

⑭ 変異原性試験

(1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No. 毒 A28)

試験機関:

報告書作成年: 1977 年

検体純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 5 菌株 (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538) およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* 1 菌株 (WP2hcr (uvrA)) を用い、Aroclor 1254 で誘導したラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9Mix) の存在下および非存在下で、Amesらの方法を用いた試験で復帰突然変異誘発性を検定した。試験は、プレート法で行ない、検体はDMSOに溶解した。試験では、1~5000 µg/プレートの 7 用量を設定した。陽性対照としては、AF-2¹、β-PL²、9-AA³、2-NF⁴および 2-AA⁵を用いた。

判定基準 : 復帰コロニー数が溶媒対照の 2 倍を超え、かつ用量反応関係が認められる場合を陽性とした。

試験結果 : 結果を次頁以降の表に示した。S9 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。

一方、陽性対照として用いた AF-2、β-PL、9-AA、2-NF および 2-AA では、すべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は、本試験条件下で復帰突然変異誘発性を示さないと判断される。

¹ AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

² β-PL : β-プロピオラクトン

³ 9-AA : 9-アミノアクリジン

⁴ 2-NF : 2-ニトロフルオレン

⁵ 2-AA : 2-アミノアントラセン

復帰突然変異試験結果 (表中の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度(μg/ プレート)	S9-Mix 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		
			TA100	TA1535	WP2hcr	TA98	TA1537	TA1538
対照 (DMSO)	-	-	127	17	35	38	13	12
検体	1	-	123	29	45	35	10	12
	10	-	107	28	31	25	10	10
	50	-	133	23	33	39	11	12
	100	-	118	17	28	32	11	5
	500	-	63	5	28	27	8	5
	1000	-	25	5	17	23	8	7
	5000	-	*	*	2	*	*	*
対照 (DMSO)	-	+	132	22	50	43	10	13
検体	1	+	126	11	52	40	10	14
	10	+	183	13	39	40	20	16
	50	+	103	12	35	38	12	15
	100	+	127	5	36	47	10	10
	500	+	82	8	24	34	10	8
	1000	+	59	4	14	24	4	12
	5000	+	*	*	*	*	1	*
陽性 対照	AF-2	0.1	-	700		690	527	
	β-PL	50	-		686			
	9-AA	100	-				670	
	2-NF	50	-					199
	2-AA	20	+	1200	225		1567	64

*: 菌の生育阻害が認められたことを示す。

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

β-PL: β-プロピオラクトン

2-NF: 2-ニトロフルオレン

9-AA: 9-アミノアクリジン

2-AA: 2-アミノアントラセン

⑭ 変異原性試験

(2) CHO 培養細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 No. 毒 A29)

試験機関:

報告書作成年: 1983 年

検体純度 :

試験方法 : チャイニーズハムスター卵巣由来の細胞株 (CHO 細胞) を用い、非代謝活性化法および代謝活性化法によって検体の染色体異常誘発性を検定した。検体は、Hanks 緩衝液に溶解して用いた。

用量設定根拠;

判定基準 ; 各用量 100 個の中期分裂像 (50 個/プレート×2 プレート) を観察し、染色体の異常を構造的異常 [ギャップ (gap)、切断 (break)、交換 (exchange) など] および数的異常に分類し計測した。異常細胞出現頻度が 5% 未満を陰性、5% 以上 10% 未満を擬陽性、10% 以上の場合を陽性とした。

非代謝活性化法; 非代謝活性化法では、24 および 48 時間の連続処理を行った。その結果、両条件の最高濃度の相対的有糸分裂指数は、24 時間で 39%、48 時間で 17% であり、それぞれ 4 用量全てについて染色体の観察を行った。

代謝活性化法; 代謝活性化法では、S9 処理の条件において、6 時間の暴露期間後に 6 時間の回復期間を設ける (6-6 時間) 条件と 18 時間の回復期間を設ける (6-18 時間) 2 条件で行った。その結果、両条件の最高濃度の相対的有糸分裂指数は、6-6 時間で 63%、6-18 時間で 31% であり、6 用量全てについて染色体の観察を行った。

陽性対照には、4-ニトロキノリン 1-オキシド (4NQO) およびジメチルニトロソアミン (DMN) を用いた。

試験結果 : 非代謝活性化条件では、細胞毒性を示した用量を含め、いずれの条件においても、染色体異常の発現頻度において、用量と相関した増加、または、溶媒対照と比較して有意な増加はなかった。代謝活性化条件では、6-6 時間で 14.0%、6-18 時間で 11.0% と最高で 10% を超える異常の発現が観察され、溶媒対照と比較して有意な増加がみられた。また、陽性対照として用いた 4NQO および DMN では、溶媒対照と比較して、著しい染色体異常の誘発が認められた。

以上の結果より、検体は、本試験条件下において、代謝活性化系の存在下で弱い染色体異常誘発性を有すると判断される。

CHO 培養細胞を用いた染色体異常試験の結果 (非代謝活性化法)

処理時間	投与量 (M)	観察細胞数	倍数体数	染色体異常の細胞数							染色体異常出現頻度(%)		相対分裂指数 (%)
				染色分体型		染色体型		ギャップ		その他	-g	+g	
				切断	交換	切断	交換	染色分体型	染色体型				
24	Hanks 緩衝液	100	0	0	0	0	1	1	0	0	1.0	2.0	100
	1×10^{-6}	100	0	1	0	0	0	2	0	0	1.0	3.0	93
	3×10^{-6}	100	0	0	0	0	0	2	1	0	0	3.0	100
	1×10^{-5}	100	0	0	0	0	0	4	1	0	0	4.0	46
	3×10^{-5}	100	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2.0	39
	4-NQO (1×10^{-6})	100	2	27	52	0	6	22	17	29	55.0	64.0	43
48	Hanks 緩衝液	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	1×10^{-6}	100	0	0	0	0	0	2	1	0	0	3.0	49
	3×10^{-6}	100	0	0	0	0	1	2	0	0	1.0	3.0	29
	1×10^{-5}	100	0	1	0	0	0	3	0	0	1.0	4.0	29
	3×10^{-5}	100	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1.0	17
	4-NQO (1×10^{-6})	100	10	10	18	7	2	22	7	5	23.0	33.0	29

4-NQO: 4-ニトロキノリン 1-オキシド

-g: ギャップのみを持つ細胞を除いた染色体異常出現頻度

+g: ギャップのみを持つ細胞を含めた染色体異常出現頻度

CHO 培養細胞を用いた染色体異常試験の結果 (代謝活性化法)

処理時間 回復時間	投与量 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	倍数 体数	染色体異常の細胞数							染色体異常 出現頻度(%)		相対 分裂 指数 (%)
				染色分体型		染色体型		ギャップ		そ の 他	-g	+g	
				切断	交換	切断	交換	染色分 体型	染色体 型				
6-6	Hanks 緩衝液	100	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4.0 ^{*1}	100
	1×10^{-6}	100	0	7	2	0	1	10	0	0	8.0	14.0	93
	3×10^{-6}	100	0	14	3	1	1	11	1	1	7.0	14.0	67
	1×10^{-5}	100	0	3	1	0	0	5	0	0	4.0	7.0	90
	3×10^{-5}	100	0	3	1	1	0	2	0	0	4.0	6.0	97
	1×10^{-4}	100	0	1	0	0	0	3	0	0	1.0	4.0	67
	3×10^{-4}	100	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2.0	63
	DMN (1×10^{-2})	100	0	19	3	0	5	25	3	13	31.0	47.0	67
6-18	Hanks 緩衝液	100	0	1	0	0	0	2	0	0	1.0	3.0	100
	1×10^{-6}	100	0	1	7	0	0	5	0	0	4.0	8.0	103
	3×10^{-6}	100	0	1	4	0	0	1	1	0	4.0	5.0	78
	1×10^{-5}	100	0	1	2	0	1	3	0	0	4.0	7.0	75
	3×10^{-5}	100	0	7	1	0	1	5	0	0	6.0	9.0	78
	1×10^{-4}	100	0	6	6	0	1	1	0	0	10.0	11.0	66
	3×10^{-4}	100	0	1	1	0	1	3	0	1	4.0	6.0	31
	DMN (1×10^{-2})	100	0	41	47	0	7	39	1	7	50.0	60.0	53

*1: 申請者註 報告書に記載されている数値は3.0であるが、染色分体型ギャップの出現数が4であるので、+gの染色体異常出現頻度は、4.0であると考えられる。

DMN: ジメチルニトロソアミン

-g: ギャップのみを持つ細胞を除いた染色体異常出現頻度

+g: ギャップのみを持つ細胞を含めた染色体異常出現頻度

⑭ 変異原性試験

(3) CHL 培養細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 No. 毒 A30)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 1989 年

検体の純度:

試験方法 : チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 (CHL 細胞) を用い、非代謝活性化法および代謝活性化法によって検体の染色体異常誘発性を検定した。検体は、純水に溶解して用いた。

用量設定根拠:

判定基準 ; 各用量 200 個の中期分裂像 (100 個/プレート×2 プレート) を観察し、染色体の異常を構造的異常 [ギャップ (gap)、切断 (break)、交換 (exchange) など] および数的異常 [倍数性、核内倍化] に分類し計測した。異常細胞出現頻度が 5% 未満を陰性、5% 以上 10% 未満を擬陽性、10% 以上の場合を陽性とした。

非代謝活性化法 ; 非代謝活性化法では、24 および 48 時間の連続処理を行った。その結果、両条件の最高濃度の相対的有糸分裂指数は、24 時間で 48.8%、48 時間で 32.2% であり、それぞれ 3 用量全てについて染色体の観察を行った。

代謝活性化法 ; 代謝活性化法では、S9 処理および非処理の条件において、6 時間の暴露期間後に 18 時間の回復期間を設けて行った。その結果、最高濃度の相対的有糸分裂指数は 49.0% であり、3 用量全てについて染色体の観察を行った。

陽性対照には、マイトマイシン C (MMC) およびシクロホスファミド (CPA) を用いた。

試験結果 : 代謝活性化の有無に係わらず、検体投与による CHL 細胞に対する染色体異常の誘発はみられなかった。また、陽性対照として用いた MMC および CPA では、溶媒対照と比較して、著しい染色体異常の誘発が認められた。

以上の結果より、検体は、本試験条下で染色体異常誘発性を示さないと判断される。

染色体異常試験の結果 (非代謝活性化法)

処理時間	投与量 (µg/mL)	観察細胞数	倍数体数	染色体異常の細胞数						染色体異常出現頻度(%)	
				染色分体型		染色体型		ギャップ	その他	-g	+g
				切断	交換	切断	交換				
24	純水	200	1	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5
	120	200	0	0	0	0	0	1	0	0	0.5
	240	200	0	0	0	0	0	1	0	0	0.5
	480	200	1	0	0	0	0	1	1	0.5	1.0
	MMC (0.03)	200	0	14	43	0	0	3	0	27.5	28.5
48	純水	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	200	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	200	1	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5
	40	200	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	MMC (0.03)	200	0	23	41	2	2	3	0	27.0	28.5

MMC: マイトマイシン C

-g: ギャップのみを持つ細胞を除いた染色体異常出現頻度

+g: ギャップのみを持つ細胞を含めた染色体異常出現頻度

染色体異常試験の結果 (代謝活性化法)

S9 Mixの有無	処理時間 回復時間	投与量 (µg/mL)	観察細胞数	倍数体数	染色体異常の細胞数						染色体異常出現頻度(%)	
					染色分体型		染色体型		ギャップ	その他	-g	+g
					切断	交換	切断	交換				
+	6-18	純水	200	2	0	1	0	0	2	0	0.5	1.5
		1350	200	0	0	0	0	0	1	0	0	0.5
		2700	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		5400	200	1	0	0	0	0	1	0	0	0.5
		CPA (10)	200	1	30	80	3	0	2	0	51.5	52.5
-		純水	200	1	0	1	0	0	1	0	0.5	1.0
		1350	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2700	200	1	0	0	0	0	1	0	0	0.5
		5400*										
		CPA (10)	200	1	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0

CPA: シクロホスファミド、*: 細胞毒性のため分裂細胞が認められなかった。

-g: ギャップのみを持つ細胞を除いた染色体異常出現頻度

+g: ギャップのみを持つ細胞を含めた染色体異常出現頻度

⑭ 変異原性試験

(4) マウスを用いた小核試験

(資料 No. 毒 A31)

試験機関:

報告書作成年: 1983 年

検体純度 :

供試動物 : BDF 1 系マウス、7 週齢

1 回投与法 低用量群: 雌雄各 6 匹、高用量群: 雌雄各 8 匹

連続投与法 雌雄各群 6 匹

試験期間 : 1983 年 8 月 25 日～1983 年 10 月 13 日

試験方法:

用量設定根拠;

判定基準; MNPCE の出現頻度が陰性対照と比較して用量依存性を伴う明らかな増加を示した場合、または、再現性のある単独な用量で明らかな増加を示した場合に陽性とした。

試験結果 : 骨髓標本の観察結果を次頁の表に示す。

すべての検体投与群において、MNPCE の出現頻度に陰性対照群と比較して有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照の MMC は、MNPCE の出現頻度に陰性対照群と比較して明らかな増加が認められた。

結論 : 以上の結果から、本試験条件下において、検体は、マウスの骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

小核試験結果

投与方法	採取時間 (時間)	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	MNPCE (%)	PCE/(PCE+NCE) (%)
1回 投与法 (高用量)	16	陰性対照 (純水)	-	雄	6	64.3	0.18
				雌	6	64.3	0.15
		検体	320	雄	8	60.3	0.08
			500	雌	7 ^{*1}	60.6	0.14
	24	陰性対照 (純水)	-	雄	6	64.7	0.15
				雌	6	61.4	0.08
		検体	320	雄	8	58.4	0.19
			500	雌	7 ^{*1}	59.1	0.11
	陽性対照 (MMC)	2	雄	6	49.8	5.08***	
			雌	6	54.2	3.73***	
	48	陰性対照 (純水)	-	雄	6	57.5	0.13
				雌	6	60.7	0.05
		検体	320	雄	8	48.9	0.11
			500	雌	7 ^{*1}	42.7	0.16
72	陰性対照 (純水)	-	雄	6	61.1	0.05	
			雌	6	58.6	0.17	
	検体	320	雄	8	39.6	0.08	
		500	雌	5 ^{*1}	33.8	0.16	
1回 投与法 (低用量)	24	陰性対照 (純水)	-	雄	6	60.2	0.17
				雌	6	60.6	0.22
		検体	160	雄	6	54.2	0.17
			240		6	53.7	0.15
			220	雌	6	62.7	0.03
			360		6	59.3	0.27
連続 投与法	16	陰性対照 (純水)	-	雄	6	65.7	0.12
				雌	6	61.1	0.05
		検体	90	雄	6	58.4	0.10
				雌	6	61.5	0.08
	24	陰性対照 (純水)	-	雄	6	64.2	0.08
				雌	6	64.6	0.07
		検体	90	雄	6	50.0	0.20
				雌	6	57.8	0.07
	48	陰性対照 (純水)	-	雄	6	62.7	0.03
				雌	6	60.9	0.00
		検体	90	雄	6	40.5	0.03
				雌	6	45.1	0.02
	72	陰性対照 (純水)	-	雄	6	57.1	0.10
				雌	6	62.2	0.13
検体		90	雄	6	34.9	0.08	
			雌	6	21.9	0.03	

MMC: マイトマイシン C、*1: 死亡個体あり、Kastenbaum-Bowman 法 ***: P<0.001

MNPCE: 多染性赤血球 2000 個中の小核を有する多染性赤血球の割合

PCE/(PCE+NCE): 全赤血球に対する多染性赤血球の割合

PCE: 多染性赤血球、NCE: 正染性赤血球

⑭ 変異原性試験

(5) 細菌を用いた DNA 修復試験 (Rec-assay)

(資料 No. 毒 A32)

試験機関:

報告書作成年:1977 年

検体の純度:

試験方法 : *B. subtilis*の組換修復機構の野生株 (H17, Rec⁺) および欠損株 (M45, Rec⁻) を用い、非代謝活性化の条件下において、DNA 損傷作用があるか否かを検定した。

検体は蒸留水に溶解して用いた。20、100、200、500、1000、2000 µg/ディスクの 6 用量を設定した。陰性対照として KM (カナマイシン)、陽性対照として MMC (マイトマイシン C) を用いた。

判定基準 : H17 株および M45 株に対する生育阻止帯の直径差が 5 mm 以上である場合を陽性とした。

試験結果 : 検体投与群では、両株に生育阻止帯を示したが、いずれの濃度においても、5 mm 以上の阻止帯差は観察されなかった。一方、溶媒対照では、両株に生育阻止帯を示さなかった。

また、陰性対照として用いた KM では、両株に生育阻止帯を示したが、5 mm 以上の阻止帯差は観察されなかった。陽性対照として用いた MMC では、M45 株に明らかな生育阻止帯を示し、両株の間に 5 mm 以上の阻止帯差が生じた。

以上の結果より、検体は、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を示さないと判断される。

DNA修復試験結果

薬物	濃度 (µg/ディスク)	-S9			
		阻止帯 (mm)		差 (mm)	
		M45	H17		
溶媒対照(蒸留水)	0	0	0	0	
検体	20	1.0	<1.0	<1.0	
	100	3.0	2.0	1.0	
	200	6.0	4.0	2.0	
	500	7.5	5.5	2.0	
	1000	8.5	6.0	2.5	
	2000	10.0	8.0	2.0	
陰性対照	KM	10	8.5	6.5	2.0
陽性対照	MMC	0.1	11.0	2.0	9.0

KM : カナマイシン

MMC : マイトマイシン C

⑭ 変異原性試験

(6) ラットを用いた優性致死試験

(資料 No. 毒 A33)

試験機関:

報告書作成年: 1986 年

検体純度 :

供試動物 : Crl:CD(SD)系ラット、雄 1 群 15 匹

雄 12~14 週齢 65 匹、雌 8~10 週齢 390 匹、体重: 雄 306.4~356.1 g

試験期間 : 1985 年 11 月 14 日~1986 年 3 月 25 日

試験方法 : 検体を蒸留水に溶解し、雄ラットに連続 10 週間にわたり 1 日あたり 0、2、10 および 20 mg/kg の用量で容量 10 mL/kg を強制経口投与した。投与後、各雄ラットを未処理の未経産雌ラット 3 匹と 7 日間同居させた。この交配期間の経過後に雄ラットを離し、新たに未処理の未経産雌ラット 3 匹と 7 日間同居させた。雌ラットは、雄ラットのケージから離れた後、10 日目に屠殺した。雄ラットは、雌ラットの解剖終了後、約 4 週間生存させ、屠殺した。陰性対照群には蒸留水、陽性対照群には生理食塩水に溶解したトリエチレンメラミン (TEM) を第 5 週にのみ 5 回の筋肉内投与を行った。

観察項目 : 一般症状および生死を毎日 2 回観察し、全例について、剖検時に肉眼的病理検査を行った。雄ラットについては、1 週間に 1 回、詳細な症状観察と体重測定を行い、屠殺後、一部の動物の精子検査および臓器重量測定を行った。雌ラットについては、屠殺後、黄体数、着床数、生存胚および死亡胚数を検査した。また、生存着床数から変異誘発指数を算出した。

試験結果 : 結果を次頁の表に示す。

20 mg/kg 群では、雄の顕著な体重減少および全身状態の悪化がみられたため、第 4 週から 7 週の間 14 匹を切迫屠殺した。

10 mg/kg 群では、雌の妊娠率が明らかに低下した。また、着床前胚死亡率の増加、着床率の減少および妊娠率の低下したラットにおける変異誘発指数の増加が認められた。雄の精巣および精巣上体の重量には、検体の影響はみられず、精子の運動性、密度および形態に関しても、検体の影響は認められなかった。同群では、2 匹の死亡が認められたが、検体投与による影響ではないと考えられる。

2 mg/kg 群では、全体的な交配機能、着床死亡数および変異誘発指数に対して明らかに有害な影響は認められなかった。

考 察 : 以上の結果から、20 mg/kg 群では、検体の毒性が観察された。10 mg/kg 群では、着床死亡数の増加および変異誘発指数の増加を特徴とする優性致死に対する影響の可能性を示すデータが示された。しかし、10 mg/kg 群では、精子形成のどの段階が影響を受けたかを判断することは不可能であるため、投与期間を短縮し、未処理雌ラットと 8 週間、継続交配させる計画で試験を実施する必要がある。

結 論 : 20 mg/kg 群では、検体の毒性が観察され、10 mg/kg 群では、着床死亡数の増加および変異誘発指数の増加がみられたことから、本試験における、検体の NOAEL は 2 mg/kg/day と判断される。

申請者註:

優性致死試験の結果

投与群 (mg/kg)	陰性対照 (蒸留水)	2	10	20	陽性対照 (TEM)	
動物数 (雌)	45	45	42	3	15	
雄の死亡率(%)	0	0	13.3	93.3	0	
雄の体重変化*1 (g)	+237	+228	+221	+186	+192	
第一 回 交 配	妊娠数	40	29*	10**	1	15
	黄体数	602	457	109	19	227
	着床数	561	413	82	9	206
	着床前胚死亡率 (%)	6.8	9.6	24.8	52.6	9.3
	妊娠初期子宮内死亡数	17	12	4	1	5
	妊娠後期子宮内死亡数	7	3	1	0	3
	着床後胚死亡率 (%)	4.3	3.6	6.1	11.1	3.9
	生存着床数	537	398	77	8	198
	変異誘発指数	-	-2.2	42.5	40.3	1.5
第二 回 交 配	妊娠数	40	40	4**	0	14
	黄体数	608	597	35	-	214
	着床数	530	563	26	-	207
	着床前胚死亡率 (%)	12.8	7.9*2	25.7	-	3.3
	妊娠初期子宮内死亡数	18	33	1	-	10
	妊娠後期子宮内死亡数	4	7	0	-	2
	着床後胚死亡率 (%)	4.2	7.1	3.8	-	5.8
	生存着床数	508	523	25	-	194
変異誘発指数	-	-3.1	50.4	-	-9.4	

頻度 (%) 以外の数値は群の合計数を示す。

*1: 群毎の平均体重変化 (g) = 投与終了時体重 (g) - 投与開始時体重 (g)

*2: 1例を含まず 39匹のデータを示す。

TEM: トリエチレンメラミン

t 検定またはカイ二乗検定 *: P<0.05、 **: P<0.01

⑭ 変異原性試験

(7)ラットを用いた優性致死試験

(資料 No. 毒 A34)

試験機関:

報告書作成年:1986年

検体純度 :

供試動物 : Wister系ラット、雄:33週齢(繁殖試験終了後)対照群23匹、投与群24匹
雌:9週齢47匹

試験方法 : 繁殖試験で用いた対照群および200ppm投与群のF0世代の雄ラットを繁殖期終了後に未処理の雌ラットと交配した。交配した雌を妊娠14日目に開腹し、子宮内の検査を行った。

観察項目 : 雌ラットについては、屠殺後、妊娠率、黄体数、着床数、生存胚および死亡胚数を検査した。雄ラットについては、交尾後の膣垢中の精子数測定、試験終了時に病理組織学的検査を行った。

試験結果 : 結果を下表に示す。

200ppm群と交配した雌では、対照群に比べ妊娠率、黄体数、着床数および生存胚数が減少した。しかし、優性致死変異の証拠となる初期死亡胚数の増加はみられず、着床前胚死亡数の増加についても本試験では確認できなかった。

投与群の雄の交尾能力は正常であったが、膣垢中の精子数の減少傾向がみられた。また、病理学的検査では、精巣上体および精管に精子肉芽腫の形成、精液のうっ滞などの変化が認められ、更に、精管では粘膜上皮の増生、不動毛の癒着、粘膜の単一細胞性壊死および好中球浸潤などの変化がみられた。

考察 : 繁殖試験では、200ppm群に妊娠率の低下と着床数および出産児数の減少がみられており、検体投与による影響と考えられる。しかし、雄ラットの病理組織学的所見および膣垢中の精子数の減少傾向を併せて考えると、優性致死突然変異の誘発による変化ではなく、むしろ雄ラットの一次的な乏精子症に起因する変化であると考えられる。

結論 : 以上の結果から、本試験条件下において、検体は、優性致死を示す遺伝毒性はないと判断される。

優性致死試験の結果

投与群 (ppm)	0	200
動物数 (雌雄)	23	24
妊娠数	23	11
妊娠率 (%)	100	45.8***
黄体数	16.7	14.4*
着床数	13.7	7.0**
生存胚数	13.0	6.6**
初期死亡胚数	16	4
死亡着床率 (%)	5.2	3.6

頻度 (%) 以外の数値は群の平均値を示す。

カイ二乗検定 *: P<0.05、 **: P<0.01、 ***: P<0.001

⑭ 変異原性試験

(8)ラットを用いた優性致死試験

(資料 No. 毒 A35)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:1988年

検体純度 :

供試動物 : SD系 (CD) ラット、雄 1群 20匹 (陽性対照群のみ 10匹)
(雄 9~11週齢 90匹、雌 9~11週齢 1440匹)
体重:雄 269~374g

試験期間 : 1988年 6月 13日~1988年 8月 22日

試験方法 : 検体を蒸留水に溶解し、雄ラットに連続 5日間にわたり 1日あたり 0、10、20 および 40 mg/kg の用量で強制経口投与した。投与後、各雄ラットを未処理の未経産雌ラット 2匹と 7日間同居させた。この交配期間の経過後に雄から雌ラットを離し、新たに未処理の未経産雌ラット 2匹と 7日間同居させた。この交配手順を 8週間繰り返した。雌ラットは、雄ラットのケージから離れた後、10日目に屠殺した。雄ラットは、第 8回交配の雌ラットの解剖終了後に屠殺した。陰性対照群には蒸留水、陽性対照群には蒸留水に溶解したエチルメタンサルホネート (EMS) を 100 mg/kg の用量で経口投与した。なお、いずれの投与も容量 10 mL/kg とした。

観察項目 : 一般症状および生死を毎日 1回観察し、全例について、剖検時に肉眼的病理検査を行った。雄ラットについては、5日間の投与期間中の毎日体重測定を行い、屠殺後、繁殖能力の低下がみられた一部の動物の精子検査および臓器重量測定を行った。雌ラットについては、屠殺後、妊娠率、黄体数、着床数、生存胚および死亡吸収胚数を検査した。

試験結果 : 結果を次頁の表に示す。

40 mg/kg 群では、投与期間中に体重増加抑制がみられたが、一般症状には検体投与の影響はみられなかった。

10 mg/kg 群では、未妊娠の雌が 3例みられたが、交配した雄の生殖能力には検体の影響は認められなかった。また、同群では、第 5週に交配した雌で初期死亡胚の有意な増加がみられたが、用量相関がなく、試験群の不均一性により偶発的に増加したものと考えられる。

陽性対照として用いた EMS 群では、第 1から 4週に初期死亡胚が顕著に増加し、第 2および 3週ではほぼ完全な不妊もみられる明らかな優性致死作用が認められた。また、第 1から 5週の各週で総着床数の明らかな低下が観察された。

結論 : 以上の結果から、検体は、致死量に近い 40 mg/kg/day を最高用量とする本試験条件下において、優性致死を示す遺伝毒性はないと判断される。

優性致死試験の結果-1 (第1~5回交配)

投与群 (mg/kg)	陰性対照 (蒸留水)	10	20	40	陽性対照 (EMS)100	
動物数 (雄)	20	20	20	20	10	
雄の死亡率 (%)	0	0	0	0	0	
雄の体重変化 ^{*1} (g)	+25	+26	+19	+10	-16	
第一回交配	妊娠率 (%)	97.5	80.0	100.0	90.0	75.0 *2
	黄体数	571	529	582	564	276
	着床数	571	452	582	521	202
	未着床率 (%)	0	14.6	0	7.6	26.8
	妊娠初期胚死亡数	30	30	21	19	97***
	妊娠後期胚死亡数	1	1	0	1	0
	着床後胚死亡率 (%)	5.6	7.2	3.8	3.8	75.2***
	生存着床数	504	383	525	483	32
第二回交配	妊娠率 (%)	85.0	80.0	92.5	90.0	30.0***
	黄体数	547	509	559	527	194***
	着床数	484	459	552	512	57**
	未着床率 (%)	11.5	9.8	1.3	2.8	70.6
	妊娠初期胚死亡数	17	15	21	21	8***
	妊娠後期胚死亡数	0	0	0	0	0
	着床後胚死亡率 (%)	3.9	3.4	4.1	4.4	100.0***
生存着床数	417	421	493	454	0	
第三回交配	妊娠率 (%)	97.5	92.5	85.0	87.5	5.0***
	黄体数	590	629	556	573	201***
	着床数	590	581	515	515	12
	未着床率 (%)	0	7.6	7.4	10.1	94.0
	妊娠初期胚死亡数	38	23	21	40	1
	妊娠後期胚死亡数	0	0	0	0	0
	着床後胚死亡率 (%)	7.3	4.4	4.5	8.8	100.0
生存着床数	486	503	449	412	0	
第四回交配	妊娠率 (%)	90.0	85.0	85.0	82.5	55.0*
	黄体数	563	524	522	517	241*
	着床数	520	480	482	470	144
	未着床率 (%)	7.6	8.4	7.7	9.1	40.2
	妊娠初期胚死亡数	20	24	20	28	30***
	妊娠後期胚死亡数	0	0	1	0	0
	着床後胚死亡率 (%)	4.2	5.6	4.5	6.7	35.3***
生存着床数	451	402	428	393	55	
第五回交配	妊娠率 (%)	100.0	87.5	100.0	94.9	80.0*
	黄体数	583	578	633	597	277
	着床数	583	517	633	585	230
	未着床率 (%)	0	10.6	0	2.0	17.0
	妊娠初期胚死亡数	20	29	48**	23	10
	妊娠後期胚死亡数	0	0	0	0	0
	着床後胚死亡率 (%)	3.6	6.3	8.9**	4.3	5.3
生存着床数	533	430	492	509	178	

頻度 (%) 以外の数値は群の合計数を示す。

*1: 群毎の平均体重変化 (g) = 投与終了時体重 (g) - 投与開始時体重 (g)

*2: 申請者註 報告書に記載されている数値は 65.0 であるが、着床は 20 例中 15 例に認められているので、妊娠率は、75.0 であると考えられる。

EMS: エチルメタンスルホネート、カイ二乗検定 *: P<0.05、 **: P<0.01、 ***: P<0.001

優性致死試験の結果-2 (第 6~8 回交配)

投与群 (mg/kg)	陰性対照 (蒸留水)	10	20	40	陽性対照 (EMS) 100	
第六回交配	妊娠率 (%)	95.0	87.5	92.5	92.5	90.0
	黄体数	615	591	614	627	288
	着床数	590	542	602	593	261
	未着床率 (%)	4.1	8.3	2.0	5.4	9.4
	妊娠初期胚死亡数	28	14	22	25	22
	妊娠後期胚死亡数	0	0	0	0	0
	着床後胚死亡率 (%)	5.3	3.0	4.3	5.0	9.2
	生存着床数	503	450	494	477	216
第七回交配	妊娠率 (%)	92.5	87.5	92.5	95.0	75.0
	黄体数	578	561	577	582	227
	着床数	563	533	545	563	217
	未着床率 (%)	2.6	5.0	5.5	3.3	4.4
	妊娠初期胚死亡数	22	20	30	29	14
	妊娠後期胚死亡数	1	0	0	0	0
	着床後胚死亡率 (%)	4.3	4.2	6.2	5.9	7.1
	生存着床数	490	460	454	459	182
第八回交配	妊娠率 (%)	97.5	90.0	95.0	87.5	95.0
	黄体数	594	625	613	580	304
	着床数	578	560	606	524	296
	未着床率 (%)	2.7	10.4	1.1	9.7	2.6
	妊娠初期胚死亡数	25	19	25	20	16
	妊娠後期胚死亡数	0	0	0	0	0
	着床後胚死亡率 (%)	4.6	3.9	4.7	4.2	5.9
	生存着床数	520	463	505	451	255

頻度 (%) 以外の数値は群の合計数を示す。

EMS: エチルメタンサルホネート

⑮生体機能への影響に関する試験

ベフランにおける薬理試験

(資料 No. 毒 A36)

試験機関:

報告書作成年:1993年

検体の純度:

1) 中枢神経系に対する作用

①マウスにおける一般状態

供試動物 : Crj:CD-1 (ICR)系マウス、5～6 週齢、体重:雄 24.21～28.49 g、雌 19.33～22.17 g、1 群雄雌各 5 匹

投与方法 : 50、100、200、400 および 800 mg/kg の検体を 5 mL/kg の液量で強制経口投与し、対照群には生理食塩水を同様に投与した。投与後 15、30 分、1、2、4、6、24、48、72 および 96 時間に Irwin の多元観察法に従い一般状態を観察した。

結 果 : 200 mg/kg 以上の用量群で立毛や眼裂狭小などの症状が発現し、400 mg/kg 以上で死亡が用量相関的にみられた他、認知力の低下、運動性の抑制、姿勢の異常、運動失調、反射の低下など抑制性の症状および筋緊張、自律神経症状がみられた。

②マウスの最大電撃痙攣に対する作用

供試動物 : Crj:CD-1 (ICR)系マウス、5～6 週齢、体重:雄 24.21～28.49 g、1 群雄 10 匹

投与方法 : 100、200、400 mg/kg の検体を 5 mL/kg の液量で強制経口投与し、対照群には生理食塩水を同様に投与した。検体投与後 2 時間に電撃痙攣装置を用いて角膜電極を介して電撃(20～25 mA、0.2 msec.)を加え、強直性屈曲痙攣、強直性伸展痙攣および間代性痙攣の持続時間を測定した。

結 果 : 検体投与による抗痙攣作用は認められなかった。

③マウスの睡眠時間に対する作用

供試動物 : Crj:CD-1 (ICR)系マウス、5～6 週齢、体重:雄 24.21～28.49 g、1 群雄 10 匹

投与方法 : 100、200、400 mg/kg の検体を 5 mL/kg の液量で強制経口投与し、対照群には生理食塩水を同様に投与した。検体投与 2 時間後にヘキソバルビタール 100 mg/3mL/kg を腹腔内投与し、正向反射が消失してから回復するまでの時間を測定した。

結 果 : 検体投与による睡眠増強作用は認められなかった。

④マウスの鎮痛に対する作用

供試動物 : Crj:CD-1 (ICR)系マウス、5～6 週齢、体重:雄 24.21～28.49 g、1 群雄 10 匹

投与方法 : 100、200、400 mg/kg の検体を 5 mL/kg の液量で強制経口投与し、対照群には生理食塩水を同様に投与した。検体投与 2 時間後に 0.7%酢酸水溶液を 10 mL/kg の割合で腹腔内投与して投与 5 分後から 10 分後までの writhing 数を

測定した。

結 果 : 検体投与による鎮痛作用は認められなかった。

2)呼吸・循環器系に対する作用

①ウサギの呼吸および循環器に対する作用

供試動物 : 日本白色種ウサギ、12~17 週齢、体重:雄 2.10~2.55 kg、1 群雄 3 匹

投与方法 : 2 および 4 mg/kg (投与液量 0.1 mL/kg) の検体をウレタン麻酔で背位に保定したウサギに耳静脈内投与し、呼吸、血流量、血圧、心拍数および心電図を観察、記録した。呼吸運動は気管にカニューレを挿入し、血液モニタリングキットを介して測定し、血圧は頸動脈圧を動脈カニューレを介して血圧トランスデューサを用いて測定した。血流量は頸動脈から電磁血流計を用い、心電波形は第Ⅱ誘導法で、心拍数は心電図から誘導し測定した。

結 果 : 2 mg/kg 投与後に血圧の低下が、4 mg/kg 投与後に一過性の血圧上昇とそれに引き続き血圧の低下がみられ、これらは心拍数の増加を伴っていた。

3)神経筋標本に対する作用

①ラットの横隔神経—筋標本に対する作用

供試動物 : Cj:CD(SD)系ラット、8~11 週齢、体重:雄 274.98~364.05 g、1 群雄 3 匹

投与方法 : 放血致死させたラットを開胸し、胸腔内臓器を切除して横隔膜とともに横隔神経を摘出し、神経と横隔膜に電極を取り付け、さらに横隔膜にセルフィンをつけ 50 mL のタイロッド液 (液温 30~32°C、95% O₂+5% CO₂ の混合気体で飽和) を満たしたマグヌス管に懸垂し、FDピックアップに接続した。電気刺激装置を用い、神経刺激で 500 mA、0.1 Hz、0.3 msec. 5 V 以下、横隔膜刺激で 500 mA、0.1 Hz、3 msec. 25 V 以下の短形により刺激した。負荷は 5 g とし、収縮は FDピックアップを介して記録計に記録した。検体は生理食塩水に溶解後、タイロッド液の最終濃度が 1×10^{-7} 、 3×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 3×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 3×10^{-5} および 1×10^{-4} g/mL となるように添加した。

結 果 : 検体投与による神経伝達および横隔膜収縮への影響は認められなかった。

4)骨格筋に対する作用

①ウサギの前脛骨筋収縮に対する作用

供試動物 : 日本白色種ウサギ、12~17 週齢、体重:雄 2.10~2.55 kg、1 群雄 3 匹

投与方法 : ウレタン麻酔下に背位に保定し、前脛骨筋の腱と血管を痛めないように上部まで分離して腱に糸を付け、ストレインゲージにつなぎ筋収縮を記録した。この時の負荷は 10 g 程度とした。大腿部外側後部の皮膚を縦に切開し、大腿骨中央部付近の腓骨神経、脛骨神経および坐骨神経を露出し、腓骨神経は電気刺激を与えるため中枢側で切断し双極刺激電極にのせた。脛骨神経および坐骨神経は切断し、これらの神経が支配する筋の活動が記録へ混入することを防いだ。さらに、電気刺激を与えるため、前脛骨筋に双極刺激電極を接触させた。電極周辺および前脛骨筋表面には流動パラフィンを塗布し、電流の漏れと組織の乾燥を防止した。電気刺激装置を用い、神経刺激で 10 mA、0.1 Hz、0.1 msec.、筋肉刺激で 10 mA、0.1 Hz、1 msec. の短形波により刺激した。

このとき3 V以下の電圧から次第に刺激を強くし、筋収縮反応が最大になるように刺激強度を設定した。最大筋収縮反応が得られた30分後に、2および4 mg/kgの検体を静脈内投与し、投与後1時間までポリグラフにより筋収縮を記録した。

結 果 : 検体投与による神経伝達および前脛骨筋収縮への影響は認められなかった。

5) 消化器に対する作用

①ラットの小腸輸送能に対する作用

供試動物 : C_{rl}:CD(SD)系ラット、8～11週齢、体重:雄 274.98～364.05 g、1群雄 5匹

投与方法 : 一夜絶食したラットに38、75、150、300 mg/kgの検体を5 mL/kgの液量で強制経口投与し、対照群には生理食塩水を同様に投与した。検体投与30分後に粉末活性炭・アラビアゴムの各10%懸濁液を10 mL/kgで強制経口投与した。その30分後にクロロホルムで麻酔死させ、開腹して幽門部から炭末先端までの長さを測定し、小腸全体の長さに対する比率を求めた。

結 果 : 38 mg/kg群から小腸輸送能の有意な低下が用量依存的に認められた。

②ラットの胃液分泌に対する作用

供試動物 : C_{rl}:CD(SD)系ラット、8～11週齢、体重:雄 274.98～364.05 g、1群雄 5匹

投与方法 : ラットを麻酔下で開腹し胃の幽門部を結紮した後、検体を静脈内投与して腹部を閉じた。検体投与4時間後に麻酔下に再度開腹し、胃の噴門部を結紮した後、胃を摘出して胃内に貯留する胃液を採取し、胃液量を測定した。検体投与量は1、2および4 mg/kg、投与液量は2 mL/kgとした。対照群には生理食塩水を同様に投与した。

結 果 : 検体投与による胃液分泌に及ぼす影響は認められなかった。

6) 血液に対する作用

①溶血性試験

供試動物 : 日本白色種ウサギ、12～17週齢、体重:雄 2.10～2.55 kg、1群雄 1匹

投与方法 : 心臓採血した血液を遠心分離後、赤血球を生理食塩水で3回洗浄し、10倍量の生理食塩水に浮遊させ赤血球浮遊液を調製した。検体は最終濃度が0、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-4} 、 5×10^{-4} および 1×10^{-3} g/mLとなるように生理食塩水に懸濁したもの9.5 mLと赤血球浮遊液0.5 mLを混和して2時間38°Cに保った後、遠心分離(2000 rpm 15分)した上清を肉眼的に観察して判定した。

結 果 : 検体投与による溶血作用は認められなかった。

②血液凝固に対する作用

供試動物 : 日本白色種ウサギ、12～17週齢、体重:雄 2.10～2.55 kg、1群雄 3匹

投与方法 : 75、150および300 mg/kgの検体を3 mL/kgの液量で強制経口投与し、対照

群には生理食塩水を同様に投与した。検体投与前および投与後 10、30、60 分に耳静脈から採血した血液を 3.13%クエン酸ナトリウム加(1/10 容)試験管に採取し、遠心分離した血漿を用いて、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 : 検体投与による血液凝固に変化は認められなかった。

7) 泌尿器系に対する作用

① ラットの腎臓に対する作用

供試動物 : Cj:CD(SD)系ラット、8~11 週齢、体重:雄 274.98~364.05 g、1 群雄 5 匹

投与方法 : 75、150 および 300 mg/kg の検体を 5 mL/kg の液量で強制経口投与し、対照群には生理食塩水を同様に投与した。検体投与 2 時間に PSP 液 18 mg/3 mL/kg を静脈内に投与して、その 15 分後にエーテル麻酔下で腹部大動脈から採血した。遠心分離後、分光光度計を用いて 560 nm の吸光度より血漿中の PSP 濃度を求めた。

結 果 : 検体投与による腎臓の PSP 排泄能に変化は認められなかった。

8) 代謝機能に対する作用

① ラットの肝臓に対する作用

供試動物 : Cj:CD(SD)系ラット、8~11 週齢、体重:雄 274.98~364.05 g、1 群雄 5 匹

投与方法 : 75、150 および 300 mg/kg の検体を 5 mL/kg の液量で強制経口投与し、対照群には生理食塩水を同様に投与した。検体投与 2 時間後に ICG 液 10 mg/2 mL/kg を静脈内投与し、その 10 分後にエーテル麻酔下で腹部大動脈から採血した。遠心分離後、分光光度計を用いて 805 nm の吸光度より血漿中の ICG 濃度を求めた。

結 果 : 検体投与による肝臓の ICG 排泄能に変化は認められなかった。

以上の結果から、マウスの一般症状観察では立毛や眼裂狭小などの自律神経症状が投与後の早期からみられ、また抑制性的変化も認められた。死亡を含め自律神経症状以外の諸症状は過量投与による毒性の発現と考えられた。ウサギを用いた呼吸・循環器に対する作用として、一過性の軽度の血圧上昇とこれに続く血圧の低下がみられ本検体特有の薬理的な作用と考えられた。心拍数および血流量の増加は血圧低下に対する反射反応と考えられる。この血圧低下はある種のアドレナリン作動性神経遮断薬でみられる現象と類似している。

本試験で観察された立毛や眼裂狭小などの自律神経症状は血圧に対する影響と同様、ノルアドレナリンの放出と、その後生じるノルアドレナリンの枯渇による自律神経(交感神経)系の抑制によるものと考えられる。

その他に脳波、筋弛緩および体温への影響はみられず、前脛骨筋収縮試験、最大電撃痙攣試験においても影響はみられなかった。また、血液凝固能には影響はみられなかった。さらに PSP 排泄能および ICG 排泄能では対照と比べ差はなく、腎および肝機能に対する急性的な影響はないものと考えられる。

生体の機能に及ぼす影響試験の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 一般状態 [Irwin 法] (マウス)	経口 (生理 食塩水)	0	雄 5 雌 5	200	100	認知力の低下、運動性の抑制、姿勢の異常、運動失調、筋緊張、反射の低下、自律神経症状の発現、死亡(≥400 mg/kg)
		50				
		100				
		200				
		400				
800						
中枢神経系 最大電撃 痙攣 (マウス)	経口 (生理 食塩水)	0	雄 10	>400	400	影響なし
		100				
		200				
		400				
中枢神経系 睡眠時間 (マウス)	経口 (生理 食塩水)	0	雄 10	>400	400	影響なし
		100				
		200				
		400				
中枢神経系 鎮痛作用 (マウス)	経口 (生理 食塩水)	0	雄 10	>400	400	影響なし
		100				
		200				
		400				
呼吸・ 循環器系 呼吸・循環器 (ウサギ麻酔 下)	静脈内 (生理 食塩水)	2	雄 3	2	<2	血圧低下、心拍数増加、 血流量増加
		4				
神経筋標本 横隔神経－ 横隔膜 (ラット)	マグヌス 管内添加 (生理 食塩水)	1×10^{-7}	雄 3	> 10^{-4}	10^{-4}	影響なし
		1×10^{-4} (g/mL)				
骨格筋 前脛骨筋 収縮 (ウサギ麻酔 下)	静脈内 (生理 食塩水)	2	雄 3	>4	4	影響なし
		4				
消化器 小腸輸送能 (ラット)	経口 (生理 食塩水)	0	雄 5	38	<38	輸送能低下
		38				
		75				
		150				
消化器 胃液分泌 (ラット)	静脈内 (生理 食塩水)	0	雄 5	>4	4	影響なし
		1				
		2				
		4				

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－生体機能影響〉

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
血液 溶血性試験 (ウサギ)	赤血球 浮遊液に 添加 (生理 食塩水)	1×10^{-6} 1×10^{-3} (g/mL)	雄 1	$>10^{-3}$	10^{-3}	影響なし
血液 血液凝固 (ウサギ)	経口 (生理 食塩水)	0 75 150 300	雄 3	>300	300	影響なし
泌尿器系 腎臓 PSP 排泄能 (ラット)	経口 (生理 食塩水)	0 75 150 300	雄 5	>300	300	影響なし
代謝機能 肝臓 ICG 排泄能 (ラット)	経口 (生理 食塩水)	0 75 150 300	雄 5	>300	300	影響なし

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

⑯ その他

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体一機序検討〉

⑯ その他

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体—機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

⑩ その他

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

⑩ その他

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

⑯ その他

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

⑩ その他

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

<原体-機序検討>

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

⑩ その他

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

⑩ その他

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体-機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

⑩ その他

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

⑯ その他

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体一機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈原体－機序検討〉

⑰ 解毒及び治療

(1) ビーグル犬を用いた静脈内投与による循環系への影響 (資料 No. 毒 A47)

試験機関:

報告書作成年: 1986 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 40%水溶液

組成:

1) 体内薬物動態学的パラメータ測定

試験動物 : ビーグル犬 4 匹

試験方法 : 麻酔をかけたビーグル犬に検体(有効成分換算 5mg/kg)を静脈内投与し、5、7.5、10、15、20、30、45、60、120 及び 180 分後に採血し、イミノクタジン酢酸塩濃度を測定した。

結果 : 比較的長時間、高い血中濃度を保つと考えられる。

2) イミノクタジン酢酸塩の血圧低下作用に対するエピネフリン、ネオシネフリン、プロタノールの効果

試験動物 : ビーグル犬 11 匹

試験方法 : 麻酔をかけたビーグル犬に検体(有効成分換算 10mg/kg)を静脈内投与し、血圧低下時にエピネフリン、ネオシネフリン、プロタノールを持続的に静脈内投与し、血圧が上昇してから循環系のパラメータを測定した。

結果 : イミノクタジン酢酸塩の投与によって血圧低下を来たしたビーグル犬に投与した昇圧剤のうち、エピネフリン投与が最も効果的だった。

以上の結果より、検体には循環系に対しては、血管の拡張と同時に、心抑制作用があると推測される。これに対して、血管収縮剤と β 刺激剤の様な薬剤を同時に使用することが合理的と考えられ、この両作用を持っているエピネフリンが適当と考えられた。

⑰ 解毒及び治療

(2) ビーグル犬を用いた解毒及び治療効果試験 (資料 No. 毒 A48)

試験機関:

報告書作成年: 1986 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 25%液剤

組成:

試験動物 : ビーグル犬 15 匹

試験期間 : 投与後 3 時間観察

試験方法 : 検体(有効成分換算 5~10 mg/kg)を静脈注射して、体内薬物動態及び循環器系への影響・拮抗剤の効果を調べた。

結果 :

体内薬物動態:

分布容量が他の農薬に比べて小さく、服毒事故の場合、比較的長時間、血中濃度を高く保っているものと考えられる。このことから、大量に飲んだ場合には血液環流が有効と考えられた。

循環系への影響と拮抗剤の効果

イミノクタジン酢酸塩は循環系に対し、血管の拡張と同時に心抑制作用が推測されるため、このような作用に有効なエピネフリン、ネオシネフリン、プロタノールの効果を検討した。

- a) エピネフリン: 血圧上昇、心拍数上昇、心拍出量の上昇があり、全末梢抵抗はそれほど変わらない状態で釣り合いがとれた。
- b) ネオシネフリン: 血圧が上昇したが、十分なものではなかった。心拍数は上昇した。全末梢抵抗はイミノクタジン酢酸塩投与前に比べて低く、心拍出量が低下した。
- c) プロタノール: 心拍数は上昇するが、血圧は回復せず、心拍出量も低下した。

以上の結果より、イミノクタジン酢酸塩による血圧低下には血管収縮剤と β 刺激剤の様な薬剤を併用することが合理的であり、両作用を有するエピネフリンが適当と考えられた。

2. 原体混在物および代謝物の毒性試験成績

① 変異原性試験()

(1) 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料 No. 毒 B1)

試験機関:

報告書作成年: 1983 年

検体の純度:

試験方法 : ヒスチジン要求性サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2hcr 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 Mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いた試験で変異原性を検定した。検体は水に溶解し、10～10000 µg/プレート の 7 用量で実施した。陽性対照としては、AF-2、ENNG (N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、2-NF (2-ニトロフルオレン)、9-AA (9-アミノアクリジン) および 2-AA (2-アミノアントラセン) を用いた。

判定基準 : 復帰コロニー数が溶媒対照の 2 倍を超える場合を陽性とした。

試験結果 : 結果を次頁以降の表に示した。両試験とも S9 Mix の有無にかかわらず、菌株に生育阻害を起こした最高用量において、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。

一方、陽性対照として用いた AF-2、ENNG (N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、2-NF (2-ニトロフルオレン)、9-AA (9-アミノアクリジン)、および 2-AA (2-アミノアントラセン) では、すべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

<代謝物・混在物－変異原>

試験結果(表中の数値は2反復の平均値)

薬物	濃度 (μg/プレート)	S9-Mix 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			
			TA100	TA1535	WP2hcr	TA98	TA1537	TA1538	
対照(水)	-	-	123	13	13	40	15	11	
	10	-							
	50	-							
	100	-							
	500	-							
	1000	-							
	5000	-							
	10000	-							
対照(水)	-	+	100	8	17	41	15	22	
	10	+							
	50	+							
	100	+							
	500	+							
	1000	+							
	5000	+							
	10000	+							
陽性 対照	AF-2	0.01	-	478					
		0.04	-			504			
		0.1	-				597		
	ENNG	10	-		378				
	9-AA	80	-					>1000	
	2-NF	2	-						325
	2-AA	0.5	-	100			43		17
		2	-		10			7	
		40	-			19			
		0.5	+	446			275		258
		2	+		188			120	
40	+			>1000					

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

2-NF : 2-ニトロフルオレン

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

*: 生育障害が認められた

② 急性経口投与毒性試験

(1) 代謝物 のラットを用いた急性経口投与毒性試験 (資料 No. 毒 B2)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2014 年

検体純度:

供試動物: Crl:CD(SD)系ラット、7 週齢、体重 雌 168.6~244.8 g、1 群 1~5 匹

観察期間: 14 日間

試験方法: 固定用量法 (2000 mg/kg 群: 1 匹、300 mg/kg 群: 1 匹、50 mg/kg 群: 5 匹)

投与方法: 検体に注射用水を加えて調製し、強制的に経口投与した。投与前日の夕方から投与約 4 時間後まで絶食期間を設けた。

観察・検査項目: 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。投与直前、投与 1、3、7 及び 14 日目に体重を測定した。死亡動物は発見後速やかに、また、生存動物については投与 14 日目にイソフルラン麻酔下で腹大動脈から放血し、病理解剖を行った。

結 果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌: 50、300、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌: 50 < LD ₅₀ ≤ 300
死亡開始及び終了時間	2000 mg/kg: 投与 1 時間以内 300 mg/kg: 投与 2 時間後まで
症状発現及び消失時間	2000 mg/kg 及び 300 mg/kg: 投与直後 から投与 1 時間以内 50 mg/kg: 投与直後から投与 3 日後
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	—
死亡例が認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌: 50

中毒症状は、2000 mg/kg 群では、投与直後に、流涎、よろめき歩行、腹臥位、側臥位及び口周囲汚染が観察され、投与 1 時間以内に死亡した。300 mg/kg 群では、投与直後に、腹臥位、側臥位、よろめき歩行、紅潮、回転、半眼、閉眼、散瞳及び皮温低下が観察され、投与 1 時間以内に死亡した。50 mg/kg 群では、投与直後に、流涎及び自発運動の低下が、投与 1 日目に肛門周囲汚染及び軟便、投与 2 日目に肛門周囲汚染がみられたが、投与 3 日目までに消失した。

50 mg/kg 群の体重に、検体投与による変化は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

<代謝物・混在物—急毒>

肉眼的病理検査は、2000 mg/kg 群では、腺胃の淡赤色領域(多数)、十二指腸～空腸に白色内容物が、300 mg/kg 群では、腺胃の淡赤色領域、十二指腸に白色内容物が観察されたが、50 mg/kg 群では、何れの動物にも異常は認められなかった。

③ 変異原性試験

(1) 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 No. 毒 B3)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 2015 年

検体純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 4 菌株 (TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、フェノバルビタール及び 5, 6-ベンゾフラボンで誘導したラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 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試験を実施した。試験は、プレインキュベーション法で行い、検体は注射用水に溶解した。本試験 1 回目の用量段階は、予備試験の結果から、S9 Mix の存在下では 100 µg/plate、非存在下では 200 µg/plate を最高用量に公比 2 で 6 用量 (S9 Mix の存在下 : 3.13、6.25、12.5、25、50、及び 100 µg/plate、S9 Mix の非存在下 : 6.25、12.5、25、50、100、及び 200 µg/plate) を設定した。本試験 2 回目の用量段階は、本試験 1 回目の結果から、S9 Mix の存在に関わらず、100 µg/plate を最高用量に公比 2 で 6 用量 (3.13、6.25、12.5、25、50、及び 100 µg/plate) を設定した。本試験 3 回目の用量段階は、本試験 1 及び 2 回目の結果から、S9 Mix の非存在下の TA1537 菌株のみ、100 µg/plate を最高用量に公比 2 で 6 用量 (3.13、6.25、12.5、25、50 及び 100 µg/plate) を設定した。陽性対照としては、ENNG¹、2NF²、9AA³、及び 2AA⁴ を用い、DMSO に溶解した。

判定基準 : 復帰コロニー数が溶媒対照の 2 倍以上に増加し、かつ、用量反応性又は再現性が認められる場合を陽性とした。

試験結果 : 結果を次頁以降の表に示す。検体は、S9 Mix の存在下で、TA1537 菌株の復帰変異コロニー数が増加し、再現性がみられた。本試験 2 回目において、S9 Mix の非存在下で TA1537 株の 12.5 及び 25 µg/plate で溶媒対照の 2 倍を超える復帰変異コロニー数がみられたが、本試験 3 回目で再現されなかったことから、偶発的なものと判断された。

陽性対照として用いた ENNG、2NF、9AA、及び 2AA では、すべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は、本試験条件下で復帰突然変異誘発性を示すと判断される。

¹ ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

² 2NF : 2-ニトロフルオレン

³ 9AA : 9-アミノアクリジン

⁴ 2AA : 2-アミノアントラセン

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

<代謝物・混在物-変異原>

復帰突然変異試験 1 回目 (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	-	-	94	8	26	14	20	
検体	6.25	-						
	12.5	-						
	25	-						
	50	-						
	100	-						
	200	-						
対照 (DMSO)	-	+	101	10	22	21	24	
検体	3.13	+						
	6.25	+						
	12.5	+						
	25	+						
	50	+						
	100	+						
陽性 対照	ENNG	2.0	-			369		
		3.0	-	588				
		5.0	-		283			
	2NF	1.0	-				167	
	9AA	80	-					325
	2AA	0.5	+				302	
		1.0	+	634				
		2.0	+		286			99
		10	+			918		

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン
 2NF : 2-ニトロフルオレン
 9AA : 9-アミノアクリジン
 2AA : 2-アミノアントラセン

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

<代謝物・混在物-変異原>

復帰突然変異試験 2 回目 (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	-	-	92	9	31	13	9	
検体	3.13	-						
	6.25	-						
	12.5	-						
	25	-						
	50	-						
	100	-						
対照 (DMSO)	-	+	100	11	29	23	15	
検体	3.13	+						
	6.25	+						
	12.5	+						
	25	+						
	50	+						
	100	+						
陽性 対照	ENNG	2.0	-			356		
		3.0	-	709				
		5.0	-		372			
	2NF	1.0	-				181	
	9AA	80	-					210
	2AA	0.5	+				325	
		1.0	+	670				
		2.0	+		236			
		10	+			923		92

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン
 2NF : 2-ニトロフルオレン
 9AA : 9-アミノアクリジン
 2AA : 2-アミノアントラセン

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

<代謝物・混在物-変異原>

復帰突然変異試験 3 回目 (表中の数値は 3 反復の平均値)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate	
			フレームシフト型	
			TA1537	
対照 (DMSO)	-	-	9	
検体	3.13	-		
	6.25	-		
	12.5	-		
	25	-		
	50	-		
	100	-		
陽性 対照	9AA	80	-	499

9AA : 9-アミノアクリジン

③ 変異原性試験

(2)代謝物

のマウスを用いた小核試験

(資料 No. 毒 B4)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:2015 年

検体純度 :

供試動物 : Crl:CD1(ICR)マウス、7 週齢、体重 32.7~38.1 g、1 群雄各 5 匹

試験期間 : 2014 年 9 月 29 日~2015 年 2 月 6 日

試験方法 : 検体を純水で希釈し、62.5、125 及び 250 mg/kg の投与量で 24 時間間隔にて 2 回強制経口投与した。溶媒対照群(陰性対照)には純水を同様に投与した。陽性対照としては、マイトマイシン C(MMC)を用い、1 回腹腔内投与した。最終投与 24 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髓を採取してスライドグラス上で乾燥させた後、メタノールにて固定し、骨髓標本を作製した。骨髓標本を 3%ギムザ液で染色し、光学顕微鏡下にて観察を行った。動物当たり 1 枚の標本について、4000 個の多染性赤血球(PCE)を観察し、小核を有する多染性赤血球数(MNPCE)を計数した。また、細胞毒性を調べるために、1000 個の赤血球を観察し、全赤血球に対する PCE の割合を算出した。

用量設定根拠:

判定基準: 統計学的解析の結果、少なくとも 1 つの検体投与群で小核を有する MNPCE の出現頻度が有意に増加し、さらに傾向検定により有意な用量相関性も認められれば陽性とした。一方、いずれの検体投与群においても小核を有する MNPCE の出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性とした。

試験結果 : 骨髓標本の観察結果を次頁の表に示す。

すべての検体投与群において、MNPCE の出現頻度に陰性対照群と比較して有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照の MMC は、MNPCE の出現頻度に陰性対照群と比較して有意な増加が認められた。

結論 : 以上の結果から、本試験条件下において、検体はマウスの骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

小核試験結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	MNPCE/PCE % (平均値)	PCE / (PCE+NCE) % (平均値)
24	陰性対照 (純水)	0	雄	5	0.250	52.1
	検体	62.5	雄	5		
		125	雄	5		
		250	雄	5		
24	陽性対照 (MMC)	0.5	雄	5	2.050***	47.6

Kastenbaum-Bowman 法 (検体投与群、片側) 及びカイ二乗検定 (陽性対照群、両側)

***: $P < 0.001$

MMC: マイトマイシン C

MNPCE/PCE: 多染性赤血球 4000 個中の小核を有する多染性赤血球の割合

PCE/(PCE+NCE): 全赤血球に対する多染性赤血球の割合

PCE: 多染性赤血球、NCE: 正染性赤血球、MNPCE: 小核を有する多染性赤血球数

③ 変異原性試験

(3) 代謝物 のトランスジェニックマウスを用いる遺伝子突然変異試験 (資料 No. 毒 B5)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2017 年

検体純度:

試験動物: CD₂-LacZ80/HazfBRマウス (MutaTM Mouse)、1 群雄各 6 匹、開始時 9 週齢

試験期間: 2017 年 8 月 30 日～2017 年 9 月 29 日

試験方法: 検体を注射用水に混和し、5.00、10.0、20.0 及び 40.0 mg/kg/day の投与量で 1 日 1 回、28 日間強制経口投与した。溶媒対照群には注射用水を同様に投与した。陽性対照としては、*N*-エチル-*N*-ニトロソウレア (ENU) を用い、1 日 1 回、2 日間腹腔内投与した。最終投与後 3 日 (陽性対照群は最終投与後 10 日) に動物を安楽死させた。いずれの群においても死亡又は瀕死動物が認められなかったため、10.0、20.0 及び 40.0 mg/kg/day の 3 用量及び対照群について、各動物から肝臓及び腺胃を摘出して凍結した。各群 5 匹について凍結臓器から DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングを行った後、宿主大腸菌に感染させて表現型の変化 (レポーター遺伝子: *lacZ*) により遺伝子突然変異を検出した。出現した突然変異ブランク数を総ブランク数で除して、突然変異体頻度を算出した。

用量設定根拠:

判定基準: 統計解析を行い溶媒対照群と比べて、有意に突然変異体頻度が増加した場合を陽性とした。ただし、最終的な判定は、用量依存性及び試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

試験結果: 突然変異体頻度の算出結果を次頁の表に示す。溶媒対照及び陽性対照を含むすべての投与群において、臨床症状はみられなかった。

検体では、いずれの投与群においても腺胃における突然変異体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。肝臓における突然変異体頻度は、40.0 mg/kg/day で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が、その値 ($47.8 \pm 2.7 \times 10^{-6}$) は試験施設における溶媒対照群の背景データの範囲 (Min~Max: $19.0 \sim 95.0 \times 10^{-6}$) 内かつ、その平均値 (50.6×10^{-6}) より低い値であった。また、明確な用量依存性も認められなかった。したがって、生物学的に意味のある増加ではないと判断した。

一方、陽性対照として用いた ENU では、突然変異体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、検体の遺伝子突然変異誘発性は陰性と判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

<代謝物・混在物－変異原>

突然変異体頻度算出結果

薬物	投与量 (mg/kg/day)	性	観察 動物数	突然変異体頻度($\times 10^{-6}$) (平均値 \pm SD)	
				肝臓	腺胃
陰性対照 (注射用水)	0	雄	5	33.1 \pm 6.8	43.7 \pm 12.1
検体	10.0	雄	5		
	20.0	雄	5		
	40.0	雄	5		
陽性対照 (ENU)	100	雄	5	107.2 [#] \pm 20.4	369.0 [#] \pm 28.1

Dunnett の多重比較検定(両側)*: $P < 0.05$

Student の t 検定(両側)#: $P < 0.05$

ENU: *N*-エチル-*N*-ニトロソウレア

④ 28日間反復経口投与毒性試験

(1)代謝物 のラットを用いた飼料混入投与による反復経口毒性試験(資料 No.毒 B6)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:2017年

検体純度:

供試動物: Crl:CD(SD)ラット、1群雌雄各5匹、開始時6週齢、
群分け時体重 雄 222~243 g、雌 159~175 g

投与期間: 28日間(2017年8月15日~2017年9月11日)

投与方法: 検体を0、100、300、600 ppmの濃度で飼料に混入し、28日間にわたって毎日摂食させた。検体を混入した飼料を2週毎に調製し、給餌まで室温で保存した。

投与量設定根拠:

試験項目及び結果:

一般状態及び死亡率;各動物の一般状態を毎日2回観察した。また、詳細な一般状態観察を入荷時及び毎週1回行った。

投与期間中、雌雄とも死亡動物は認められず、一般状態の変化及び詳細観察において検体投与に伴う変化も認められなかった。

体重変化;各動物の体重を投与1(投与開始日)、8、15、22及び28日に測定し、投与1~28日の体重増加量を算出した。

雄では、いずれの測定日においても、検体投与群と対照群との間で有意な差は認められなかった。

雌では、100及び600 ppm群で投与28日の体重値が有意な低値を示し、投与期間中の体重増加量がすべての検体投与群で有意な低値を示した。しかし、投与用量との関連性が認められないこと、背景データ(体重:205~261 g、体重増加量:49~94 g)の範囲内

で

あることから、毒性影響ではないと判断した。

体重測定結果を次頁表に示す。

項目	検査 時期 (日)	投与量(ppm)					
		雄			雌		
		100	300	600	100	300	600
平均 体重 (g)	1						
	8						
	15						
	22						
	28						
体重増加量 (g)							

表中の数値は対照群に対する変動率(%)

Bartlett-Dunnnett/Steel 検定(両側) ↓: P<0.05、↓↓: P<0.01

摂餌量: 各動物の餌重量について、投与開始日(投与1日目)以降、毎週1回測定し(投与8、15、22及び28日目)、測定日の重量差から平均1日摂餌量(g/day)を算出した。

雄では、検体投与に伴う変化はみられなかった。

雌では、600 ppm 群のすべての測定期間の平均1日摂餌量が、100及び300 ppm 群の投与8~15日及び投与22~28日の平均1日摂餌量が、いずれも対照群と比べ有意な低値を示した。しかし、投与用量との関連性が認められないこと、今回の対照群の値が背景データ(投与1-8日:16~18g、投与8-15日:17~18g、投与15-22日:17~18g、投与22-28日:15~17g)の上限又はわずかに超える範囲で推移し

、偶発的に対照群の摂餌量が高値であったと考えられることから、毒性影響ではないと判断した。

摂餌量測定結果

項目	検査 時期 (日)	投与量(ppm)					
		雄			雌		
		100	300	600	100	300	600
平均1日 摂餌量 (g)	1-8						
	8-15						
	15-22						
	22-28						

表中の数値は対照群に対する変動率(%)

Bartlett-Dunnnett/Steel 検定(両側) ↓: P<0.05、↓↓: P<0.01

検体摂取量; 投与期間中の平均検体摂取量は以下のとおりであった。

投与量(ppm)		100	300	600
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄			
	雌			

血液学的検査; 全動物について、剖検日にイソフルラン麻酔下で腹大動脈から採血し、以下の項目の測定を行った。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度、網赤血球率、網赤血球数 (Reti)、血小板数、白血球数、白血球百分率 (好中球数、リンパ球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、大型非染色球数)、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

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。

項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	100	300	600	100	300	600
MCV						
MCH						
Reti						

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

Bartlett-Dunnnett/Steel 検定 (両側) ↓ : P<0.05

600 ppm 群の雌で MCV 及び MCH が有意な低値を示したが、軽微な変化であり、背景データ (MCV: 53.8~58.0 μm^3 , MCH: 19.1~20.8 pg) の範囲内であることから、毒性影響ではないと判断した。

また、100 ppm 群の雌でも MCH が、300 ppm 群の雄で Reti が有意な低値を示したが、投与用量との関連性が認められなかったため、偶発的な変化と判断した。

血液生化学的検査; 血液学的検査で使用した血液から得られた血清を用い、以下の項目の測定を行った。

総蛋白、血糖、中性脂肪、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、総ビリルビン、総胆汁酸、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、 γ -グルタミルトランスぺプチターゼ、カルシウム、無機リン、ナトリウム、カリウム、塩素、A/G、アルブミン濃度

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。

項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	100	300	600	100	300	600
総胆汁酸						
塩素						

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

Bartlett-Dunnnett/Steel 検定 (両側) ↑ ↓ : P<0.05

300 及び 600 ppm 群の雌で総胆汁酸の有意な低値がみられた。しかし、総胆汁酸の低値方向への変動には毒性学的な意義は低く、また、他の検査項目には変化が認められなかったため検体投与の影響ではないと判断した。

その他、100 ppm 群の雌で塩素が有意な高値を示したが、投与量との関連性が認められなかったため、偶発的な変化と判断した。

尿検査; 投与最終週に給餌・給水条件下で新鮮尿及び 24 時間尿を採取し、以下の項目の測定を行った。

pH、潜血、ケトン体、糖、蛋白、ビリルビン、ウロビリノーゲン、尿量、色調、尿浸透圧

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。

項目	投与量(ppm)							
	雄				雌			
	0	100	300	600	0	100	300	600
検査動物数								
尿 pH 8								
8.5								
≥9								

Wilcoxon 検定(両側)*: P<0.05

300 ppm 群の雌で、尿 pH が有意な変化を示したが、変化の程度はわずかなもので、投与量との関連性が認められないため偶発的な変化と判断した。その他の項目には、検体投与に関連のある変化は認められなかった。

機能検査; 投与最終週に全動物について、以下の項目を測定した。

反応性検査(聴覚反応、接近反応、触覚反応、痛覚反応、瞳孔反応)、握力、自発運動量測定

各測定項目に検体投与に関連のある変化は認められなかった。

臓器重量; 試験終了時の全生存動物を対象として以下の臓器重量を測定し、対体重比を算出した。

脳、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む)、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、精巣上体、精囊(凝固腺含む)、前立腺(尿道を含む)、卵巣、子宮

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。

項目	投与量 (ppm)					
	雄			雌		
	100	300	600	100	300	600
剖検時体重						
心臓	重量					
	対体重比					
肝臓	重量					
	対体重比					
腎臓	重量					
	対体重比					
卵巣	重量					
	対体重比					
甲状腺	重量					
	対体重比					

表中の数値は対照群に対する変動率 (%)

Bartlett-Dunnett/Steel 検定(両側) ↑ ↓ : P<0.05、↓ ↓ : P<0.01

600 ppm 群の雌で、甲状腺の対体重比(相対重量)が対照群と比べ統計学的に有意な高値を示したが(対照群:0.006 %、600 ppm 群:0.009 %)、背景データ(0.006%~0.010%)の範囲内の変動であり、病理組織学的検査では検体投与に関連する異常所見が認められないことから、検体投与の影響ではないと判断した。また、すべての検体投与群の雌で、心臓重量が有意な低値を示し、100 ppm 群の雌で、肝臓、腎臓及び卵巣の重量が有意な低値を示したが、いずれも対体重比には変化が認められず、剖検時の体重の低値に起因した変化と考えられた。また、いずれの器官にも病理組織学的検査では検体投与に関連する異常所見が認められないことから、臓器重量の変化は検体投与の影響ではないと判断した。雄では、対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目はなかった。

肉眼的病理検査;試験終了時の全生存動物を対象として剖検を行った。

対照群及び投与群において認められた変化を下表に示す。

性別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	100	300	600	0	100	300	600
臓器	所見 \ 検査動物数								
肺	褐色斑点								
肝臓	嚢胞								
	肝横隔膜結節								
腎臓	嚢胞								
	陥凹巣								
子宮	内腔拡張								

表中の数値は匹数

検体投与に関連のある変化は認められなかった。いずれの所見も、単発性の発生であり自然発生性の変化と考えられた。

組織病理学的検査;対照群及び高用量群の全生存動物を対象として、以下の組織についてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、鏡検した。雌雄各群 2 例については、腎臓の PAS 反応標本を作製し、鏡検した。

肺(気管支を含む)、心臓、大動脈(胸部)、腎臓、肝臓、胸腺、脾臓、膵臓、リンパ節(頸部、腸間膜)、副腎、唾液腺(舌下腺、下顎腺)、下垂体、脳、脊髄(頸髄、胸髄、腰髄)、胃、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、精巣、精巣上体、精嚢(凝固腺を含む)、前立腺(尿道を含む)、卵巣、卵管、子宮、膣、膀胱、眼球(視神経を含む)、ハーダー腺、骨格筋(大腿部)、坐骨神経、皮膚、乳腺、気管、食道、甲状腺、上皮小体、胸骨、大腿骨、骨髓(胸骨、大腿骨)

対照群及び 600 ppm 群において認められた変化を下表に示す。

性別		雄				雌			
投与量(ppm)		0	100	300	600	0	100	300	600
臓器	所見 \ 検査動物数								
肺	マクロファージ集簇								
膵臓	炎症性変化								
肝臓	血管拡張								
	肝細胞の脂肪化								
	小肉芽腫								
	肝横隔膜結節								
腎臓	嚢胞								
	再生尿細管								
	炎症性変化								
精巣上体	炎症性変化								
前立腺	炎症性変化								
下垂体	嚢胞								

Fisher exact test で有意差なし

表中の数値は匹数

検体投与に関連のある変化は認められなかった。所見は、対照群においても認められる変化または単発性の変化であり、自然発生性の変化と考えられた。

以上、検体のラットに対する 28 日間反復混餌投与した結果、600 ppm 群の雌で摂餌量及び体重の低値が認められたが、いずれも被験物質投与による毒性影響とは判断できなかったため、無毒性量(NOEL)は、雌雄とも 600 ppm(雄:41 mg/kg/day、雌:45 mg/kg/day)以上であると判断される。

3. 製剤を用いた試験成績

① 急性経口毒性(ベフラン液剤 25)

(1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No. 毒 C1)

試験実施機関:

報告書作成年:1981年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 25%液剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 25 %

界面活性剤 5 %

水 70 %

試験動物 : SD系ラット、5週齢(投与時)

体重:雄 89~108 g、雌 82~95 g、一群雌雄各 10匹

試験期間 : 14日間観察

投与方法 : 検体は生理食塩水で調製し、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与前16時間は絶食した。

観察項目 : 一般状態および生死を14日間観察した。体重は全生存動物について投与直前および投与後は毎日測定した。死亡動物は死亡時に、生存動物は観察期間終了時に解剖し、肉眼的病理検査を行なった。

結 果 :

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌雄とも 0、594.8、684.0、786.6、 904.6、1040.3、1196.4、 1375.8、1582.2、1819.5
LD ₅₀ (mg/kg)	雄: 980.0 雌: 1050.0
死亡開始および終了時間	投与1時間目に開始し、 投与後8日目に終了
症状発現および消失時間	投与直後に発現し、 試験終了時まで消失せず
死亡例が認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄とも 594.8

中毒症状として、自発運動増加、流涎、流涙、沈鬱、起立不能、自発運動低下、うずくまり、消瘦が認められなかった。

体重の増加抑制が786.6 mg/kg以上の投与量で認められた。

剖検では、死亡動物に腎臓の退色および腫大、肝臓の退色および萎縮、消化管内に水様物の充満、胃および腸の充出血および脾臓の萎縮が見られた。生存動物には変化が見られなかった。

(2) マウスにおける急性経口毒性試験

(資料 No. 毒 C2)

試験実施機関:

報告書作成年:1981 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 25%液剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 25 %
界面活性剤 5 %
水 70 %

試験動物 : ICR 系マウス、5 週齢(投与時)

体重:雄 22.6~27.7 g、雌 17.3~20.8 g、一群雌雄各 10 匹

試験期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体は生理食塩水で調製し、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与前 16 時間は絶食した。

観察項目 : 一般状態および生死を 14 日間観察した。体重は全生存動物について投与直前および投与後は毎日測定した。死亡動物は死亡時に、生存動物は観察期間終了時に解剖し、肉眼的病理検査を行なった。

結 果 :

投与方法	経 口
投 与 量 (mg/kg)	雌雄とも 0、400.0、520.0、676.0、 878.8、1142.4、1485.2、 1930.7、2509.9
LD ₅₀ (mg/kg)	雄: 1310.0 雌: 950.0
死亡開始および終了時間	投与 1 時間目に開始し、 投与後 6 日目に終了
症状発現および消失時間	投与直後に発現し、 投与後 7 日目に終了
死亡例が認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄とも 520.0

中毒症状として、自発運動の抑制、一過性の飲水量減少、腹部膨満、むくみ。

体重に投与による影響は生存動物については明らかではなかった。

剖検では、死亡動物に腎臓の退色および腫大、肝臓の退色および萎縮、胃および腸の充出血が見られた。生存動物の 5 例にも軽度の腎臓の退色および腫大が見られた。

② 急性経皮毒性(ベフラン液剤 25)

ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 No. 毒 C3)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:1985 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 25%液剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 25 %

界面活性剤 5 %

水 70 %

試験動物 : SD 系ラット、雄および雌(週齢の記載なし)

体重:雄 208~242 g、雌 202~230 g、一群雌雄各 10 匹

試験期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体を刈毛した背部に塗布し、ガーゼで覆った上から粘着テープで固定し、24 時間閉塞塗布した。

観察項目 : 一般状態および生死を 14 日間観察した。体重は全動物について投与直前、投与 8 日目および 15 日目に測定した。試験終了時に全動物を解剖し、肉眼的病理検査を行なった。

結 果 :

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	雌雄とも 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄とも > 2000
死亡開始および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	投与後 1 時間以内に発現し、 投与 10 日目に消失
死亡例が認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄とも 2000

中毒症状として、鼻周囲の汚れが投与後 1 時間以内から投与 3 日目まで全例に見られた。また投与部位の紅斑が投与 7 日目から 10 日目まで見られた。

体重に投与による影響は見られなかった。

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。

③ 急性吸入毒性(ベフラン液剤 25)

ラットにおける急性吸入毒性試験

(資料 No. 毒 C4)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:1986 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 25%液剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 25 %

界面活性剤 5 %

水 70 %

試験動物 : CFHB WISTAR 系ラット、雄および雌(週齢の記載なし)

体重:雄 172~210 g、雌 186~218 g、一群雌雄各 5 匹

試験期間 : 14 日間観察

暴露方法 : エアゾル発生装置を用いてミストを発生させ、0.038、0.058、0.145、0.295、1.43 mg/L の濃度で4時間全身暴露した。暴露空気をガラスフィルターを用いて捕集し、重量測定法により実際濃度を求めた。

実際濃度(mg/L)	0.038	0.058	0.145	0.295	1.43
粒子径分布(%) ¹⁾					
> 5.5 (μm)	4.7	11.0	10.4	13.6	9.65
3.5~5.5	9.0	12.8	9.7	5.9	7.25
2.0~3.5	20.5	24.0	28.3	29.1	32.6
0.3~2.0	18.6	20.4	31.1	45.9	39.1
< 0.3	47.2	32.0	20.7	5.7	11.5
空気力学的質量中位径(μm)	0.34	1.72	2.04	2.43	2.25
呼吸可能な粒子(<5.5μm)の割合(%)	95.3	89.0	89.6	86.4	90.4
チャンバー容積(L)	130				
チャンバー内通気量(L/分)	25				
暴露条件	ミスト 4 時間 全身暴露				

1) 重量測定法により 2 回測定した平均

観察項目 : 暴露中および暴露後、一般状態および生死を 14 日間観察した。体重は全動物について暴露日およびその後は毎日測定した。試験終了時に全動物を解剖し、肉眼的病理検査を行なった。

結 果 :

投与方法	吸 入
暴露濃度 (mg/L)	雌雄とも 0.038、0.058、0.145、 0.295、1.43
LC ₅₀ (mg/L)	0.073 mg/L
死亡開始および終了時間	暴露終了 1 時間以内に開始し、 暴露後 13 日目に終了
症状発現および消失時間	暴露開始後まもなく発現し、 暴露後 14 日目にも消失せず
毒性徴候が認められなかった 最高暴露濃度 (mg/L)	雌雄とも 0.038
死亡例が認められなかった 最高暴露濃度 (mg/L)	雌雄とも 0.038

中毒症状として、眼瞼の完全または部分的閉鎖、唾液分泌過多、異常呼吸、鼻汁、息切れおよび流涙。

体重増加抑制が見られた。

剖検所見では、死亡動物に肺のうっ血が、生存動物の大半に肺の蒼白および／または腫脹が認められた。

④ 皮膚一次刺激性(ベフラン液剤 25)

ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 No. 毒 C5)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:1985 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 25%液剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 25 %

界面活性剤 5 %

水 70 %

試験動物 : ニュージーランド白色種ウサギ、雌

体重: 2.4 ~ 2.9 kg、一群 6 匹

試験期間 : 14 日間観察

投与方法 : 動物の背中を刈毛し、2.5 cm 四方のリント布に検体 0.5 mL を浸み込ませて半閉塞塗布した。塗布時間は 4 時間とし、その後は皮膚に残った検体は微温水により除去した。

観察項目 : 塗布終了後 1 時間、24 時間、48 時間、72 時間、7 日間および 14 日間後に塗布部位の刺激性変化(紅班、痂皮、浮腫)を判定し、「B.S.950 Part 1」に従って評点した。

結果 : 観察した刺激性変化の結果は以下の表のとおりである。

項目	最高 評点	投与後の時間					
		1時間	24 時間	48 時間	72 時間	7 日間	14 日間
紅班	4	1.00	1.50	1.50	1.50	2.67	3.67
浮腫	4	0.20	0.20	0.50	0.50	0.67	1.16
合計	8	1.20	1.70	2.00	2.00	3.34	4.83

注) 表の数値は 6 匹の平均値である。

試験終了時までいずれの動物にも皮膚反応が認められた。

以上の結果から、本検体はウサギの皮膚に対して中等度の刺激性を有するものと判断される。

⑤ 眼一次刺激性(ベフラン液剤 25)

(1) ウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料 No. 毒 C6)

試験実施機関:

報告書作成年:1982 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 25%液剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 25 %
界面活性剤 5 %
水 70 %

試験動物 : ニュージーランド白色種ウサギ、雄 3 ヶ月齢

体重: 2.06 ~ 2.32 kg、非洗眼群一群 6 匹、洗眼群一群 3 匹

試験期間 : 13 日間観察

投与方法 : 検体 0.1 mL を片眼の結膜嚢内に投与し、眼瞼を閉じて 1 秒間閉鎖して保持した。洗眼群の 3 匹は投与 20~30 秒後から微温水で 1 分間洗眼した。

観察項目 : 投与後 1、2、3、4、7、10 および 13 日後に、EPA ガイドラインに従って角膜、虹彩、結膜の発赤、浮腫および分泌物を採点した。

結果 : 観察した刺激性変化の結果は以下の表のとおりである。

非洗眼群

動物	項目		最高 評点	投与後の時間						
				1 日	2 日	3 日	4 日	7 日	10 日	13 日
1	角膜混濁	程度	4	1	1	2	2	2	3	3
		面積	4	4	4	4	0	4	3	3
	虹彩		2	1	1	1	1	1	1	1
	結膜	発赤	3	3	3	3	2	3	2	2
		浮腫	4	2	1	1	1	1	1	1
		分泌物	3	2	2	2	2	2	1	1
2	角膜混濁	程度	4	3	3	4	4	4	4	4
		面積	4	4	4	4	4	4	4	4
	虹彩		2	2	2	2	2	0	0	0
	結膜	発赤	3	3	3	3	2	3	3	2
		浮腫	4	2	1	2	1	2	1	1
		分泌物	3	2	2	2	3	1	2	0
3	角膜混濁	程度	4	3	1	2	2	4	4	4
		面積	4	4	0	4	4	4	4	4
	虹彩		2	2	1	1	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	3	3	3	2	3	3	2
		浮腫	4	2	1	1	1	2	1	1
		分泌物	3	2	1	1	1	2	2	2

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

(ベフラン液剤 25-急毒・刺激・感作性)

動物	項目		最高 評点	投与後の時間						
				1日	2日	3日	4日	7日	10日	13日
4	角膜混濁	程度	4	3	1	2	3	4	4	4
		面積	4	4	4	4	4	4	4	4
	虹彩		2	1	1	1	1	0	0	0
	結膜	発赤	3	3	3	3	3	3	3	3
		浮腫	4	2	2	1	1	1	2	1
		分泌物	3	2	1	1	1	2	2	2
5	角膜混濁	程度	4	3	4	4	4	4	4	4
		面積	4	3	4	4	4	4	4	4
	虹彩		2	1	2	2	2	0	0	0
	結膜	発赤	3	3	3	3	3	3	3	2
		浮腫	4	2	1	1	1	1	1	1
		分泌物	3	2	2	1	2	1	1	0
6	角膜混濁	程度	4	2	1	1	1	4	4	3
		面積	4	3	3	3	4	4	4	4
	虹彩		2	1	1	1	1	0	0	0
	結膜	発赤	3	3	3	1	1	3	3	3
		浮腫	4	2	2	1	2	2	2	1
		分泌物	3	2	1	1	2	1	2	1
合計			660	399	310	397	387	517	520	482

洗眼群

群	項目		最高 評点	投与後の時間						
				1日	2日	3日	4日	7日	10日	13日
洗 浄 群	角膜混濁	程度	4	1.7	1.0	1.3	1.7	1.3	1.3	1.3
		面積	4	2.0	1.3	1.3	1.3	1.3	1.0	1.3
	虹彩		2	1.3	1.0	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7
	結膜	発赤	3	3.0	2.7	3.0	2.7	1.7	1.7	1.0
		浮腫	4	2.3	1.0	0.0	0.7	0.3	0.3	0.3
		分泌物	3	2.0	1.7	1.0	1.0	1.0	0.7	1.0
	合計			110	39.7	30.7	34.7	34.7	31.0	28.7

表中の数値は3匹の平均値

非洗眼群では投与後1日目から角膜混濁、虹彩の充血、結膜の発赤と浮腫および分泌物が全例に見られ、投与後13日目においても消失しなかった。洗眼群では同様の所見が見られたが非洗眼群に比べて軽度であった。

以上の結果から、検体はウサギの眼粘膜に対して可逆性の重度の刺激性を有するものと考えられる。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈ベフラン液剤 25-急毒・刺激・感作性〉

(2) ウサギを用いた眼一次刺激性試験(100, 300, 1000 倍希釈液) (資料 No. 毒 C7)

試験実施機関:

報告書作成年:1982 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 25%液剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 25 %

界面活性剤 5 %

水 70 %

試験動物: 日本白色種ウサギ、雄 2.5 ヶ月齢

体重: 2.39 ~ 2.77 kg、一群 2 匹

試験期間: 14 日間観察

投与方法: 検体の各蒸留水希釈液 0.1 mL を片眼の結膜嚢内に投与し、眼瞼を閉じて 5 秒間保持した。

観察項目: 投与直後、投与 30 分後、1、3、6 時間後、1、2、3、4、5、6、7、10 および 14 日後に、角膜、虹彩、結膜の発赤、浮腫および分泌物を Draize の方法で採点した。

結果: 観察した刺激性変化の結果は以下の表のとおりである。

群	項目		最高 評点	投与後の時間						
				1 日	2 日	3 日	4 日	7 日	10 日	14 日
1000 倍 希釈液	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0	0	0	0
	合計		110	0	0	0	0	0	0	0
300 倍 希釈液	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	1	1	1	1	0.5	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	1	0	0	0	0	0	0
	合計		110	4	2	2	2	2	1	0
100 倍 希釈液	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0
	虹彩		2	0	1	1	1	0.5	0	0
	結膜	発赤	3	2	1.5	2	2	1	0.5	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	1	0	0.5	1	1	0	0
	合計		110	6	8	10	11	6.5	1	0

表中の数値は 2 匹の平均値

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈 ベフラン液剤 25－急毒・刺激・感作性 〉

1000 倍希釈液では、投与による影響は見られなかった。300 倍希釈液では、両動物ともに投与直後から 6 時間後まで眼瞼反応が低下し、10 日目まで結膜および瞬膜の軽度の充血と分泌物が見られた。100 倍希釈液では、投与後 6 時間まで眼瞼閉鎖、角膜表層部の充血が見られ、1 日目から 10 日目まで結膜および瞬膜の軽度の充血と分泌物が見られた。

以上の結果から、検体は 300 倍希釈以下の希釈倍率でウサギの眼粘膜に対して軽度の刺激性を有するものと考えられる。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈 ベフラン液剤 25－急毒・刺激・感作性 〉

(3) ウサギを用いた眼一次刺激性試験(250 倍希釈液) (資料 No. 毒 C8)

試験実施機関: (株) ポゾリサーチセンター

[GLP 対応]

報告書作成年: 1991 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 25%液剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 25 %

界面活性剤 5 %

水 70 %

試験動物 : 日本白色種ウサギ、雌 14 週齢(投与時)

体重: 2.55 ~ 3.00 kg、一群 6 匹

試験期間 : 3 日間観察

投与方法 : 検体 0.1 mL を片眼の結膜嚢内に投与し、眼瞼を閉じて 1 秒間保持した。

観察項目 : 投与直後、投与 1、24、48 および 72 時間後に、角膜、虹彩、結膜の発赤、浮腫について農林水産省 59 農蚕第 4200 号(昭和 60 年 1 月 28 日)に従って評点し、Federal Register 37, 8534 (1972 年)に従って刺激性の程度を区分した。

結果 : 観察した刺激性変化の結果は以下の表のとおりである。

群	項目		最高 評点	投与後の時間			
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
250 倍 希釈液	角膜混濁	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	0.8	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0
	合計*		104	0	1.6	0	0

表中の数値は 6 匹の平均値

検体の 250 倍希釈液ではウサギの眼に対して結膜に評点 1 の発赤のみであった。

以上の結果から、検体の 250 倍希釈液はウサギの眼粘膜に対して刺激性を有さないものと考えられる。

⑥ 皮膚感作性(ベフラン液剤 25)

モルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 No. 毒 C9)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:1989 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 25%液剤
組成: イミノクタジン酢酸塩 25 %
界面活性剤 5 %
水 70 %

試験動物 : ハートレー系モルモット(Dunkin-Hartley)、雌 6~8 週齢(感作開始時)
体重 373~497 g(感作開始時)、試験群 20 匹および対照群 20 匹

試験期間 : 惹起後 48 時間観察

投与方法 : [Maximization 法]

投与量設定根拠;

感 作 : 各動物の投与部位を剪毛し、試験群の動物には、検体の 0.1 %水溶液、検体の 0.2%水溶液と Freund の Complete Adjuvant の 1 対 1 乳化液、Freund の Complete Adjuvant の蒸留水 50%乳化液を 0.1 ml ずつ 20 匹の動物に皮内注射し、対照群の動物には、Freund の Complete Adjuvant の蒸留水 50%乳化液と蒸留水を 0.1 ml ずつ 20 匹の動物に皮内注射した。皮内注射の 7 日後、各動物の皮内注射部位周囲の毛を剪毛し、試験群の動物では検体の 30%水溶液を飽和させた 2×2cm の Watman No.3 のろ紙を注射部位に貼付し、対照群の動物には蒸留水を貼付した。

惹 起 : 感作の 14 日後に各動物の投与部位を剪毛し、全動物の左背側部に検体の原液(100%)を飽和させた 2×2cm の Watman No.3 のろ紙を、右背側部には検体の 50%水溶液を飽和させたろ紙を 24 時間貼付した。

観察項目 : 惹起暴露終了後、24 および 48 時間目に塗布部位の紅斑および浮腫の有無を肉眼的に観察し、Magnusson & Kligman の方法で下記の基準に従って評点した。

皮膚反応率(%)	等級	分類
0 ~ 8	1	極軽度
9 ~ 28	2	軽度
29 ~ 64	3	中等度
65 ~ 80	4	強度
81 ~ 100	5	極強度

結果 : 各観察時間における感作性変化が認められた動物数を以下に示す。

群				供試動物数	反応動物数										陽性率 (%)
					24 時間後					48 時間後					
					皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計	
0	1	2	3	0	1	2	3								
検体	検体*4	30%検体	100%検体	20	18	2	0	0	2/20	18	2	0	0	2/20	15
			50%検体		20	0	0	0	0/20	20	1	0	0	1/20	
溶媒対照	溶媒*5	蒸留水	100%検体	19	19	0	0	0	0/19	20	0	0	0	0/19	0
			50%検体		19	0	0	0	0/19	20	0	0	0	0/19	
陽性対照	0.1% DNCB	1.0% DNCB	0.05% DNCB	10	3	6	1	0	7/10	5	5	0	0	5/10	70
			0.025% DNCB		5	4	1	0	5/10	5	5	0	0	5/10	50

*1: 0.1 ml 皮内注射

*2: 局所貼付

*3: 各濃度を同一動物の異なる部位に適用

*4: 1匹につき、Freundの Complete Adjuvant の50%水乳化液、検体0.1%水溶液、検体0.2%と Freund の Complete Adjuvant の等量混合液で計3箇所にて投与

*5: 1匹につき、Freund の Complete Adjuvant の50%水乳化液を2箇所、蒸留水を1箇所にて投与

検体処理群において、20匹中3匹に皮膚反応が見られた。また、陽性対照群では高い陽性動物数であった。

以上の結果から、検体の皮膚感作性は陽性であると判断される。

① 皮膚一次刺激性(ベフラン塗布剤 3)

ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 No.毒 C10)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:1992 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 3%塗布剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 3 %

水溶性樹脂、色素、有機溶剤 97 %

試験動物 : 日本白色種ウサギ、雌 14 週齢(投与時)

体重: 2.81 ~ 3.23 kg、1 群 6 匹

試験期間 : 3 日間観察

投与方法 : 刈毛した動物の背中に 2.5 cm 四方の lint 布に検体 0.5 mL を浸み込ませて半閉塞塗布した。塗布時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は蒸留水により除去した。

観察項目 : 塗布終了後 1 時間、24 時間、48 時間および 72 時間後に塗布部位の刺激性変化(紅班、痂皮、浮腫)を判定し、Draize 法に従って評点した。

結 果 : 観察した刺激性変化の結果は以下の表のとおりである。

項目	最高評点	投与後の時間			
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
紅班	4	0	0	0	0
浮腫	4	0	0	0	0
合計	8	0	0	0	0

注) 表の数値は 6 匹の平均値である。

試験終了時までいずれの動物にも皮膚反応が認められなかった。

以上の結果から、本検体はウサギの皮膚に対して刺激性を有さないものと判断される。

② 眼一次刺激性(ベフラン塗布剤 3)

(1) ウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料 No 毒 C11)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:1992 年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 3%塗布剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 3%

水溶性樹脂、色素、有機溶剤 97%

試験動物: 日本白色種ウサギ、雌 14 週齢(投与時)

体重: 2.66 ~ 3.23 kg、非洗眼群 1 群 6 匹、洗眼群 1 群 3 匹

試験期間: 8 日間観察

投与方法: 検体 0.1 mL を片眼の結膜嚢内に投与し、眼瞼を閉じて 1 秒間保持した。洗眼群の 3 匹は投与 2~3 分後に 200 mL の微温湯で 1 分間洗眼した。

観察項目: 投与後 1 時間目、24 時間目、その後は 1 日 1 回 8 日目まで農林水産省 59 農蚕第 4200 号(昭和 60 年 1 月 28 日)の評価表に従って角膜、虹彩、結膜の発赤、浮腫および分泌物を評点し、「Federal Register 37, 8534 (1972 年)」に従って刺激性の程度を区分した。

結果: 観察した刺激性変化の結果は以下の表のとおりである。

非洗眼群

動物	項目		最高 評点	投与後の時間								
				1 時間	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日	7 日	8 日
1	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	0	1	1	2	2	1	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	0	1	1	2	2	1	1	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	2	2	2	2	1	1	1	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

(ベフラン塗布剤 3-急毒・刺激・感作性)

動物	項目		最高 評点	投与後の時間								
				1時間	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日
4	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	2	2	2	2	2	1	1	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	0	2	2	2	2	2	1	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	0	2	1	1	1	1	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計*			660	4	20	18	22	22	16	8	4	0

洗眼群

項目		最高 評点	投与後の時間								
			1時間	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日
角膜混濁	程度	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	面積	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
虹彩		2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
結膜	発赤	3	0.0	0.7	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	浮腫	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	分泌物	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
合計*		110	0.0	1.4	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表中の数値は3匹の平均値

非洗眼群では、全例で評点1~2の結膜発赤が塗布後6~8日目まで持続的に認められた。洗眼群では、適用後24あるいは48時間に評点1の結膜発赤が2例に観察された。

以上の結果から、検体はウサギの眼粘膜に対して刺激性を有するが、洗眼効果を認めるものと考えられる。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈 ベフラン塗布剤 3-急毒・刺激・感作性 〉

(2) ウサギを用いた眼一次刺激性試験(15倍希釈液) (資料 No.毒 C12)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:1992年

検体の純度: イミノクタジン酢酸塩 3%塗布剤

組成: イミノクタジン酢酸塩 3%

水溶性樹脂、色素、有機溶剤 97%

試験動物: 日本白色種ウサギ、雌 14 週齢(投与時)

体重: 2.62 ~ 2.96 kg、非洗眼群一群 6 匹、洗眼群一群 3 匹

試験期間: 3 日間観察

投与方法: 検体の 15 倍希釈液 0.1 mL を片眼の結膜嚢内に投与し、眼瞼を閉じて 1 秒間保持した。洗眼群の 3 匹は投与 2~3 分後に 200 mL の微温湯で 1 分間洗眼した。

観察項目: 投与後 1 時間、24 時間 48 時間および 72 時間に農林水産省 59 農蚕第 4200 号(昭和 60 年 1 月 28 日)の評価表に従って角膜、虹彩、結膜の発赤、浮腫および分泌物を評点し、「Federal Register 37, 8534 (1972 年)」従って刺激性の程度を区分した。また、眼におけるその他の反応および一般状態は、投与 6 時間後までと、その後は 1 日 1 回観察した。

結果: 観察した刺激性変化の結果は以下の表のとおりである。

非洗眼群

動物	項目		最高 評点	投与後の時間			
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
1	角膜 混濁	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	1	1	0
		浮腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
2	角膜 混濁	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	1	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈 ペフラン塗布剤 3-急毒・刺激・感作性 〉

動物	項目		最高 評点	投与後の時間			
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
3	角膜 混濁	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	1	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
4	角膜 混濁	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 混濁	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	1	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
6	角膜 混濁	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	8	2	0

非洗眼群では、4例に評点1の結膜発赤が見られ、一部の動物に一過性の閉眼が見られた。洗眼群ではいずれの動物にも投与による影響は見られなかった。

以上の結果から、検体の15倍希釈液のウサギの眼粘膜に対する刺激性は陰性であり、極軽度認められた変化も洗眼によって消失するものと考えられる。

① 急性経口毒性 (ベフトップジンフロアブル)

ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No. 毒 C13)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

検体の純度:

組成	イミノクタジン酢酸塩	15.7 %
	チオファネートメチル	26.2 %

試験動物 : Slc:Wistar 系ラット、8 週齢、雌、体重:135 ~ 142 g

1 群 5 匹 (2000mg/kg では 1 匹のみ)

試験期間 : 14 日間

投与方法 : 検体は注射用水を用いて調製し、ラット用金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。ラットは、投与前日の夕方から投与後 3~4 時間、絶食させた。

試験項目 : 中毒症状および生死を 14 日間観察した。投与日および投与 1, 2, 3, 4, 7, 14 日後に全生存動物の体重を測定した。

試験終了時に全生存動物を解剖し、肉眼的病理検査を行なった。

結 果 :

投与方法	経 口
投 与 量 (mg/kg)	300、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	300~2000
死亡開始および終了時間	300mg/kg: 死亡はみられなかった 2000mg/kg: 投与 2 時間後に死亡した。
症状発現および消失時間	300mg/kg: 投与 3~6 時間後まで 2000mg/kg: 投与直後から 2 時間後 (死亡)まで
死亡例が認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	300

中毒症状としては、300mg/kg で神経過敏、動作緩慢、痙攣、腹臥が観察された。2000mg/kg では洗顔、痙攣、自発運動亢進、腹臥、歩行異常、神経過敏、半閉眼が観察された。

生存動物では体重に影響はなく、毒性症状が消失した後は、特筆すべき変化を認めなかった。また、剖検所見においても、いずれの個体にも異常所見を認めなかった。

② 急性経皮毒性 (ベフトップジンフロアブル)

ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 No. 毒 C14)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

検体の純度:

組成	イミノクタジン酢酸塩	15.7 %
	チオファネートメチル	26.2 %

試験動物 : Slc:Wistar 系ラット、8 週齢、雌雄 1 群各 5 匹、

体重:雄 199 ~ 213 g、雌 146 ~ 152 g

観察期間 : 14 日間

投与方法 : 検体をリント布に含漬させ、剃毛した背部に塗布した。密着性を良くするため、粘着性の包帯を巻き、24 時間接触させた。暴露後、皮膚に残った検体は蒸留水により除去した。

試験項目 : 皮膚反応、中毒症状および生死を 14 日間観察した。投与日および投与 1, 2, 3, 4, 7, 14 日後に全生存動物の体重を測定した。試験終了時に全動物を解剖し、肉眼的病理検査を行なった。

結 果 :

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	雌雄とも 0, 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄とも > 2000
死亡開始および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	症状発現なし
死亡例が認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄とも 2000

中毒症状は認められなかった。

雌雄共に、投与部位には貼付除去後からはっきりした紅斑が見られたが、6 ~ 9 日後に非常に軽度の紅斑となり、7 ~ 11 日後には消失した。投与 1 日目に対照群と同様の貼付影響による体重減少が見られたが、その後は順調な増加推移を示した。

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。

③ 皮膚一次刺激性 (ベフトップジンフロアブル)

ウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 No. 毒 C15)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

検体の純度:

組成	イミノクタジン酢酸塩	15.7 %
	チオファネートメチル	26.2 %

試験動物 : 日本白色種ウサギ、雌 12 週齢
体重: 2.41 ~ 2.45 kg、1 群 3 匹

試験期間 : 14 日間観察

試験方法 : 検体 (0.5ml) をリント布 (25×25 mm) に含漬させ、刈毛した動物の背中の皮膚に塗布した。塗布時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は蒸留水により除去した。

試験項目 : 塗布終了後 1, 24, 48 および 72 時間から 14 日後まで、塗布部分の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無等を観察し、農水省ガイドラインに従って評点した。観察は可逆性を明確にするため 14 日後まで続けた。

結果 : 観察した刺激性変化の平均スコア (3 匹) は以下の表のとおりである。

項目	最高 評点	判定時間									
		時間				日					
		1	24	48	72	4	5	6-11	12	13	14
紅斑・痂皮	4	2.0	1.0	1.3	2.3	2.3	3.3	4.0	4.0	1.3	0.0
浮腫	4	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.3	0.0	0.0
合計	8	2.0	1.0	1.3	3.3	3.3	4.3	5.0	4.3	1.3	0.0

貼付除去 1、24、48 時間後の紅斑および浮腫のそれぞれの平均評点を算出し、その合計を皮膚一次刺激性インデックス (P.C.I) で評価した。

貼付除去後、はっきりした紅斑がみられ、5~6 日目で痂皮ができたため、12 日後まで同じ値の評点が続いた。痂皮の落屑後は、皮膚状態が回復し、可逆性の変化であることが確認された。

P.C.I 値は 1.4 であり、軽度刺激物の範疇であった。

以上の結果から、検体はウサギの皮膚に対して軽度の刺激性があると結論された。本剤は皮膚に対して軽度の刺激性を有するが、その変化は可逆性のものであった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

〈 ベフトップジンフロアブル急毒・刺激・感作 〉

④ 眼一次刺激性 (ベフトップジンフロアブル)

ウサギを用いた眼刺激性試験

(資料 No. 毒 C16)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

検体の純度:

組成	イミノクタジン酢酸塩	15.7%
	チオファネートメチル	26.2%

試験動物 : 日本白色種ウサギ、12 週齢、雌 (体重: 2.29 ~ 2.52 kg)、1 群 3 匹

観察期間 : 21 日間観察

試験方法 : 検体 0.1 ml を片方の眼に投与し、放置した。洗眼群では投与 30 秒後に微温水で洗眼した。

試験項目 : 投与後 1、3、6、24、48、72 時間および非洗眼群は 4、7、14、21 日後に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Kay & Calandra の眼刺激評価基準に従って評点した。

結果 : 観察した刺激性評点の平均スコアーは以下の表のとおりである。

非洗眼群

動物	項目	最高 評点	投与後の時間										
			時間						日				
			1	3	6	24	48	72	4	7	14	21	
1	角膜 程度	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	混濁 面積	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	虹彩	2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
	結膜	発赤	3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
		浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0
2	角膜 程度	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	混濁 面積	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	虹彩	2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	
	結膜	発赤	3	1	1	1	2	2	2	2	1	0	0
		浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0
3	角膜 程度	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	混濁 面積	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	虹彩	2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	
	結膜	発赤	3	1	1	1	2	2	2	2	1	1	0
		浮腫	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		分泌物	3	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0
合計*		330	24	18	18	33	31	31	29	23	17	0	

洗浄群

項目	最高 評点	投与後の時間						
		1 時間	3 時間	6 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
角膜 混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0
	面積	4	0	0	0	0	0	0
虹彩	2	0	0	0	0	0	0	
結膜	発赤	3	1	1	1	1	1	0
	浮腫	4	0	1	1	0	0	0
	分泌物	3	1	1	1	1	0	0
合計	110	4	6	6	4	2	0	

被験物質の適用により、全例に結膜に発赤、浮腫および分泌物がみられ、虹彩には充血全例に見られたが、21 日以内に全ての反応が消失した。洗眼群では、結膜に同様の反応がみられたが、角膜および虹彩に異常は認められなかった。洗眼処置により刺激反応は 72 時間以内に消失し、洗眼効果が認められた。本剤の急性眼刺激指数の最大値は、非洗眼群で投与 24 時間後の 11.0 であり、洗眼群では投与 3～6 時間後の 6.0 であった。

Kay & Calandra の評価基準により、ベフトップジンフロアブルは洗眼群および非洗眼群共に「軽度の刺激」を有すると評価された。

以上の結果から、検体はウサギの眼に対して軽度の刺激性を有すると考えられる。

⑤ 皮膚感作性 (ベフトップジンフロアブル)

モルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 No. 毒 C17)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

検体の純度:

組成	イミノクタジン酢酸塩	15.7%
	チオファネートメチル	26.2%

試験動物 : ハートレー系モルモット、雌 5 週齢、体重 302~338 g(投与開始時)、
試験群 20 匹、対照群 10 匹、陽性対照群とその対照群(各 10 匹)

試験期間 : 誘発後 48 時間観察

試験方法 : [Buehler 法]

投与量設定根拠:

感作;左腹側部を刈毛し、感作開始 0 日目に検体 0.5 ml を蒸留水で湿らせたリント布 (2×3cm) に載せ、絆創膏を用いて 6 時間閉塞貼付した。この操作を 7 日毎に 1 回、計 3 回行った。対照群には蒸留水、陽性対照物質感作群には DNCB0.05% エタノール液、その対照群として溶媒に用いたエタノールのみで同操作を行った。

惹起;右腹側部を刈毛し、感作開始 28 日目に検体 0.1g をパッチテスト用絆創膏に含浸させ、さらに絆創膏で固定した。6 時間閉塞貼付を行った。陽性対照群には DNCB 0.05%、0.025%、0.01% エタノール液を用いた。

24 および 48 時間後に皮膚反応の判定を行った。

観察項目 : 惹起暴露終了後、24 および 48 時間目に塗布部位の紅斑および浮腫の有無を肉眼的に観察し、Magnusson & Kligman の方法で下記の基準に従って評点した。

結果 : 誘発処理後の観察結果を次頁に示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本曹達株式会社にある

(ベフトップジンフロアブル急毒・刺激・感作)

群			供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)	
				24 時間後					48 時間後						
感作	惹起	検体		皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計	24 時間	48 時間
			0	1	2	3	0		1	2	3				
	100%	100%	20	20	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0/20	0	0
	溶媒	100%	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0
陽性対照	0.05% DNCB	0.05%	10	0	0	9	1	10/10	0	0	10	0	10/10	100	100
		0.025%		0	4	6	0	10/10	0	4	6	0	10/10	100	100
		0.01%		0	6	4	0	10/10	0	7	3	0	10/10	100	100
	溶媒	0.05%	10	10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0
		0.025%		10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0
		0.01%		10	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0/10	0	0

検体処理の誘発部位には、皮膚反応は認められなかった。一方、陽性対照群においては紅斑、浮腫等の明瞭な陽性反応がみられた。

以上の結果から、検体の皮膚感作性は陰性であると判断される。

① 急性経口毒性(ペフキノン水和剤)

(1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No.C18)

試験実施機関:

報告書作成年:1982年

検体の純度:

組成:	イミノクタジン酢酸塩	7.0 %
	8-ヒドロキシキノリン銅	50.0 %
	界面活性剤等	43.0 %

試験動物 : Wister 系ラット(石川実験動物研究所)、7 週齢(投与時)

体重(平均):雄 209.4 g、雌 166.6 g、一群雌雄各 10 匹

試験期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体は注射用蒸留水に懸濁して胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

観察項目 : 中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重測定は行わなかった。

死亡動物は死亡時に、生存動物は試験終了時に解剖し、肉眼的病理検査を行なった。

結 果 :

投与方法	経 口
投 与 量 (mg/kg)	雄: 2000、2400、2880、3456、4147 雌: 2400、2880、3456、4147、4977
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄: 3175 (2810~3588) 雌: 3525 (3092~4019)
死亡開始および終了時間	雄: 投与 24 時間後から 8 日後まで 雌: 投与 6 時間後から 8 日後まで
症状発現および消失時間	投与 30 分後から 8 日後まで
死亡例が認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	なし

中毒症状として、投与後 30~60 分後から雌雄ともに運動量の低下、飲水量の増加が、5~6 時間頃から粘液便を排泄する動物が見られた。高用量群の死亡に至った動物の雄では投与 24 時間後頃から、雌では 7 時間後頃から 8 日後まで、血便や下痢、立毛、鎮静、衰弱が認められた。

剖検所見では、死亡動物の雌雄に胃および腸に炎症および出血が認められた。生存動物の雌雄の胃に炎症と潰瘍が散見された。

② 急性経皮毒性(ペフキノン水和剤)
ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 No.C19)

試験実施機関：
報告書作成年：1982 年

検体の純度：

組成： イミノクタジン酢酸塩 7.0 %
8-ヒドロキシキノリン銅 50.0 %
界面活性剤等 43.0 %

試験動物 : Wister 系ラット(石川実験動物研究所)、7 週齢(投与時)
体重(平均):雄 202.7 g、雌 161.9 g、一群雌雄各 10 匹

試験期間 : 14 日間観察

投与方法 : 刈毛した背部を蒸留水で湿らせ、そこに検体を塗布し、絆創膏で 24 時間固定した。

観察項目 : 中毒症状および生死を 14 日間観察した。体重測定は行わなかった。
試験終了時に全動物を解剖し、肉眼的病理検査を行なった。

結 果 :

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	雌雄とも 5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄とも > 5000
死亡開始および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	症状発現なし
死亡例が認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄とも 5000

中毒症状は観察されなかった。

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。

① 急性経口毒性 (ラブサイドベフラン粉剤 DL)
ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 No.C20)

試験実施機関:

報告書作成年: 1982 年

検体の純度:

組成: イミノクタジン酢酸塩 1.5 %
フサライド 2.0 %

供試動物: Wistar 系ラット、6 週齢、体重 雄 155~160g、雌 135~145g
1 群雌雄各 10 匹

観察期間: 14 日間

投与方法: 被験物質を蒸留水に懸濁して強制経口投与した。

観察項目: 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。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。

結 果:

投与方法	経 口
投 与 量 (mg/kg)	雌雄とも 5000, 6500
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄とも > 6500
死亡開始および終了時間	死亡例なし
死亡例が認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄とも 5000

雌雄ともに死亡は認められなかった。

中毒症状としては、若干の自発運動量の減少がみられた。

剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。

② 急性経皮毒性 (ラブサイドベフラン粉剤 DL)

ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 No.C21)

試験実施機関:

報告書作成年: 1982 年

検体の純度:

組成: イミノクタジン酢酸塩 1.5 %
フサライド 2.0 %

供試動物: Wistar 系ラット、6 週齢、体重 雄 155~160g、雌 135~145g
1 群雌雄各 10 匹

観察期間: 14 日間

投与方法: 被験物質を蒸留水に懸濁し、剪毛した背部中央に塗布した。

観察項目: 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。試験終了時の全生存動物について適用部位を含む組織の肉眼的病理検査を行った。

結 果:

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	5000, 6500
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄とも > 6500
死亡開始および終了時間	死亡例なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄とも 6500
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄とも 6500

雌雄ともに死亡は認められず、中毒症状も観察されなかった。
剖検所見では、主要な組織器官に特記すべき変化は認められなかった。