

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

②ウサギにおける催奇形性試験

(資料 2-15)

試験機関 : Argus Research Laboratories, Inc.

[GLP 対応]

<試験実施番号 ARGUS 101-027>

報告書作成年 : 1997 年

検体純度 :

供試動物 : New Zealand White [Hra:(NZW)SPF] ウサギ, 1群当り自然交配雌 25匹

妊娠 0 日 : 約 6ヶ月齢, 体重 3.01~4.60 kg

試験期間 : 動物試験期間 29 日間 (1996 年 11 月 15 日~12 月 13 日)

投与期間 妊娠 6 日から 28 日までの 23 日間

投与方法 : 検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液に懸濁し, 0, 5, 10, 20 または 40 mg/kg/日の用量で, 妊娠 6 日から 28 日までの 23 日間毎日 1 回ほぼ同時刻に, 10 mL/kg 体重の容量で胃管を用いて強制経口投与した (交配日を妊娠 0 日とした)。なお, 対照群の動物には媒体の 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液を同様に投与した。

用量設定根拠 :

観察・検査項目 :

母動物 ; 妊娠 0~28 日の間, 一般状態及び死亡について毎日少なくとも 2 回 (投与期間中は投与の前後にそれぞれ少なくとも 1 回) 観察して所見を記録した。各雌の体重を妊娠 0 日と 6 日から 29 日までの毎日記録し, それらの体重値から体重増加量を算出した。各雌の摂餌量を妊娠 6 日から 29 日まで毎日記録し, 絶対値 (g/日) と相対値 (g/kg 体重/日) で表した。妊娠 29 日に, 母動物から採血して血液学的検査 (赤血球数, ヘマトクリット, 血色素, 平均赤血球容積, 平均血色素量, 平均血色素濃度, 白血球数, 類別白血球数, 血小板数, 平均血小板容積, 網赤血球数, 赤血球形態) と生化学的検査 (アルブミン, アルカリホスファターゼ, 総ビリルビン, クレアチニン, 尿素窒素, カルシウム, 塩素, 総コレステロール, クレアチニンホスホキナーゼ, γ -グルタミルトランスペプチダーゼ, 血糖, 無機リン, カリウム, 総蛋白, アラニンアミノトランスフェラーゼ, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, ナトリウム) を行った。採血後母動物を安楽死させて剖検し, 妊娠の成否と肉眼による病理学的変化について調べた。すべての雌の肝臓重量を測定し, 対照群と 40 mg/kg 群の雌の肝臓について病理組織学的検査を行った。卵巣と子宮を摘出して, 卵巣については妊娠黄体数を数え, 子宮については妊娠子宮重量, 着床数, 吸収・死亡胚数及び生存胎児数を記録した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

胎児： 各生存胎児の体重を測定し、外表の変化について肉眼で検査した後、内臓を検査した。その際内部生殖器を観察して性を判定し、性比(総雄胎児数/総生存胎児数)を算出した。各腹で半数の胎児の頭部を切断し、標準的な連続切片法に準じて軟組織の変化について調べた。各腹残りの胎児の頭部は、頭蓋中央部の脳の断面を検査した。すべての胎児(半数の頭部を除く)をイソプロピルアルコールで固定した後、アリザリンレッドSとアルシアンブルーで骨・軟骨の二重染色を施した標本を作製し、骨格の変化について検査した。胎児変化は、奇形(本動物種および系統において低い発生率で起こる不可逆的な変化)または変異(本動物種および系統において普通の所見であり、発生における可逆的な遅延または加速)に分類した。

結果：概要を次ページ以下の表に示す。

対照群の雌1匹が妊娠12日に、40 mg/kg 群の雌1匹が妊娠24日に死亡したが、投与(挿管)の事故によるものであった。対照群の雌1匹が妊娠20日に、20 mg/kg 群の雌1匹が妊娠24日に流産したが、検体投与との関連はなかった。検体投与によると考えられる臨床所見もなかった。

40 mg/kg 群でのみ以下の変化が認められた。体重が妊娠24~29日に減少した(20 mg/kg 群で妊娠0~29日の体重増加量に統計学的に有意な低値がみられたが、これは投与開始前期間の妊娠0~6日における体重増加量が低かったことによるものであり、検体投与に関連したものではなかった)。妊娠子宮重量は、対照と比較して減少傾向を示した。この所見は、やや少ない生存同腹児数に関係があり、胚死亡率の軽度ながら統計学的に有意な増加と胎児体重の軽度な減少(有意差なし)を反映していた。妊娠子宮重量で補正した母動物の体重増加量と全投与期間(妊娠6~29日)を通した母動物の体重増加量は影響を受けなかった。摂餌量(絶対値と相対値)は、妊娠24~29日に減少する傾向がみられ、妊娠19~29日については軽微に減少した(有意差なし)。血色素、ヘマトクリット及び平均赤血球容積が対照と比較して軽度ながら有意に減少し、血小板数とアルカリホスファターゼ活性の値が有意に増加した。肝臓の病理組織学的変化は認められなかったが、絶対重量と最終体重に対する重量比に増加傾向がみられた。肝臓重量の増加は、検体の予想される毒性影響であることから、検体投与の影響と考えられた。

胚吸収のある腹と腹当りの死亡・吸収胚の率が統計学的に有意に増加した。それに関連して生存胎児数のわずかな減少ならびに胎児体重の減少もみられた。これらの数値はどれも背景対照データの範囲内にあるものの、胚・胎児の生存力と成長におけるこれらの軽微な変化は、高用量群でのみ、また予備試験の同用量でもみられていることから、検体投与によるものと考えられた。

検体投与に起因する胎児の肉眼的外表、軟組織または骨格の奇形または変異は、40 mg/kg/日の用量まで何も誘発されなかった。

申請者注：側脳室拡張が10及び40 mg/kg/日の各1例に観察された。異常の程度は10 mg/kg/日の1例は“extreme”，10 mg/kg/日の1例は“marked”であり、現在の試験実施施設の種類では「水頭症」に分類される(2002年より、側脳室拡張の程度により、“slight”及び“moderate”は「側脳室拡張」に、“extreme”及び“marked”は「水頭症」に分類している)。しかしながら、本異常は、その発生に用量依存性がないこと及び試験施設の背景対照値の範囲内であることから、投与に起因する異常ではないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果：

母動物；

投与量 (mg/kg/日)	0	5	10	20	40	
1 群当り交配雌動物数	25	25	25	25	25	
死亡雌動物数	1*	0	0	0	1*	
流産 (屠殺) 雌動物数	1	0	0	1	0	
生存雌動物数	23	25	25	24	24	
非妊娠雌動物数	0	1	1	1	1	
妊娠雌動物数	25	24	24	24	24	
生存胎児のある雌動物数 (帝王切開時)	23	24	24	23	23	
一般状態	—	検体投与に起因する異常は認められなかった				
体重	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし	
補正体重 ^a (kg)	3.64	3.63	3.68	3.58	3.63	
体重増加量	—	有意差なし	有意差なし	↓妊娠0-29日	有意差なし (妊娠24-29日に減少)	
摂餌量	—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし (妊娠19-29日微減, 妊娠24-29日減少傾向)	
血液学的成績 ^b						
血色素(mg/dl) ^a	12.10	11.99	12.42	12.33	↓11.33	
ヘマトクリット(%) ^a	34.80	34.76	35.75	35.83	↓32.64	
平均赤血球容積(fl) ^a	66.11	66.22	65.64	65.49	↓63.76	
血小板(thsn/ul) ^a	369.9	373.7	410.2	365.8	↑459.1	
血液生化学的成績 ^b						
アルカリホスファターゼ ^a (u/l) ^a	29.4	35.1	32.1	37.2	↑63.0	
剖検所見	—	検体投与に起因する異常は認められなかった				
肝臓重量 絶対重量 ^a (g)	96.6	96.7	96.3	98.4	108.8	
%体重比 ^a	2.320	2.320	2.292	2.438	2.665	
妊娠子宮重量 ^a (g)	522.8	529.9	517.9	477.4	462.0	
着床所見	検査腹数	23	24	24	23	23
	妊娠黄体数 ^a	9.3	9.4	9.2	9.1	8.9
	着床数 ^a	9.0	9.2	9.2	8.5	8.7
	胚吸収のある腹数(%)	5(21.7)	3(12.5)	7(29.2)	8(34.8)	13(↑56.5)
	腹当り胚死亡率 ^a (%)	2.5	1.5	3.8	7.2	↑12.4
	生存胎児数 ^a	8.8	9.1	8.8	8.0	7.7
	性比(%雄) ^a	49.8	51.9	47.0	54.5	57.6
胎児体重 ^a (g)：	雄	42.97	42.19	43.09	42.90	40.70
	雌	42.38	41.37	41.49	41.63	39.32

*：投与事故による死亡

^a 平均, ^b 統計学的有意差のみられた項目のみ記載

Dunnett 検定：体重, 体重増加量, 摂餌量, 血液学的成績, 血液生化学的成績, 肝臓重量, 妊娠子宮重量

Kruskal-Wallis 検定後に Dunn の多重比較または Fisher の直接確率計算法：一般状態, 剖検所見
 ↑↓：p≤0.05, ↑↓：p≤0.01 で対照群と比較して統計学的に有意差あり

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果：

胎児：

投与量 (mg/kg/日)	0	5	10	20	40
検査胎児(腹)数	202(23)	219(24)	212(24)	183(23)	177(23)
変化胎児のある腹数(%)	11 (47.8)	11 (45.8)	12 (50.0)	9 (39.1)	8 (34.8)
変化のある胎児数(%)	13 (6.4)	21 (9.6)	17 (8.0)	15 (8.2)	13 (7.3)
腹当たり変化胎児(%) ^a	6.0	10.5	7.8	7.3	7.4
外表変化：					
検査胎児(腹)数	202(23)	219(24)	212(24)	183(23)	177(23)
奇形：					
二分脊椎/角膜周囲出血	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
短尾	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
変異：					
皮膚出血部	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
内臓変化：					
検査胎児(腹)数	202(23)	219(24)	212(24)	183(23)	177(23)
奇形：					
側脳室拡張 (腹あたりの発生率%)	0(0) (0)	0(0) (0)	1(1) (0.60)	0(0) (0)	1(1) (0.48)
変異：					
角膜周囲出血	2(2)	5(5)	1(1)	0(0)	1(1)
肺中間葉欠損	1(1)	7(4)	4(2)	4(4)	2(2)
胆嚢欠損	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
低位置腎臓	0(0)	1(1)	1(1)	0(0)	0(0)

^a 平均

外表変化以下の括弧内の数値は腹数を表す

Kruskal-Wallis 検定後に Dunn の多重比較または Fisher の直接確率計算法：胎児変化

側脳室拡張の腹あたりの発生頻度をは Kruskal-Wallis 検定で多群の比較を実施し、有意な場合は Wilcoxon の順位和検定を実施（申請者実施）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果：

胎児：

投与量 (mg/kg/日)	0	5	10	20	40
骨格変化：					
検査胎児(腹)数	202(23)	219(24)	212(24)	183(23)	177(23)
奇形：					
胸椎半椎	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
胸椎椎体片側性骨化/ 癒合	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
腰椎椎弓癒合/開放	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
尾椎配列不整	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
尾椎数 13/癒合	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
二分肋骨	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)
癒合肋骨	0(0)	1(1)	0(0)	2(2)	1(1)
変異：					
頭蓋不完全，不整骨化	4(4)	0(0)	3(3)	4(3)	2(2)
舌骨翼角状	3(3)	2(1)	4(3)	1(1)	1(1)
頸肋	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(2)
肥厚肋骨	2(1)	1(1)	1(1)	0(0)	0(0)
近接，過剰肋骨 (腹あたりの発生率%)	0(0) (0)	0(0) (0)	0(0) (0)	0(0) (0)	1(1) (1.45)
第一胸骨分節不完全 骨化	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	1(1)
胸骨分節癒合	1(1)	2(2)	0(0)	4(3)	1(1)
胸骨分節非対称	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)
肩甲骨肩峰不整形	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)

括弧内の数値は腹数を表す

Kruskal-Wallis 検定後に Dunn の多重比較または Fisher の直接確率計算法：胎児変化

過剰肋骨の腹あたりの発生頻度は Kruskal-Wallis 検定で多群の比較を実施し，有意な場合は Wilcoxon の順位和検定を実施（申請者実施）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果：

胎児：

投与量 (mg/kg/日)	0	5	10	20	40
骨化部位(骨化数)*：					
舌骨	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
頸椎	7.00	7.00	7.05	7.00	7.00
胸椎	12.57	12.63	12.57	12.49	12.48
腰椎	6.42	6.36	6.40	6.51	6.51
仙椎	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
尾椎	16.83	16.69	16.86	16.65	16.72
肋骨	12.49	12.57	12.53	12.43	12.42
胸骨柄	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
胸骨分節	3.92	3.94	3.88	3.91	3.93
剣状突起	0.98	0.94	0.96	0.98	0.96
手根骨	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
中手骨	5.00	5.00	4.99	5.00	5.00
手指	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
指骨	13.85	13.90	13.88	13.95	13.93
足根骨	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
中足骨	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
足指	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
趾骨	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00

* 腹当りの平均

以上の結果から、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母動物及び胎児における無毒性量はともに20 mg/kg/日であった。また、最高投与量の40 mg/kg/日でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

VIII.1.9. 変異原性試験

1) 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 2-16-①)

試験機関：Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 5 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537 および TA1538) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 株を用い、アロクロール 1254 で誘導した雄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 らの方法を用いてプレート法で変異原性を検索した。検体は溶媒としてアセトンを用いて調製し、処理容量は 20 μ L/プレートとした。各用量 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 から 72 時間培養後、復帰変異コロニーを計数した。再現性のある正の用量反応関係が認められる場合あるいは溶媒対照に比し 2.5 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められる場合に変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠：

結果：結果を次頁の表に示した。

分析の結果、アセトンに調製した検体溶液は少なくとも 1 日は安定であった。

2 回の独立した復帰突然変異試験の結果、検体処理群において、S9 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の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では、明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下における本検体の細菌に対する突然変異誘発性は陰性であると結論された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-1 復帰突然変異試験成績 (1回目の実験)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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		
			WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA100	TA1535	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (アセトン)	20 μL	-	89	144	23	25	15	19
検 体	31.25	-	84	131	24	27	11	27
	62.50	-	109	136	28	29	14	23
	125.00	-	116	165	29	32	17	24
	250.00	-	110	144	27	24	13	19
	500.00	-	101	119	23	30	12	26
	1000.00	-	86	116	25	21	11	16
	2000.00	-	76	131	27	28	11	18
	5000.00	-	84	133	24	33	9	17
陽性対照								
NaN ₃	2.0	-	N	N	427	N	N	N
NaN ₃	5.0	-	N	839	N	N	N	N
PD	20	-	385	N	N	N	N	N
AAC	25	-	N	N	N	N	140	N
NF	5	-	N	N	N	447	N	693
溶媒対照 (アセトン)	20 μL	+	92	113	22	34	24	27
検 体	31.25	+	98	104	23	34	25	29
	62.50	+	105	117	21	42	20	31
	125.00	+	100	146	25	40	18	30
	250.00	+	97	113	18	39	18	23
	500.00	+	85	94	21	37	17	34
	1000.00	+	74	114	21	40	18	28
	2000.00	+	68	122	21	36	12	25
	5000.00	+	68	115	20	39	10	26
陽性対照								
BP	10	+	594	415	N	248	N	190
AAN	5	+	N	N	147	N	N	N
NR	20	+	N	N	N	N	222	N

N : 試験を行っていない

NaN₃ : アジ化ナトリウム, PD : 重クロム酸カリウム, AAC : 9-アミノアクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン, BP : ベンズ(a)ピレン, AAN : 2-アミノアントラセン

NR : ニュートラルレッド

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-2 復帰突然変異試験成績 (2回目の実験)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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		
			WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA100	TA1535	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (アセトン)	20 μL	-	111	111	23	28	17	23
検 体	31.25	-	115	89	27	27	21	22
	62.50	-	126	79	27	27	14	18
	125.00	-	120	88	25	32	20	24
	250.00	-	110	81	25	20	14	26
	500.00	-	101	95	33	31	16	20
	1000.00	-	88	110	27	29	18	27
	2000.00	-	87	90	25	25	13	24
5000.00	-	104	115	33	34	18	27	
陽性対照								
NaN ₃	2.0	-	N	N	424	N	N	N
NaN ₃	5.0	-	N	442	N	N	N	N
PD	20	-	549	N	N	N	N	N
AAC	25	-	N	N	N	N	N	N
NF	5	-	N	N	N	725	59	452
溶媒対照 (アセトン)	20 μL	+	94	90	24	34	22	29
検 体	31.25	+	112	73	17	34	25	29
	62.50	+	115	89	22	37	22	30
	125.00	+	124	119	20	34	25	28
	250.00	+	111	96	19	38	22	30
	500.00	+	103	95	23	32	22	31
	1000.00	+	61	109	21	32	26	28
	2000.00	+	76	110	19	29	15	32
5000.00	+	81	123	22	38	24	30	
陽性対照								
BP	10	+	420	349	N	274	N	166
AAN	5	+	N	N	137	N	N	N
NR	20	+	N	N	N	N	290	N

N : 試験を行っていない

NaN₃ : アジ化ナトリウム, PD : 重クロム酸カリウム, AAC : 9-アミノアクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン, BP : ベンズ(a)ピレン, AAN : 2-アミノアントラセン

NR : ニュートラルレッド

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

2) チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 2-16-②)

試験機関：Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いて、検体の染色体異常誘発性を薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で検索した。

検体に最も適した溶媒としてアセトンを選択した。検体はアセトンに 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで溶解した。

S9 mix を添加しない染色体異常試験においては細胞播種 24 時間後に検体溶液を添加し、24 時間ならびに 48 時間連続して検体処理した後、染色体標本作製した。

S9 mix を添加する試験においては細胞播種 24 時間後に培地を交換し、S9 mix 存在下で 3 時間検体処理した。検体処理後新しい培地に交換し、検体処理開始から 24 時間ならびに 48 時間培養後に染色体標本作製した。

何れの場合も無処理対照、溶媒対照ならびに陽性対照を同時に試験し、すべて各濃度あたり 2 系列で培養した。

可能な限り各用量群につき 200 個の分裂中期像を観察した。200 個のうち、倍数性細胞を除く 20 ± 2 動原体の染色体数を有する細胞についてのみ染色体異常を観察した。

データはロジットリンクおよび二項誤差構造を用いる一般線形モデルを用いて解析し、溶媒対照に異常が認められない場合はフィッシャーの直接確率法を用いて各処理群と溶媒対照群を比較した。また、用量相関性についての傾向検定を実施した。

用量設定根拠：

結果：結果を次頁以降の表に示した。

検体は S9 mix 非存在下では何れの標本作製時間においても構造的染色体異常を有する細胞ならびに倍数性細胞の有意な増加を誘発しなかった。陽性対照であるメチルメタンスルフォネートは構造的染色体異常の明らかな増加を誘発した。

一方、S9 mix 存在下で 3 時間検体処理し、検体処理開始から 24 時間後に標本作製する群において、最高用量である 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で構造的染色体異常を有する細胞数に溶媒対照に比べて有意な上昇が認められた。1 回目の実験ではデータの不均一性を考慮して検定した場合には統計学的有意差は認められなかったが、不均一性を考慮せずに検定した場合にはギャップを含まない構造的染色体異常を有する細胞数に有意な上昇が認められた。同じ用量で実施した 2 回目の実験においては、最高用量である 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においてギャップを含むならびに含まない構造的染色体異常を有する細胞数に溶媒対照に比し有意な上昇が認められ、ギャップを含まない構造的染色体異常を有する細胞については正の用量反応関係も有意であった。何れの試験においても陽性対照であるベンズ (a) ピレンは構造的染色体異常の明らかな増加を誘発した。

S9 mix 存在下で 3 時間検体処理し、検体処理開始から 48 時間後に標本作製する群において

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。
は、検体処理群の何れの用量においても構造的染色体異常を有する細胞の有意な増加は認められなかった。陽性対照であるシクロフォスファミド処理群では染色体異常の上昇が認められなかったが、検体処理時間が短く（3 時間）、回復期間が長い（45 時間）ことから予想されなかったことではなかった。同じ細胞を用いて同じ培養条件で実施した 24 時間標本作製群においてベンズ(a)ピレン処理群で陽性結果が得られているため、この試験は有効とした。
S9 mix 存在下の何れの標本作製時間、何れの検体用量においても倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、本検体はチャイニーズハムスター卵巣細胞において S9 mix 存在下で弱い構造的染色体異常誘発性を有するものと結論された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-1 染色体異常試験結果 (-S9 mix)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間	標本作製時間	S9 mix の有無	相対分裂指数 (%)	倍数性細胞 (%)	構造異常 観察細胞 数	各染色体異常を有する細胞の頻度(%)							異常を有する 細胞の頻度(%)		判定	
								Gap	染色分体型			染色体型		その他	+Gap	-Gap		
									切断	断片	交換	断片	交換 ^a					
無処理対照		24	24	-	85	0.0	200	3.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	3.5	0.5	/	
溶媒対照 (アセト)		24	24	-	100	0.0	200	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	/	
検体	1.56	24	24	-	95	0.0	200	2.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.5	-	
	6.25				91	0.0	200	2.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0		0.5
	12.5				55	0.0	200	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5		0.0
陽性対照 (MMS)	20	24	24	-	61	0.0	200	5.5	5.5	0.0	6.5	4.5	1.0	0.0	19.5**	15.0**	+	
無処理対照		48	48	-	122	1.0	198	2.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	3.03	1.01	/	
溶媒対照 (アセト)		48	48	-	100	0.0	200	4.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.00	0.50	/	
検体	0.625	48	48	-	68	0.0	200	6.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	6.50	0.50	-	
	2.500				107	0.0	200	4.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.00	0.50		
	5.000				91	0.0	200	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.50	0.00		
陽性対照 (MMS)	20	48	48	-	85	0.5	199	15.1**	16.6	2.0	28.1	18.1	0.5	4.5	56.28**	52.76**	-	

各濃度あたり計 200 個の細胞を観察し、倍数性細胞以外の細胞について構造的染色体異常を観察した
標本作製時間には処理時間を含む

相対分裂指数：溶媒対照の分裂指数（分裂中期の細胞数/観察細胞数）を 100%として表示

Gap：ギャップ，交換^a：二動原体および環，+Gap：ギャップを含める，-Gap：ギャップを含めない

MMS：メチルメタンスルフォネート

溶媒対照群に対し，**： $p \leq 0.01$ （ロジットリンクおよび二項誤差構造を用いた一般線形モデルにより

解析），**： $p \leq 0.01$ （溶媒対照に異常が認められない場合，Fisher の直接確率法により解析）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-2 染色体異常試験結果 (+S9 mix, 実験1)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間	標本作製時間	S9 mixの有無	相対分裂指数(%)	倍数性細胞(%)	構造異常観察細胞数	各染色体異常を有する細胞の頻度(%)							異常を有する細胞の頻度(%)		判定
								Gap	染色体分体型			染色体型		その他	+Gap	-Gap	
									切断	断片	交換	断片	交換*				
無処理対照		3	24	+	116	1.5	197	3.6	1.0	0.0	1.0	0	0.0	0.0	4.57	2.03	/
溶媒対照 (アeton)		3	24	+	100	1.0	198	7.0	1.0	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	9.09	2.53	/
検体	6.25	3	24	+	101	3.5	193	4.1	1.6	0.0	2.6	0.5	0.0	0.0	7.25	4.15	(+)
	25.00				96	0.5	199	3.0	0.5	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	4.02	1.51	
	50.00				156	0.5	199	8.5	1.5	0.0	5.0	3.0	0.0	1.0	16.08**	9.05**	
陽性対照 (BP)	25	3	24	+	87	0.5	199	6.0	1.5	0.0	4.5	3.5	0.0	0.0	12.06	9.55**	+
無処理対照		3	48	+	73	0.0	200	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.50	0.00	/
溶媒対照 (アeton)		3	48	+	100	0.0	200	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.00	0.00	/
検体	4.375	3	48	+	112	0.0	200	1.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	2.00	0.50	-
	17.500				116	0.0	200	1.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	2.50	1.50	-
	35.000				95	1.0	198	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.03	1.02	-
陽性対照 (CP)	60	3	48	+	74	0.0	200	1.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	2.50	1.50	+

各濃度あたり計200個の細胞を観察し、倍数性細胞以外の細胞について構造的染色体異常を観察した
標本作製時間には処理時間を含む

相対分裂指数：溶媒対照の分裂指数（分裂中期の細胞数/観察細胞数）を100%として表示

Gap：ギャップ，交換*：二動原体および環，+Gap：ギャップを含める，-Gap：ギャップを含めない

BP：ベンズ(a)ピレン，CP：シクロfosファミド

溶媒対照群に対し，*： $p \leq 0.05$ （ロジットリンクおよび二項誤差構造を用いた一般線形モデルにより解析）

**：データの不均一性を考慮しないで検定した場合は有意差あり，考慮して検定した場合はなし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-3 染色体異常試験結果 (+S9 mix, 実験2)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	処理時間	標本作製時間	S9 mixの有無	倍数性細胞(%)	構造異常観察細胞数	各染色体異常を有する細胞の頻度(%)							異常を有する細胞の頻度(%)		判定
							Gap	染色分体型			染色体型		その他	+Gap	-Gap	
								切断	断片	交換	断片	交換*				
無処理対照		3	24	+	0.0	200	1.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	2.00	0.50	
溶媒対照 (アト)		3	24	+	0.0	200	2.5	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	3.50	1.00	
検体	6.25	3	24	+	0.0	200	2.0	0.0	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	3.50	1.50 \$	+
	25.00				0.0	200	2.0	0.5	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.50	1.50 \$	
	50.00				0.0	200	4.5	1.0	0.0	5.5	2.0	0.0	0.0	11.50*	7.00 \$	
陽性対照 (BP)	25	3	24	+	0.0	200	4.0	0.0	0.5	10.5	4.0	0.5	0.0	17.00**	14.00**	+

各濃度あたり計200個の細胞を観察し、倍数性細胞以外の細胞について構造的染色体異常を観察した。

標本作製時間には処理時間を含む

相対分裂指数：溶媒対照の分裂指数（分裂中期の細胞数/観察細胞数）を100%として表示

Gap：ギャップ，交換*：二動原体および環，+Gap：ギャップを含める，-Gap：ギャップを含めない

BP：ベンズ(a)ピレン

溶媒対照群に対し，+： $p \leq 0.05$ **： $p \leq 0.01$ （ロジットリンクおよび二項誤差構造を用いた一般線形モデルにより解析）

\$：傾向検定の結果，正の用量反応関係有意

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

3) マウスを用いた小核試験

(資料 2-16-③)

試験機関：SITEK Research Laboratories

[GLP 対応]

報告書作成年：1995 年

検体純度：

供試動物： CD-1 マウス，(入荷時 42 日齢，7 日間馴化，用量設定試験投与時体重範囲：雄 25～31 g，雌 21～26 g，小核試験投与時平均体重 23～29 g，雌 19～26 g)

1 群雌雄各 5 匹

試験方法： 検体を 0.5% カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し，400，1000 および 2000 mg/kg の用量で胃ゾンデを用いて単回経口投与した。陰性対照群は媒体である 0.5% カルボキシメチルセルロース水溶液を同様に単回経口投与した。検体投与群および溶媒対照群ともに投与容量は 20 mL/kg とした。陽性対照群はトリエチレンメラミン (TEM) を 1.0 mg/kg の用量，10 mL/kg の容量で単回腹腔内投与した。

投与 24，48 および 72 時間後に動物を二酸化炭素で窒息させて屠殺し，各動物から大腿骨の骨髓を採取して骨髓塗沫標本作製した。スライド標本はメタノールで固定後，Wright-Giemsa 染色した。陽性対照群は投与 24 時間後に屠殺し，同様に骨髓塗沫標本作製した。

すべてのスライドにコード番号を付し，ブラインドで観察した。各標本について細胞毒性を調べるために 1000 個の赤血球を観察し，多染性赤血球 (PCE) 数と正染性赤血球 (NCE) 数を計数した。さらに，多染性赤血球 2000 個を観察し，小核を有するものの数を計数すると同時に小核を有する正染性赤血球についても計数した。

用量設定根拠：

結果： 骨髓標本の観察結果を表に示した。

検体投与により，体重が 10%低下した動物は認められなかった。

雌雄ともに，検体投与群では，いずれの用量，標本作製時間においても小核を有する多染性赤血球の頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。また，雌雄ともに検体投与群のすべての標本作製時間，すべての用量群で多染性赤血球の割合が溶媒対照に比し減少したことから，検体は標的である骨髓に達し，細胞毒性を示したことが確認された。一方，雌雄ともにトリエチレンメラミンを投与した陽性対照群では小核を有する多染性赤血球の頻度に明らかな増加が認められ，また，多染性赤血球の割合の減少も認められた。よって，本小核試験は有効であると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

観察結果

採取時間	性	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE % (平均±SD)#	PCE/(PCE+NCE) % (平均値±SD)#
24 時間	雄	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.10±0.05	69.2± 5.4
		検体	400	5	0.04±0.04	59.5± 3.7
			1000	5	0.09±0.04	64.4±10.1
			2000	5	0.10±0.06	53.4± 7.6
	陽性対照 (TEM)	1.0	5	6.66±0.13 *	34.9± 8.0	
	雌	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.07±0.04	65.1± 5.4
		検体	400	5	0.12±0.06	47.4± 5.6
			1000	5	0.03±0.04	49.6±10.9
			2000	5	0.07±0.06	47.9± 9.3
	陽性対照 (TEM)	1.0	5	6.56±0.13 *	31.3± 6.2	
48 時間	雄	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.06±0.04	72.5± 2.9
		検体	400	5	0.05±0.04	38.3± 4.6
			1000	5	0.08±0.03	46.8±19.5
	2000	5	0.08±0.03	42.9±17.7		
	雌	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.04±0.02	70.9± 8.1
		検体	400	5	0.02±0.03	55.0± 6.1
			1000	5	0.08±0.04	39.6±13.0
			2000	5	0.05±0.04	47.1± 8.4
72 時間	雄	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.06±0.07	72.1± 4.7
		検体	400	5	0.03±0.03	28.5±15.8
			1000	5	0.03±0.03	24.5± 9.2
	2000	5	0.04±0.04	57.8±16.1		
	雌	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.09±0.04	75.4± 2.2
		検体	400	5	0.05±0.06	38.5±10.9
			1000	5	0.07±0.04	38.7±13.4
			2000	5	0.05±0.05	26.5±12.7

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

CMC:カルボキシメチルセルロース, TEM : トリエチレンメラミン

検体投与群の MNPCE 頻度を溶媒対照の値と Student の t-検定を用いて比較した (検体投与群の各用量の平均値が溶媒対照の平均値以下である場合は実施しなかった)。* ; $p \leq 0.05$

(平均±SD) : 申請者が計算

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

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

4) ラットの初代培養肝細胞を用いた in vivo 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (資料 2-16-④)

試験機関 : SITEK Research Laboratories

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1995 年

検体純度 :

試験方法 : 検体を in vivo で投与したラットから調製した初代培養肝細胞における不定期 DNA 合成誘発能をオートラジオグラフィ測定法により検索した。検体は 0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁した。用量設定試験の結果に基づき、雄 Sprague-Dawley ラット(体重 125~150 g) に 400, 1000 および 2000 mg/kg の検体溶液および溶媒対照として溶媒を経口投与し、投与 4 時間および 16 時間後に屠殺して肝細胞を採取した。各肝細胞採取時間ならびに各用量あたり 3 匹のラットを用いた。陽性対照として 4 時間後肝細胞採取群はメチルメタンсульフォネートを 100 mg/kg の用量で屠殺 2 時間前に、16 時間後肝細胞採取群は 2-アセチルアミノフルオレンを 50 mg/kg の用量で屠殺 18 時間前に経口投与した。投与容量は検体投与群および溶媒対照群は 20 mL/kg (ただし 1000 mg/kg のみ 10 mL/kg)、陽性対照群は 10 mL/kg とした。屠殺後、Williams および Bradlaw の方法の改良法に従い、肝臓を灌流し、肝細胞を分離した。トリパンブルー排除法により生細胞を計数し、約 5×10^5 個の生細胞をカバーガラスを入れた培養用プレートに播種した。各ラットにつき 3 枚のプレートを用いた。約 2 時間培養後、初代培養肝細胞を洗い、 ^3H -チミジンを最終濃度 $10 \mu\text{Ci/mL}$ で加えた血清を含まない培地に再播種した。18 時間培養後、オートラジオグラフィにより ^3H -チミジンの取り込みを測定した。各ラットにつき無作為に (正常な形態を示す細胞についてのみ) 選択した 150 個の核 (および核の大きさに相当する核に近接した 3 箇所の細胞質) グレイン数をコロニーカウンターで計数した。さらに、各動物につき無作為に 1500 個の核を観察し、S 期合成期核 (複製 DNA 合成中の核) の割合を求めた。平均細胞核グレイン数から核の大きさに相当する核に近接した 3 箇所の細胞質グレイン数の平均を引いて、正味の核グレイン数を求め、各処理群の平均および標準偏差ならびに正味核グレイン数が 5 個以上の細胞の割合について求めた。

次の基準が満たされる場合、当該試験は有効であると判断した : 溶媒対照の正味核グレイン数が 1 以下であり、正味核グレイン数が 5 個以上の細胞の割合が 20%未満。陽性対照群において計数した細胞の少なくとも 30%が 5 個以上の正味核グレインを有し、また細胞あたりの正味核グレイン数が 5 個以上。溶媒対照の動物における S 期合成期核の割合が 0.2%以上。

平均正味核グレイン数が溶媒対照に比し少なくとも 5 個増加した場合、あるいは計数した細胞の 25%以上が 5 個以上の正味核グレインを有する場合に各用量における結果を有意であると判断した。試験結果の判定は、少なくとも 1 用量で平均正味核グレイン数の有意な増加が認められ用量相関性を伴う場合、ならびに用量相関性は欠くが、平均正味核グレイン数の有意な上昇が連続した 2 用量で認められる場合は陽性と判定した。いかなる用量においても正味核グレイン数に有意な上昇が認められない場合は陰性であると判定した。

用量設定根拠 :

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果： 結果を表に示した。

UDS 試験の結果、検体は何れの肝細胞採取時間およびいかなる用量においても有意な平均正味核グレイン数の上昇を誘発しなかった。また、試験の有効性基準はすべて満たされた。検体処理群および溶媒対照群の S 期合成期核の割合は 0.2%以上であったため、UDS 試験の陰性結果は DNA 合成の抑制によるものではないことが示された。

以上の結果より、検体は本試験条件下では、検体投与ラットの初代培養肝細胞を用いた in vivo 不定期 DNA 合成試験において陰性であると結論された。

表 UDS 試験成績

薬剤	濃度 (mg/kg)	肝細胞 採取時間	動物 数	計数 核数	正味核グレイン数 平均±標準偏差	正味核グレイン数が5個 以上の細胞の割合	S 期合成期 核の割合
溶媒対照 (0.5%CMC)	20 μ L/mL	4	3	450	-1.90 \pm 0.58	1.56%	0.45%
検体	400	4	3	450	-2.00 \pm 0.80	2.00%	0.78%
	1000	4	3	450	-1.69 \pm 0.61	1.33%	0.54%
	2000	4	3	450	-1.48 \pm 0.31	1.33%	0.89%
陽性対照 MMS	100	2	3	450	14.05 \pm 1.47	97.56%	0.69%
溶媒対照 (0.5%CMC)	20 μ L/mL	16	3	450	-1.81 \pm 0.23	1.11%	1.00%
検体	400	16	3	450	-2.33 \pm 0.50	1.33%	1.89%
	1000	16	3	450	-2.32 \pm 0.48	1.33%	1.22%
	2000	16	3	450	-1.76 \pm 0.40	2.22%	0.98%
陽性対照 2AAF	50	18	3	450	11.7 \pm 0.14	96.22%	1.02%

CMC ; カルボキシメチルセルロース, MMS ; メチルメタンсульフォネート

2AAF ; 2-アセチルアミノフルオレン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

VIII.1.10. 生体機能への影響に関する試験

メトコナゾールにおける薬理試験

(資料 2-17)

試験機関：株式会社環境バイリス研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検体の純度：

中枢神経系に対する作用

マウスにおける一般状態

供試動物：ICR 系マウス (Crj:CD-1, SPF), 5 週齢(試験開始時), 体重 雄 23.8~26.9 g, 雌 21.1~24.0 g, 1 群雌雄各 3 匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し, 0, 128, 320, 800 および 2000 mg/kg を単回経口投与し, 一般状態を観察した(投与前, 投与 1, 3, 6, 24 時間後)。なお, 用量設定は

結果：

投与量(mg/kg)	結果	24 時間後の体重
128	影響無し	増加
320	警戒性, 受動性及び正向反射の低下, 歩行失調・・・24 時間後に回復	増加
800, 2000	警戒性及び受動性の低下, 異常姿勢, 歩行失調あるいは歩行不能, 刺激に対する各種反応・反射機能の低下, 筋緊張度低下, 呼吸数減少, 体温低下等	体重減少

ラットにおける一般状態

供試動物：SD 系ラット (Crj:CD, SPF), 4~5 週齢(試験開始時), 体重 雄 100.0~110.2 g, 1 群雄 5 匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し, 0, 128, 320, 800 および 2000 mg/kg を単回経口投与し, 一般状態を観察した(投与前, 投与 1, 3, 6, 24 時間後)。なお, 用量設定

結果：

投与量(mg/kg)	結果	24 時間後の体重
128	影響無し	増加
320	正向反射の低下, 尿失禁・・・24 時間後に回復	増加
800, 2000	警戒性及び受動性の低下, 異常姿勢, 歩行失調あるいは歩行不能, 刺激に対する各種反応・反射機能の低下, 筋緊張度低下, 呼吸数減少, 自発運動の減少等	体重減少

800 mg/kg 群の 1 例および 2000 mg/kg 群の 4 例が, 投与 24 時間後に瀕死状態に陥った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。
着地開脚幅 (mm)

投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間 (時間)			
		1	3	6	24
0	49.6	50.7 (103.0)	47.4 (96.0)	46.1 (93.6)	53.9 (109.2)
128	48.7	47.1 (98.3)	50.5 (105.1)	54.2 (117.7)	48.3 (98.1)
320	39.7	46.6 (118.9)	42.9 (109.9)	42.8 (106.5)	44.9 (113.9)
800	58.3	59.0 (99.5)	55.1 (93.4)	50.6 (85.8)	35.3 (62.6↓)
2000	65.8	60.1 (96.3)	47.4 (73.6)	45.0 (68.7)	25.0↓ (38.8↓)

(下段の数値) は投与前の値に対するパーセンテージ

Dunnett 検定 ↓ p<0.01

800 及び 2000 mg/kg 群において、投与 24 時間後の着地開脚幅に有意な低下が認められた。

マウスの hexobarbital 誘発睡眠に対する作用

供試動物：ICR 系マウス (Crj:CD-1, SPF), 5 週齢 (試験開始時), 体重 雄 24.1~27.6 g,
1 群雄 8 匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し, 0, 0.3, 1, 3 および 10 mg/kg を単回経口投与し, 1 時間後に hexobarbital 80 mg/kg を腹腔内投与した。Hexobarbital 投与後睡眠導入時間と睡眠時間を測定した。なお, 投与量の設定は,

結果：

投与量 (mg/kg)	睡眠時間 (分)
0	36
0.3	38
1	45
3	86↑
10	108↑

Dunnett 検定 ↑ p<0.01

0.3 及び 1 mg/kg 投与群では対照群と比較し hexobarbital 誘発睡眠時間の延長は認められなかった。3 及び 10 mg/kg 投与群では有意な延長が認められた。

ラットの体温に関する作用 (一般状態と同じラット使用)

供試動物, 投与方法等はラットにおける一般状態を参照。投与前, 投与 1, 3, 6 及び 24 時間後に直腸温を測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果：体温 (°C)

投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間 (時間)			
		1	3	6	24
0	38.0	38.3 (100.8)	38.2 (100.6)	38.2 (100.6)	37.6 (98.9)
128	37.5	37.9 (100.9)	37.9 (101.1)	37.5 (99.9)	37.6 (100.2)
320	37.5	38.0 (101.4)	37.3 (99.5)	37.2 (99.2)	37.8 (100.9)
800	38.0	36.5↓ (96.1↓)	35.5↓ (93.6↓)	33.1↓ (87.2↓)	34.0 (89.4)
2000	37.5	35.2↓ (94.0↓)	33.1↓ (88.3↓)	29.6↓ (78.8↓)	27.9↓ (74.4↓)

(下段の数値) は投与前の値に対するパーセンテージ

Dunnett 検定 ↓ p<0.01

128 及び 320 mg/kg 投与群は投与による影響がみられなかった。

800 及び 2000 mg/kg 投与群は投与後 1 時間から体温の有意な低下が認められた。

循環器系に対する作用

ラットの血圧, 心拍数に対する作用

供試動物：SD 系ラット (Crj:CD, SPF), 5~7 週齢 (試験開始時), 体重 雄 142.5~208.1 g,

1 群雄 5 匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し, 0, 128, 320, 800 および 2000 mg/kg を単回経口投与し, tail-cuff 法で無麻酔下の収縮期血圧及び心拍数を測定した (投与前, 投与 1, 3, 6 時間後)。

なお, 用量設定は

結果：

検査項目	投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間 (時間)		
			1	3	6
血圧 (mmHg)	0	126	125 (98.8)	124 (98.3)	129 (102.3)
	128	132	127 (96.7)	122 (92.9)	123 (93.7)
	320	130	127 (97.7)	115 (87.9↓)	105↓ (80.7↓)
	800	131	120 (91.2)	114 (87.2↓)	104↓ (79.6↓)
	2000	127	118 (93.3)	108↓ (85.3↓)	97↓ (76.5↓)
心拍数 (beat/min)	0	402	400 (99.4)	400 (99.4)	386 (95.8)
	128	398	384 (96.8)	374 (94.6)	383 (96.8)
	320	382	373 (98.1)	325↓ (85.4)	297↓ (78.1↓)
	800	396	316↓ (80.6↓)	278↓ (71.5↓)	251↓ (64.9↓)
	2000	406	330↓ (81.2↓)	251↓ (61.8↓)	211↓ (51.9↓)

(下段の数値) は投与前の値に対するパーセンテージ, Dunnett 検定 ↓ p<0.05, ↓↓ p<0.01

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

128 mg/kg 投与群では血圧及び心拍数ともに影響がなかった。320 mg/kg 以上の投与群では、血圧が投与後 3 時間から有意な低下を示し、心拍数も投与後 1 ないし 3 時間から有意な低下を示した。

自律神経系に対する作用

ラットの瞳孔径に対する作用（一般状態と同じラット使用）

供試動物、投与方法等はラットにおける一般状態を参照。投与前、投与 1, 3, 6 及び 24 時間後にミニマスタールーペで瞳孔径を測定した。

結果：瞳孔径 (mm)

投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間 (時間)			
		1	3	6	24
0	0.52	0.52 (100)	0.48 (92.7)	0.56 (108.0)	0.56 (108.0)
128	0.54	0.52 (96.7)	0.46 (85.3)	0.54 (100.7)	0.56 (104.7)
320	0.60	0.54 (90.5)	0.56 (93.8)	0.58 (97.1)	0.58 (96.7)
800	0.50	0.54 (109.0)	0.60 (122.7)	1.04↑ (209.3↑)	0.64 (129.0)
2000	0.54	0.64 (120.0)	0.94↑ (179.3↑)	1.40↑ (264.0↑)	0.54 (100.0)

(下段の数値) は投与前の値に対するパーセンテージ

Dunnett 検定 ↑ p<0.05, ▲ p<0.01

128 及び 320 mg/kg 投与群では投与による影響がなかった。800 mg/kg 以上では投与後 3 ないし 6 時間で有意な瞳孔径の拡大が認められたが、24 時間後には 800 mg/kg の 1 例を除いて回復した。

消化器系に対する作用

マウスの小腸炭末輸送能に対する作用

供試動物：ICR 系マウス (Crj:CD-1, SPF), 5 週齢(試験開始時), 体重 雄 27.6~31.9 g,

1 群雄 8 匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し、0, 128, 320, 800 および 2000 mg/kg を単回経口投与し、1 時間後に 5% 活性炭末懸濁液を経口投与した。炭末投与 30 分後にマウスを屠殺し腸管を摘出し、胃幽門部から盲腸開口部間の距離及び炭末の最長到達距離を測定した。なお、投与量の設定は、

結果：128 及び 320 mg/kg 投与群では、対照群と比較し小腸炭末輸送能に影響は認められなかった。800 及び 2000 mg/kg では炭末移行率の軽度の低下が見られたが有意差は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

骨格筋に対する作用

ラットの握力に対する作用（一般状態と同じラット使用）

供試動物、投与方法等はラットにおける一般状態を参照。投与前、投与1, 3, 6及び24時間後に前肢及び後肢の圧力を測定した。

結果：

検査項目	投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間 (時間)			
			1	3	6	24
前肢 (kgf)	0	0.385	0.396 (104.1)	0.351 (93.9)	0.375 (101.4)	0.460 (123.7)
	128	0.358	0.468 (132.5)	0.456 (130.3)	0.434 (123.9)	0.479 (136.6)
	320	0.301	0.387 (140.6)	0.381 (138.6)	0.366 (133.1)	0.467 (164.4)
	800	0.338	0.317 (97.8)	0.280 (88.6)	0.277 (88.9)	0.237↓ (88.2)
	2000	0.362	0.292 (84.8)	0.237 (72.7)	0.163 (47.6)	0.058↓ (17.5↓)
後肢 (kgf)	0	0.098	0.134 (133.9)	0.146 (147.3)	0.125 (126.1)	0.138 (143.3)
	128	0.115	0.107 (94.1)	0.099 (88.1)	0.111 (99.9)	0.129 (113.8)
	320	0.136	0.099 (77.5)	0.120 (93.5)	0.125 (98.5)	0.133 (103.9)
	800	0.133	0.094 (95.1)	0.100 (90.5)	0.081 (87.7)	0.100 (83.3↓)
	2000	0.110	0.101 (99.8)	0.123 (128.7)	0.058↓ (55.7)	0.051↓ (52.5↓)

(下段の数値)は投与前の値に対するパーセンテージ

Dunnett 検定 ↓ p<0.05, ↓↓ p<0.01

128及び320 mg/kg 投与群では、有意な影響は認められなかった。800 mg/kg では、投与24時間後に前後肢の握力の有意な低下が認められた。2000 mg/kg では、投与6時間後に後肢の握力の低下が、24時間後には前後肢に有意な握力の低下が認められた。

腎機能に対する作用

ラットの尿量、尿中電解質排泄量、浸透圧、pH、潜血、蛋白質、ケトン体及びグルコースに対する作用

供試動物：SD系ラット (Crj:CD, SPF), 6週齢(試験開始時), 体重 雄 177.2~199.1 g,

1群雄5匹

投与方法：ラットを強制排尿させた後、検体をコーンオイルに懸濁し、0, 51.2, 128, 320, 800および2000 mg/kgを単回経口投与し、その直後と30分後に生理食塩液2.5 mL/100g体重の割合で経口負荷した。最初の生理食塩液負荷直後1匹ずつ採尿ケージに入れ、投与後6時間まで尿を採取し、上記項目を測定した。なお、用量設定は

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果：

投与量 (mg/kg)	尿量 (mL/100g/6hr)	K+排泄量 (μ Eq/100g/6hr)	Na/K 比 (μ Eq/100g/6hr)
0	2.3	73	4.81
51.2	2.5	70	5.92
128	3.2	83	4.89
320	3.4↑	103	4.92
800	3.6↑	109	5.25
2000	1.3	27↓	10.97↑

Dunnett 検定 ↑↓ p<0.05, ↑ p<0.01

128 mg/kg までは、腎機能への影響は認められなかった。800 mg/kg 以上では、尿 pH が中性～アルカリ性の個体が散見され、尿糖陽性例と尿蛋白出現例数が増加し腎機能への影響が認められた。なお、320～800 mg/kg で用量に依存した尿量の増加が認められた。2000 mg/kg 群では K+排泄量の有意な減少と Na/K 比の有意な増加が認められた。

以上の試験結果より、本剤は 3 mg/kg で肝臓の代謝酵素阻害に起因すると考えられる hexobarbital 誘発睡眠時間延長が認められた。その他の生体機能に対する影響は、投与 24 時間後に回復する一過性の変化が 320 mg/kg で、さらに重篤な変化は死亡を生じる用量である 800 及び 2000 mg/kg で認められたが、これらの変化は全身状態の悪化がもたらした非特異的な反応と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

メトコナゾールの「生体機能への影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数/ 群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 一般状態 [Irwin法]	マウス	経口 (コーンオイル)	0, 128, 320, 800, 2000	雄 3 雌 3	320	128	警戒性, 受動性 及び正向反射の 低下, 歩行失調
	ラット	経口 (コーンオイル)	0, 128, 320, 800, 2000	雄 5	320	128	正向反射の低下, 警戒性, 受動性の低下, 歩行失調
中枢神経系 体温	ラット	一般状態と同じ動物使用			800	320	体温の低下
中枢神経系 hexobarbital 誘発睡眠	マウス	経口 (コーンオイル)	0, 0.3, 1, 3, 10	雄 8	3	1	睡眠延長
循環器系 血圧・心拍数	ラット	経口 (コーンオイル)	0, 128, 320, 800, 2000	雄 5	320	128	血圧及び心拍数 ともに低下
自律神経系 瞳孔径	ラット	経口 (コーンオイル)	一般状態と同じ動物使用		800	320	瞳孔径の拡大 1例を除き24時 間で回復
消化器系 小腸炭末輸送 能	マウス	経口 (コーンオイル)	0, 128, 320, 800, 2000	雄 8	—	2000	800 mg/kg 以上 で炭末移行率の 低下が見られた 有意差なし
骨格筋 握力	ラット	経口 (コーンオイル)	一般状態と同じ動物使用		800	320	前後肢握力の 低下
腎機能	ラット	経口 (コーンオイル)	0, 51.2, 128, 320, 800, 2000	雄 5	320	128	尿 pH の中性～ アルカリ性, 尿 糖陽性, 尿蛋白 出現の増加

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

VIII.1.11. その他

- 1) ラットの妊娠後期における血清中ステロイドホルモン濃度及び肝臓薬物代謝酵素含量の測定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

以上の結果から、本剤を 750ppm (43.0 mg/kg/日) の濃度で雌ラットに投与すると、主として妊娠 19 日及び 21 日における E/P 比の上昇が抑制されるため、分娩の発来遅延や娩出困難が引き起こされ、妊娠期間の延長と一部の雌に分娩時死亡が発現したと結論される。この E/P 比の上昇抑制には、少なくとも肝臓のミクロソーム CYP3A2 含量が著しく増加したことによる 17 β -エストラジオールの過度の代謝促進と黄体細胞の増殖活性が持続したことによるプロジェステロン産生の長期化が関連していると推察される。本剤は、150ppm (8.89 mg/kg/日) の濃度でミクロソーム蛋白含量とチトクローム P-450 含量を増加させる可能性があるが、E/P 比の上昇に悪影響を及ぼすことはなく無毒性量と考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表 2 検査結果の概要

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

2) カニクイザルにおける 13 週間反復経口投与眼毒性試験

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

以上の結果から、イヌの亜急性毒性試験および慢性毒性試験でみられた眼の水晶体の異常は、カニクイザルでは認められず、イヌに特有な症状と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

3) マウスを用いた肝薬物代謝酵素誘導, 細胞増殖及び活性酸素産生能試験 (資料 2-32)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

以上の結果より、本検体はフェノバルビタールに類似した肝薬物代謝酵素誘導剤であり、また、細胞分裂促進作用のある既知の非変異原性肝発癌物質 nongenotoxic-mitogenic hepatocarcinogen と同様な細胞増殖能(mitogenic activity)を有することが示唆された。加えて、酸化ストレスを介しての細胞障害性も併せ持つことが示唆された。なお、本試験における無毒性量 no-observed-adverse-effect level (NOAEL) は 30ppm (4.49 mg/kg/日) であると判断され、本剤の肝薬物代謝酵素誘導、細胞増殖および酸化ストレスを介しての細胞障害作用にはそれぞれ閾値があることが確認された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

4) Wistarラットを用いた4週間飼料混入投与による免疫毒性試験 (資料2-30-⑨)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

以上の結果、検体をWistar系雄ラットに 0, 70, 210及び630 ppmの濃度で4週間飼料混入投与したところ、630 ppm群において体重増加量の低下が観察されたが、免疫毒性に関する検査項目に異常は認められなかった。したがって、検体の免疫毒性に関する無毒性量は、630 ppm (52 mg/kg/日)であり、全身毒性の無毒性量は、210 ppm (17 mg/kg/日)であると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

5) ウサギにおける経皮投与による催奇形性試験

(資料 2-33)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

以上の結果から、本剤を妊娠ウサギに経皮投与した場合の母動物における無毒性量は 90 mg/kg/日であると判断される。また、胚・胎児の発生における毒性は何れの用量においてもみられず、無毒性量は 270 mg/kg/日であると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

VIII. 2. 原体混在物及び代謝物

急性毒性

1) メトコナゾール cis およびメトコナゾール trans

①ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 2-20)

試験機関: Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年: 1989 年

検体の純度^{a)}: メトコナゾール cis(ラセミ体) ()
 メトコナゾール trans(ラセミ体) ()
 メトコナゾール cis(-) ()

供試動物: Fischer 344 ラット, 入荷時 8~9 週齢, 投与開始時体重範囲 187~223 g,
 1 群雄各 3 匹

観察期間: 14 日間観察

投与方法: 検体をコーン油に懸濁して経口投与した。投与前に一晩絶食した。

観察・検査項目: 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。投与日, 投与後 7 日および 14 日に体重を測定した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果:

検 体	メトコナゾール cis (ラセミ体)	メトコナゾール trans (ラセミ体)	メトコナゾール cis(-)
投与方法	経口		
投与量 (mg/kg)	300, 600, 900	300, 600, 900	300, 600, 900
累積死亡数	0/3, 0/3, 1/3	0/3, 3/3, 3/3	0/3, 0/3, 0/3
死亡開始時間及び終了時間	投与後 4 日から開始 投与後 4 日に終了	投与後 3 日から開始 投与後 4 日に終了	—
症状発現時間及び消失時間	投与後 1 時間から発現 投与後 10 日に消失	投与後 1 時間から発現 投与後 9 日に消失	投与後 2 時間から発現 投与後 9 日に消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量	—	—	—
死亡例の認められなかった最高投与量	600	300	900
急性経口毒性の強さ	2	1	3

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

メトコナゾール cis (ラセミ体) ;

900 mg/kg 投与群で投与 4 日目に 1 例が死亡した。全動物に粗毛が認められ、中間用量群および高用量群において下痢が認められた。その他の臨床症状として 600 mg/kg 群の 1 例における色素涙、900 mg/kg 群の全例における運動失調および眼球退色、900 mg/kg 群の数例における異常姿勢 (円背位)、不活発、口周囲の血液付着が認められた。また、900 mg/kg 群の生存ラットにおいて、試験第 1 週に体重の減少または体重増加量の低下が認められた。

メトコナゾール trans (ラセミ体) ;

600 および 900 mg/kg 群の全動物が、投与後 3 日目または 4 日目に死亡した。

全動物に粗毛が認められた。300 mg/kg 投与群では異常姿勢 (円背位) が観察された。また、600 および 900 mg/kg 群の全動物において下痢、嗜眠、眼球退色が、900 mg/kg 群の全動物および 600 mg/kg 群の数例において色素涙および歩行失調・不活発が、600 mg/kg 群の 1 例において運動失調および昏睡が認められた。

300 mg/kg 群のラットにおいて投与第 1 週に体重減少がみられた。

メトコナゾール cis (-) ;

死亡は認められなかった。

試験期間を通して全動物に下痢および粗毛がみられた。その他 900 mg/kg 群のラットにおいて異常姿勢 (円背位) および眼球退色がみられた。900 mg/kg 群の 1 例において投与第 1 週に体重が減少した。

以上の結果から、死亡率、600 および 900 mg/kg 投与群の動物における臨床症状の程度、投与第 1 週の体重変化を考慮して、3 種の検体の急性経口毒性を以下のとおりランク付けした。

メトコナゾール trans (ラセミ体) >メトコナゾール cis (ラセミ体) >メトコナゾール cis (-)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

2) 原体混在物

①マウスにおける急性経口毒性試験

(資料 2-21-①)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1992年

化学名：

検体の純度：

供試動物：ICR系SPFマウス(Crj:CD-1)，7日間馴化，

投与開始時5週齢，投与開始時体重範囲 雄 25.3～34.6 g，雌 21.0～26.4 g，

1群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察

投与方法：検体をオリーブ油に懸濁して単回強制経口投与した。投与約3時間30分前よりすべての動物への投与終了後3時間まで動物を絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。

体重測定は，投与時，動物の死亡発見時，投与後3，7および14日目に実施した。途中死亡動物および試験終了時における全生存動物について剖検し，肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	263, 341, 444, 577, 750
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄：543(440-671) 雌：480(430-537)
死亡開始時間及び終了時間	投与後2日から開始 投与後3日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後1時間から発現 投与後3日に消失
症状の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄：263 雌：なし
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄：341 雌：341

中毒症状として，自発運動低下，よろめき歩行，痙攣，呼吸緩徐，鎮静および昏睡が雌雄ともに認められ，検体投与に起因する症状と考えられた。途中死亡動物の剖検では小腸内水様性内容物うっ滞が認められた。試験終了時における生存動物の剖検では雌雄いずれの動物にも異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

②細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 2-21-②)

試験機関：(財)残留農薬研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

化学名：

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA1535, TA1537, TA98 および TA100) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用い、ラットの肝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 らの方法を用いてプレート法で変異原性を検索した。

検体は溶媒としてジメチルスルホキシドを用いて調製し、処理用量は 100 μ L とした。各用量 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数した。試験は 2 回行い、結果に再現性があることを確認した。

検体処理群において、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、この増加が再現性および用量-反応効果を伴うものである場合に、検体は変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠：

結果：結果を次頁の表に示した。

検体は 2 回の試験において、S9 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溶媒対照に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加を示さなかった。S9 mix の有無にかかわらず、500 μ g/プレート以上の用量で菌株に対する抗菌性が認められた。

一方、陽性対照群では、溶媒対照に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、試験に用いた菌液、検体溶液、S9 mix に雑菌の汚染がないこと、各菌株の溶媒対照においてその菌株特有の自然復帰変異コロニー数が出現する事を確認し、試験の有効性が確認された。

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

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-1 復帰突然変異試験成績 (1 回目の実験)

(表中の値は 3 枚のプレートの平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	-	90	7	16	30	5
検体	15.6	-	76	7	22	25	6
	31.3	-	71	8	15	30	6
	62.5	-	80	8	15	32	5
	125	-	80	11	19	27	7
	250	-	69	10	20	25	8
	500	-	*	6*	14*	*	*
陽性対照							
AF-2	0.01	-	435	N	N	N	N
SA	0.5	-	N	491	N	N	N
AF-2	0.04	-	N	N	655	N	N
AF-2	0.1	-	N	N	N	562	N
9-AA	80	-	N	N	N	N	1547
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	+	80	7	14	32	13
検体	15.6	+	73	9	22	30	11
	31.3	+	80	7	20	35	7
	62.5	+	90	4	18	35	13
	125	+	89	3	23	34	10
	250	+	88	6	15	24	7
	500	+	44*	3*	19*	23*	5*
陽性対照							
2-AA	0.5	+	587	N	N	N	N
2-AA	2	+	N	344	N	N	N
2-AA	40	+	N	N	513	N	N
2-AA	0.5	+	N	N	N	625	N
2-AA	2	+	N	N	N	N	232

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, SA : アジ化ナトリウム,

9-AA : 9-アミノアクリジン, 2-AA : 2-アミノアントラセン, N : 試験を行っていない

*: 菌株の生育阻害を認める

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-2 復帰突然変異試験成績 (2回目の実験)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	-	95	9	17	26	6
検体	15.6	-	87	8	16	20	6
	31.3	-	81	7	17	25	4
	62.5	-	84	7	20	21	7
	125	-	90	7	18	24	6
	250	-	95	5	17	26	8
	500	-	*	6*	15*	*	*
陽性対照							
AF-2	0.01	-	377	N	N	N	N
SA	0.5	-	N	399	N	N	N
AF-2	0.04	-	N	N	494	N	N
AF-2	0.1	-	N	N	N	521	N
9-AA	80	-	N	N	N	N	2050
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	+	78	7	17	29	9
検体	15.6	+	76	6	15	29	5
	31.3	+	79	6	21	24	8
	62.5	+	72	7	17	26	12
	125	+	87	11	23	32	9
	250	+	77	6	21	30	6
	500	+	46*	4*	19*	25*	2*
陽性対照							
2-AA	0.5	+	758	N	N	N	N
2-AA	2	+	N	351	N	N	N
2-AA	40	+	N	N	655	N	N
2-AA	0.5	+	N	N	N	737	N
2-AA	2	+	N	N	N	N	267

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, SA : アジ化ナトリウム,

9-AA : 9-アミノアクリジン, 2-AA : 2-アミノアントラセン, N : 試験を行っていない

*: 菌株の生育阻害を認める

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

3) 原体混在物

①ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 2-22-①)

試験機関 : Safeparm Laboratories Limited

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1999 年

化学名 :

検体の純度 :

供試動物 : Sprague-Dawley CD (Cr1:CD(SD)IGS BR)系ラット, 5日間以上馴化,
投与開始時 8~12 週齢, 投与開始時体重範囲 雄 200~222 g, 雌 207~246 g
1 群雌雄各 5 匹

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体を DMSO に溶解して経口投与した。投与前に一晩絶食した。

観察・検査項目 : 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。投与前 (0 日), 投与後 7 日および 14 日および死亡時に体重を測定した。試験終了時に, 動物を頸部脱臼により屠殺し, 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 : 1000, 1414, 2000 雄 : 2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌 : 1519 (974-2368) 雄 : >2000
死亡開始時間及び終了時間	投与後 1 日から開始 投与後 3 日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後 30 分から発現 投与後 9 日に消失
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌 : なし 雄 : 2000

中毒症状としては, 運動失調, 脱水, 削瘦, 円背位, 嗜眠, 立毛, 呼吸数減少, 喘鳴呼吸および努力性呼吸, 流涎の増加, 眼, 口, 鼻周囲の汚れ, がに股歩行あるいは爪先歩行が観察された。死亡動物の剖検では, 出血性あるいは異常に赤い肺, 肝臓の暗調化, 腎臓の暗調化, 胃粘膜の出血, 小腸および大腸の出血が観察された。試験終了時の生存動物の剖検では, 異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

②細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 2-22-②)

試験機関 : Safeparm Laboratories Limited

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1999 年

化学名 :

検体純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA1535, TA1537, TA98 および TA100) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用い、ラットの肝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 らの方法を用いて、プレート法で変異原性を検索した。

検体は溶媒としてジメチルスルホキシドを用いて調製し、処理容量は 100 μ L とした。各用量 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、コロニーカウンターを用いて復帰変異コロニーを計数した。復帰突然変異試験は 2 回実施した。少なくとも 1 つの菌株において、再現性を伴う用量に相関した統計学的に有意な復帰変異体数の増加が認められた場合に、検体は変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠 :

結果 : 結果を次頁の表に示した。

検体処理群において、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの用量においても、復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。サルモネラ菌では 500 μ g/プレート以上の用量において、菌株に対する抗菌性が認められる場合があった。5000 μ g/プレートの用量で検体の析出が認められた。

一方、試験に用いたすべての陽性対照物質は、復帰変異コロニー数の明らかな増加を誘発した。従って、S9 mix の活性および菌株の感受性が確認された。また、溶媒対照の復帰変異コロニー数は正常範囲内であった。

以上の結果より、本検体は、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。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-1 復帰突然変異試験成績 (実験 1)

(表中の値は 3 枚のプレートの平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	-	139	13	21	25	15
検体	5	-	137	13	N	20	12
	15	-	128	14	N	27	12
	50	-	139	14	21	25	10
	150	-	137	15	21	26	14
	500	-	75*	12*	17	16	0*
	1500	-	0*	0*	23	19*	0*
	5000	-	N	N	14P	N	N
陽性対照							
ENNG	3	-	749	N	N	N	N
ENNG	5	-	N	259	N	N	N
ENNG	2	-	N	N	1127	N	N
4NQO	0.2	-	N	N	N	182	N
9AA	80	-	N	N	N	N	1397
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	+	151	14	29	32	18
検体	5	+	157	13	N	32	19
	15	+	152	13	N	26	18
	50	+	153	15	28	26	21
	150	+	160	16	24	23	15
	500	+	100*	11	19	26	4*
	1500	+	0*	0*	32	17*	0*
	5000	+	N	N	14P	N	N
陽性対照							
2AA	1	+	1196	N	N	N	N
2AA	2	+	N	290	N	N	N
2AA	10	+	N	N	807	N	N
BP	5	+	N	N	N	399	N
2AA	2	+	N	N	N	N	390

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド,
9AA : 9-アミノアクリジン, 2AA : 2-アミノアントラセン, BP : ベンズ(a)ピレン

N : 試験を行っていない

* : バックグラウンドの菌の生育阻害が認められる

P : 検体の析出が認められる

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-2 復帰突然変異試験成績 (実験 2)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	-	114	31	22	20	9
検体	5	-	122	29	N	19	12
	15	-	113	26	N	21	10
	50	-	101	24	26	23	12
	150	-	110	22	28	17	11
	500	-	85*	16*	25	18	0*
	1500	-	0*	0*	21	15*	0*
	5000	-	N	N	11P	N	N
陽性対照							
ENNG	3	-	778	N	N	N	N
ENNG	5	-	N	523	N	N	N
ENNG	2	-	N	N	973	N	N
4NQO	0.2	-	N	N	N	226	N
9AA	80	-	N	N	N	N	1100
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	+	126	16	30	35	21
検体	5	+	131	18	N	38	17
	15	+	122	17	N	36	14
	50	+	125	20	29	34	16
	150	+	107	12	27	25	16
	500	+	84*	16*	24	29	7*
	1500	+	0*	2*	21	25*	0*
	5000	+	N	N	16P	N	N
陽性対照							
2AA	1	+	909	N	N	N	N
2AA	2	+	N	269	N	N	N
2AA	10	+	N	N	639	N	N
BP	5	+	N	N	N	231	N
2AA	2	+	N	N	N	N	455

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド,

9AA : 9-アミノアクリジン, 2AA : 2-アミノアントラセン, BP : ベンズ(a)ピレン

N : 試験を行っていない

* : バックグラウンドの菌の生育阻害が認められる

P : 検体の析出が認められる

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

4) 原体混在物

①ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 2-23-①)

試験機関 : Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1992 年

化学名 :

検体の純度 :

供試動物 : Fischer 344 ラット, 4 日間以上馴化,

入荷時 8~9 週齢, 投与開始時体重範囲 雄 202~219 g, 雌 121~159 g,

1 群雌雄各 5 匹

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体をコーン油に溶解して単回強制経口投与した。投与前に一晩絶食させた。

観察・検査項目 : 中毒症状および生死を 14 日間観察した。第 1 日, 第 8 日および第 15 日の体重を記録し, 体重の変化を計算した。第 15 日にベンゾピリテール・ナトリウムの腹腔内注射により屠殺し, 剖検した。肉眼による病理学的変化はすべて記録した。

結 果 :

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌 : >5000
死亡開始時間及び終了時間	なし
症状発現時間及び消失時間	投与後 0.4 時間から発現 投与後 5 日目に消失
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000

試験終了時の剖検で, 肉眼による変化は見られなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

②ウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料 2-23-①)

試験機関 : Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1992 年

化学名 :

検体の純度 :

供試動物 : ニュージーランドホワイト種ウサギ, 12 日間以上馴化,
入荷時 3~5 ヶ月齢, 投与開始時体重範囲 雄 3.72~4.26 kg, 雌 4.07~4.45 kg,
1 群雌雄各 3 匹

観察期間 : 7 日間観察

投与方法 : 投与前日に電気バリカンを用いて動物の背部の毛を刈り取った。皮膚の供試部位を水で湿らせた。検体 (500 mg) を 6 cm² のリント・パッチに付けて湿らせた皮膚に貼り付け, ガーゼで覆い, 半閉塞性の弾力のある粘着包帯で固定した。4 時間暴露後, 包帯を取り除き, 皮膚を水で洗ってから乾かした。

観察項目 : パッチ除去後, 紅斑, 浮腫及びその他の皮膚の変化について検査した。紅斑及び浮腫は EEC の基準 (申請者注 : 農林水産省ガイドラインの基準と同様) に従って採点した。24, 48 および 72 時間後の各時点での平均評点および群平均評点を計算した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点は以下の表のとおりである。

項目	最高評点*	暴露後時間				
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	7 日
紅斑	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
浮腫	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
合計	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表の点数は 6 匹の平均値である。

* 判定基準の最高評点

いずれの動物においても皮膚刺激性反応, その他の異常も認められなかった。

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

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

③ウサギにおける眼刺激性試験

(資料 2-23-①)

試験機関 : Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1992 年

化学名 :

検体の純度 :

供試動物 : ニュージーランドホワイト種ウサギ, 12 日間以上馴化,
入荷時 3~5 ヶ月齢, 投与開始時 雄 : 3.49~3.66 kg, 雌 : 4.01~4.69 kg
1 群雌雄各 3 匹

観察期間 : 7 日間観察

投与方法 : 検体 54 mg (0.1 mL 相当) を, 各動物の片方の眼の下部結膜嚢内に入れた。処理した眼は
2, 3 秒間そっと閉じておき, 検体の喪失を防いだ。洗眼は行わなかった。

観察項目 : 適用後 1, 4, 24, 48, 72 時間及び 7 日後に角膜, 虹彩, 結膜の刺激性変化を観察し, EEC
の基準 (申請者注 : 農林水産省ガイドラインと同様) に従って採点した。

結 果 :

項目			最高 評点 ^a	暴露後時間					
				1 時間	4 時間	24 時間	48 時間	72 時間	7 日
非 洗 眼 群 6 匹	角膜	程度(A)	4	0	0	0	0	0	0
		面積(B)	4	0	0	0	0	0	0
	虹彩	(C)	2	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤(D)	3	0.2	0.2	0	0	0	0
		浮腫(E)	4	0	0	0	0	0	0
		その他(分泌物)(F) ^b	3	1.0	0	0	0	0	0
合 計 ^c			110	2.4	0.4	0	0	0	0

表の点数は 6 匹の平均値である。

a 判定基準の最高評点

b 申請者注 ドレイズ法に従って最高評点を 3 として採点。「わずかな分泌物」を評点 1 とした

c 申請者注 ドレイズ法による評価合計点

群平均値より算出, $((A) \times (B) \times 5) + ((C) \times 5) + ((D) + (E) + (F)) \times 2$

結膜の充血が検体適用後 1 及び 4 時間に 1 例で観察された。この軽微な刺激性変化は 24 時間以内に消失した。

角膜及び虹彩には検体投与の影響はみられなかった。

以上の結果から, 本検体はウサギに対して刺激性がないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

④モルモットにおける皮膚感作性試験

(資料 2-23-①)

試験機関 : Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1992 年

化学名 :

検体の純度 :

供試動物 : Dunkin-Hartley 系統, 8 日間以上馴化,

入荷時 5~9 週齢, 投与開始時体重範囲 雄 351~425 g, 雌 342~408 g

検体投与群雌雄各 10 匹, 対照群 1 群雌雄各 5 匹,

観察期間 : 惹起後 48 時間観察

投与方法 : [Maximization 法]

投与量設定根拠 :

皮内感作投与 ; 第 1 日に肩甲部を刈毛し, 正中線をはさんで片側 1 列に 3 箇所ずつ, 計 6 箇所に皮内投与液 0.1 mL を投与した。

局所感作投与 ; 第 7 日 (感作皮内投与 6 日後) に感作皮内投与部位を刈毛し, 0.45 mL の適度に薄めた検体を湿らせ, 48 時間閉塞貼付した。

局所惹起投与 ; 第 22 日, 感作経皮貼付投与から 3 週間後に刈毛した脇腹に, 0.15 mL の適度に薄めた検体を閉塞貼付した。惹起の 24 時間後および 48 時間後に, 惹起に対する皮膚の反応を評価した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果：各観察時間における感作変化が認められた動物数を下表に示す。

群	感作	惹起	観察時間	皮膚反応動物数/ 供試動物数
検体投与群	皮内投与 0.2%	70% 検体	0	10/20
			24	2/20
			48	0/20
検体対照群	皮内投与 0.2%	70% 検体	0	7/10
			24	0/10
			48	0/10

20 匹の供試動物中の 2 匹がチャレンジ・パッチ除去の 24 時間後に陽性反応を示した。48 時間後には陽性反応を示した動物はなかった。

雄 1 匹の対照動物が、局所感作手順中に施された包帯の除去の翌日に、出血性脱腸を生じた。この動物は苦痛を与えないように屠殺した。

以上の結果から、本検体の皮膚感作性は陰性であると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

⑤ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 2-23-①)

試験機関 : Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1992 年

化学名 :

検体の純度 :

供試動物 : Fischer 344 ラット, 4 日間以上馴化,
入荷時 8~9 週齢, 投与開始時体重範囲 雄 207~249 g, 雌 148~157 g,
1 群雌雄各 5 匹

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 投与前日に電気バリカンを用いて動物の背部の毛を刈り取った。第 1 日に動物の体重を測定し, 検体の単回投与量を皮膚に塗布した。検体は脱イオン水で湿らせ, ガーゼ (約 6×8 cm) で包帯して適所に保持し, 防水粘着テープで覆った。その後ラットを個別別に収容した。24 時間の暴露後に包帯を取り除き, 皮膚を暖かい薄めた洗剤液で洗い, 乾かした。動物はグループ毎の収容に戻した。

観察・検査項目 : 投与当日 (第 1 日) には 6 回, 14 日間の観察期間中のその他の日には毎日 2 回, 詳細に臨床的な検討を行った。最初 (第 1 日), 第 8 日および第 15 日の体重を記録し, 体重の変化を計算した。第 15 日にペントバルビタル・ナトリウムの腹腔内注射により屠殺し, 剖検した。肉眼による病理学的変化はすべて記録した。

結 果 :

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄雌 : >2000
死亡開始時間及び終了時間	なし
症状発現時間及び消失時間	投与後 2 日から発現 投与後 3 日目に消失
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000

全身毒性を示す症状は観察されなかった。パッチ除去後 2 日に投与部位に紅斑が観察されたが, 翌日には回復した。

剖検では, 投与部位の皮膚および皮下組織の血管のうっ血が観察された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

⑥細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 2-23-②)

試験機関 : Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1992 年

化学名 :

検体の純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 5 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537 および TA1538) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2*uvrA*/pKM101 株を用い, アロクロール 1254 で誘導した雄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 らの方法を用いてプレート法で変異原性を検索した。

検体は溶媒としてジメチルスルホキシドを用いて調製し, 処理容量は 20 μ L/プレートとした。各用量 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 から 72 時間培養後, 復帰変異コロニーを計数した。再現性のある正の用量反応関係が認められる場合あるいは溶媒対照に比し 2.5 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められる場合に変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠 :

結果 : 結果を次頁の表に示した。

分析の結果, ジメチルスルホキシドに調製した検体溶液は少なくとも 1 日は安定であった。2 回の独立した復帰突然変異試験の結果, 検体処理群において, S9 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の増加は認められなかった。一方, 陽性対照群では, 明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より, 本試験条件下における本検体の細菌に対する突然変異誘発性は陰性であると結論された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表1 復帰突然変異試験成績 (実験1)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			TA100	TA1535	WP2uvrA/ pKM101	TA1538	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	20 μL	-	93	17	111	23	30	12
検体	31.25	-	85	17	106	20	26	11
	62.5	-	89	27	108	11	25	10
	125	-	95	17	114	8	31	11
	250	-	97	12	105	12	27	13
	500	-	84	21	106	9	25	9
	1000	-	81	23	92	12	21	10
	2000	-	70	17	94	13	20	11
	5000	-	75	10	94	10	14	9
陽性対照								
NaN ₃	2	-	N	706	N	N	N	N
NaN ₃	5	-	589	N	N	N	N	N
AAC	50	-	N	N	N	N	N	407
PD	20	-	N	N	498	N	N	N
NF	5	-	N	N	N	675	653	N
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	20 μL	+	114	16	113	25	32	14
検体	31.25	+	111	12	118	25	30	16
	62.5	+	120	8	118	21	28	11
	125	+	121	12	120	14	28	13
	250	+	141	13	109	14	25	11
	500	+	118	16	117	13	21	12
	1000	+	112	13	99	13	24	11
	2000	+	98	10	109	15	18	12
	5000	+	83	13	108	9	22	11
陽性対照								
BP	10	+	856	N	784	255	537	N
AAN	5	+	N	212	N	N	N	N
NR	20	+	N	N	N	N	N	283

NaN₃:アジ化ナトリウム, AAC:9-アミノアクリジン, PD:ニクロム酸カリウム,
 NF:2-ニトロフルオレン, BP:ベンズ(a)ピレン, AAN:2-アミノアントラセン,
 NR:ニュートラルレッド
 N:試験を行っていない

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表2 復帰突然変異試験成績 (実験2)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9mix の 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			TA100	TA1535	WP2uvrA/ pKM101	TA1538	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	20 μL	-	96	15	112	18	20	12
検体	31.25	-	103	12	106	18	17	11
	62.5	-	86	14	108	13	14	13
	125	-	99	12	109	21	14	11
	250	-	102	11	100	18	12	11
	500	-	86	13	88	14	14	12
	1000	-	93	10	82	13	16	9
	2000	-	84	12	54	15	9	9
5000	-	85	12	83	16	11	12	
陽性対照								
NaN ₃	2	-	N	665	N	N	N	N
NaN ₃	5	-	657	N	N	N	N	N
AAC	50	-	N	N	N	N	N	281
PD	20	-	N	N	502	N	N	N
NF	5	-	N	N	N	621	473	N
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	20 μL	+	114	14	111	24	22	13
検体	31.25	+	108	12	106	22	17	14
	62.5	+	121	14	103	25	19	13
	125	+	119	11	119	21	19	13
	250	+	122	12	92	24	16	13
	500	+	111	9	103	24	16	13
	1000	+	107	11	94	18	16	12
	2000	+	89	13	101	19	13	12
5000	+	91	10	106	20	16	13	
陽性対照								
BP	10	+	697	N	804	305	550	N
AAN	5	+	N	249	N	N	N	N
NR	20	+	N	N	N	N	N	267

NaN₃:アジ化ナトリウム, AAC:9-アミノアクリジン, PD:二クロム酸カリウム,
 NF:2-ニトロフルオレン, BP:ベンズ(a)ピレン, AAN:2-アミノアントラセン,
 NR:ニュートラルレッド
 N:試験を行っていない

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

5) 原体不純物

①ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 2-24-①)

試験機関 : Safepharm Laboratories Limited

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1999 年

化学名 :

検体の純度 :

供試動物 : Sprague-Dawley CD (Cr1:CD(SD) IGS BR)系ラット, 5 日間以上馴化,
投与開始時 8~12 週齢, 投与開始時体重範囲 雄 219~230 g, 雌 211~224 g
1 群雌雄各 5 匹

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体を DMSO に溶解して単回強制経口投与した。投与前に一晩絶食した。

観察・検査項目 : 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。投与前 (0 日), 投与後 7 日および 14 日に体重を測定した。試験終了時に, 動物を頸部脱臼により屠殺し, 肉眼的病理検査を行った。

結 果 :

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄 : >2000
死亡開始時間及び終了時間	なし
症状発現時間及び消失時間	投与後 2 時間から発現 投与後 2 日に消失
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状としては, 投与後 2 時間~1 日に, 円背位が全例で認められたが, 投与 2 日後には回復した。

試験終了時の生存動物の剖検では, 異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

②細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 2-24-②)

試験機関 : Safeparm Laboratories Limited

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1999 年

化学名 :

検体純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA1535, TA1537, TA98 および TA100) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用い、ラットの肝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 らの方法を用いて、プレート法で変異原性を検索した。

検体は溶媒としてジメチルスルホキシドを用いて調製し、処理容量は 100 μ L とした。各用量 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、コロニーカウンターを用いて復帰変異コロニーを計数した。復帰突然変異試験は 2 回実施した。少なくとも 1 つの菌株において、再現性を伴う用量に相関した統計学的に有意な復帰変異体数の増加が認められた場合に、検体は変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠 :

結果 : 結果を次頁の表に示した。

検体処理群において、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの用量においても、復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。サルモネラ菌では、菌株により用量は異なるが、検体による抗菌性が認められた。

一方、試験に用いたすべての陽性対照物質は、復帰変異コロニー数の明らかな増加を誘発した。従って、S9 mix の活性および菌株の感受性が確認された。また、溶媒対照の復帰変異コロニー数は正常範囲内であった。

以上の結果より、本検体は、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。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表1 復帰突然変異試験成績 (実験1)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	-	125	11	18	23	9
検体	5	-	139	13	N	N	14
	15	-	138	15	N	N	15
	50	-	139	16	21	16	10
	150	-	139	16	18	16	10
	500	-	115	18	18	17	4*
	1500	-	66*	17*	21	16	0*
	5000	-	N	N	11P	13*P	N
陽性対照							
ENNG	3	-	749	N	N	N	N
ENNG	5	-	N	259	N	N	N
ENNG	2	-	N	N	1127	N	N
4NQO	0.2	-	N	N	N	129	N
9AA	80	-	N	N	N	N	1397
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	+	151	11	27	26	20
検体	5	+	155	14	N	N	17
	15	+	154	14	N	N	21
	50	+	170	13	27	29	19
	150	+	155	15	30	29	19
	500	+	123	13	27	18	17
	1500	+	92*	13*	24	20	8*
	5000	+	N	N	10P	13*	N
陽性対照							
2AA	1	+	1196	N	N	N	N
2AA	2	+	N	290	N	N	N
2AA	10	+	N	N	807	N	N
BP	5	+	N	N	N	274	N
2AA	2	+	N	N	N	N	390

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド,

9AA : 9-アミノアクリジン, 2AA : 2-アミノアントラセン, BP : ベンズ(a)ピレン

N : 試験を行っていない

* : バックグラウンドの菌の生育阻害が認められる

P : 検体の析出が認められる

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表2 復帰突然変異試験成績 (実験2)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9mix 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	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	-	106	36	25	19	10
検体	5	-	99	18	N	N	8
	15	-	110	29	N	N	7
	50	-	113	33	24	21	9
	150	-	119	32	26	20	10
	500	-	85*	27*	28	23	5
	1500	-	38*	28*	17	24	6*
	5000	-	N	N	12P	12*P	N
陽性対照							
ENNG	3	-	455	N	N	N	N
ENNG	5	-	N	323	N	N	N
ENNG	2	-	N	N	641	N	N
4NQO	0.2	-	N	N	N	143	N
9AA	80	-	N	N	N	N	1649
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	+	97	19	27	28	14
検体	5	+	97	16	N	N	17
	15	+	87	19	N	N	17
	50	+	92	19	26	33	15
	150	+	88	17	27	25	15
	500	+	76	11*	24	25	14
	1500	+	51*	11*	25	26	6*
	5000	+	N	N	11P	15*P	N
陽性対照							
2AA	1	+	953	N	N	N	N
2AA	2	+	N	260	N	N	N
2AA	10	+	N	N	627	N	N
BP	5	+	N	N	N	229	N
2AA	2	+	N	N	N	N	307

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド,

9AA : 9-アミノアクリジン, 2AA : 2-アミノアントラセン, BP : ベンズ(a)ピレン

N : 試験を行っていない

* : バックグラウンドの菌の生育阻害が認められる

P : 検体の析出が認められる

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

6) 代謝物

①ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 2-25-①)

試験機関 : Safeparm Laboratories Limited

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1999 年

化学名 :

検体の純度 :

供試動物 : Sprague-Dawley CD (CrI:CD(SD)IGS BR)系ラット, 5 日間以上馴化,
投与開始時 8~12 週齢, 投与開始時体重範囲 雄 205~224 g, 雌 215~228 g,
1 群雌雄各 5 匹

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体を DMSO に溶解して単回強制経口投与した。投与前に一晩絶食させた。

観察・検査項目 : 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。体重は, 投与前 (0 日), 投与後 7 日および 14 日に測定した。試験終了時に, 動物を頸部脱臼により屠殺し, 肉眼的病理検査を行った。

結 果 :

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄 : >2000
死亡開始時間及び終了時間	なし
症状発現時間及び消失時間	投与後 2 時間から発現 投与後 2 日に消失
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状としては, 雌 2 例に円背位が観察された。雄ならびに残りの雌では試験期間中異常は認められなかった。

剖検では, 異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

②細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 2-25-②)

試験機関：Safeparm Laboratories Limited

[GLP 対応]

報告書作成年：1999 年

化学名：

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA1535, TA1537, TA98 および TA100) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用い、ラットの肝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 らの方法を用いて、プレート法で変異原性を検索した。

検体は溶媒としてジメチルスルホキシドを用いて調製し、処理容量は 100 μ L とした。各用量 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、コロニーカウンターを用いて復帰変異コロニーを計数した。5000 μ g/プレートの用量ではプレート上に著しい析出が認められたため、肉眼で復帰変異コロニーを計数した。復帰突然変異試験は 2 回実施した。少なくとも 1 つの菌株において、再現性を伴う用量に相關した統計学的に有意な復帰変異体数の増加が認められた場合に、検体は変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠：

結果：結果を次頁の表に示した。

検体処理群において、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの用量においても、復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。1500 μ g/プレート以上あるいは 5000 μ g/プレートの用量において、菌株に対する抗菌性が認められた。また、5000 μ g/プレートの用量で、プレート上に検体の析出が認められた。

一方、試験に用いたすべての陽性対照物質は、復帰変異コロニー数の明らかな増加を誘発した。従って、S9 mix の活性および菌株の感受性が確認された。また、溶媒対照の復帰変異コロニー数は正常範囲内であった。

以上の結果より、本検体は、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。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表1 復帰突然変異試験成績 (実験1)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド*)	100 μL	-	103	19	22	22	15
検体	15	-	100	16	20	24	18
	50	-	106	16	20	22	13
	150	-	103	17	23	23	9
	500	-	97	18	25	22	8
	1500	-	67*	13*	24	25	2
	5000	-	0*P	0*P	0*P	0*P	0*P
陽性対照							
ENNG	3	-	497	N	N	N	N
ENNG	5	-	N	248	N	N	N
ENNG	2	-	N	N	1131	N	N
4NQO	0.2	-	N	N	N	128	N
9AA	80	-	N	N	N	N	1077
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド*)	100 μL	+	117	13	33	25	22
検体	15	+	103	14	34	33	19
	50	+	95	13	27	31	18
	150	+	108	11	23	32	17
	500	+	117	14	26	32	14
	1500	+	74	11*	23	25	6
	5000	+	0*P	0*P	13*P	10*P	0*P
陽性対照							
2AA	1	+	652	N	N	N	N
2AA	2	+	N	261	N	N	N
2AA	10	+	N	N	558	N	N
BP	5	+	N	N	N	277	N
2AA	2	+	N	N	N	N	326

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド,

9AA : 9-アミノアクリジン, 2AA : 2-アミノアントラセン, BP : ベンズ(a)ピレン

N : 試験を行っていない

* : バックグラウンドの菌の生育阻害が認められる

P : 検体の析出が認められる

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表 2 復帰突然変異試験成績 (実験 2)

(表中の値は 3 枚のプレートの平均値)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	-	115	30	28	29	13
検体	15	-	113	28	26	23	16
	50	-	125	28	22	21	9
	150	-	126	28	21	15	10
	500	-	126	27	28	20	10
	1500	-	74*	24*	22	21	5*
	5000	-	0*P	0*P	0*P	0*P	0*P
陽性対照							
ENNG	3	-	778	N	N	N	N
ENNG	5	-	N	523	N	N	N
ENNG	2	-	N	N	973	N	N
4NQO	0.2	-	N	N	N	226	N
9AA	80	-	N	N	N	N	1100
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	+	101	9	28	25	17
検体	15	+	101	9	31	27	13
	50	+	94	8	32	27	19
	150	+	107	10	32	27	21
	500	+	108	10	29	24	15
	1500	+	57*	9*	26	25	6*
	5000	+	49*P	0*P	17*P	0*P	0*P
陽性対照							
2AA	1	+	909	N	N	N	N
2AA	2	+	N	192	N	N	N
2AA	10	+	N	N	639	N	N
BP	5	+	N	N	N	231	N
2AA	2	+	N	N	N	N	455

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド,
9AA : 9-アミノアクリジン, 2AA : 2-アミノアントラセン, BP : ベンズ(a)ピレン

N : 試験を行っていない

* : バックグラウンドの菌の生育阻害が認められる

P : 検体の析出が認められる

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

7) 代謝物

①ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 2-26)

試験機関：American Cyanamid Company

[GLP 対応]

報告書作成年：1997 年

化学名：

検体の純度：

供試動物：Sprague-Dawley CD (CrI:CD(SD)BR)系ラット，7日間以上馴化，

投与開始時 8 週齢，投与開始時体重範囲 雄 227～243 g，雌 172～182 g，

1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間観察

投与方法：検体を 0.5%CMC 水溶液に懸濁して単回強制経口投与した。投与前に一晩絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察した。体重は，投与前 (0 日)，投与後 7 日および 14 日に測定した。試験終了時に全生存動物について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)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄：>5000
死亡開始時間及び終了時間	なし
症状発現時間及び消失時間	なし
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000

14 日間の観察期間中，臨床症状は観察されなかった。

試験終了時の全ての動物は，14 日間の試験期間中体重が増加した。

剖検では，異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

8) 代謝物

①ラットにおける急性経口毒性試験

(資料 2-27-①)

試験機関 : Safeparm Laboratories Limited

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1999 年

化学名 :

検体の純度 :

供試動物 : Sprague-Dawley CD (Cr1:CD(SD) IGS BR)系ラット, 1群雌雄各5匹, 5日間以上馴化
投与開始時 8~12 週齢, 投与開始時体重範囲 雄 210~247 g, 雌 212~221 g

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体を DMSO に溶解して単回強制経口投与した。投与前に一晩絶食させた。

観察・検査項目 : 中毒症状及び生死を 14 日間観察した。体重は, 投与前 (0 日), 投与後 7 日および 14 日に測定した。試験終了時に, 動物を頸部脱臼により屠殺し, 肉眼的病理検査を行った。

結 果 :

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌雄 : >2000
死亡開始時間及び終了時間	なし
症状発現時間及び消失時間	投与後 4 時間から発現 投与後 9 日に消失
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状としては, 円背位が全例にみられ, 立毛を伴う場合もあった。
剖検では, 異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

②細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 2-27-②)

試験機関 : Safeparm Laboratories Limited

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1999 年

化学名 :

検体純度 :

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA1535, TA1537, TA98 および TA100) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用い、ラットの肝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 らの方法を用いて、プレート法で変異原性を検索した。

検体は溶媒としてジメチルスルホキシドを用いて調製し、処理容量は 100 μ L とした。各用量 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 時間培養後、コロニーカウンターを用いて復帰変異コロニーを計数した。復帰突然変異試験は 2 回実施した。少なくとも 1 つの菌株において、再現性を伴う用量に 관련된 統計学的に有意な復帰変異体数の増加が認められた場合に、検体は変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠 :

結果 : 結果を次頁の表に示した。

検体処理群において、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの用量においても、復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。サルモネラ菌では 5000 μ g/プレートの用量において、菌株に対する抗菌性が認められる場合があった。

一方、試験に用いたすべての陽性対照物質は、復帰変異コロニー数の明らかな増加を誘発した。従って、S9 mix の活性および菌株の感受性が確認された。また、溶媒対照の復帰変異コロニー数は正常範囲内であった。

以上の結果より、本検体は、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。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-1 復帰突然変異試験成績 (実験 1)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	-	104	18	23	21	11
検体	15	-	108	19	N	27	12
	50	-	98	20	24	28	12
	150	-	100	18	20	23	13
	500	-	109	17	20	22	14
	1500	-	97	19	20	18	12
	5000	-	83*	15*	20	18	5*
陽性対照							
ENNG	3	-	497	N	N	N	N
ENNG	5	-	N	248	N	N	N
ENNG	2	-	N	N	1131	N	N
4NQO	0.2	-	N	N	N	128	N
9AA	80	-	N	N	N	N	1077
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	+	104	11	32	33	21
検体	15	+	113	13	N	29	18
	50	+	102	12	29	30	17
	150	+	102	15	26	28	20
	500	+	104	14	28	26	17
	1500	+	106	13	28	30	19
	5000	+	99*	9	28	27	13
陽性対照							
2AA	1	+	652	N	N	N	N
2AA	2	+	N	261	N	N	N
2AA	10	+	N	N	558	N	N
BP	5	+	N	N	N	277	N
2AA	2	+	N	N	N	N	326

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド,
9AA : 9-アミノアクリジン, 2AA : 2-アミノアントラセン, BP : ベンズ(a)ピレン

N : 試験を行っていない

* : バックグラウンドの菌の生育阻害が認められる

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-2 復帰突然変異試験成績 (実験 2)

(表中の値は 3 枚のプレートの平均値)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	-	113	33	28	21	6
検体	15	-	101	23	N	N	9
	50	-	100	16	25	20	9
	150	-	106	21	20	20	8
	500	-	99	21	22	18	7
	1500	-	115	18	27	18	6
	5000	-	83*	18*	22	17*	6*
陽性対照							
ENNG	3	-	455	N	N	N	N
ENNG	5	-	N	323	N	N	N
ENNG	2	-	N	N	641	N	N
4NQO	0.2	-	N	N	N	143	N
9AA	80	-	N	N	N	N	1649
溶媒対照 (ジメチルスルホキシド)	100 μL	+	100	13	31	33	18
検体	15	+	97	N	N	N	N
	50	+	96	14	31	31	14
	150	+	94	16	25	23	16
	500	+	101	17	17	32	16
	1500	+	91	11	30	35	14
	5000	+	84*	11	28	27*	16
陽性対照							
2AA	1	+	953	N	N	N	N
2AA	2	+	N	260	N	N	N
2AA	10	+	N	N	627	N	N
BP	5	+	N	N	N	229	N
2AA	2	+	N	N	N	N	307

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 4NQO : 4-ニトロキノリン-1-オキシド,
9AA : 9-アミノアクリジン, 2AA : 2-アミノアントラセン, BP : ベンズ(a)ピレン

N : 試験を行っていない

* : バックグラウンドの菌の生育阻害が認められる