 (mg/kg)	性別	観察動物数	MNPCE (%) ^a (平均値±SD) ^b	PCE/(PCE+NCE) (%) ^a (平均値±SD) ^c	
24	陰性対照 (1% CMC)	10 (mL/kg)	雄	5	0.18±0.13	50.9±5.2	
			雌	5	0.16±0.11	56.0±7.6	
	検体	1250	雄	5	0.10±0.07	52.2±3.5	
			雌	5	0.28±0.16	58.4±3.0	
		2500	雄	5	0.08±0.08	55.2±6.1	
			雌	5	0.14±0.15	58.3±3.9	
		5000	雄	5	0.20±0.07	56.6±6.4	
			雌	5	0.08±0.08	56.5±5.1	
	陽性対照 (CP)	60	雄	5	3.42±1.29**	49.1±1.6	
			雌	5	3.84±1.58**	57.2±6.6	
48	陰性対照 (1% CMC)	10 (mL/kg)	雄	5	0.20±0.14	57.6±8.0	
			雌	5	0.14±0.15	53.8±6.9	
	検体	1250	雄	5	0.12±0.08	54.1±4.4	
			雌	5	0.14±0.05	61.2±4.2	
		2500	雄	5	0.14±0.11	55.0±1.7	
			雌	5	0.22±0.11	56.0±4.1	
	5000	雄	5	0.16±0.11	55.1±6.3		
		雌	5	0.06±0.09	62.4±1.8*		
	72	陰性対照 (1% CMC)	10 (mL/kg)	雄	5	0.18±0.13	52.4±6.7
				雌	5	0.08±0.08	50.9±12.1
検体		1250	雄	5	0.12±0.18	57.1±6.0	
			雌	5	0.12±0.04	54.9±4.3	
		2500	雄	5	0.08±0.04	52.5±3.4	
			雌	5	0.10±0.07	54.9±7.4	
5000		雄	5	0.12±0.08	54.5±7.9		
		雌	5	0.10±0.10	56.0±5.9		

^a : 各動物毎に 1000 個の網赤血球を調査し、百分率で表示。

^b : Kastenbaum and Bowman 検定

^c : t 検定

* : p<0.05, ** : p<0.01, 値は平均値

CP : Cyclophosphamide

PCE : 多染性赤血球数

NCE : 常染性赤血球数

MNPCE : 小核を有する多染性赤血球数

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 No. T-50)

エトキサゾール原体のラット肝細胞を用いた in vivo/in vitro 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検 体: エトキサゾール原体 (純度 %)

供試動物: Crl:CD®BR 系雄ラット (試験開始日 44~48 日齢, 試験開始日体重 191~249 g)
1 群 3 匹 (1 群 5 匹に投与し, そのうち 3 匹を評価に用いた。)

方 法: 検体を 1% (w/v) カルボキシメチルセルロース (CMC) に懸濁し, 2500 および 5000 mg/kg の投与量で, 強制的に単回経口投与した。なお, 陰性対照としては 1%CMC を使用し, 12~14 時間試験の陽性対照としては 2-アセトアミドフルオレン (2-AAF) を, 2~4 時間試験の陽性対照としてはジメチルニトロソアミン (DMN) を使用した。投与 2~4 時間後および 12~14 時間後に肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流した後に摘出して肝細胞を分離した。分離した肝細胞をカバースリップに付着させ, 10 μ Ci/mL の [3 H]-チミジンを含むウィリアムズ E 不完全培地 (WE-I) 中で 4 時間培養した。その後, 非標識チミジンを含む WE-I 培地中で一晚培養した後, 細胞を氷酢酸:エタノール=1:3 (v/v) で固定し, 各動物, 3 枚のスライドについてオートラジオグラム用標本を作製し, Mayer's Haemalum 染色した。

各群 3 匹の動物について, それぞれ 2 枚のスライドを用いて観察を行い, 100 個 (各群 300 個) の肝細胞を観察した。核内粒子数を計数し, 核と同等の面積の細胞質 3 カ所の平均粒子数を差し引いて, 正味の核内粒子数を求めた。また, 修復細胞 (正味の核内粒子数が 5 以上の細胞) の割合および修復細胞における正味の核内粒子数の平均値を求めた。検体投与群の正味の核内粒子数の群平均値が 0 を上回り, かつ修復細胞の割合が 20%以上で, 正味の核内粒子数および修復細胞の割合の両方に増加が認められた場合に陽性とした。

用量設定根拠:

5000 mg/kg を最高用量とし, 以下 2500 mg/kg を本試験の用量として設定した。

結 果: 結果を次表に示した。

いずれの標本採取時間のいずれの検体投与群においても, 正味の核内粒子数および修復細胞の割合を増加させなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

一方、陽性対照である 2-アセトアミドフルオレン (2-AAF) およびジメチルニトロソアミン (DMN) 投与群では、陽性の基準を超える正味の核内粒子数および修復細胞の割合の増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において、本検体はラット肝細胞に不定期 DNA 合成を誘発せず、遺伝毒性を有しないと判断された。

試験結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	核内粒子数 (平均値±SD)	細胞質粒子数 (平均値±SD)	正味の核内粒子数 ^{a)} (平均値±SD)	修復細胞の 正味の核内粒子数 (平均値±SD)	修復細胞の割合 ^{b)} (%, 平均値±SD)	判定
2~4	溶媒対照 (1%CMC)	0 ^{c)}	3	2.31±0.53	3.91±0.60	-1.6±0.1	8.2±1.6	1.0±1.0	-
	検体 (エトキシゲル原体)	2500	3	2.34±0.40	4.56±1.14	-2.2±0.8	5.0±0.0	0.3±0.6	-
		5000	3	1.70±0.89	3.50±0.91	-1.8±0.0	6.0±0.5	0.7±0.6	-
	陽性対照 (DMN)	10	3	10.31±1.03	1.94±0.69	8.4±0.4	10.0±0.9	76.7±2.5	+
12~14	溶媒対照 (1%CMC)	0 ^{c)}	3	1.77±0.41	3.36±0.74	-1.6±0.3	26.0±0.0	0.3±0.6	-
	検体 (エトキシゲル原体)	2500	3	2.63±1.00	5.10±1.38	-2.5±0.4	0	-	-
		5000	3	2.72±0.16	5.63±0.82	-2.9±0.9	0	-	-
	陽性対照 (2-AAF)	75	3	12.46±3.31	4.73±0.93	7.7±2.4	9.7±2.0	71.7±18.0	+

DMN : ジメチルニトロソアミン, 2-AAF : 2-アセトアミドフルオレン, 1%CMC : 1% (w/v) カルボキシメチルセルロース

a) : 正味の核内粒子数 = 核内粒子数 (平均値) - 細胞質粒子数 (平均値)

b) : 正味の核内粒子数 5 以上の細胞の割合

c) : 20 mL/kg

(10) 生体機能影響

(資料 No. T-28)

エトキサゾール原体の生体機能への影響に関する試験

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検 体：エトキサゾール原体（純度 %）

1) 中枢神経系に対する作用

(1) 雌雄マウスの一般症状

供試動物：ICR 系雌雄マウス 体重 28.2~35.2 g (雄), 24.1~28.5 g (雌)

1 群雌雄 3 匹

方 法：1% Tween 80 水溶液に検体を懸濁させ，0, 19.5, 78.1, 313, 1250 および 5000 mg/kg の用量で腹腔内投与し，投与前，投与 30 分，1, 3 および 6 時間後，翌日以降は 1 日 1 回 7 日目まで，Irwin 法に従って行動を多元観察した。

結 果：雌雄マウスに 78.1 mg/kg 以上の用量を腹腔内投与すると，軽度な抑制性の症状が用量に依存して発現した。すなわち，雌雄マウスとも，78.1 mg/kg 以上の投与群に運動性の低下および自律神経系の異常が，313 mg/kg 以上の投与群に運動失調および筋緊張の低下が，1250 mg/kg 以上の投与群に姿勢の異常が，5000 mg/kg 投与群では極軽微な反射の低下および認知力の低下（雄）が認められた。これらの症状は投与後 30 分以降に発現し，4 日以内に完全に消失した。いずれの群にも死亡は認められなかった。雌雄マウスとも 19.5 mg/kg 投与群には検体投与によると考えられる異常は認められなかった。

(2) 雄ウサギの一般症状

供試動物：日本白色種 雄ウサギ 体重 2.16~2.37 kg, 1 群 3 匹

方 法：1% Tween 80 水溶液に検体を懸濁させ，0 および 5000 mg/kg の用量で経口投与し，投与前，投与 30 分，1, 3, 6 時間 および 1 日後に「新しい毒性試験と安全性の評価」*に従って症状を多元観察した。

結 果：5000 mg/kg を投与しても，検体投与によると考えられる異常症状は認められなかった。

*：参考文献 吐山 豊秋，小久江 栄一（1975）

生体機能におよぼす試験法（薬理試験法）

新しい毒性試験と安全性の評価（白須 泰彦，松岡 理 編集）

539 頁~572 頁，ソフトサイエンス社，東京

(3) 雄マウスのヘキソバルビタール睡眠時間に対する作用

供試動物：ICR系 雄マウス 体重 29.1~44.0 g 1群 10匹

方 法：1% Tween 80 水溶液に検体を懸濁させ、腹腔内投与してヘキソバルビタール皮下投与による睡眠時間を測定した。初め、検体を1250 mg/kg 投与して、投与前、投与1時間、1、2、3、5、7、14 および21 日後に睡眠時間を測定した。次に、検体を0、19.5、78.1、313、1250 および5000 mg/kg の用量で投与して、投与1時間および3 日後に睡眠時間を測定した。

結 果：1250 mg/kg 投与後の睡眠時間は、検体投与1時間後では統計学的に有意な延長を示し、投与1日以降には短縮に転じ、2日および3日目には統計学的に有意な短縮を示した。投与7日以降には投与前と統計学的有意差は認められなかった。次に、睡眠時間が延長または短縮されたそれぞれの時期において、睡眠時間に対する検体の用量依存性を調べた。延長期(1時間前処置)には313 mg/kg 以上の投与群に統計学的に有意な睡眠時間の延長が認められた。短縮期(3日前処置)にも313 mg/kg 以上の投与群に統計学的に有意な睡眠時間の短縮が認められた。延長期および短縮期とも78.1 mg/kg 以下の投与群には検体投与によると考えられる明確な変化は認められなかった。

2) 呼吸および循環器系に対する作用

(1) 雄ウサギの呼吸、血圧、心電図および心拍数に対する作用

供試動物：日本白色種 雄ウサギ 体重 2.16~2.37 kg 1群 3匹

方 法：1% Tween 80 水溶液に検体を懸濁させ、0 および5000 mg/kg の用量で経口投与し、投与前、投与30分、1、3、6時間および1日後に呼吸数、最高血圧、平均血圧、最低血圧、心拍数および心電図を測定した。本項目は「一般症状」と同一ウサギを用いて検査した。

結 果：5000 mg/kg の用量を投与しても、呼吸、血圧、心拍数および心電図に検体投与によると考えられる明確な変化は認められなかった。

3) 消化器に対する作用

(1) 雄マウスの小腸炭末輸送能に対する作用

供試動物：ICR系雄マウス 体重 26.1~35.0 g 1群 10匹

方 法：1% Tween 80 水溶液に検体を懸濁させて、0、19.5、78.1、313、1250 および5000 mg/kg の用量で腹腔内投与し、1時間後に炭末懸濁液を経口投与し、その30分後に屠殺して炭末の小腸内移動率(全小腸の長さに対する小腸起始部から炭末先端までの長さの百分率)を測定した。

結 果：78.1 mg/kg 以上の投与群に小腸炭末輸送の統計学的に有意な抑制が認められた。一方、19.5 mg/kg 投与群には検体投与によると考えられる変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

4) 血液に対する作用

(1) 雄マウスの血液に対する作用 (溶血と凝固)

供試動物：ICR系雄マウス 体重 29.5～39.9 g 1群5匹

方 法：1% Tween 80 水溶液に検体を懸濁させ、0, 313, 1250 および 5000 mg/kg の用量で腹腔内投与し、投与1時間後に採血して、血漿ヘモグロビン濃度、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

結 果：いずれの投与群にも血漿ヘモグロビン濃度、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間に検体の影響は認められなかった。

以上の試験結果より、本剤を雌雄マウスに腹腔内投与すると 78.1 mg/kg 以上で軽度な抑制性の症状が観察されたが、5000 mg/kg を投与しても死亡は認められなかった。雄マウスに 78.1 mg/kg 以上を腹腔内投与すると小腸炭末輸送能の抑制が観察された。雄マウスに 313 mg/kg 以上の用量を腹腔内投与すると投与初期 (1 時間後) にヘキソバルビタール睡眠時間の延長が、投与 2～3 日後には短縮が認められた

一方、雄マウスに 5000 mg/kg 腹腔内投与しても血液 (凝固と溶血) には影響は認められなかった。

さらに、雄ウサギに本剤を 5000 mg/kg 経口投与しても一般症状、呼吸、血圧、心拍数および心電図に変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

「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 (供試動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要	
中枢神経系 一般症状 [Irwin法] (雌雄マウス)	腹腔内投与 (1% Tween80 水溶液)	0	3	78.1	19.5	軽度な抑制性の症状が観察されたが、死亡例は認められなかった。	
		19.5 78.1 313 1250 5000					
一般症状 (雄ウサギ)	経口投与 (1% Tween80 水溶液)	0 5000	3	-	5000	検体に起因する異常症状は認められなかった。	
ヘキソバル ピタール 睡眠時間 (雄マウス)	腹腔内投与 (1% Tween80 水溶液)	1250投与後の経時変化 (投与前, 投与 1時間, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21日後)					投与1時間後に統計学的に 有意な延長が、投与2, 3日 後に統計学的に有意な短縮 が認められ、投与7日後には 回復した。
		延長期 (投与1時間後) の用量依存					313 mg/kg以上で統計学的に 有意な延長が認められた。
		0	10	313	78.1		
		19.5 78.1 313 1250 5000					
短縮期 (投与3日後) の用量依存					313mg/kg以上で統計学的に 有意な短縮が認められた。		
		0	10	313	78.1		
		19.5 78.1 313 1250 5000					

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(つづき)

試験項目 (供試動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
循環器系 呼吸・循環器系 (雄ウサギ)	経口投与 (1% Tween80 水溶液)	0 5000	3	-	5000	検体に起因する変化は認められなかった。
消化器 炭末輸送能 (雄マウス)	腹腔内投与 (1% Tween80 水溶液)	0 19.5 78.1 313 1250 5000	10	78.1	19.5	統計学的に有意な抑制が認められた。
血液 (雄マウス)	腹腔内投与 (1% Tween80 水溶液)	0 313 1250 5000	5	-	5000	検体に起因する溶血、PT、APTTの変化は認められなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(11) その他

(資料 No. T-20-1およびT-20-2)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

2. 原体中混在物および代謝物の毒性

(資料 No. T-29)

エトキサゾール原体中混在物

のラットにおける急性経口毒性試験

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：

検 体：

(原体中混在物：報告書では と表記)

供試動物：Sprague-Dawley系ラット 4~7週齢

開始時平均体重 雄；101 g, 雌；106 g, 1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

投与方法：検体を1%メチルセルロース水溶液に50%の濃度に懸濁し、一晚絶食させたラットに1回強制経口投与した。給餌は投与後4時間目から行った。

観察項目：一般状態および死亡の有無を14日間観察した。体重は投与直前、投与後8および15日に測定した。

試験終了時に全ての生存動物を屠殺・剖検した。

結 果：下表に示す。

投与方法	経 口	
	雄	雌
性 別	雄	雌
投与量(mg/kg)	5000	5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	>5000	>5000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現および 消失時間	5分 12日	5分 12日
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	5000	5000

雌雄で投与直後から立毛および喘鳴が認められ、雌では流涎も認められた。その後、投与当日に円背位、動揺性歩行、四肢の退色および呼吸数の減少が認められた。投与後2日から雌雄で、軟便、爪先歩行、脱毛、鼻および口吻周辺部の赤色または褐色の汚れが認められ、雌ではさらに嗜眠、尿量の増加および落ち着きの無さが観察された。脱毛以外の症状は、雄で8日、雌で7日で消失したが、脱毛は雄で1匹に10日まで、他の1匹に11日まで観察され、雌では1匹に11

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

日まで観察された。

雌雄各1匹で投与第8日に体重増加抑制が認められたが、その他の動物では順調に推移した。剖検において肉眼的異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 No. T-30)

エトキサゾール代謝物

のラットにおける急性経口毒性試験

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：

検 体：

(代謝分解物一覧表および代謝分解経路図中の記号：R3)

供試動物：Sprague-Dawley系ラット 4~7週齢

開始時平均体重 雄；101 g, 雌；97 g, 1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

投与方法：検体を1%メチルセルロース水溶液に50%の濃度に溶解し、一晚絶食させたラットに1回強制経口投与した。給餌は投与後4時間目から行った。

観察項目：一般状態および死亡の有無を14日間観察した。体重は投与直前、投与後8および15日に測定した。

試験終了時に全ての生存動物を屠殺・剖検した。

結 果：下表に示す。

投与方法	経 口	
	雄	雌
性 別	雄	雌
投与量 (mg/kg)	5000	5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	>5000	>5000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現および 消失時間	2分 5日	2分 5日
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

雌雄で投与直後から立毛が認められ、3時間で円背位も認められた。円背位は4時間では認められなかったが、立毛は4日まで認められた。

体重増加は順調に推移した。剖検において肉眼的異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 No. T-31)

エトキサゾール代謝物

のラットにおける急性経口毒性試験

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：

検 体：

(代謝分解物一覧表および代謝分解経路図中の記号：R7)

供試動物：Sprague-Dawley系ラット 4~7週齢

開始時平均体重 雄；94 g, 雌；103 g, 1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

投与方法：検体を1%メチルセルロース水溶液に50%の濃度に懸濁し、一晚絶食させたラットに1回強制経口投与した。給餌は投与後4時間目から行った。

観察項目：一般状態および死亡の有無を14日間観察した。体重は投与直前、投与後8および15日に測定した。
試験終了時に全ての生存動物を屠殺・剖検した。

結 果：下表に示す。

投与方法	経 口	
	雄	雌
性 別		
投与量 (mg/kg)	5000	5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	>5000	>5000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現および 消失時間	6分 12日	6分 12日
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

雌雄で投与直後から立毛が認められ、その後、投与当日では動揺性歩行、四肢の退色、爪先歩行、落ち着きの無さおよび呼吸量の増加が認められた。その他、雄では喘ぎ、雌では排便障害が認められた。投与後2日以降、雌雄に四肢の退色、眼球突出、脱毛、鼻部および口吻部の赤色および褐色の汚れが認められ、雌では嗜眠、尿量増加および過敏が認められた。脱毛以外の症状は、雌雄とも7日で消失したが、脱毛は11日まで観察された。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

投与後8日にわずかな体重増加抑制がすべての雄および4匹の雌で認められたが、その後は順調に推移した。剖検において肉眼的異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 No. T-32)

エトキサゾール代謝物

のラットにおける急性経口毒性試験

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：

検 体：

(代謝分解物一覧表および代謝分解経路図中の記号：R8)

供試動物：Sprague-Dawley系ラット 6週齢

開始時平均体重 雄；177 g 雌；144 g, 1群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察

投与方法：検体を1% Tween 80水溶液に所定の濃度に懸濁し、一晚絶食させたラットに1回強制経口投与した。絶食は投与後3時間まで行った。

観察項目：一般状態および死亡の有無を14日間観察した。体重は投与直前、投与第8日および15日に測定した。死亡例は死亡発見時に測定した。

試験終了時にすべての生存動物を屠殺・剖検した。死亡例は発見時に直ちに剖検した。

結 果：下表に示す。

投与方法	経 口	
	雄	雌
性 別		
投与量 (mg/kg)	0, 244, 391, 625, 1000, 1600	0, 244, 391, 625, 1000, 1600
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	943 (574~1550)	791 (425~1472)
死亡開始および 終了時間	1時間 1日	1時間 2日
症状発現および 消失時間	10分 6日	10分 7日
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	391	244

雌雄で投与後10分より自発運動低下、流涎、振戦、立毛、呼吸緩徐、散瞳、外陰部被毛汚れおよび腹部被毛汚れが認められた。雄では更に歩行困難、痙攣および口周囲被毛汚れが認められた。これらはすべて投与後7日までには回復した。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

投与後8および15日の体重測定では、各群の雌雄とも投与前の値と比較して全例に体重の増加が認められた。死亡例の剖検では、雌雄ともに鼻出血、肺の暗赤色斑および胃内水溶性内容物が認められた。試験終了時の生存動物の剖検では、前胃部粘膜の肥厚が認められた。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 No. T-33)

エトキサゾール代謝物

のラットにおける急性経口毒性試験

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：

検 体：

(代謝分解物一覧表および代謝分解経路図中の記号：R10)

供試動物：Sprague-Dawley系ラット 6週齢

開始時平均体重 雄：149 g, 雌：126 g, 1群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察

投与方法：検体を1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に所定の濃度に懸濁し、一晩絶食させたラットに1回強制経口投与した。絶食は投与後3時間まで行った。

観察項目：一般状態および死亡の有無を14日間観察した。体重は投与直前、投与後8日および15日に測定した。死亡例は死亡発見時に測定した。

試験終了時にすべての生存動物を屠殺・剖検した。死亡例は発見時に直ちに剖検した。

結 果：下表に示す。

投与方法	経 口	
	雄	雌
性 別		
投与量 (mg/kg)	0, 5000	0, 5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	>5000	>5000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現および 消失時間	症状発現なし	症状発現なし
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

投与による異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 No. T-34)

エトキサゾール代謝物

のラットにおける急性経口毒性試験

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：

検 体：

(代謝分解物一覧表および代謝分解経路図中の記号：R11)

供試動物：Sprague-Dawley系ラット 6週齢

開始時平均体重 雄：148 g, 雌：122 g, 1群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察

投与方法：検体を1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に所定の濃度に懸濁し、一晩絶食させたラットに1回強制経口投与した。絶食は投与後3時間まで行った。

観察項目：一般状態および死亡の有無を14日間観察した。体重は投与直前、投与後8日および15日に測定した。死亡例は死亡発見時に測定した。

試験終了時にすべての生存動物を屠殺・剖検した。死亡例は発見時に直ちに剖検した。

結 果：下表に示す。

投与方法 性 別	経 口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	1302, 1822, 2551, 3571, 5000	1302, 1822, 2551, 3571, 5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	3453 (2886~4133)	3018 (計算不能)
死亡開始および 終了時間	1時間 2日	1時間 2日
症状発現および 消失時間	10分 2日	10分 6時間
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2551	2551

雌雄で投与後10分より自発運動低下、歩行異常、振戦およびうずくまり姿勢が認められた。雌では更に昏睡および呼吸緩徐が認められた。体重測定では、投与後8日および15日に、各群の雌雄とも投与前の値と比較して全例に体重の増加

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

が認められた。死亡例の剖検では、雌雄ともに腺胃粘膜潰瘍、腺胃壁出血斑および小腸内黒色内容物が認められ、雄では更に胃内黒色内容物が認められた。試験終了時の生存動物の剖検では、肉眼的異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 No. T-35)

エトキサゾール代謝物

のラットにおける急性経口毒性試験

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年：

検 体：

(代謝分解物一覧表および代謝分解経路図中の記号：R14)

供試動物：Sprague-Dawley系ラット 6週齢

開始時平均体重 雄；147 g, 雌；129 g, 1群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察

投与方法：検体を1% Tween 80水溶液に所定の濃度に懸濁し、一晚絶食させたラットに1回強制経口投与した。絶食は投与後3時間まで行った。

観察項目：一般状態および死亡の有無を14日間観察した。体重は投与直前、投与後8日および15日に測定した。死亡例は死亡発見時に測定した。

試験終了時にすべての生存動物を屠殺・剖検した。死亡例は発見時に直ちに剖検した。

結 果：下表に示す。

投与方法	経 口	
	雄	雌
性 別		
投与量 (mg/kg)	0, 5000	0, 5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	>5000	>5000
死亡開始および 終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現および 消失時間	症状発現なし	症状発現なし
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	5000	5000

投与による異常は認められなかった。

(資料 No. T-36)

エトキサゾール原体中混在物
test)

の細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames

試験機関 :

[GLP対応]

報告書作成年 :

検 体 :

(原体中混在物 : 報告書では と表記)

方 法 : ヒステジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA 98, TA 100, TA 1535および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, ラット肝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討した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。試験菌株を用いた予備試験において, 5000 µg/プレートにおいても毒性を示さなかったため, これを最高処理濃度とした。陽性対照物質および処理濃度は結果の表中に示した。本試験はプレインキュベーション法を用い, 37°C, 60分間プレインキュベーションを行った後, 37°Cで3日間培養後, コロニー数をコロニーカウンターで計数した。試験は3連制とし, 同様の試験を2回行った。

結 果 : 結果を次頁の表に示した。

本検体はS-9 mixの有無にかかわらず, いずれの菌株, いずれの処理濃度においても復帰突然変異コロニー数を増加させなかった。

一方, 陽性対照ではS-9 mixの存在下および非存在下で, 復帰突然変異コロニー数が顕著に増加した。

以上の結果より, 本検体は薬物代謝酵素系の有無にかかわらず, 本試験条件下で復帰突然変異誘発性を示さなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

第1回試験

供試物質	S-9 mix	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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		
			TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537	
溶媒対照 (DMSO)	-	100*	116	15	88	16	9	
検体	-	0.0**	139	16	82	21	8	
		312.5	130	10	79	17	8	
		625	124	11	80	17	8	
		1250	115	15	79	18	8	
		2500	91	18	81	18	8	
		5000	119 P	11 P	82 P	19 P	6 P	
溶媒対照 (DMSO)	+	100*	125	17	68	25	7	
検体	+	0.0***	129	14	74	24	7	
		312.5	134	14	78	24	6	
		625	135	14	83	23	8	
		1250	126	16	75	18	7	
		2500	128	14	70	23	9	
		5000	126 P	13 P	61 P	23 P	9 P	
陽性対照	ENNG	-	3.0	499				
			5.0		812			
			2.0			626		
			1.0				260	
	NF							
	9-AC		80.0				X	
	AA	+	1.0	686				
			2.0		247			248
10.0					322			
0.5						394		

数値は3連の平均値 P: 検体析出 X: コロニー数が過剰(3500以上)で計数不能

*: $\mu\text{L}/\text{プレート}$ **: リン酸緩衝液のみを添加 ***: S-9 mixのみを添加

ENNG: *N*-Ethyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine 9-AC: 9-Aminoacridine

NF: 2-Nitrofluorene AA: 2-Aminoanthracene

陽性対照物質はすべてDMSOに溶解して使用

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

第2回試験

供試物質	S-9 mix	濃度 μg/プレート	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	
			TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
溶媒対照 (DMSO)	-	100*	103	14	77	23	10
検体	-	0.0**	121	14	78	23	10
		312.5	113	12	74	23	8
		625	119 P	12 P	66 P	21 P	7 P
		1250	109 P	14 P	81 P	18 P	10 P
		2500	103 P	11 P	82 P	24 P	9 P
		5000	129 P	9 P	72 P	20 P	10 P
溶媒対照 (DMSO)	+	100*	120	17	67	26	11
検体	+	0.0***	119	16	67	23	10
		312.5	141	15	65	25	8
		625	121 P	13 P	61 P	21 P	10 P
		1250	106 P	16 P	63 P	21 P	11 P
		2500	111 P	13 P	69 P	20 P	9 P
		5000	127 P	12 P	65 P	26 P	5 P
陽性対照	ENNG	-	3.0	445	/	/	/
		-	5.0	/	645	/	/
		-	2.0	/	/	611	/
	NF	-	1.0	/	/	/	221
		-	80.0	/	/	/	X
	AA	+	1.0	338	/	/	/
			2.0	/	76	/	49
			10.0	/	/	266	/
0.5			/	/	/	168	

数値は3連の平均値 P: 検体析出 X: コロニー数が過剰 (3500以上) で計数不能

*: μL/プレート **: リン酸緩衝液のみを添加 ***: S-9 mixのみを添加

ENNG: *N*-Ethyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine 9-AC: 9-Aminoacridine

NF: 2-Nitrofluorene AA: 2-Aminoanthracene

陽性対照物質はすべてDMSOに溶解して使用

(資料 No. T-37)

エトキサゾール代謝物

の細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames test)

試験機関 :

[GLP対応]

報告書作成年 :

検 体 :

(代謝分解物一覧表および代謝分解経路図中の記号 : R3)

方 法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA 98, TA 100, TA 1535およびTA 1537) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA) を用い, ラット肝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討した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。試験菌株を用いた予備試験において, 5000 µg/プレートにおいても毒性を示さなかったため, これを最高処理濃度とした。陽性対照物質および処理濃度は結果の表中に示した。本試験はプレインキュベーション法を用い, 37°C, 60分間プレインキュベーションを行った後, 37°Cで3日間培養後, コロニー数をコロニーカウンターで計数した。試験は3連制とし, 同様の試験を2回行った。

結 果 : 結果を次頁の表に示した。

本検体はS-9 mixの有無にかかわらず, いずれの菌株, いずれの処理濃度においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方, 陽性対照ではS-9 mixの存在下および非存在下で, 復帰突然変異コロニー数が顕著に増加した。

以上の結果より, 本検体は薬物代謝酵素系の有無にかかわらず, 本試験条件下で復帰突然変異誘発性を示さなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

第1回試験

供試物質	S-9 mix	濃度 (µg/プレート)	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		
			TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537	
溶媒対照 (DMSO)	-	100*	116	15	88	16	9	
検体	-	0.0**	139	16	82	21	8	
		312.5	110	12	89	18	10	
		625	99	12	73	16	10	
		1250	104	14	83	21	11	
		2500	113 P	16 P	58 P	22 P	8 P	
		5000	148 P	18 P	94 P	23 P	8 P	
溶媒対照 (DMSO)	+	100*	125	17	68	25	7	
検体	+	0.0***	129	14	74	24	7	
		312.5	131	16	95	28	9	
		625	113	12	72	20	7	
		1250	126	13	76	22	9	
		2500	109 P	14 P	70 P	22 P	6 P	
		5000	110 P	15 P	81 P	20 P	7 P	
陽性 対照	ENNG	-	3.0	499	/	/	/	/
			5.0	/	812	/	/	/
			2.0	/	/	626	/	/
	NF	-	1.0	/	/	/	260	/
			9-AC	80.0	/	/	/	/
	AA	+	1.0	686	/	/	/	/
			2.0	/	247	/	/	248
			10.0	/	/	322	/	/
0.5			/	/	/	394	/	

数値は3連の平均値 P: 検体析出 X: コロニー数が過剰 (3500以上) で計数不能

*: µL/プレート ** : リン酸緩衝液のみを添加 *** : S-9 mixのみを添加

ENNG: *N*-Ethyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine 9-AC: 9-Aminoacridine

NF: 2-Nitrofluorene AA: 2-Aminoanthracene

陽性対照物質はすべてDMSOに溶解して使用

第2回試験

供試物質	S-9 mix	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	
			TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
溶媒対照 (DMSO)	-	100*	103	14	77	23	10
検体	-	0.0**	121	14	78	23	10
		312.5	120	12	69	23	11
		625	112	16	68	19	9
		1250	113	17	75	21	9
		2500	122 P	12 P	72 P	26 P	9 P
		5000	126 P	12 P	79 P	22 P	10 P
溶媒対照 (DMSO)	+	100*	120	17	67	26	11
検体	+	0.0***	119	16	67	23	10
		312.5	129	14	69	24	8
		625	122	17	70	24	10
		1250	117	17	60	30	9
		2500	103 P	17 P	65 P	20 P	7 P
		5000	121 P	14 P	62 P	20 P	10 P
陽性 対照	ENNG	-	3.0	445	/	/	/
		-	5.0	/	645	/	/
		-	2.0	/	/	611	/
	NF	-	1.0	/	/	/	221
	9-AC	-	80.0	/	/	/	X
	AA	+	1.0	338	/	/	/
		+	2.0	/	76	/	49
		+	10.0	/	/	266	/
+		0.5	/	/	/	168	

数値は3連の平均値 P: 検体析出 X: コロニー数が過剰 (3500 以上) で計数不能

*: $\mu\text{L}/\text{プレート}$ **: リン酸緩衝液のみを添加 ***: S-9 mixのみを添加

ENNG: *N*-Ethyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine 9-AC: 9-Aminoacridine

NF: 2-Nitrofluorene AA: 2-Aminoanthracene

陽性対照物質はすべてDMSOに溶解して使用