

(8) 繁殖性に及ぼす影響

① ラットを用いた2世代繁殖毒性試験

(資料No. 28)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : SDラット、約6週齢、体重: 雄150-231g 雌114-179g、1群雌雄各30匹(F<sub>0</sub>)、25匹(F<sub>1</sub>)

投与期間 : F<sub>0</sub>世代; 投与開始からF<sub>1B</sub>児離乳時まで(交配まで9週間投与)

F<sub>1</sub>世代; 離乳時(4週齢)からF<sub>2B</sub>児離乳時まで(交配まで8週間投与)  
(1980年3月19日-1981年1月8日)

投与方法 : 検体をコーン油に溶解し、0、37.5、150及び625ppmの濃度になるよう飼料に混入し、自由に摂食させた。飼料は毎週調製した。

投与量設定根拠; ラット催奇形性試験(資料No. 29)に基づき、投与量を設定した。

検体を0、6、25及び100mg/kgの用量で妊娠1日から20日までの20日間強制経口投与した結果、100mg/kg群では親動物において体重増加量及び摂餌量の著しい減少並びに胎盤重量の増加が認められ、25mg/kg群においても軽度ではあるが同様の変化が認められたことから、2世代繁殖毒性試験における最高用量は25mg/kg程度の濃度が適当と考えられた。従って本試験ではラット慢性毒性/発がん性併合試験(資料No. 22)と同様、1.5、6.0及び25 mg/kgに相当する用量として、37.5、150及び625ppmを設定した。

交配・調整・選抜及び観察・検査項目: 概要を表1にまとめた。

一般状態及び死亡率; 一般状態を観察し、さらに定期的に触診も実施した。

体重変化; F<sub>0</sub>及びF<sub>1A</sub>世代については投与開始1週間前、その後投与開始から週1回測定した。交配期間中の雌動物は1日おき、交尾確認後は妊娠0、7、14、17及び20日に測定した。また、交配の陽性徴候が見られなかった動物は出産した日から妊娠期間を22日として逆算した。出産後は哺育0、7、14及び21日に測定した。児動物については出生時及び生後4、8、12及び21日に測定した。

摂餌量; F<sub>0</sub>及びF<sub>1</sub>世代の雌雄について、交配前の期間中毎週測定した。

交配及び交尾・妊娠の確認; 雌雄を1対1で最大20日間同居させ、毎日膣栓または膣ヌア中の精子の存在により交尾を確認した。交尾確認日を妊娠0日とした。

繁殖性に関する指標; 各雌動物毎に、交配、交尾、妊娠及び出産の観察に基づき、以下の指標を算出した。

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

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

$$\text{妊娠率} = (\text{妊娠動物数} / \text{交配動物数}) \times 100$$

$$\text{出産率}^* = (\text{生存児出産動物数} / \text{妊娠動物数}) \times 100$$

\*: データに基づき申請者が算出した。

分娩時観察; F<sub>0</sub>及びF<sub>1</sub>世代の妊娠雌は自然分娩させ、分娩後速やかに同腹児数を数え、性別判断、体重測定及び外部異常の検査を行った。また、個体毎に妊娠期間を算出した。

児動物の観察；F<sub>1</sub>及びF<sub>2</sub>児動物について、一般状態及び生死を毎日観察した。体重測定は生後4、8、12及び21日に実施した。以下の指標を算出した。

$$\text{性比(雄)} = (\text{雄動物数} / \text{出産あるいは生存児総数}) \times 100$$

離乳並びにF<sub>1(A)</sub>及びF<sub>2(A)</sub>世代の選抜は生後21日に行った。選抜されなかった動物から1群雌雄各10匹を選び、肉眼的検査及び臓器重量測定を実施し、さらにこのうち雌雄各5匹について病理組織学的検査を実施した。その他の児動物については屠殺後に外部及び内部の肉眼的検査、生殖腺による性別の確認を実施した。

肉眼的病理検査；F<sub>0</sub>及びF<sub>1</sub>世代の生存親動物はF<sub>1B</sub>児動物又はF<sub>2B</sub>児動物の離乳後に、また次世代に選抜されなかったF<sub>1A</sub>児動物の雌雄各10匹及び全生存F<sub>1B</sub>児動物、F<sub>2A</sub>児動物の雌雄各10匹及び全生存F<sub>2B</sub>児動物は離乳時に検査した。死亡動物についても検査を実施した。

臓器重量；F<sub>1A</sub>親動物、選抜されなかったF<sub>1A</sub>児動物及びF<sub>2A</sub>児動物から1群雌雄各10匹を対象として、以下の臓器重量を測定し、体重比（相対）を算出した。

副腎\*、肺、脾臓、脳、卵巣\*、精巣\*、心臓、下垂体\*、胸腺、腎臓、前立腺\*、甲状腺\*、肝臓、精囊\*、子宮\*

\*：離乳時のF<sub>1</sub>及びF<sub>2</sub>動物では測定せず。

病理組織学的検査；F<sub>1A</sub>親動物から1群雌雄各10匹、選抜されなかったF<sub>1A</sub>児動物及びF<sub>2A</sub>児動物から1群雌雄各5匹を対象として、以下の組織の病理組織標本を作製し鏡検した。さらに、肉眼病変部位についても鏡検した。

副腎、骨髓、脳(髄質、小脳及び皮質部)、盲腸、十二指腸、眼、心臓、回腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節(頸部及び腸間膜)、乳腺、卵巣、脾臓、下垂体、前立腺、唾液腺、骨格筋(大腿部)、脾臓、胃(腺胃及び前胃)、精巣、胸腺、甲状腺、膀胱、子宮、精囊、病変部位

結果：結果の概要を表2に示す。

親動物；625ppm群F<sub>0</sub>世代の雌の約1/3に妊娠後期及び周産期初期に蒼白化、立毛、円背位などの症状、さらに分娩時間の延長が認められた。F<sub>1</sub>世代雌でも低頻度ではあるが同様の症状が認められた。雄ではF<sub>0</sub>世代の1回目の交配後に攻撃的な行動が全群に認められ、その期間が対照群及び37.5ppm群では約2週間であったのに対し、150ppm群では約3週間、625ppm群では約4週間とより長期間にわたって認められた。また、2回目の交配後は625ppm群のみに約3週間認められた。

また、雌では難産による死亡がF<sub>0</sub>世代対照群1回目の交配で1匹、625ppm群1回目及び2回目で各2匹、F<sub>1</sub>世代625ppm群1回目及び2回目で各2匹に認められたが、雄ではF<sub>0</sub>、F<sub>1</sub>及びF<sub>2</sub>世代のいずれにおいても検体投与に関連した死亡は認められなかった。

625ppm群のF<sub>0</sub>及びF<sub>1</sub>世代の雌雄で体重増加量の抑制傾向が認められた。

投与群の両世代において摂餌量が対照群と比べて僅かに減少したが一貫性は認められず投与の影響とは考えられなかった。

肉眼的病理検査に検体投与による影響は認められなかった。

625ppm群のF<sub>1</sub>世代の雄で最終体重で補正した肝臓重量の増加が認められた。

交尾率、受胎率、妊娠率、出産率に投与による影響はなかった。妊娠期間が22日を超える雌の割合が625ppm群で増加したが、F<sub>1</sub>世代2回目の交配では変化は見られなかった。また、625ppm群の雌F<sub>0</sub>世代の両交配及びF<sub>1</sub>世代の1回目の交配で全同腹児損失数がそれぞれ4、2、3腹認められた。

児動物 ; F<sub>1</sub>及びF<sub>2</sub>児動物の625ppm群で、出生時の同腹児数及び離乳までの生存率の低下、またF<sub>1A</sub>、F<sub>2A</sub>及びF<sub>2B</sub>児動物の出生時体重のわずかな増加が認められた。性比に投与による影響はみられなかった。臓器重量では有意な変化が散見されたが、いずれも補正重量のみに見られたこと、また関連した病理組織学的な変化は認められなかったことから、毒性学的意義は不明であった。

肉眼的病理所見及び病理組織学的所見に投与に関連した変化はなかった。

以上、本剤のラットを用いた混餌投与による2世代繁殖毒性試験において、親動物では、625ppm群のF<sub>0</sub>及びF<sub>1</sub>世代雌で蒼白化、立毛、円背位などの症状が認められ、雌雄で体重増加抑制が認められた。また少数の難産による死亡、妊娠期間の延長傾向、さらにF<sub>0</sub>世代雌の分娩時間の延長が認められた。150ppm以下の群では繁殖能に対する影響は認められなかった。625ppm群のF<sub>0</sub>及びF<sub>1</sub>世代及び150ppm群のF<sub>0</sub>世代の雄で交配後の攻撃的な行動の期間延長が認められた。

児動物では、625ppm群で同腹児数の減少、生存率の低下及び出生時体重の増加が認められた。従って、本試験における無毒性量\*は親動物の雄で37.5ppm(F<sub>0</sub>: 3.11、F<sub>1</sub>: 3.70mg/kg/日)、雌で150ppm(F<sub>0</sub>: 13.84、F<sub>1</sub>: 17.46mg/kg/日)であり、児動物は150ppm(F<sub>0</sub>雄: 12.71、F<sub>0</sub>雌: 13.84、F<sub>1</sub>雄: 15.54、F<sub>1</sub>雌: 17.46mg/kg/日)であると判断された。繁殖能に対しては150ppm以下では影響がなかった。

\*申請者注: 報告書には無毒性量の記載がないため、試験結果に基づき申請者が無毒性量を判断した。

表1 試験項目概要-1

世代	期間 (週間)	交配・調整・選抜	観察・検査項目
F <sub>0</sub>	生育 (9週)		症状、生死観察：毎日 体重、摂餌量測定：週1回
	交配 (20日間)	雌雄1対1で交配 交尾は膣栓あるいはスメア中の精子の存在で確認 (妊娠0日)	交配状況観察：毎日 体重測定：隔日
	妊娠 (3週)		体重、摂餌量測定： 妊娠0、7、14、17、20日
	F <sub>1</sub> 出産 (F <sub>1A</sub> )		妊娠期間算出、出産状況の観察： 出産児数、生存児数、死亡児数、外表異常、性別及び同腹生存児体重測定
	F <sub>1</sub> 哺育 (3週) (F <sub>1A</sub> )		F <sub>0</sub> 雌動物の体重、摂餌量測定： 哺育0、7、14、21日 F <sub>1</sub> 動物の生死、症状観察：毎日 F <sub>1</sub> 動物の体重測定： 哺育0、4、8、12、21日 F <sub>1</sub> 動物の性別確認： 哺育0、21日
F <sub>1</sub> 離乳 (F <sub>1A</sub> )	継代用の雌雄各25匹を可能な限り各腹から選抜	継代用以外のF <sub>1A</sub> 動物の雌雄各10匹の肉眼的病理検査、臓器重量測定及びそのうち雌雄各5匹の病理組織学的検査  選抜外F <sub>1A</sub> 動物の外部及び内部の肉眼的検査及び生殖腺検査	
F <sub>0</sub>	生育 (約10日)		(F <sub>0</sub> /F <sub>1A</sub> に準ずる)
	交配 (20日間)	(F <sub>0</sub> /F <sub>1A</sub> に準ずる)	交配状況観察：毎日 体重測定：隔日
	妊娠 (3週)		体重、摂餌量測定： 妊娠0、7、14、17、20日
	F <sub>1</sub> 出産 (F <sub>1B</sub> )		(F <sub>0</sub> /F <sub>1A</sub> に準ずる)
	F <sub>1</sub> 哺育 (3週) (F <sub>1B</sub> )		(F <sub>0</sub> /F <sub>1A</sub> に準ずる)
	F <sub>1</sub> 離乳 (F <sub>1B</sub> )		F <sub>1B</sub> 動物の外部及び内部の肉眼的検査及び生殖腺検査 F <sub>0</sub> 親動物の外部及び内部の肉眼的病理検査、1及び2群雌の各1匹、4群雌4匹の心臓及び動脈の病理組織学的検査

表1 試験項目概要-2

世代	期間 (週間)	交配・調整・選抜	観察・検査項目
F <sub>1A</sub>  F <sub>2A</sub>	生育 (8週)		(F <sub>0</sub> に準ずる)
	交配 (20日)	(F <sub>0</sub> に準ずる)	(F <sub>0</sub> に準ずる)
	妊娠 (3週)		(F <sub>0</sub> に準ずる)
	F <sub>2</sub> 出産 (F <sub>2A</sub> )		(F <sub>0</sub> /F <sub>1A</sub> に準ずる)
	F <sub>2</sub> 哺育 (3週)	(F <sub>1A</sub> に準ずる)	(F <sub>0</sub> /F <sub>1A</sub> に準ずる)
	F <sub>2</sub> 離乳 (F <sub>2A</sub> )		(F <sub>0</sub> /F <sub>1A</sub> に準ずる)
			F <sub>2A</sub> 動物の雌雄各10匹の肉眼的病理検査、 臓器重量測定及びそのうち雌雄各5匹の 病理組織学的検査  選抜外F <sub>2A</sub> 動物の外部及び内部の肉眼的検査 及び生殖腺検査
F <sub>1A</sub>  F <sub>2B</sub>	生育 (約10日)		(F <sub>0</sub> に準ずる)
	交配 (20日)	(F <sub>0</sub> に準ずる)	(F <sub>0</sub> に準ずる)
	妊娠 (3週)		(F <sub>0</sub> に準ずる)
	F <sub>2</sub> 出産 (F <sub>2B</sub> )		(F <sub>0</sub> /F <sub>1A</sub> に準ずる)
	F <sub>2</sub> 哺育 (3週)	(F <sub>1A</sub> に準ずる)	(F <sub>0</sub> /F <sub>1A</sub> に準ずる)
	F <sub>2</sub> 離乳 (F <sub>2B</sub> )		
			F <sub>2B</sub> 動物の肉眼的病理検査  F <sub>1A</sub> 親動物の雌雄各10匹の肉眼的病理検査、 臓器重量測定及び病理組織学的検査  選抜外F <sub>1A</sub> 親動物の外部及び内部の肉眼的 検査

表2 試験結果

世代		親 : F <sub>0</sub> 児 : F <sub>1</sub>				親 : F <sub>1</sub> 児 : F <sub>2</sub>				
投与量 (ppm)		0	37.5	150	625	0	37.5	150	625	
供試動物数	雄	30	30	30	30	25	25	25	25	
	雌	30	30	30	30	25	25	25	25	
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	0	3.11	12.71	56.84	0	3.70	15.54	69.46	
	雌	0	3.45	13.84	58.43	0	4.48	17.46	80.78	
一般状態	雄			攻撃的 行動	攻撃的 行動					
	雌				蒼白、 立毛、 円背位、 分娩時間 延長				蒼白、 立毛、 円背位	
死亡	雄	0	1	1	1	0	0	0	1	
	雌	1回目	1	1	0	2	0	0	0	2
		2回目	0	0	0	2	0	0	0	2
親動物 体重増加量 (g)	-1-27* <sup>1</sup> / 4-29* <sup>2</sup> 週	雄	504	552	534	488	506	520	529	453
		雌	254	247	253	229	267	270	269	245
	1回目	妊娠0日	289	288	294	273	256	263	265	237
		妊娠7日	307	312	315	287	284	296	294	257
		妊娠20日	412	407	420	382	389	398	405	343
		分娩0日	314	325	327	293	297	308	305	255
		分娩7日	328	348	339	313	315	326	328	280
		分娩21日	314	343	332	312	308	322	321	288
	2回目	妊娠0日	323	325	331	313	307	314	320	282
		妊娠7日	345	346	351	332	330	336	342	301
		妊娠20日	447	446	453	426	434	441	454	390
		分娩0日	358	362	358	330	342	349	350	301
		分娩7日	368	375	372	350	357	363	374	322
		分娩21日	363	369	363	345	343	354	357	313
摂餌量 (g)	生育期	雄	2010	1929 [96]	1933 [96]	1915 [95]	1488	1425 [96]	1485 [100]	1368 [92]
		雌	1347	1269 [94]	1333 [99]	1275 [95]	1375	1236 [90]	1203 [87]	1196 [87]
食餌効率 (%) (生育期)	雄	8.67	7.31	7.90	8.27	10.37	11.33	11.57	12.87	
	雌	6.46	5.66	6.06	6.25	12.22	10.22	9.46	10.77	

Dunnett, Williams, Steel検定 ↑↓: p<0.05, ↑↓: p<0.01, ↑↓: p<0.001

[ ]内の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

\*1: F<sub>0</sub>世代、\*2: F<sub>1</sub>世代、空欄: 異常なし

表2 試験結果 (続き)

世代		親 : F <sub>0</sub>				親 : F <sub>1</sub>					
投与量 (ppm)		0	37.5	150	625	0	37.5	150	625		
供試動物数	雄	30	30	30	30	25	25	25	25		
	雌	30	30	30	30	25	25	25	25		
交尾率(雌%)	1回目	86.7	100	100	100	100	96.0	96.0	100		
	2回目	86.2	93.1	96.7	100	100	96.0	92.0	100		
妊娠率(雌%)	1回目	83.3	100	96.7	100	100	92.0	88.0	100		
	2回目	79.3	79.3	90.0	100	100	92.0	84.0	95.7		
受胎率(雌%)	1回目	96.2	100	96.7	100	100	95.8	91.7	100		
	2回目	92.0	85.2	93.1	100	100	95.8	91.3	95.7		
出産率(雌%)	1回目	96.0	96.6	100	80.0	96.0	100	100	80.0		
	2回目	100	95.7	100	85.7	95.8	100	100	90.9		
全同腹児損失 (腹数)	1回目	0	1	0	4	1	0	0	3		
	2回目	0	1	0	2	1	0	0	0		
親動物	妊娠期間	1回目	検査動物数	24	29	29	28	25	23	25	23
			21日	4	3	3	0	11	4	3	0
			22日	13	17	18	13	12	19	16	8
			23日	5	5	7	9	1	0	2	9
			24日	0	1	0	1	0	0	0	1
			平均(日)	22.0	22.2	22.1	22.5	21.6	21.8	22.0	22.6
	2回目	検査動物数	23	23	27	26	24	23	21	20	
		21日	4	5	3	2	23	5	2	0	
		22日	15	13	14	12	1	16	16	17	
		23日	3	2	7	11	0	1	2	2	
		24日	0	0	0	0	0	1	0	1	
	平均(日)	22.0	21.9	22.2	22.4	21.9	21.9	22.0	22.2		
	肉眼的病理検査		異常なし				異常なし				
	病理組織学的検査		異常なし				異常なし				
臓器重量	雄	最終体重(g)	-	-	-	-	592	615	619	534	
		肝臓 補正*	-	-	-	-	22.9	21.9 [96]	22.5 [98]	25.9↑ [113]	
	雌	最終体重(g)	-	-	-	-	338	359	336	313	

Student's t検定

Williams検定 ↑ ↓: p<0.05

臓器重量単位: 補正実重量は(g)。

[ ]内の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものの。

\*: 体重を共変量として補正。

-: 対応するデータなし

表2 試験結果 一続き一

世代		親 : F <sub>0</sub> 児 : F <sub>1</sub>				親 : F <sub>1</sub> 児 : F <sub>2</sub>				
投与量 (ppm)		0	37.5	150	625	0	37.5	150	625	
産児数	1回目	14.0	11.9↓	13.5	12.5↓	13.1	13.4	13.6	10.6↓	
	2回目	14.0	12.9	13.4	11.9↓	13.2	13.4	14.5↑	11.1↓	
生存 児数	1回目	出生時	14.0	11.9↓	13.2	12.1↓	12.9	13.4	13.4	9.5↓
		4日	13.8	11.5↓	12.5↓	11.8↓	12.5	13.1	13.0	9.1↓
		8日	13.4	11.3↓	12.3	11.6↓	12.3	12.9	13.0	8.8↓
		12日	13.1	11.2↓	12.2	11.4↓	12.1	12.9	12.9	8.7↓
		21日	12.8	11.2	12.1	11.2↓	12.0	12.9	12.8	8.6↓
	2回目	出生時	13.7	12.8	13.2	10.9↓	13.0	13.0	14.4↑	10.9↓
		4日	13.2	12.4	12.7	9.9↓	12.6	12.7	14.0↑	10.7↓
		8日	12.7	11.4	12.3	9.7↓	12.3	12.5	13.8↑	10.6↓
		12日	12.5	11.2	12.1	9.6↓	12.3	12.5	13.7↑	10.5↓
		21日	12.3	11.2	11.9	9.5↓	12.2	12.5	13.7↑	10.5↓
	性比(雄%)	1回目	51.6	54.5	50.4	50.9	53.3	50.4	59.4	52.3
		21日	2回目	52.4	50.9	52.9	51.6	50.4	52.8	47.8
児動物 体重 (g)	1回目	出生時	5.8	6.1↑	6.0↑	6.1↑	5.6	5.6	5.8	5.9↑
		4日	8.0	8.9↑	8.6	8.4	7.9	7.9	8.1	8.5
		8日	12.9	15.5↑	14.3↑	13.2	13.1	12.9	13.5	14.0
		12日	20.1	23.1↑	21.7	19.8	20.5	20.4	21.5	21.5
		21日	38.6	46.0↑	42.4	38.0	41.5	41.7	43.0	42.7
	2回目	出生時	5.8	6.1	6.1↑	6.2	5.7	5.8	5.8	6.2↑
		4日	8.4	8.5	8.8	8.6	8.2	8.4	8.5	8.9↑
		8日	14.4	14.7	14.9	14.4	14.2	14.8	14.5	15.0
		12日	22.4	22.9	22.6	22.3	21.7	22.7	22.3	21.9
		21日	45.3	46.5	45.5	43.8	42.9	45.1	43.6	40.5
	一般状態		異常なし				異常なし			
	臓器 重量	雄	最終体重(g)	54.88	57.65	51.87	45.79	46.88	49.34	47.32
肝臓 補正*			2.996	2.948 [98]	3.070 [102]	3.417↑ [114]				
胸腺 補正*			0.221	0.201 [91]	0.215 [97]	0.164↓ [74]				
雌		最終体重(g)	49.73	53.88	50.26	42.79	42.58	47.43	42.74	40.99
		脳 補正*	1.352	1.352 [100]	1.393 [103]	1.250↓ [92]				
		胸腺 補正*	0.217	0.185 [85]	0.224 [103]	0.178↓ [82]				
肝臓 補正*					2.321	2.539↑ [109]	2.519↑ [109]	2.643↑ [114]		
肉眼的病理検査		異常なし				異常なし				
病理組織学的検査		異常なし				異常なし				

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

臓器重量単位: 補正重量は(g)。

[ ]内の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

\*: 体重を共変量として補正。

空欄: 異常なし

② ラットを用いた催奇形性試験

(資料No. 29)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : SDラット、8-9週齢、体重 ; 211-288g、1群雌20匹(対照群31匹)

投与期間 : 妊娠20日間 (1979年1月9日-1月28日)

投与方法 : 検体を0、6、25及び100mg/kg/日の投与量となるよう10%アラビアゴム水溶液に懸濁し、10ml/kgの容量で妊娠1日から20日の20日間、毎日1回強制経口投与した。投与液は毎週調製した。交配成立の証拠が得られた日を妊娠1日とした。

投与量設定根拠 ; 予備試験結果に基づき、投与量を設定した。

観察・検査項目 :

親動物 ; 一般状態及び生死を1日2回観察した。体重は妊娠21日に屠殺するまでの毎日、摂餌量は妊娠1-4、4-7、7-10、10-13、13-16、16-19及び19-21日に測定した。妊娠21日に屠殺し、肉眼的病理検査を行った後、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数(初期、後期、吸収痕)、胎盤重量を測定した。また、以下の指標を求めた。

$$\text{着床前死亡胚率}^*1 = \{ (\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数} \} \times 100$$

$$\text{着床後死亡胚率}^*1 = \{ (\text{着床数} - \text{生存胎児数}) / \text{着床数} \} \times 100$$

\*1 : 申請者算出

胎児 ; 体重を測定し、性別、外表異常について検査した。全胎児について内臓異常の有無を検査した。その後、各腹の偶数番号の胎児について頭部を切断しブアン固定し、さらに全ての胎児についてタール固定後にDawson変法にて染色後し、骨格異常の有無を検査した\*2。

\*2 申請者注 : 結果の概要には奇形、変異に再分類して示した。

結果 : 概要を表1に示す。

親動物 ; 25及び100mg/kg/日群で鼻及び顔面を床敷にこすりつける行動及び唾液の分泌亢進が認められ、検体の影響と考えられた。死亡はいずれの群においても認められなかった。摂餌量の有意な減少が25及び100mg/kg/日群で認められ、妊娠1日の体重で補正した体重増加量の有意な減少が100mg/kg/日群で認められた。肝臓の絶対及び相対重量が、100mg/kg/日群で有意に増加し、25mg/kg/日群で軽度増加する傾向が認められた。胎盤重量\*3の有意な増加が25及び100mg/kg/日群で認められた。いずれの群においても投与に関連した肉眼的病理所見及び病理組織学的所見は認められなかった。また、着床率及び生存率が減少する傾向が100mg/kg/日群で認められた。その他に検体投与による影響は認められなかった。

\*3 申請者注 : 胎盤重量の有意な増加が25mg/kg/日以上群で認められたが、25mg/kg/日群では着床率、生存率などにおいて全て対照群と同等であることから、胎盤重量の増加は、胎盤において酵素誘導が起こる過程で見られる適応反応であると考えられた。

一方、100mg/kg/日群では着床率、生存率などが統計学的有意な差ではないものの対照群と比較し減少していることから、胎盤重量の有意な増加は検体投与による影響と考えられた。

胎児 ; 100mg/kg/日群雌雄で胎児重量の低下が認められ、雄では統計学的有意であった。骨格検査では100mg/kg/日群の1腹当りの左後肢の骨化中足骨数、左後肢の骨化指骨数の有意な減少が認められ、また骨化不全の脊椎椎弓を有する胎児の増加傾向が同変化を有する腹の有意な増加として認められた。性比に影響はなかった。6及び25mg/kg/日群では検体投与に関連する影響は認められなかった。

以上の結果より、本剤のラットを用いた器官形成期経口投与による催奇形性試験において、100mg/kg/日群では、親動物において一般状態でこすりつけ行動及び唾液分泌亢進が認められた。さらに体重増加量、摂餌量の減少が認められ、また肝臓の絶対及び相対重量の増加及び胎盤重量の増加が認められた。胎児においても胎児重量の低下と共に、1腹当りの左後肢の骨化中足骨数、左後肢の骨化指骨数の有意な減少が認められ骨化不全の脊椎椎弓を有する胎児を有する腹が増加したが、催奇形性を示唆する変化は認められなかった。

25mg/kg/日群では、親動物においてこすりつけ行動及び唾液分泌亢進、摂餌量の減少、肝臓の絶対及び相対重量の軽度な増加傾向が認められたが、胎児への影響は認められなかった。

6mg/kg/日群では、親動物及び胎児共に影響は認められなかった。

従って、本試験における無毒性量 (NOAEL) は親動物6mg/kg/日、児動物25mg/kg/日と判断された。また、胎児に対する催奇形性はないと判断された。

表1 結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		0	6	25	100		
1群当たりの動物数		31	20	20	20		
親動物	死亡動物数	0	0	0	0		
	非妊娠動物数	4	2	2	1		
	妊娠動物数	27	18	18	19		
	妊娠率 (%)	87	90	90	95		
	妊娠20日生存数	27	18	18	19		
	一般状態	こすりつけ行動	0	0	16	19	
		唾液分泌亢進	1	0	18	19	
	体重増加量 (g)	(1-21日)	153.0	143.9 [94]	146.1 [95]	134.5 [88]	
	平均補正体重 増加量 (g)*1	(1-21日)	153.1	144.1 [94]	145.8 [95]	134.4 ↓ [88]	
	摂餌量 (g/100g体重/ 日)	(4-7日)	11.4	11.0[96]	10.8[95]	10.2[89] ↓	
		(7-10日)	10.8	10.4[96]	10.0[93] ↓	9.9[92] ↓	
		(16-19日)	9.1	8.7[96]	8.4[92] ↓	8.8[97]	
	剖検所見		検体投与に起因する所見なし				
	臓器重量	検査動物数		25	18	18	19
		肝臓	絶対重量 (g)	16.08	15.96[99]	16.86[105]	18.38 ↑ [114]
相対重量 (%)			4.09	4.12[101]	4.35[106]	4.89 ↑ [120]	
着床所見	検査親動物数		27	18	18	19	
	黄体数		16.7	15.9	16.5	15.5	
	着床数		15.7	14.2	14.8	13.5	
	着床率 (%) *2		93.8	88.5	89.6	84.9	
	生存率 (%) *2		94.1	96.5	91.4	87.2	
	総吸収胚数		0.9	0.5	1.1	0.8	
	生存胎児数		14.7	13.6	13.5	12.2	
	着床前死亡胚率 (%) *3		6.2	11.1	10.4	12.9	
	着床後死亡胚率 (%) *3		6.1	3.9	8.6	9.7	
	胎盤重量 (g)	雄胎児	0.42	0.45[107]	0.49[117] ↑	0.56[133] ↑	
雌胎児		0.41	0.44[107]	0.49[120] ↑	0.57[139] ↑		

Scheffe検定、共分散分析、一元配置分散分析、一元配置共分散分析 ↑ ↓ : p<0.05、↑ ↓ : p<0.01、

↑ ↓ : p<0.001

[ ]内の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの。

\*1 妊娠1日の体重を共変量として補正

\*2 Healy(1972)の方法

\*3 申請者算出

生存率 (%) = (生存受胎数) / (受胎数) × 100

表1 結果の概要 ー続きー

投与量 (mg/kg/日)		0	6	25	100	
検査親動物数		27	18	18	19	
平均生存胎児体重(g)	雄	3.56	3.48[98]	3.55[100]	3.26[92] ↓	
	雌	3.35	3.29[98]	3.35[100]	3.12[93]	
生存胎児の性比(雄:雌)		1:1.13	1:0.88	1:0.74	1:1.00	
検査胎児数(腹)		397(27)	245(18)	243(18)	232(19)	
外表	奇形	頭-脳ヘルニア		1(1)		
		眼-網膜皺壁			1(1)	
		腹部-臍帯ヘルニア		1(1)		
		後肢、尾-湾曲				1(1)
	変異	皮下-赤色	3(2)	2(2)	3(3)	
		皮下-浮腫			2(2)	
内臓	奇形	横隔膜-ヘルニア			1(1)	
		心臓-心室壁肥厚			1(1)	
	変異	尿管-拡張	3(3)		2(2)	4(4)
		尿管-捻転	23(14)	9(6)	22(10)	23(13)
骨格検査胎児数(腹) [総数]		397(27)	245(18)	243(18)	232(19)	
骨格検査胎児数(腹) [非断頭]		202(27)	127(18)	122(18)	120(18)	
胎児	奇形	胸骨分節-奇形		1(1)		
		波状肋骨	1(1)	1(1)		
	変異	頭蓋骨縫合線拡張	15(11)	12(4)	6(4)	9(4)
		14脊椎			1(1)	2(2)
		13肋骨短小	3(3)			4(4)
		14肋骨短小	13(12)	21(11)	22(15)	8(5)
		頭蓋骨骨化不全	36(14) {0.18}	14(8) {0.11}	24(10) {0.23}	46(13) {0.40}
		舌骨-骨化不全		1(1)		
		脊椎-椎弓骨化不全	(0)	1(1)	(0)	\$(3#)
		鎖骨-骨化不全		1(1)		
		胸骨分節骨化数	{5.71}	{5.73}	{5.76}	{4.93}
		肋骨-第1組骨化不全				1(1)
		腸骨-骨化不全				1(1)
		坐骨-骨化不全	1(1)			5(3)
		恥骨-骨化不全	14(5)	7(2)	2(2)	21(4)
		前肢、腓骨、脛骨-骨化遅延				5(1)
		後肢-骨化中足骨数(左)	{4.00}	{3.99}	{4.01}	{3.91 ↓}
		後肢-骨化指骨数(左)	{0.38}	{0.27}	{0.24}	{0.14 ↓}

Scheffe検定、Fisher検定 ↑ ↓: p<0.05、↑ ↓: p<0.01

[ ]内の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものの。

空欄は「0」を示す。

{ }内の数値は1腹当りの数値を表す。

\$: 報告書には部位別の頻度しか記載されておらず集計胎児数は不明(7-11匹と推定される)。

#: 100mg/kg/日群は、対照群との比較で有意ではないが、他の3群の合計との比較で有意。

③ ウギ<sup>®</sup>を用いた催奇形性試験

(資料No. 30)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : ニュージーランド<sup>®</sup>白色ウギ<sup>®</sup>、体重: 2.8-4.2kg、1群雌18匹

投与期間 : 妊娠28日間 (1979年9月12日-10月17日)

投与方法 : 検体を0、3、12及び48mg/kg/日の投与量となるよう10%アラビ<sup>®</sup>アコム水溶液に懸濁し、1.0ml/kgの容量で妊娠1日から28日の28日間、毎日1回強制経口投与した。交配成立の証拠が得られた日を妊娠0日とした。

投与量設定根拠 ; 予備試験の結果に基づき、投与量を設定した。

観察・検査項目 :

親動物 ; 一般状態及び生死を1日2回観察した。投与期間中体重は毎日、摂餌量は3日以内の間隔で測定した。妊娠29日に屠殺し、肉眼的病理検査を行った後、肝臓重量、黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数、死亡胚数 (早期、後期及び流産) を測定した。また、以下の指標を求めた。

$$\text{着床前死亡胚率} = \{ (\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数} \} \times 100$$

$$\text{着床後死亡胚率} = \{ (\text{着床数} - \text{生存胎児数}) / \text{着床数} \} \times 100$$

胎児 ; 体重を測定し、性別、外表異常について検査した。全胎児について内臓異常の有無を検査した。頭部は前頭頂骨縫合で切開し、肉眼的に検査した。骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。胎児の変化は、奇形、異常、変異に分類した。

結果 : 概要を表1に示す。

親動物 ; 投与に関連した症状及び死亡は認められなかった。48mg/kg/日群において肝臓の相対重量の統計学的有意な増加及び絶対重量の増加傾向、肝臓の褪色の発生率の僅かな増加 (3/13例) が認められた。その他、妊娠率、黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児数、着床前及び着床後死亡胚率に検体投与による影響は認められなかった。

胎児 ; 全投与群において胎児の外表、内臓及び骨格検査のいずれにおいても検体投与による変化は観察されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

以上の結果より、本剤のウサギを用いた器官形成期経口投与による催奇形性試験において、48mg/kg/日群の親動物では肝臓の重量の増加及び褪色化の頻度増加が認められたが、胎児では投与による影響は認められなかった。

従って、本試験における無毒性量（NOAEL）は親動物で12mg/kg/日、胎児で48mg/kg/日と判断された。また、最高用量の48mg/kg/日においても胎児に対する催奇形性はないと判断された。

表1 結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		0	3	12	48	
1群当たりの動物数		18	18	18	18	
親動物	死亡動物数	3	1	3	3	
	非妊娠動物数	1	1	0	1	
	妊娠動物数	13	15	15	13	
	妊娠率 (%)	92.9	93.8	100.0	93.3	
	流産動物数	1	1	0	1	
	一般状態	検体投与に起因する症状なし				
	体重 (g)	(1日)	3503.1	3444.3	3404.3	3368.8
		(7日)	3652.3	3584.3	3495.7	3482.7
		(14日)	3840.0	3744.3	3746.4	3690.4
		(21日)	3955.4	3919.3	3907.1	3873.8
		(28日)	4063.5	4014.7	4044.6	3961.5
	摂餌量 (g/ウサギ/日)	(4-6日)	173	168[97]	150[87]	146[84]
		(16-18日)	173	174[101]	176[102]	176[102]
		(28日)	138	128[93]	155[112]	130[94]
	剖検所見	検査動物数	13	15	14	13
肝臓の褪色		1	1	0	3	
臓器重量 (g)	肝臓*	絶対重量	100.5	99.8[99]	113.0[112]	160.4[160]
		相対重量	96.9	98.8[102]	109.1[113]	159.0[164] ↑
着床所見 (一腹当り)	検査親動物数	13	15	14	13	
	黄体数	10.3	11.0	10.9	10.4	
	着床数	9.3	10.1	8.9	9.7	
	早期吸収胚数	0.8	0.4	0.9	0.5	
	後期吸収胚数	0.5	0.9	0.5	1.5	
	総吸収胚数	1.3	1.3	1.4	2.1	
	生存胎児数	8.0	8.8	7.6	7.6	
	着床前死亡胚率 (%)	10.2	7.6	16.1	6.7	
	着床後死亡胚率 (%)	12.0	12.4	17.4	21.9	

Williams検定      ↑ ↓ : p < 0.05, ↑ ↓ : p < 0.01

\*: 変換値 (logx+1) を用いる共分散分析後、Williams検定

[ ]内の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものの。

表1 結果の概要 —続き—

投与量 (mg/kg/日)		0	3	12	48		
検査親動物数		13	15	14	13		
胎児	同腹児体重 (g)	335.0	356.7	298.8	305.1		
	平均生存胎児体重 (g)	41.7	41.2	41.5	40.7		
	生存胎児の雄性比 (%)	47.5	42.0	57.9	48.7		
	検査胎児数 (腹)	104(13)	132(15)	106(14)	99(13)		
	奇形	奇形胎児数 (腹)	2(2)	2(2)	3(3)	1(1)	
		外表	外脳症、口蓋裂、開眼			1(1)	
			耳頭症、前肢湾曲			1(1)	
			脊椎二分	1(1)			
			膈ヘルニア				1(1)
		内臓	心室中隔欠損症		2(2)		
			肺動脈幹拡張、 上行大動脈狭窄	1(1)			
		骨格	胸骨未分化			1(1)	
	内臓検査胎児数 (腹)		104(13)	132(15)	106(14)	99(13)	
	内臓変異	内臓変異胎児数 (腹)	2(2)	9(4)	7(7)	5(5)	
		内訳	眼-角膜混濁		7(2)	2(2)	
			眼-虹彩出血				1(1)
			上行動脈拡張、 肺動脈幹狭窄			1(1)	
			肺-中葉欠損	2(2)	1(1)	2(2)	2(2)
			肺-膨張不全			1(1)	
			胆嚢-欠損			1(1)	
			胆嚢-分葉				2(2)
			胆嚢-萎縮		1(1)		
	骨格検査胎児数 (腹)		102(13)	130(15)	103(14)	98(13)	
骨化・骨格変異	内訳	頭骨頭頂部骨化異常		2(2)			
		頭頂間骨欠損			1(1)		
		頭頂間骨変異		2(1)			
		縫合骨	3(3)	1(1)	5(5)	1(1)	
		過剰椎骨				1(1)	
		尾椎骨化異常			1(1)		
		胸骨融合	1(1)		2(2)	5(2)	
		胸骨片		2(2)			
		第一胸骨過剰骨化	1(1)	4(3)		1(1)	
		第二胸骨変形	1(1)				
		胸骨変異	36(10)	23(10)	19(8)	23(7)	
		頸肋	3(3)	1(1)			
		13肋骨	40(13)	46(12)	48(12)	47(11)	
	距骨化不全				1(1)		

Williams検定  
空欄は「0」を示す。

④ ウサギを用いた催奇形性試験

(資料No. 53)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : フンチ交配雌ウサギ、交配時4~6ヵ月齢、妊娠0日の体重 ; 2450~3470 g、1群16匹

投与期間 : 妊娠6~18日 (13日間)

投与方法 : 検体を1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁して0、10、40及び160mg/kg/日の投与量で妊娠6日から18日までの13日間、毎日1回経口投与した。交配日を妊娠0日とした。

投与量設定根拠 : 同試験機関で行った用量設定試験の結果に基づき、投与量を選択した。

検査項目 :

親動物 : 一般状態、妊娠状態及び生死を毎日観察した。体重を毎日測定し、妊娠6、11、15、19、24及び28日に摂餌量を測定し、飲水量を毎日測定した。妊娠28日に全動物を屠殺し、帝王切開して黄体数、着床数、生存・死亡胎児数及び胚・胎児吸収数を検査した。肉眼的病理検査を行い、肝臓重量を測定した。子宮重量を測定し、妊娠6日の体重に基づく妊娠28日の補正体重増加量を算出した。

胎児 : 体重を測定し、外表異常の有無を検査した。胎児を切開して内臓異常の有無を検査し、性別を記録した。頭蓋骨の骨化の程度を確認し、頭部を固定後に連続的に切断して異常の有無を検査した。さらに、体幹の骨格標本作製して骨格異常の有無を検査した。

結果 : 概要を表1に示す。

親動物 : 投与に関連した死亡例はなく、一般状態の異常もなかった。

160mg/kg/日投与群で妊娠6~11日の体重増加量が減少傾向を示し、妊娠6~15日の摂餌量が有意に減少し、妊娠6~11日の飲水量が減少傾向を示した。

40及び10mg/kg/日投与群においても摂餌量が妊娠24~28日に低下したが、投与量と負の関連性を示したことから、偶発的変化と考えられた。

肉眼的病理検査で投与に関連した変化はなく、160mg/kg/日投与群で肝臓の絶対重量および体重比が有意に増加した。

160mg/kg/日投与群で2例が妊娠せず、1例が全胚胎児吸収を示した。

これらの結果からは、非妊娠および全胚胎児吸収の発生頻度について投与による毒性影響が生じたとは考えられないが、用量設定試験の結果を参照すると、これらの発生頻度の僅かな増加傾向は投与に関連する可能性があると考えられた。

160mg/kg投与群で胎児吸収数が有意に増加した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

胎児 ; 体重および性比は対照群と投与群で同程度であり、外表、内臓、頭部および骨格異常の発生頻度および種類について投与による影響は認められなかった。骨格異常（骨化遅延）のいくつかの所見の発生頻度について、対照群と比べ有意な変動が認められたが、用量依存性がないか、または発生頻度の減少であるため、偶発的なものと考えられた。

以上の結果より、本剤の妊娠ウサギを用いた経口投与による催奇形性試験において、親動物では160 mg/kg/日群で体重増加量抑制傾向、摂餌量の減少及び飲水量の減少傾向が認められ、肝臓の絶対及び相対重量の増加、胎児吸収胚数の増加が認められた。胎児動物に投与による影響は認められなかった。

従って、本試験における無毒性量は親動物で40mg/kg/日、胎児で160mg/kg/日であった。また、最高投与量の160mg/kg/日でも胎児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断された。

\*申請者注：報告書では親動物及び胎児の無毒性量を40mg/kg/日としているが、胎児に検体投与による影響が認められなかったことから、本試験における胎児の無毒性量は160mg/kg/日であると考えられる。

表1 結果の概要

投与群 (mg/kg/day)	0	10	40	160	統計 処理
1群あたり動物数	16	16	16	16	-
死亡数	0	0	0	0	-
妊娠数	15	16	15	14	
流産数	1	0	0	0	
全胚胎児吸収を示した動物数	0	0	0	1	
一般状態	投与による影響はなかった				-
体重増加量 [数値は対照群を100とした場合の値 (%) ] *					
妊娠6~11日		111	102	38	①
妊娠11~15日		81	113	108	
妊娠15~19日		101	86	118	
妊娠6~19日		98	101	88	
妊娠19~24日		73	84	84	
妊娠24~28日		53	95	74	
妊娠6~28日		83	96	84	
補正体重増加量 (%) *	1.2	-2.0	1.4	-2.6	-
摂餌量 [数値は対照群を100とした場合の値 (%) ] *					
妊娠6~11日		92	95	↓77	①
妊娠11~14/15日		105	103	↓83	
妊娠14/15~18/19日		100	96	96	
妊娠6~18/19日		98	98	85	
妊娠18/19~23/24日		84	84	90	
妊娠23/24~28日		↓65	↓71	82	
妊娠18/19~28日		76	79	87	
飲水量 [数値は対照群を100とした場合の値 (%) ] *					
妊娠6~11日		97	97	87	①
妊娠11~15日		106	105	98	
妊娠15~19日		100	98	103	
妊娠6~19日		100	100	96	
妊娠19~24日		99	106	110	
妊娠24~28日		98	116	109	
妊娠19~28日		98	110	110	
肉眼的病理検査	投与による影響はなかった				-
肝臓重量 [数値は対照群を100とした場合の値 (%) ] *					
絶対重量		95	100	↑119	①
体重比		100	104	↑122	
検査動物数	14	16	15	13	-
着床 所見 *	黄体数	7.6	8.5	7.9	②
着床数	7.6	8.4	7.6	8.7	
着床前胚損失数	0.1	0.1	0.3	0.1	
生存胎児数	7.2	7.9	6.9	7.8	
死亡胎児数	0.0	0.0	0.0	0.0	
胚吸収数	0.3	0.4	0.4	0.2	
胎児吸収数	0.1	0.1	0.3	↑0.7	
着床後胚胎児損失数	0.4	0.6	0.7	0.9	

①Dunnettの多対一t検定、②Wilcoxon検定、申請者実施、↑↓ : p<0.05、↑↓ : p<0.01

\* は生存胎児を有する母動物のみで算出。

表1 結果の概要(続き)

投与群 (mg/kg/day)		0	10	40	160	統計処理
1群あたり動物数		16	16	16	16	-
体重 (g)	雄	36.8	33.5	35.2	35.7	①
	雌	34.7	34.5	35.1	35.3	
性比 (雄の%)		45.5	48.4	52.9	49.5	③
外表異常		異常はなかった				-
内臓異常		異常はなかった				-
頭部異常						④
所見/検査動物 (腹) 数		101 (14)	126 (16)	104 (15)	101 (13)	
大脳内嚢胞様拡張		1 (1)	4 (3)	2 (2)	3 (2)	
大脳領域内水頭症		1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
小脳領域内水頭症		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
骨格異常 (奇形および変異)						
所見/検査動物 (腹) 数		101 (14)	126 (16)	104 (15)	101 (13)	
右肋骨12本、左肋骨13本、第10胸椎体領域にある余剰な胸椎弓が第10胸椎体と癒合および左過剰肋骨の基部を形成		1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
第5胸椎体半椎体 (左側欠損)、第6胸椎体左側肥大、第8胸椎体二分、左第2および3肋骨基部癒合とともに第2胸椎体に接続、第5胸骨分節二分		1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
第4頸椎体異形成および第3頸椎体と癒合、第5頸椎体半椎体、第3胸椎体左側不完全骨化、第8胸椎体半椎体 (右側欠損)、左第3および4ならびに右第6および7肋骨基部癒合、第2胸骨分節非対称		1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
第3および4胸骨分節骨化異常および癒合		0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	
両側とも肋骨12本、右第12肋骨軽度短縮		0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
2~5個の胸骨分節癒合		0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
第1胸骨分節骨化異常		0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
骨格異常 (骨化遅延)						
所見/検査動物 (腹) 数		101 (14)	126 (16)	104 (15)	101 (13)	
胸骨						
第1胸骨分節不完全骨化		0	0	1 (1)	0	
第2胸骨分節不完全骨化		1 (1)	0	1 (1)	0	
第5胸骨分節不完全骨化		18 (10)	27 (13)	16 (7)	14 (6)	
第6胸骨分節不完全骨化		0	0	1 (1)	0	
第5胸骨分節未骨化		8 (7)	14 (6)	↑19 (8)	10 (4)	

①Dunnnettの多対一t検定、③Fisherの正確確率検定、④Fisherの正確確率検定、申請者実施、

↑↓ : p<0.05、↑↑↓ : p<0.01

表1 結果の概要 (続き)

投与群 (mg/kg/day)	0	10	40	160	統計 処理
骨格異常 (化骨遅延)					
所見/検査動物 (腹) 数	101 (14)	126 (16)	104 (15)	101 (13)	
肋骨					
左第13肋骨未骨化	62 (14)	91 (16)	70 (14)	59 (13)	
右第13肋骨未骨化	62 (12)	↑95 (16)	72 (14)	62 (12)	
左第13肋骨短縮	18 (10)	20 (11)	15 (8)	18 (8)	
右第13肋骨短縮	11 (7)	22 (11)	16 (7)	16 (8)	
左前肢					
左第1中手骨不完全骨化	25 (10)	36 (13)	↑42 (11)	32 (10)	
左第1指基節骨不完全骨化	2 (2)	9 (4)	6 (4)	0	
左第2指中節骨不完全骨化	6 (5)	4 (2)	7 (6)	3 (3)	
左第3指中節骨不完全骨化	3 (3)	1 (1)	2 (2)	0	
左第4指中節骨不完全骨化	11 (6)	11 (7)	15 (8)	12 (6)	
左第5中手骨不完全骨化	1 (1)	0	0	0	
左第5指基節骨不完全骨化	1 (1)	0	0	0	
左第5指中節骨不完全骨化	17 (7)	29 (10)	19 (9)	23 (9)	④
左第1中手骨未骨化	12 (7)	25 (8)	12 (8)	10 (8)	
左第1指基節骨未骨化	2 (2)	0	1 (1)	0	
左第2指中節骨未骨化	2 (1)	0	0	0	
左第3指中節骨未骨化	2 (2)	0	0	0	
左第4指中節骨未骨化	6 (4)	4 (4)	7 (5)	2 (2)	
左第5指基節骨未骨化	1 (1)	0	0	0	
左第5指中節骨未骨化	81 (14)	93 (14)	85 (15)	71 (11)	
右前肢					
右第1中手骨不完全骨化	24 (10)	35 (13)	↑40 (11)	30 (10)	
右第1指基節骨不完全骨化	3 (3)	8 (4)	6 (4)	0	
右第2指中節骨不完全骨化	6 (5)	4 (2)	5 (4)	2 (2)	
右第3指中節骨不完全骨化	4 (3)	1 (1)	2 (2)	1 (1)	
右第4指中節骨不完全骨化	10 (6)	12 (7)	17 (7)	11 (6)	
右第5中手骨不完全骨化	1 (1)	0	0	0	
右第5指基節骨不完全骨化	1 (1)	0	0	0	
右第5指中節骨不完全骨化	17 (9)	29 (11)	18 (9)	23 (8)	

④Fisherの正確確率検定、申請者実施、↑↓ : 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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表1 結果の概要 (続き)

投与群 (mg/kg/day)	0	10	40	160	統計	
1群あたり腹数	14	16	15	13	処理	
胎 児 動 物	骨格異常 (化骨遅延)					
	所見/検査動物 (腹) 数	101 (14)	126 (16)	104 (15)	101 (13)	
	右前肢					
	右第1中手骨未骨化	12 (7)	26 (7)	14 (10)	12 (8)	
	右第1指基節骨未骨化	2 (2)	1 (1)	1 (1)	0	
	右第2指中節骨未骨化	2 (1)	0	0	0	
	右第3指中節骨未骨化	1 (1)	0	0	0	
	右第4指中節骨未骨化	7 (4)	4 (4)	8 (6)	2 (2)	
	右第5指基節骨未骨化	1 (1)	0	0	0	
	右第5指中節骨未骨化	81 (14)	93 (14)	86 (15)	72 (11)	
	左後肢					
	左踵骨不完全骨化	5 (3)	8 (4)	8 (6)	4 (3)	
	左第1趾基節骨不完全骨化	0	1 (1)	0	0	
	左第1趾中節骨不完全骨化	1 (1)	4 (2)	0	0	
	左第2趾基節骨不完全骨化	0	1 (1)	0	0	
	左第2趾中節骨不完全骨化	1 (1)	4 (2)	0	0	
	左第3趾基節骨不完全骨化	0	1 (1)	0	0	
	左第3趾中節骨不完全骨化	2 (2)	4 (2)	0	0	
	左第4趾基節骨不完全骨化	1 (1)	0	1 (1)	0	④
	左第4趾中節骨不完全骨化	72 (13)	76 (16)	67 (14)	77 (13)	
	左踵骨未骨化	0	1 (1)	0	0	
	左第4趾基節骨未骨化	0	1 (1)	0	0	
	左第4趾中節骨未骨化	22 (10)	38 (8)	29 (12)	↓11 (6)	
	右後肢					
	右踵骨不完全骨化	5 (3)	8 (4)	8 (6)	4 (3)	
	右第1趾基節骨不完全骨化	0	1 (1)	0	0	
	右第1趾中節骨不完全骨化	1 (1)	4 (2)	0	0	
	右第2趾基節骨不完全骨化	0	1 (1)	0	0	
	右第2趾中節骨不完全骨化	1 (1)	4 (2)	0	0	
	右第3趾中節骨不完全骨化	2 (2)	4 (2)	0	0	
右第3趾基節骨不完全骨化	0	1 (1)	0	0		
右第4趾基節骨不完全骨化	1 (1)	0	1 (1)	0		
右第4趾中節骨不完全骨化	72 (13)	75 (16)	67 (14)	76 (13)		
右踵骨未骨化	0	1 (1)	0	0		
右第4趾基節骨未骨化	0	1 (1)	0	0		
右第4趾中節骨未骨化	22 (10)	39 (9)	29 (12)	↓11 (6)		

④Fisherの正確確率検定、申請者実施 ↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01

(9) 変異原性

① 細菌を用いたDNA修復試験

(資料No. 31)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

試験方法 : 枯草菌*Bacillus subtilis*の組換修復機構野生株 (H17株) 及び修復機構欠損株 (M45株) を用いDNAへの損傷の誘起性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、20、50、100、200、500、1000、2000、5000  $\mu\text{g}/\text{disk}$  の濃度で処理した。陰性対照にはKanamycin、陽性対照にはMitomycin Cを用いた。結果については、H17株に0~1mmの阻止帯を示す濃度においてM45株の阻止帯が明確に3mm以上である場合を陽性と判定した。

結果 : 結果を表に示す。

検体は陰性対照として用いた Kanamycin と同様に両株に同程度の生育阻止帯を示した。

一方、陽性対照では組換修復機構野生株 (H17 株) に比べ修復機構欠損株 (M45 株) で著明な生育阻止帯が認められた。

薬 物	濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M-45	H-17	
溶媒対照 (DMSO)	-	0	0	0
検 体	20	0	0	0
	50	< 1	0	< 1
	100	1.5	< 1	
	200	2	1	1
	500	2.5	1	1.5
	1000	3	1.5	1.5
	2000	3	1.5	1.5
5000	3	1.5	1.5	
陰性対照 (Kanamycin)	10	8	6	2
陽性対照 (Mitomycin C)	0.1	11	1	10

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、DNA損傷誘発性を有しないものと判断された。

② 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料No. 31)

試験機関 :

報告書作成年 :

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* (TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2*hcr*株) を用い、ラット(SD系)雄の肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて復帰変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、5-5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲の7濃度で処理した。

試験はプレート法により各濃度につき2枚のプレートを用いた。

結果については、再現性及び用量依存性が認められた場合を陽性と判定した。

陽性対照にはAF-2 (2-(2-(furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide)、

ENNG (*N*-ethyl-*N*'-nitro-*N*'-nitrosoguanidine)、9-AA (9-aminoacridine)、

2-NF (2-nitrofluorene) 及び2-AA (2-aminoanthracene) を用いた。

結果 : 結果を表1に示す。

検体処理群ではS-9Mix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の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群ではいずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

表1：復帰変異試験（プレート法）

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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 $hcr$	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	159	9	15	40	11	17	
検体	5	-	139	9	14	34	10	21	
	10	-	138	11	14	37	10	15	
	50	-	165	13	17	31	8	18	
	100	-	142	11	14	33	10	26	
	500	-	55	7	16	45	2	26	
	1000	-	6*	1	20	37	1*	25	
	5000	-	*	3*	10	2*	*	12	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	172	7	19	53	10	39	
検体	5	+	154	6	17	43	10	31	
	10	+	177	8	23	29	10	31	
	50	+	147	5	14	29	7	32	
	100	+	122	10	19	35	8	23	
	500	+	76	5	15	30	6	30	
	1000	+	24*	4	19	24	4*	20	
	5000	+	1*	2*	14	2	*	19	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	550					
		0.04	-			202			
		0.1	-				644		
	ENNG	10	-		>2000				
	9-AA	80	-				>2000		
	2-NF	2	-					563	
	2-AA	0.5	-	169			39		27
			+	673			577		372
		2	-		13			10	
			+		304			188	
40	-			15					
	+			506					

表中の復帰変異コロニー数は2枚のプレートの平均値

\* 菌株の生育阻止有り。

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

ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

9-AA : 9-aminoacridine

2-NF : 2-nitrofluorene

2-AA : 2-aminoanthracene

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

試験方法 : チャイニーズハムスターから採取した卵巣由来細胞(CHO: K<sub>1</sub>-BH<sub>4</sub>細胞)を用い、代謝活性化系(S-9Mix)の存在下及び非存在下において、*in vitro*における染色体異常誘発性を調べた。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、S-9Mixの存在下では7~110 µg/ml、S-9Mixの非存在下では2.5~32.5 µg/mlの濃度を用いた。

24時間培養したCHO細胞に検体を処理し、S-9Mixの存在下及び非存在下で培養した。S-9Mix存在下では検体処理後2時間で新鮮培地に置き換え、さらに18時間培養した。S-9Mix非存在下では検体処理後20時間連続して培養した。溶媒対照群は4反復、検体処理群、無処理対照群及び陽性対照群は2反復で行った。培養終了後、有糸分裂を停止させ、固定、染色し標本作製し、分裂中期像について調査した。有糸分裂指数を求め、溶媒対照群に対して約50%以下の濃度を選択したところ、S-9Mix存在下では50、35及び7 µg/ml、非存在下では30、15及び2.5 µg/mlが評価対象となった。観察は1濃度あたり100個の分裂中期細胞について行い、有糸分裂指数及び染色体異常の数及びタイプについて計数した。

結果については、ギャップのみを保有する細胞は除外し、染色体異常細胞の出現頻度が溶媒対照と比較して統計学的に有意に増加を示す場合を陽性と判定した。

陽性対照としてS-9Mix存在下ではシクロホスファミド(CP)を、非存在下ではマイトマイシンC(MMC)として蒸留水に溶解させて用いた。

用量設定根拠 ; 予備試験の結果に基づき用量を決定した。

S-9Mixの存在下で70、95、120、145、170、195及び220 µg/ml、非存在下で10、25、40、55、70、85及び100 µg/mlの用量で実施し、有糸分裂指数を求め、溶媒対照群に対し約50%の低下を示す濃度を最高濃度とした。即ち、S-9Mixの存在下では7、35、50、75、90及び110 µg/ml、非存在下では2.5、7.5、12.5、15、17.5、20、22.5、27.5、30及び32.5 µg/mlを試験用量とした。

結果 : 結果を表1に示す。

検体処理群ではS-9Mix存在下、非存在下にかかわらず、溶媒対照と比較して染色体異常を有する細胞の発生率に統計学的に有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では、いずれの条件下においても染色体の構造異常の出現頻度に統計学的に有意な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず染色体異常誘発性を有しないものと判断された。

表1 試験結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	S-9 Mix の有無	観察 細胞数	異常の見られた 細胞数平均(%)		相対有糸 分裂指数 (%)
				ギャップ を除く	ギャップ を含む	
溶媒対照 (DMSO)	10 $\mu\text{l/ml}$	-	100	0.25	0.25	3.43
検体	2.5			0.5	0.5	4.90
	15			0	0.5	3.75
	30			0	1	1.75
溶媒対照 (蒸留水)	10 $\mu\text{l/ml}$			0	0	
陽性対照 (MMC)	0.4			13.5 $\uparrow$	13.5 $\uparrow$	
溶媒対照 (DMSO)	10 $\mu\text{l/ml}$	+	100	2.75	3.75	6.98
検体	7			2.5	4.0	6.65
	35			4.0	4.5	3.94
	50			4.0	6.0	3.70
溶媒対照 (蒸留水)	10 $\mu\text{l/ml}$			2.5	2.5	
陽性対照 (CP)	20			20 $\uparrow$	20.5 $\uparrow$	

Fisher直接検定  
MMC : マイトマイシンC

$\uparrow \downarrow$  :  $p < 0.05$ 、 $\uparrow \downarrow$  :  $p < 0.01$ 、 $\uparrow \downarrow$  :  $p < 0.001$   
CP : シクロホスファミド\*

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : ICRマウス、体重22-24 g、1群雌雄各15匹 (陽性対照群は5匹)

試験方法 : 骨髄中の小核を有する多染性赤血球の出現頻度を指標として小核誘発性を調べた。検体を1%メチルブルー (MC) 溶液に懸濁し、272、544及び1088 mg/kgの用量で単回強制経口投与した。溶媒対照群には1% MC溶液を同様に投与した。陽性対照群にはマイトマイシンC水溶液を8 mg/kgの用量で単回強制経口投与した。投与容量は20 ml/kgとした。最終投与後24、48及び72時間に動物を屠殺し (陽性対照は投与後24時間のみ)、大腿骨を摘出してウシ動物血清を用いて骨髄を洗い出し、骨髄標本を作製した。骨髄標本は、メタール固定後、Giemsa液染色を施し、光学顕微鏡下で、1動物あたり1000個の多染性赤血球について小核の有無を検査した。また、1動物あたり1000個以上の赤血球を観察し、多染性赤血球の正染性赤血球に対する比率も調べた。結果については、小核を有する多染性赤血球の出現頻度が溶媒対照群と比較して統計学的な増加が認められるものを陽性と判定した。

投与量設定根拠 ; 以下の用量設定試験の結果を基に設定した。

マウス雌雄各2匹を用い500、1000、2000、4000及び8000 mg/kgの用量で投与し、さらにマウス雌雄各5匹を用い937.5、1125、1350、1620及び1944 mg/kgの用量で投与した結果、72時間以内に10%が死亡する投与量は1088mg/kgであった。従って、本試験では1088 mg/kgを最高用量とし、以下、544及び272 mg/kgの計3用量を設定した。

結果 : 骨髄標本の観察結果を表1に示す。

検体投与群では、いずれの濃度においても、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。また、多染性赤血球の正染性赤血球に対する比率は1088mg/kg群の48及び72時間で減少が見られたが、これは骨髄に対する細胞毒性を示したものと考えられた。

一方、陽性対照群では、小核を有する多染赤血球数の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められたが、多染性赤血球の正染性赤血球に対する比率に減少は認められなかった。

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

表1 骨髓標本観察結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	PCE/NCE	MNP	MNN
24	溶媒対照 (1%MC)	-	0.745	0.9	0.3
	検体	272	0.725	0.3	0.2
		544	0.772	0.4	0.2
		1088	0.680	0.5	0
	陽性対照 (MMC)	8	0.714	20.2↑	0.6
48	溶媒対照 (1%MC)	-	0.774	0.2	0.2
	検体	272	0.982	0	0.2
		544	0.975	0.3	0.2
		1088	0.420↓	0.625	0.6
	72	溶媒対照 (1%MC)	-	1.006	0.3
検体		272	1.025	0.7	0
		544	0.904	0.5	0
		1088	0.629↓	0.429	0

Willcoxon検定、Kruskal-Wallis検定、Jonckheere & Spearman検定

↑↓: p<0.05、↑↓: p<0.01、↑↓: p<0.001

MC: 対細胞用スルホ水溶液 MMC: マイトマイシンC

PCE: 多染性赤血球数 NCE: 正染性赤血球数

MNP: 多染性赤血球1000個のうち、小核を有する多染性赤血球数

MNN: 赤血球1000個のうち、小核を有する正染性赤血球数

⑤ 雄マウスを用いた優性致死試験

(資料No. 34)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : CD-1マウス、5~6週齢、体重 25.7-33.4g、1群雄20匹、

試験期間 : 8週間検体投与 (1979年9月12日-1979年12月18日)

試験方法 : 検体を0、6、25及び100mg/kg/日となるよう飼料に混入し、雄マウスに8週間にわたって自由摂取させた。飼料は予想平均体重及び摂餌量に基づき毎週調製した。その後1回目交配群雌と1週間の交配後、さらに2回目交配群雌と1週間交配させた。膣栓が確認された雌は14日後 (膣栓を確認できなかった場合は交配期間中間日から14日後) に屠殺した。雄は雌の最終屠殺時に屠殺した。

投与量設定根拠; マウスを用いた亜急性毒性試験 (資料No. 19) で、検体を飼料に混入し0、25、100、400mg/kg/日で投与したところ、100mg/kg/日以上群で体重増加抑制などが認められたことから、100mg/kgを最高用量として、その下に25及び6 mg/kgの計3用量を設定した。

観察・検査項目 :

雄動物 ; 一般状態及び生死を1日1回観察した。体重は週1回測定し、摂餌量は交配前まで毎週測定した。屠殺時に肉眼的病理変化を検査し、精巣及び精巣上体の重量を測定した。

雌動物 ; 一般状態及び生死を1日1回観察した。体重は群分け時に測定した。交配確認のため毎日膣栓の検査をした。屠殺時に子宮を検査し、着床数、生存胎児数、早期及び後期死胚数を検査した。

結果 : 結果の概要を表1に示す。

一般状態、生死、体重、摂餌量及び精巣重量などに検体投与の影響は認められなかった。また交配能、着床数、生存胎児数、死胚数及着床後死胚率においても検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、本剤は雄マウスに対し優性致死性を有しないものと判断された。

表1 結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		0	6	25	100		
雄	1群当たりの動物数	20	20	20	20		
	死亡動物数	0	1(11週)	0			
	一般状態	検体投与に起因する症状なし					
	体重 (-1~13週)	検体投与に起因する変化なし					
	摂餌量 (-1~8週)	検体投与に起因する変化なし					
	交配能 (%)	1回目	95	90	95	100	
		2回目	95	90	95	95	
	肉眼的病理検査	検体投与に起因する所見なし					
	臓器重量(精巣)	検査動物数	20	19	20	20	
		絶対重量	436	448[103]	468[107]	436[100]	
相対重量		441	443[100]	464[105]	439[100]		
雌	動物数 (1回目/2回目)		20	20	20	20	
	妊娠率 (%)	1回目	95	90	95	100	
		2回目	95	90	95	95	
	検査親動物数	1回目	19	18	19	20	
		2回目	19	18	19	19	
	平均生存胎児数	1回目	11.4	11.9	10.7	10.9	
		2回目	10.1	11.0	10.4	10.9	
	着床数	1回目	12.3	13.1	11.6	11.9	
		2回目	10.7	12.2	11.3	12.1	
	死胚数	早期	1回目	0.5	0.8	0.6	0.8
			2回目	0.5	0.8	0.8	0.8
		後期	1回目	0.4	0.3	0.3	0.2
			2回目	0.1	0.4	0.1	0.3
		合計	1回目	0.9	1.1	0.9	1.0
			2回目	0.6	1.2	0.9	1.2
	着床後死亡胚率 (%)	1回目	7.8	8.8	7.7	11.1	
		2回目	9.9	11.1	9.4	11.8	

Williams検定、Jonckheere検定、Kruskal-Wallis検定

[ ]内の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したものの。

⑥ ヒト胎児線維芽細胞を用いた不定期DNA合成試験

(資料No. 35)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

試験方法 : ヒト胎児肺線維芽細胞 (Flow 2002) を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下において、*in vitro*における不定期DNAの合成の誘発性を調べた。

検体はメタノールに溶解し、0、10、40、70、100、130、160、190 及び 220  $\mu\text{g/ml}$  の濃度でアルギニン欠損 DMEM 培地で培養したヒト胎児肺線維芽細胞に処理し、S-9Mix の存在下、非存在下で 3 時間培養した。その後、リン酸緩衝食塩水を用いて洗浄し、1% 酢酸トリウム液を 10 分間処理しその後メタノール：酢酸 (3:1) で固定した。

不定期 DNA 合成の定量は、各培養ごとに 50 個の核中の粒子数を計数し、2 連の平均値とした。

結果については、平均粒数が溶媒対照群の値の倍以上であり、直近 (1982-1983 年) の背景データにおける核あたりの粒数の最高値である 1.00 を超える場合を陽性と判定した。

陽性対照として 4-ニトロキノリン-N-オキサイド (4-NQO) 及び 2-アミノアントラセン (2-AAN) を用いた。

投与量設定根拠 ; 以下の用量設定試験 (細胞毒性試験) の結果を基に設定した。

検体をメタノールに溶解し、0.1、1、10、100 及び 1000  $\mu\text{g/ml}$  の濃度でヒト胎児肺線維芽細胞に S-9Mix の存在下及び非存在下において培養したところ、1000  $\mu\text{g/ml}$  では著しい細胞毒性が認められ、さらに沈殿を生じた。また、100  $\mu\text{g/ml}$  では一部に毒性が認められた。従って本試験における最高処理濃度は 220  $\mu\text{g/ml}$  とし、以下 190、160、130、100、70、40 及び 10  $\mu\text{g/ml}$  の処理濃度を設定した。

結果 : 結果を表 1 に示す。

検体投与群では、全ての濃度において対照群と比較し統計学的有意な差は認められなかった。

一方、陽性対照群では、S-9Mix の存在下における 2-アミノアントラセン、非存在下における 4-ニトロキノリン-N-オキサイドともに対照群と比較して統計学的有意な差が認められた。

以上の結果から、本剤は代謝活性化の有無に関わらずヒト胎児肺線維芽細胞の不定期合成を誘起しないものと判断された。

表1 結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	S-9 Mix の有無	核当りの平均粒数		
			1回	2回	
溶媒対照 (メタノール)	-	-	0.78	0.26	
検体	10	-	0.63	0.68	
	40	-	0.74	0.66	
	70	-	1.26	0.96	
	100	-	0.92	0.85	
	130	-	0.81	0.83	
	160	-	0.74	0.56	
	190	-	0.86	0.83	
	220	-	0.84	0.74	
溶媒対照 (メタノール)	-	+	0.16	0.50	
検体	10	+	0.54	1.02	
	40	+	0.90	0.64	
	70	+	0.96	1.12	
	100	+	0.88	0.90	
	130	+	0.68	0.80	
	160	+	0.68	1.04	
	190	-	0.66	0.55	
	220	+	1.08	0.30	
陽性 対照	4-NQO	0.75	-	1.46	0.88
		1.5	-	6.46	2.98
	2-AAN	2	+	0.92	0.74
		4	+	2.38	0.54
		8	+	4.16	4.34
溶媒対照 (DMSO)	-	+	0.42	0.16	

表中の数値は2枚のプレートの平均値

4-NQO : 4-ニトロキノリン-N-オキサイド

2-AAN : 2-アミノアントラセン

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

試験方法 : マウス腫細胞(L5178Y)を用いて、代謝活性化系(S-9Mix)の存在下及び非存在下において、*in vitro*における遺伝子突然変異試験をCliveらの方法で実施した。

L5178Y系細胞はチジンキナーゼ(TK)遺伝子座においてヘテロ接合性である。

検体をメタールに溶解し、1回目0、0.5、1.5、5.0、15.0及び50.0 $\mu$ g/ml、2回目0、30.0、40.0、50.0、60.0及び70.0 $\mu$ g/mlの濃度でマウス腫細胞(L5178Y)に処理し、S-9Mixの存在下、非存在下で3時間培養した。培養終了後、細胞を採集し、一部を軟寒天培地で培養し、処理後0日の生存細胞検定とした。残りの細胞を新鮮培地で3日間培養し、処理後0日と同様に生存細胞検定を実施した。さらに残りの細胞をトリフルオロチミン(TFT)を含む培地で培養し、TFT抵抗性突然変異細胞数を計数した。処理後3日の生存細胞数及びTFT抵抗性突然変異細胞数から、生存細胞数 $10^6$ 個当りのTFT抵抗性突然変異細胞数を算出した。

結果については、溶媒対照における突然変異頻度と比べ、被験物質の少なくとも連続する2濃度に倍増が認められ、それが突然変異細胞の絶対数の増加を観察することが出来る場合を陽性と判定した。

陽性対照としてS-9Mix存在下ではエチルメタンサルネート(EMS)、S-9Mix非存在下では2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF)を用いた。

投与量設定根拠 ; 以下の用量設定試験(細胞毒性試験)の結果を基に設定した。

検体をメタールに溶解し、0、0.16、1.58、15.8、157.9及び1579.2 $\mu$ g/mlの濃度でマウス腫細胞(L5178Y)に処理し、代謝活性化系(S-9Mix)の存在下及び非存在下において3時間培養し、その後新鮮培地に置き換えて培養した。処理後1、2及び3日に生存細胞を検定したところ、157.9 $\mu$ g/ml以上ではS-9Mixの存在下、非存在下にかかわらず細胞死滅が認められた。従って本試験における最高処理濃度は50 $\mu$ g/mlとし、以下15.0、5.0、1.5及び0.5 $\mu$ g/mlの処理濃度を設定した。

結果 : 結果を表1及び表2に示す。

検体投与群は1回目の試験及び高濃度で実施した2回目の試験共にS-9Mix存在下、非存在下において差は認められなかった。

溶媒対照群の値は正常範囲内であり、陽性対照群の値は、S-9Mixの存在下における2-アセチルアミノフルオレン、非存在下におけるエチルメタンサルネート共に溶媒対照群と比較し高い突然変異頻度を示した。

以上の結果から、本剤は代謝活性化(S-9Mix)の有無にかかわらずマウス腫細胞(L5178Y)における遺伝子突然変異誘発性を有しないものと判断された。

表1 1回目結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	S-9 Mix の有無	処理後0日		処理後3日		TFT コロニー数 / $10^5$ 個	
			コロニー数	生存率 (%)	コロニー数	TFT コロニー数		
溶媒対照 (メタノール)	-	-	84	100	121	10	2	
検体	0.5	-	153	182	253	22	2	
	1.5	-	100	119	211	18	2	
	5.0	-	112	133	249	12	1	
	15.0	-	98	117	238	23	2	
	50.0	-	11	13	114	5	1	
溶媒対照 (メタノール)	-	+	149	100	266	66	5	
検体	0.5	+	190	128	285	33	2	
	1.5	+	195	131	251	27	2	
	5.0	+	191	128	317	27	2	
	15.0	+	192	129	201	27	3	
	50.0	+	109	73	256	22	2	
陽性 対照	EMS	200.0	-	-	138	213	170	16
		400.0	-	174	207	131	254	39
	2-AAF	50.0	+	9	6	60	79	26
		100.0	+	5	3	0	0	-

表中のコロニー数は3枚のプレートの平均値

EMS : エチルメタンサルホネート、2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

表2 2回目結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	S-9 Mix の有無	処理後0日		処理後3日		TFT コロニー数 / $10^5$ 個	
			コロニー数	生存率 (%)	コロニー数	TFT コロニー数		
溶媒対照 (メタノール)	-	-	100	100	319	90	6	
検体	30.0	-	27	27	255	54	4	
	40.0	-	14	14	166	36	4	
	50.0	-	15	15	103	8	2	
	60.0	-	4	4	0	0	-	
	70.0	-	0	0	4	1	5	
溶媒対照 (メタノール)	-	+	98	100	279	95	7	
検体	30.0	+	31	32	210	95	9	
	40.0	+	13	13	131	40	6	
	50.0	+	10	10	80	42	11	
	60.0	+	0	0	-	-	-	
	70.0	+	0	0	-	-	-	
陽性 対照	EMS	200.0	-	91	91	287	254	18
		400.0	-	73	73	257	522	41
	2-AAF	50.0	+	3	3	5	18	72
		100.0	+	5	5	7	34	97

表中のコロニー数は3枚のプレートの平均値

EMS : エチルメタンサルホネート、2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

(10) 生体機能影響

① ラット、マウス及びウサギを用いた生体機能への影響に関する試験

(資料No. 37)

試験機関：

報告書作成年：

1 一般状態に及ぼす影響

供試動物：DD系マウス、体重 22～33 g、1群雌雄各3匹

投与方法：検体をTween 80に懸濁させ、0、500、1000、1500及び2000mg/kgの用量で皮下注射した。投与容量は1 ml/100gとした。投与5、15及び60分後に、Irwinの多次元観察法に従い全身状態を観察した。

結果：2000mg/kg群雄1例で投与15分後から洗顔回数の減少、警戒性、位置視覚及び受動態の鈍化が見られ、さらに自発運動、触覚運動及び痛覚反応の著しい鈍化が軽度の間代性痙攣を伴って認められ、呼吸数が微弱となり22分後には死亡した。また、同群雄1例では投与15分後から握力の低下が認められ、60分後には洗顔回数の減少、反応性及び自発運動の低下、姿勢異常、筋緊張弛緩、耳介反射の消失などが認められた。同群雌1例では投与15分後から洗顔回数の減少、警戒性、位置視覚及び受動態の鈍化が見られ、さらに自発運動及び痛覚反応などの著しい低下及び微弱呼吸などが認められ投与40分後に死亡した。その他同群雌1例で投与60分後に握力の軽微な低下及び立毛が見られた。1500mg/kg以下の群において変化は認められなかった。

2 中枢神経系に対する作用

i) マウスの自発運動量に及ぼす影響

供試動物：DD系マウス、体重約25 g、1群雄7匹

投与方法：検体をTween 80に懸濁させ、0、500及び1500mg/kgの用量で皮下注射した。投与容量は1 ml/100gとした。投与10分後に回転籠に移し、投与30、60、90及び120分後に回転数を測定した。陽性対照群にはChlorpromazine hydrochlorideを2mg/kgの用量で皮下投与した。

結果：次表に示す。

投与量 (mg/kg)		回転数			
		投与後時間 (分)			
		30	60	90	120
溶媒対照	-	610	1155	1698	2104
検体	500	610	1099	1388	1597
	1500	568	936	1109	1149 ↓
陽性対照	2	193 ↓	221 ↓	257 ↓	317 ↓

Student-t検定 ↑ ↓ : p<0.05、⊕ ⊖ : p<0.01、↑↓ : p<0.001

1500mg/kg群の投与120分後で回転数の統計学的有意な減少が認められたが、500mg/kg群に変化は認められなかった。

陽性対照群では投与30分後から120分後まで著しい減少が認められた。

ii) マウスの電撃に対する抗痙攣作用

供試動物：DD系マウス、体重約30 g、1群雄7匹

投与方法：検体をTween 80に懸濁させ、0、500、1000及び1500mg/kgの用量で皮下注射した。投与容量は1 ml/100gとした。投与後電撃痙攣装置により、角膜電極を両眼にあて、電流(100V、15mA、0.2秒)を通じ痙攣を起こさせTF(強直屈曲性、tonic flexor)、TE(強直伸展性、tonic extensor)及びCL(間代性、clonic convulsion)の消失の有無を観察した。陽性対照群にはPhenobarbital sodiumを100mg/kgの用量で皮下投与した。

結果：TF、TE及びCLいずれに対しても検体投与による消失は認められず、検体投与による影響は認められなかった。一方、陽性対照群では抗痙攣作用が認められた。

iii) ウサギの直腸温に及ぼす作用

供試動物：ウサギ、体重3.3-4.0 kg、1群3匹

投与方法：検体をTween 80に懸濁させ、一夜絶食後に0、100及び300mg/kgの用量で筋肉注射した。投与容量は1 ml/1kgとした。投与前から投与12時間後まで1時間毎に直腸温を測定した。(日本薬局方記載の方法に準拠)

結果：検体投与による影響は認められなかった。

iv) ウサギの自発性脳波に及ぼす作用

供試動物：ウサギ、体重約3 kg、1群1匹

投与方法：30%NIKKOL HCO-60(医薬品用ボリオキシエチレン硬化ヒマシ油)-DMSO(Dimethyl sulfoxide)を用いて1%及び2%検体溶液を調製した。動物を麻酔下にて脳定位固定装置に固定し、誘導電極を脳皮質表面(知覚領、運動領、視覚領)に位置させ、麻酔から回復後、0、5及び10mg/kgの用量となるように検体溶液を静脈注射し、脳波を投与3時間後まで測定した。

結果：10mg/kg投与では投与5分後律動的な波が見られず、不規則な大徐波のみとなり、脳機能障害が示唆されたが、15分後から大徐波は減少し、120分後には投与前の状態に回復した。5mg/kg投与では投与5分後に徐波傾向にあったが投与15分後には回復した。

3 循環器系に及ぼす作用

i) ウサギの血圧、呼吸及び心電図に及ぼす作用

供試動物：ウサギ

投与方法：検体を30%NIKKOL HCO-60(医薬品用ボリオキシエチレン硬化ヒマシ油)-DMSO(Dimethyl sulfoxide)に懸濁させ、0、10及び30mg/kgの用量を麻酔下動物の股静脈に挿入したカニューレより投与し、腹部大動脈圧、呼吸運動及び心電図を投与1時間後まで測定した。

結果：30mg/kg群で心拍数の軽度減少が見られたが、間隔及び波形に変化は認められなかった。他に検体投与による影響は認められなかった。

ii) ラットの腎機能（尿量及び電解質）に及ぼす作用

供試動物：Wistar系ラット、体重 約250g、1群雄5匹

投与方法：一晩の絶食及び2時間の絶水の後、体重の3.5%量の生理食塩水を経口投与した動物に、検体をTween 80に懸濁させ、0、100及び300mg/kgの用量で皮下注射した。陽性対照群はAminophyllineを120 mg/kgの用量で経口投与した。投与後5時間に採尿し、尿量及び尿中電解質（Na及びK）を測定した。

結果：検体投与による影響は認められなかった。  
陽性対照群では統計学的に有意な尿量の増加が認められた。

#### 4 小腸輸送能に及ぼす作用

供試動物：DD系マウス、体重 24-39 g、1群雄7匹

投与方法：6時間の絶食後、Tween 80に懸濁させた検体を0、500及び1000mg/kgの用量で皮下注射した。投与容量は1 ml/100gとした。投与30分後に体重の3.5%量の炭末：アラビノース：水（1g：1g：10ml）溶液を経口投与し、20分後に屠殺して小腸を摘出した。幽門部より小腸炭末移動距離を測定し移動率を算出した。

結果：結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	移動率 (%)
対照群	69.7
溶媒対照群	63.1
500	56.2
1000	57.0

500及び1000mg/kg群ともに対照群と比較し、わずかな移動率の減少が認められたが、明らかな差はなかった。

#### 5 血液の凝固及び溶血に及ぼす作用

供試動物：ウサギ、体重3.1-3.7 kg、1群3匹

投与方法：検体をTween 80に懸濁させ、0、100及び300mg/kgの用量で皮下注射した。投与30分後及び2時間後に耳介静脈より採血し、凝固時間をLee and White法、溶血作用をParpart法により測定した。

結果：検体投与による影響は認められなかった。

#### 6 肝機能に及ぼす作用

供試動物：ウサギ、体重2-3 kg、1群3匹

投与方法：検体をTween 80に懸濁させ、100及び500mg/kgの用量で皮下注射した。投与直前及び投与後3、12及び24時間後に耳介静脈より採血し、AST (GOT)、ALT (GPT)、コリンエステラーゼ、尿素窒素及び総蛋白を測定した。

結果：見られた変化はいずれも正常範囲内の変動であり、検体投与による影響は認められなかった。

## 7 皮膚刺激に及ぼす作用

供試動物：ウサギ、体重2.9-3.3 kg、1群2匹

投与方法：投与前日に背部を除毛し、各群1匹はそのまま、1匹は鋭利な刃の背により擦傷を作り、Tween 80に懸濁させた0、3及び10%検体溶液を塗布した。塗布24、48及び72時間後にDraize法に基づき紅斑、痂皮形成及び浮腫を視診し判定した。

結果：検体投与による影響は認められなかった。

以上、一般症状(マウス)として2000mg/kgの用量で自発運動の低下、運動失調及び握力の低下などが認められ、死亡も認められた。自発運動量測定(マウス)において1500mg/kgの用量で運動量の低下が認められた。また、脳波(ウサギ)では5mg/kg以上の用量で徐波が見られ、脳機能障害が示唆されたがすぐに回復した。呼吸・循環器系(ウサギ)への影響に関しては30mg/kgの用量で心拍数の軽度減少傾向が認められた。一方、腎機能、血液凝固・溶血及び肝機能に対しては影響を示さず、皮膚刺激もないものと考えられた。

[生体の機能に及ぼす影響に関する試験] の総括表

試験項目	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 (匹/群)	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系						
一般症状 [Irwin法] (マウス)	皮下 (Tween 80)	0	雌雄3	2000	1500	2000mg/kg群：自発運動の低下、運動失調、握力低下。雌雄各1匹死亡。
		500				
		1000				
		1500				
自発運動 (マウス)	皮下 (Tween 80)	0	雄7	1500	500	1500mg/kg群：投与120分後自発運動量低下。
		500				
		1500				
抗痙攣作用 (マウス)	皮下 (Tween 80)	0	雄7	-	1500	影響なし
		500				
		1000				
体温 (ウサギ)	筋肉 (Tween 80)	0	3	-	300	影響なし
		100				
		300				
自発性脳波 (ウサギ)	静脈 (NIKKOL HCO60-DMSO)	0	1	5	-	5mg/kg以上群：徐波が出現し、脳機能障害が示唆されたが、回復した。
		5				
		10				
呼吸・循環器系						
血圧、呼吸数 心電図 (ウサギ)	動脈 (NIKKOL HCO60-DMSO)	0	1	30	10	30mg/kg群：心拍数の軽度減少。
		10				
		30				
腎機能 (ラット)	皮下 (Tween 80)	0	雄5	-	300	影響なし
		100				
		300				
炭末輸送能 (マウス)	皮下 (Tween 80)	0	雄7	-	1000	影響なし
		500				
		1000				
血液の 凝固及び溶血 (ウサギ)	皮下 (Tween 80)	0	3	-	300	影響なし
		100				
		300				
肝機能 (ウサギ)	皮下 (Tween 80)	0	3	-	500	影響なし
		100				
		500				
その他						
皮膚刺激 (ウサギ)	塗布	3、10 (%)	2	-	10(%)	影響なし

NIKKOL HCO-60 : 医薬品用ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油  
DMSO : Dimethyl sulfoxide

(11) その他

肝臓酵素誘導能試験

実施試験の種類及び結果を次表に示す。

資料 No.	試験の種類 期間					
25	肝臓の混合型酸化酵素系に及ぼす影響					
26	肝臓の混合型酸化酵素系に及ぼす影響					
27	肝臓の混合型酸化酵素系に及ぼす影響					

①

肝臓の混合型酸化酵素系に及ぼす影響

(資料No. 25)

試験機関 :

報告書作成年 :

表 試驗結果

②

肝臓の混合型酸化酵素系に及ぼす影響

(資料No. 26)

試験機関 :

報告書作成年 :

表1 試験1



表2 試験2

③

肝臓の混合型酸化酵素系に及ぼす影響

(資料No. 27)

試験機関 :

報告書作成年 :

表 結果

## 2. 原体中混在物及び代謝物

### (1) 急性毒性

#### ① 原体中混在物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 40)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : Wistar系ラット、体重 75-100g、1群雄2匹

試験期間 : 14日間観察 (投与日を0日として起算)

投与方法 : 検体を0.4%セサイズ (ヒドロキシethylセルロース) 水溶液に懸濁し、単回強制経口投与した。投与容量は10~20ml/kgとした。

観察項目 : 生死及び一般状態の観察を1日2回、14日目まで観察した。

結果 :

投与経路	経口
性別	雄
投与量 (mg/kg)	800、1600、3200
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	約3200
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
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1600

死亡 ; 3200mg/kg群で投与後4日に1匹の死亡が認められた。

② 原体中混在物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 41)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : Wistar系ラット、体重70-100g、1群雄5匹

観察期間 : 14日間観察 (投与日を0日として起算)

投与方法 : 検体をアスピロコム水溶液に懸濁し、3200mg/kgを単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。1群雄2匹に800、3200mg/kgを単回強制経口投与した予備試験では死亡は認められなかった。

観察・検査項目 : 生死及び一般状態の観察を投与直後から6時間までは継続的に、それ以降は死亡時若しくは1日2回、14日間実施した。観察期間終了時に全動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与経路	経口
性別	雄
投与量 (mg/kg)	0、3200
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	約 3200
死亡開始時間及び終了時間	投与後5日 投与後5日
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7日に消失
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	-

死亡 ; 投与後5日に2匹が死亡した。

一般状態 ; 投与後2時間から鼻汁が観察された。その後動作緩慢、呼吸数の低下、立毛、さらに昏睡、振戦等が観察されたが、投与後7日には消失した。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

③ 原体中混在物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 40)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : Wistar系ラット、体重 75-100g、1群雄2匹

試験期間 : 14日間観察 (投与日を0日として起算)

投与方法 : 検体をアラビアゴム水溶液に懸濁し、単回強制経口投与した。投与容量は10~20ml/kgとした。

観察項目 : 生死及び一般状態の観察を1日2回、14日目まで観察した。

結果 :

投与経路	経口
性別	雄
投与量 (mg/kg)	200、800、3200
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	800 ~ 3200
死亡開始時間及び終了時間	投与後0日から開始 投与後0日に終了
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	800

死亡 ; 3200mg/kg群で投与後0日に2匹の死亡が認められた。

④ 原体中混在物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 42)

試験機関 :  
報告書作成年 :

検体純度 :  
供試動物 : Wistar系ラット、体重75-100g、1群雄5匹(対照群10匹)  
観察期間 : 14日間観察(投与日を0日として起算)  
投与方法 : 検体を0.4%ゼラチン水溶液に懸濁し、3200mg/kgを単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。1群雄2匹に800、3200mg/kgを単回強制経口投与した予備試験では死亡は認められなかった。

観察・検査項目 : 生死及び一般状態の観察を投与直後から6.5時間までは継続的に、それ以降は1日2回、14日間実施した。全動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与経路	経口
性別	雄
投与量 (mg/kg)	0、3200
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	> 3200
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	投与後6.5時間以内から発現 投与後12日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	3200

死亡 ; 認められなかった。

一般状態 ; 投与後6.5時間以内に下痢が1匹に観察され、他の1匹で投与後11日に鼻汁による赤い汚れ、流涎の増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

⑤ 原体中混在物（代謝物）のラットにおける急性経口毒性試験

（資料No. 43）

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : Wistar系ラット、体重70-100g、1群雄4匹（対照群は雄10匹）

観察期間 : 14日間観察（投与日を0日として起算）

投与方法 : 検体\*を0.4%吐吐イソ水溶液に懸濁し、3200mg/kgを単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。1群雄2匹に200、800、3200mg/kgを単回強制経口投与した予備試験では死亡は認められなかった。

\*申請者注：同時に規格外混在物1化合物も評価されたが成績の記載は省略する。

観察・検査項目：生死及び一般状態の観察を投与直後から6時間までは継続的に、それ以降は1日2回、14日間実施した。観察期間終了時に対照群の5匹及び投与群の全動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与経路	経口
性別	雄
投与量 (mg/kg)	0、3200
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	> 3200
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	投与後30分から発現 投与後7日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	3200

死亡；認められなかった。

一般状態；投与後30分から透明な鼻汁、下痢、流涎の増加が認められたが、1匹を除き翌日までに回復した。1匹については投与後6日に衰弱が認められた。

肉眼的病理検査；異常は認められなかった。

⑥ 代謝物のラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 38)

試験機関 :  
報告書作成年 :

検体純度 :  
供試動物 : Wistarラット、体重84-97g、1群雄5匹(対照群10匹)  
観察期間 : 14日間観察(投与日を1日として起算)  
投与方法 : 検体\*を8%アラビアゴム水溶液に懸濁し、3200mg/kgを単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。800、1600及び3200mg/kgの用量で実施した予備試験では死亡は認められなかった。

\*申請者注：同時に有効成分プロコラズも評価されたが成績の記載は省略する。

観察・検査項目：一般状態及び生死の観察は投与直後から投与後6時間45分までは継続的に実施し、その後は少なくとも1日2回及び死亡時に14日間実施した。全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与経路	経口
性別	雄
投与量 (mg/kg)	0、3200
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	> 3200
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	投与後2日から開始 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)	3200

死亡；死亡は認められなかった。

一般状態；行動性低下、衰弱、立毛、眼の周囲の汚れ、鼻汁及び生殖器周辺の尿による汚れがみとめられたが、投与後9日には回復した。

肉眼的病理検査；異常は認められなかった。

⑦ 代謝物Cのラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 38)

試験機関 :  
報告書作成年 :

検体純度 :  
 供試動物 : Wistarラット、体重84-97g、1群雄5匹(対照群10匹)  
 観察期間 : 14日間観察(投与日を1日として起算)  
 投与方法 : 検体\*を8%アラビアゴム水溶液に懸濁し、3200mg/kgを単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。800、1600及び3200mg/kgの用量で実施した予備試験では死亡は認められなかった。

\*申請者注：同時に有効成分プロクロラズも評価されたが成績の記載は省略する。

観察・検査項目：一般状態及び生死の観察は投与直後から投与後6時間45分までは継続的に実施し、その後は少なくとも1日2回及び死亡時に14日間実施した。全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与経路	経口
性別	雄
投与量 (mg/kg)	0、3200
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	> 3200
死亡開始時間及び終了時間	投与後1日から開始 投与後1日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後1時間から開始 投与後7日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	-

死亡；1匹の死亡が認められた。

一般状態；昏睡、衰弱、鎮静化などの中枢神経機能の低下、呼吸速度の低下、立毛、下痢、体温低下、動作緩慢、運動失調、振戦、鼻汁及び流涎の増加が認められたが、投与後7日に消失した。

肉眼的病理検査；異常は認められなかった。

⑧ 代謝物Kのラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 39)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

供試動物 : Wistar系ラット、体重77-127g、1群雄5匹(対照群15匹)

観察期間 : 14日間観察(投与日を1日として起算)

投与方法 : 検体\*を10%アラビアゴム水溶液に懸濁し、200、400、800、1600及び3200mg/kgを単回強制経口投与した。投与容量は20ml/kgとした。

\*申請者注:同時に有効成分プロクロラズも評価されたが成績の記載は省略する。

観察・検査項目:一般状態及び生死の観察を投与開始から6時間まで継続的に実施し、その後は少なくとも1日2回及び死亡時に14日間実施した。200及び400mg/kg群を除く全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与経路	経口
性別	雄
投与量 (mg/kg)	0、200、400、800、1600、3200
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	800 ~ 1600
死亡開始時間及び終了時間	投与直後から開始 投与後24時間に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後30分から開始 投与後2日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	400
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	800

死亡;投与直後から3200mg/kg群で全動物、1600mg/kg群で3匹の死亡が認められた。一般状態;投与後30分以内から中枢神経機能の低下、冷感、下痢、興奮、振戦、屈曲姿勢、流涙、流涎などが認められた。また3200mg/kg群では全動物に痙攣が認められた。

肉眼的病理検査;死亡動物で消化管刺激性の形跡が認められたが、最終屠殺動物には認められなかった。

(2) 変異原性

① 原体中混在物 の細菌を用いた復帰変異試験

(資料No. 46)

試験機関 :

報告書作成年 :

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* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、1538株) を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて復帰変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、0、50、150、500、1500及び5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の濃度で処理した。試験はプレート法により各濃度につき3枚のプレートを用いて2回実施した。陽性対照には2-アミノアントラセン (AA)、2-ニトロフルオレン (NF)、9-アミノアクリジン (9AC) 及びN-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (ENNG) を用いた。

結果については、2回の試験において復帰変異コロニー数が溶媒対照に比べ2倍以上に増加し、かつ用量依存性が認められた場合を陽性と判定した。

用量設定根拠 ; 5、50、500及び5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の濃度で本試験と同様の方法で用量設定試験を実施した。その結果、最高用量で菌に対する生育阻害作用が認められなかったため、5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を本試験の最高濃度とした。

結果 : 表1及び表2に試験結果を示す。

検体処理群ではS-9Mix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の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では復帰変異コロニー数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

表1. 試験結果(1回目)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	132	14	26	13	12	
検体	0	-	125	12	22	12	8	
	50	-	133	12	20	11	8	
	150	-	116	13	15	13	9	
	500	-	81	11	18	13	10	
	1500	-	73	5	13	10	6	
	5000	-	62	5	13	9	4	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	121	13	19	13	13	
検体	0	+	125	11	21	11	13	
	50	+	122	12	20	11	12	
	150	+	124	12	19	7	11	
	500	+	75	10	18	7	12	
	1500	+	66	7	16	9	12	
	5000	+	84	4	14	5	12	
陽性 対照	ENNG	3.0	-	515				
		5.0	-		678			
	9AC	80.0	-				1392	
	NF	1.0	-			73		
		2.0	-					47
	AA	0.5	+			184		126
		1.0	+	377				
2.0		+		147		74		

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AC : 9-アミノアクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン

AA : 2-アミノアントラセン

表2. 試験結果(2回目)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (DMSO)	-	-	117	13	29	16	11
検体	0	-	122	11	34	14	11
	50	-	113	10	23	15	11
	150	-	76	10	21	12	10
	500	-	62	11	18	12	9
	1500	-	57	9	17	7	9
	5000	-	38	12	15	4	6
溶媒対照 (DMSO)	-	+	105	12	20	12	13
検体	0	+	125	11	21	12	10
	50	+	97	10	20	10	9
	150	+	88	14	20	12	10
	500	+	77	8	21	8	9
	1500	+	64	5	14	8	8
	5000	+	52	7	11	7	5
陽性 対照	ENNG	3.0	-	524			
		5.0	-		961		
	9AC	80.0	-			2648	
	NF	1.0	-			94	
		2.0	-				52
	AA	0.5	+			207	189
		1.0	+	808			
2.0		+		123		131	

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AC : 9-アミノアクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン

AA : 2-アミノアントラセン

② 原体中混在物Bの細菌を用いた復帰変異試験

(資料No. 47)

試験機関 :

報告書作成年 :

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* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、1538株) を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて復帰変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、0、50、150、500、1500及び5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の濃度で処理した。試験はプレート法により各濃度につき3枚のプレートを用いて2回実施した。陽性対照には2-アミノアントラセン(AA)、2-ニトロフルオレン(NF)、9-アミノアクリジン(9AC)及びN-エチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン(ENNG)を用いた。

結果については、復帰変異コロニー数が溶媒対照に比べ2倍以上に増加し、かつ用量依存性が認められた場合を陽性と判定した。

用量設定根拠 ; 5、50、500及び5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の濃度で本試験と同様の方法で用量設定試験を実施した。その結果、最高用量で菌に対する生育阻害作用が認められなかったため、5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を本試験の最高濃度とした。

結果 : 表1及び表2に試験結果を示す。

検体処理群ではS-9Mix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の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では復帰変異コロニー数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

表1. 試験結果(1回目)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (DMSO)	-	-	132	14	26	13	12
検体	0	-	125	12	22	12	8
	50	-	132	11	20	13	12
	150	-	122	10	22	7	10
	500	-	124	11	21	8	8
	1500	-	114	11	19	14	7
	5000	-	112	9	12	11	9
溶媒対照 (DMSO)	-	+	121	13	19	13	13
検体	0	+	125	11	21	11	13
	50	+	116	9	17	9	10
	150	+	112	10	16	9	10
	500	+	99	13	15	9	10
	1500	+	106	9	16	10	13
	5000	+	95	10	19	8	11
陽性 対照	ENNG	3.0	-	515			
		5.0	-		678		
	9AC	80.0	-			1392	
	NF	1.0	-			73	
		2.0	-				47
	AA	0.5	+			184	126
		1.0	+	377			
2.0		+		147		74	

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AC : 9-アミノアクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン

AA : 2-アミノアントラセン

表2. 試験結果(2回目)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (DMSO)	-	-	117	13	29	16	11
検体	0	-	122	11	34	14	11
	50	-	102	11	22	13	13
	150	-	107	11	25	13	9
	500	-	114	12	28	14	6
	1500	-	105	12	26	12	7
	5000	-	74	8	21	15	10
溶媒対照 (DMSO)	-	+	105	12	20	12	13
検体	0	+	125	11	21	12	10
	50	+	104	10	19	11	9
	150	+	94	13	19	10	9
	500	+	97	7	20	10	11
	1500	+	101	10	16	10	10
	5000	+	103	12	19	9	8
陽性 対照	ENNG	3.0	-	524			
		5.0	-		961		
	9AC	80.0	-			2648	
	NF	1.0	-			94	
		2.0	-				52
	AA	0.5	+			207	189
		1.0	+	808			
2.0		+		123		131	

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AC : 9-アミノアクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン

AA : 2-アミノアントラセン

③ 原体中混在物の細菌を用いた復帰変異試験

(資料No. 48)

試験機関 :

報告書作成年 :

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* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、1538株) を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて復帰変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、0、15、50、150、500及び1500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の濃度で処理した。各濃度につき3枚のプレートを用いた。陽性対照には2-アミノフラベン(AA)、2-ニトロフルオレン(NF)、9-アミノアクリジン(9AC)及びN-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(ENNG)を用いた。

結果については、復帰変異コロニー数が溶媒対照に比べ2倍以上に増加し、かつ用量依存性が認められた場合を陽性と判定した。

用量設定根拠 ; 5、50、500及び5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の濃度で本試験と同様の方法で用量設定試験を実施した。その結果、最高用量で菌に対する生育阻害作用が認められたため、1500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を本試験の最高濃度とした。

結果 : 表1及び表2に試験結果を示す。

検体処理群ではS-9Mix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の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では復帰変異コロニー数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

表1. 試験結果(1回目)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (DMSO)	-	-	132	14	26	13	12
検体	0	-	125	12	22	12	8
	15	-	124	11	20	9	8
	50	-	123	10	16	12	6
	150	-	124	11	14	12	9
	500	-	111	8	10	13	8
	1500	-	104	5	*	14	4
溶媒対照 (DMSO)	-	+	121	13	19	13	13
検体	0	+	125	11	21	11	13
	15	+	117	11	20	10	11
	50	+	110	10	19	8	7
	150	+	111	11	15	9	9
	500	+	87	10	7	8	10
	1500	+	93	8	12	6	7
陽性 対照	ENNG	3.0	-	515			
		5.0	-		678		
	9AC	80.0	-			1392	
	NF	1.0	-			73	
		2.0	-				47
	AA	0.5	+			184	126
		1.0	+	377			
2.0		+		147		74	

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AC : 9-アミナクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン

AA : 2-アミノアントラセン

\* : 生育阻害

表2. 試験結果(2回目)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (DMSO)	-	-	117	13	29	16	11
検体	0	-	122	11	34	14	11
	15	-	117	11	26	15	10
	50	-	111	11	30	16	8
	150	-	102	10	24	14	11
	500	-	93	9	12	17	10
	1500	-	*	*	*	*	*
溶媒対照 (DMSO)	-	+	105	12	20	12	13
検体	0	+	125	11	21	12	10
	15	+	96	10	20	10	9
	50	+	107	10	20	11	9
	150	+	95	12	22	12	13
	500	+	89	10	11	9	11
	1500	+	53	7	8	8	5
陽性対照	ENNG	3.0	-	524			
		5.0	-		961		
	9AC	80.0	-			2648	
	NF	1.0	-			94	
		2.0	-				52
	AA	0.5	+			207	189
		1.0	+	808			
2.0		+		123		131	

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AC : 9-アミノアクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン

AA : 2-アミノアントラセン

\* : 生育阻害

④ 原体中混在物Dの細菌を用いた復帰変異試験

(資料No. 49)

試験機関 :

報告書作成年 :

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* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, 1538株) を用い、代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて復帰変異原性を検定した。

検体はアセトンに溶解し、0、50、150、500、1500及び5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の濃度で処理した。試験はプレート法により各濃度につき3枚のプレートを用いて2回実施した。陽性対照には2-アミノアントラセン(AA)、2-ニトロフルオレン(NF)、9-アミノアクリジン(9AC)及びN-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(ENNG)を用いた。

結果については、復帰変異コロニー数が溶媒対照に比べ2倍以上に増加し、かつ用量依存性が認められた場合を陽性と判定した。

用量設定根拠 ; 5、50、500及び5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の濃度で本試験と同様の方法で用量設定試験を実施した。その結果、最高用量で菌に対する生育阻害作用が認められなかったため、5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を本試験における最高濃度とした。5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  では析出が認められた。

結果 : 表1及び表2に試験結果を示す。

検体処理群ではS-9Mix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の増加は認められなかった。最高用量の5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  では析出が認められた。一方、陽性対照群では復帰変異コロニー数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

表1. 試験結果(1回目)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (アセトン)	-	-	125	13	24	15	12	
検体	0	-	107	11	21	13	10	
	50	-	106	8	21	11	9	
	150	-	108	11	21	14	11	
	500	-	118	10	19	14	12	
	1500	-	127	12	26	15	12	
	5000#	-	115	11	26	10	8	
溶媒対照 (アセトン)	-	+	96	12	22	11	11	
検体	0	+	106	12	18	10	11	
	50	+	97	10	20	7	11	
	150	+	111	8	19	7	12	
	500	+	110	9	17	10	12	
	1500	+	119	8	17	9	10	
	5000#	+	96	10	18	9	13	
陽性 対照	ENNG	3.0	-	436				
		5.0	-		666			
	9AC	80.0	-			2177		
	NF	1.0	-			95		
		2.0	-					56
	AA	0.5	+			190		133
		1.0	+	624				
2.0		+		149		113		

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AC : 9-アミナクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン

AA : 2-アミノアントラセン

#: 析出

表2. 試験結果(2回目)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (アセトン)	-	-	100	13	25	18	9	
検体	0	-	107	12	18	13	9	
	50	-	87	12	21	11	9	
	150	-	91	11	21	11	12	
	500	-	79	10	17	12	9	
	1500	-	90	12	26	12	11	
	5000#	-	90	9	21	15	10	
溶媒対照 (アセトン)	-	+	106	15	21	14	12	
検体	0	+	100	12	20	14	10	
	50	+	84	11	17	13	9	
	150	+	94	11	18	11	8	
	500	+	86	10	14	13	11	
	1500	+	94	12	19	9	11	
	5000#	+	75	12	18	10	10	
陽性 対照	ENNG	3.0	-	459				
		5.0	-		704			
	9AC	80.0	-				2331	
	NF	1.0	-			91		
		2.0	-					53
	AA	0.5	+			203		87
		1.0	+	467				
2.0		+		94		98		

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

9AC : 9-アミノアクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン

AA : 2-アミノアントラセン

#: 析出

⑤ 原体中混在物E(代謝物E)を用いた復帰突然変異試験

(資料No. 45)

試験機関 :

報告書作成年 :

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* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538株) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて復帰変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、31.2-500  $\mu$ g/プレート<sup>1</sup>の範囲の5濃度で処理した。試験は各濃度につき3枚のプレートを用いて実施した。また、TA100株のみ同じ濃度で再試験を実施した。

結果については、復帰変異コロニー数が溶媒対照に比べ2倍以上の増加が認められた場合を陽性と判定した。

陽性対照にはシクロホスファミド<sup>2</sup>、ニュートラルレッド<sup>3</sup>、2-アミノフルオレンを用いた。

用量設定根拠; 予備試験において細胞毒性が認められたため、500  $\mu$ g/プレート<sup>1</sup>を最高濃度とした。

結果 : 結果を表1及び表2に示した。

検体処理群ではS-9Mixの存在下で500  $\mu$ g/プレート<sup>1</sup>に、S-9Mix非存在下で250及び500  $\mu$ g/プレート<sup>1</sup>に細胞毒性が認められた。TA100株のS-9Mix非存在下において、125  $\mu$ g/プレート<sup>1</sup>で復帰変異コロニー数の増加 (溶媒対照の2倍未満) が観察されたため、再試験を実施したところ復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。その他の菌株においてはS-9Mixの有無に関わらず復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では全ての試験菌株で復帰変異コロニー数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

表1：試験結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	113	24	42	10	43	
検体	31.2	-	108	16	34	11	38	
	62.5	-	151	22	33	11	40	
	125	-	217	12	32	8	32	
	250	-	35*	7*	11*	3*	12*	
	500	-	nr	nr	nr	nr	nr	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	136	22	32	8	25	
検体	31.2	+	83	22	26	7	24	
	62.5	+	131	21	25	4	23	
	125	+	131	19	21	5	26	
	250	+	127	13	11	4	19	
	500	+	13*	0*	1*	0*	2*	
陽性 対照	CP	250	-	-	48	-	-	-
			+	-	>500	-	-	-
	NR	25	-	-	-	-	16	-
			+	-	-	-	>500	-
	2-AF	50	-	130	-	119	-	107
			+	>1000	-	>2000	-	>2000

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

nr:細胞毒性のため記録せず

CP: Cyclophosphamide

NR: Neutral red

2-AF: 2-Aminofluorene

\*: 生育阻害

表2：再試験結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/ プレート	
			塩基対置換型	
			TA100	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	142	
検体	31.2	-	115	
	62.5	-	107	
	125	-	133	
	250	-	nr	
	500	-	nr	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	136	
検体	31.2	+	127	
	62.5	+	141	
	125	+	143	
	250	+	99	
	500	+	15*	
陽性 対照	2-AF	50	-	154
			+	>1000

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

nr:細胞毒性のため記録せず

2-AF: 2-Aminofluorene

\*: 生育阻害

⑥ 代謝物Bの細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料No. 44)

試験機関 :

報告書作成年 :

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* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538株) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて復帰変異原性を検定した。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、62.5-1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲の5濃度で処理した。各濃度につき3枚のプレートを用いた。

結果については、復帰変異コロニー数が溶媒対照に比べ2倍以上の増加が認められた場合を陽性と判定した。

陽性対照にはシクロホスファミド、ニュートラルレッド、2-アミノフルオレンを用いた。

用量設定根拠 ; 予備試験において細胞毒性が弱かったことから、検体の最高濃度を1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とし、以下500、250、125及び62.5  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の計5濃度を設定した。

結果 : 結果を表1に示した。

検体処理群では最高濃度の1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で析出が認められたが、S-9Mix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の増加は認められなかった。また、TA100株では1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で生育阻害が見られた。

一方、陽性対照群では全ての試験菌株で復帰変異コロニー数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

表1：試験結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	128	20	37	10	20	
検体	62.5	-	124	19	36	13	23	
	125	-	112	21	29	9	25	
	250	-	119	18	37	9	24	
	500	-	119	23	38	10	28	
	1000#	-	40*	14	44	8	23	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	144	24	30	11	19	
検体	62.5	+	119	23	33	7	21	
	125	+	117	24	28	6	22	
	250	+	115	17	30	10	21	
	500	+	122	20	27	8	23	
	1000#	+	69*	16	42	13	20	
陽性 対照	CP	250	-	-	38	-	-	-
		+	-	>500	-	-	-	
	NR	25	-	-	-	-	17	-
		+	-	-	-	-	>500	-
	2-AF	50	-	163	-	193	-	157
		+	>2000	-	>2000	-	>2000	

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

CP : Cyclophosphamide

NR : Neutral red

2-AF : 2-Aminofluorene

# : 析出 \* : 生育阻害

⑦ 代謝物Cの細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料No. 44)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 :

試験方法 : ヒストジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538株) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて復帰変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、15.6-250  $\mu$ g/プレート の範囲の5濃度で処理した。各濃度につき3枚のプレートを用いた。

結果については、復帰変異コロニー数が溶媒対照に比べ2倍以上の増加が認められた場合を陽性と判定した。

陽性対照にはシクロホスファミド、ニュートラルレッド、2-アミノフルオレンを用いた。

用量設定根拠 ; 予備試験において生育阻害が認められたため、15.6、31.2、62.5、125及び250  $\mu$ g/プレートを設定した。

結果 : 結果を表1に示した。

検体処理群ではS-9Mix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の増加は認められなかった。また、250  $\mu$ g/プレートで生育阻害が認められた。

一方、陽性対照群では全ての試験菌株で復帰変異コロニー数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

表1：試験結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	159	18	37	12	28	
検体	15.6	-	129	21	36	12	30	
	31.2	-	139	16	37	13	25	
	62.5	-	137	23	32	15	31	
	125	-	143	16	34	12	23	
	250	-	55*	14*	41*	6*	24*	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	128	23	35	12	18	
検体	15.6	+	105	28	29	8	27	
	31.2	+	121	23	28	9	19	
	62.5	+	115	28	29	14	19	
	125	+	99	30	29	13	21	
	250	+	80*	20*	29*	10*	16*	
陽性 対照	CP	250	-	-	54	-	-	-
			+	-	>500	-	-	-
	NR	25	-	-	-	-	17	-
			+	-	-	-	324	-
	2-AF	50	-	210	-	309	-	250
			+	>1000	-	>2000	-	>2000

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

CP: Cyclophosphamide

NR: Neutral red

2-AF: 2-Aminofluorene

\*: 生育阻害

⑧ 代謝物Kを用いた復帰突然変異試験

(資料No. 45)

試験機関 :

報告書作成年 :

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* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538株) を用い、ラットの肝臓から調製した代謝活性化系 (S-9Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて復帰変異原性を検定した。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、62.5-1000  $\mu$ g/プレート の範囲の5濃度で処理した。各濃度につき3枚のプレートをを用いた。  
結果については、復帰変異コロニー数が溶媒対照に比べ2倍以上の増加が認められた場合を陽性と判定した。

陽性対照にはシクロホスファミド、ニュートラルレッド、2-アミノフルオレンを用いた。

用量設定根拠 ; 最高濃度を1000  $\mu$ g/プレートとし、以下公比2で計5濃度を設定した。

結果 : 結果を表1に示した。

検体処理群ではS-9Mix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の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では全ての試験菌株で復帰変異コロニー数の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において本剤は、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

表1：試験結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S-9 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	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	175	23	20	10	31	
検体	62.5	-	140	23	19	13	46	
	125	-	167	19	20	6	37	
	250	-	154	21	17	7	34	
	500	-	140	18	22	9	39	
	1000	-	144	30	22	13	31	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	131	25	26	7	24	
検体	62.5	+	142	25	32	13	26	
	125	+	154	21	33	11	26	
	250	+	136	19	29	8	21	
	500	+	134	19	35	9	24	
	1000	+	117	25	29	10	27	
陽性 対照	CP	250	-	-	48	-	-	-
		+	-	361	-	-	-	
	NR	25	-	-	-	-	12	-
		+	-	-	-	-	>500	-
	2-AF	50	-	147	-	104	-	72
		+	>1000	-	>2000	-	>2000	

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

CP : Cyclophosphamide

NR : Neutral red

2-AF : 2-Aminofluorene

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

### 3. 製剤

#### (1) 急性毒性

##### ① ラットにおける急性経口毒性試験

(資料No. 5)

試験機関 :  
報告書作成年 :

検体純度 : 25%乳剤

[組成] フロコラス 28.0 %  
有機溶剤、界面活性剤 等 72.0 %

供試動物 : Wistarラット、5週齢、体重雄130-160g 雌120-140g、1群雌雄各10匹

観察期間 : 14日間観察 (投与日を0日として起算)

投与方法 : 検体を蒸留水に懸濁させ、50%(w/v)溶液とし、所定投与量に相当する容量を単回強制経口投与\*した。

\*申請者注：報告書に投与前の給餌制限等の記載無し。

観察・検査項目：生死及び一般状態を投与後15分、30分、1、3及び6時間、その後14日間毎日観察した。体重は投与直後、投与後1、2、3、4、5、6、7及び14日に測定した。死亡時もしくは観察期間終了時に全動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与経路	経口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	0、1736、2083、2500、 3000、3600、4320	0、1736、2083、2500、 3000、3600、4320
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	2960 (2619 ~ 3345)	2350 (2061 ~ 2679)
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	投与後1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15分から開始 投与後4日に消失	投与後15分から開始 投与後4日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2083	1736

死亡；死亡動物は投与後1日～4日に観察され、腹臥位姿勢で静止したまま、音及び光刺激反応が鈍麻し死に至った。

一般状態；自発運動の低下、蹲り姿勢及び腹臥位姿勢が認められた。

体重；投与群の雌雄で投与後1～3日で体重増加抑制或いは体重減少が認められた。

肉眼的病理検査；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エフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

② マウスにおける急性経口毒性試験

(資料No. 4)

試験機関 :  
報告書作成年 :

検体純度 : 25%乳剤  
 [組成] プロクロラズ 25.0 %  
 有機溶剤、界面活性剤 等 75.0 %  
 供試動物 : ICRマウス、入手時7-8週齢、開始時体重雄28-35g 雌26-31g、1群雌雄各5匹  
 観察期間 : 14日間観察 (投与日を1日として起算)  
 投与方法 : 検体を雄は0、800、1131、1600及び2261mg/kg、雌は0、1131、1600及び2261mg/kg  
 の用量で原液のまま単回強制経口投与\*した。0 mg/kgは挿管のみ行った。

\*申請者注：報告書に投与前の給餌制限等の記載無し。

観察・検査項目：生死及び一般状態を投与当日は頻繁に、その後は毎日投与14日まで観察した。体重は投与直前、投与後8及び15日に測定した。死亡時もしくは観察期間終了時に全動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与経路	経口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	0、800、1131、1600、 2261	0、1131、1600、2261
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	2036 (1636 ~ 2534)	1668 (1191 ~ 2333)
死亡開始時間及び終了時間	投与後1日から開始 投与後2日に終了	投与後4.5時間から開始 投与後2日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後2時間から開始 投与後3日に終了	投与後2時間から開始 投与後3日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	800	-
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1131	-

死亡；投与後4.5時間から2日の間に、1131mg/kg群雌1匹、1600mg/kg群雄1匹、雌3匹、2261mg/kg群雄3匹、雌3匹が死亡した。

一般状態；活動性の低下、筋肉の緊張力の低下、体温低下が認められた。

体重；異常は認められなかった。

肉眼的病理検査；死亡動物並びに生存動物に、肺の暗色斑、うっ血肺、膀胱の拡張などが認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

③ ラットにおける急性経皮毒性試験

(資料No. 6)

試験機関 :  
報告書作成年 :

検体純度 : 25%乳剤

[組成] プロクロラズ 25.0 %  
有機溶剤、界面活性剤 等 75.0 %

供試動物 : SD(Cr1:CD)ラット、雄9週齢 雌10週齢、体重；雄275-310g 雌205-235g、  
1群雌雄各5匹

観察期間 : 14日間観察（投与日を1日として起算）

投与方法 : ラットの背部6×10cmを処理前日に刈毛した。処理は処理部を7μm箔で被い、耐水性の  
包帯で保持し、検体をそのまま処理部に注入した。投与量は4915mg/kgで容量は  
5ml/kgとした。処理後24時間に被覆物を取り除き、残余検体を洗浄し乾燥させた。

観察・検査項目 : 生死及び一般状態を処理日は頻繁に、翌日以降は業務日は1日2回、その他は1日1  
回以上、14日間観察した。体重は投与直後、投与後8及び15日に測定した。観察期  
間終了時に全動物について肉眼的病理検査を実施した。

結果 :

投与経路	経皮	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	0、4915	0、4915
LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	> 4915	> 4915
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	処理後2日から開始 処理後3日に消失	処理後2日から開始 処理後6日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	4915	4915

死亡；死亡は認められなかった。

一般状態；接触による過剰反応、尿失禁/尿による汚れ及び顔面の汚れが認められ  
た。

刺激性変化；痂皮形成が処理群雌1匹に試験終了時まで、その他全処理群に処理後5  
日から9日半まで認められた。

体重；処理後7日雄で軽微な体重増加抑制が認められたが、14日間での変化は認め  
られなかった。

肉眼的病理検査；異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

① ウキギ<sup>®</sup>を用いた皮膚刺激性試験

(資料No. 14)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 : 25%乳剤

[組成] プロクロラズ 25.0 %  
有機溶剤、界面活性剤 等 75.0 %

供試動物 : NZWウキギ<sup>®</sup>、11-13週齢、体重2.7-3.0kg、1群雌3匹

観察期間 : 10日間観察 (暴露日を1日として起算)

投与方法 : 動物の腰背部皮膚を処理24時間前に刈毛し、検体投与部位には検体0.5mlを2.5×2.5cmのガーゼパッド<sup>®</sup>を用いて貼付した。暴露時間は4時間とし、貼付部位を水で洗浄し、残余検体を除去した。

観察項目 : 暴露終了後30分、48、72及び96時間、その後更に5日から10日まで観察し、適用部位の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無を観察し、Draize法に従って採点した。

結果 : 観察した刺激性変化の採点を下表に示す。

動物 番号	項目	最高 評点	暴露後時間(日)									
			1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1616	紅斑・痂皮	4	1	1	1	2	2	2	2	1	1	0
	浮腫	4	1	1	1	1	2	1	1	1	0	0
1617	紅斑・痂皮	4	1	1	1	2	2	2	2	1	1	0
	浮腫	4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1618	紅斑・痂皮	4	2	2	2	2	2	2	2	1	1	0
	浮腫	4	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0
平均	紅斑・痂皮	4	1.3	1.3	1.3	2	2	2	2	1	1	0
	浮腫	4	1	1	1	1	1.7	1	1	1	0.3	0

\*暴露後30分に観察

極めて軽度～軽度の浮腫を伴う紅斑が認められたが、10日までに全ての動物で完全に消失した。

以上の結果から、本剤はウキギ<sup>®</sup>皮膚に対して刺激性を有すると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

② ウキ<sup>®</sup>を用いた皮膚刺激性試験(40倍希釈液)

(資料No. 15)

試験機関 :

報告書作成年 :

- 検体純度 : 25%乳剤  
[組成] ブロコロ<sup>®</sup> 27.1 %  
有機溶剤、界面活性剤 等 72.9 %
- 供試動物 : NZウキ<sup>®</sup>、8週齢、体重1.72-1.96kg、1群雄6匹
- 観察期間 : 14日間観察(暴露日を1日として起算)
- 投与方法 : 処理前日に各動物の背部を刈毛し、注射針を用いて切傷した擦過皮膚2ヵ所、非擦過皮膚2ヵ所を設定し、蒸留水を用いて40倍に希釈した被験液0.5mlを2.5×2.5cmのリト布に均一に塗布し貼付した。対照部位にはリト布のみを貼付した。暴露時間は4時間とし、残余検体は微温水で清拭した。
- 観察項目 : 暴露終了後30分、24、48及び72時間、7日及び14日に適用部位の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)の有無を観察し、Draize法に従って採点した。  
一般状態は皮膚反応の観察と同時に実施し、体重は暴露日及び観察終了日に測定した。
- 結果 : 観察した刺激性変化の採点を次表に示す。

紅斑が投与後72時間までほぼ全ての動物で認められたが、7日にはほとんどの動物で回復し、14日には全て消失した。浮腫については投与後30分から一部の動物に認められ、投与後24時間には全例に認められたがその後消失し、7日にはすべて消失した。これらの刺激反応の程度はすべて非常に軽度ないし軽度であった。  
皮膚一次刺激指数は2.09となり中等度の刺激と分類された。

以上の結果から、25%乳剤40倍希釈液はウキ<sup>®</sup>皮膚に対して中等度の刺激性を有すると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

動物 番号	項目	最高 評点	暴露後時間						
			0.5h	24h	48h	72h	7日	14日	
非 擦 過	R13766	紅斑・痂皮	4	1	2	2	2	0	0
		浮腫	4	0	1	0	0	0	0
	R13767	紅斑・痂皮	4	1	1	2	2	1	0
		浮腫	4	1	1	0	0	0	0
	R13768	紅斑・痂皮	4	0	1	1	1	0	0
		浮腫	4	0	1	0	0	0	0
	R13769	紅斑・痂皮	4	1	2	2	2	0	0
		浮腫	4	0	1	1	1	0	0
	R13770	紅斑・痂皮	4	1	1	1	1	0	0
		浮腫	4	0	1	0	0	0	0
	R13771	紅斑・痂皮	4	1	1	1	1	0	0
		浮腫	4	0	1	0	0	0	0
	平均*	紅斑・痂皮	4	0.83	1.33	1.50	1.50	0.17	0
		浮腫	4	0.17	1.00	0.17	0.17	0	0
平均刺激性評点の合計*			4.00						
擦 過	R13766	紅斑・痂皮	4	2	2	2	2	0	0
		浮腫	4	1	2	0	0	0	0
	R13767	紅斑・痂皮	4	1	1	2	2	1	0
		浮腫	4	1	1	1	1	0	0
	R13768	紅斑・痂皮	4	1	1	1	1	0	0
		浮腫	4	0	1	0	0	0	0
	R13769	紅斑・痂皮	4	2	2	2	2	0	0
		浮腫	4	0	1	0	0	0	0
	R13770	紅斑・痂皮	4	1	1	1	1	0	0
		浮腫	4	1	1	1	0	0	0
	R13771	紅斑・痂皮	4	1	2	1	1	0	0
		浮腫	4	1	1	1	0	0	0
	平均*	紅斑・痂皮	4	1.33	1.50	1.50	1.50	0.17	0
		浮腫	4	0.67	1.17	0.50	0.17	0	0
平均刺激性評点の合計*			4.34						
皮膚一次刺激性指数(P. I. I.)			2.09*						

※一部申請者が算出した。

\*24及び72時間の合計

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

③ ウキギ<sup>®</sup>を用いた皮膚刺激性試験(100倍希釈液)

(資料No. 16)

試験機関 :

報告書作成年 :

- 検体純度 : 25%乳剤  
[組成] プロクロラズ 25.0 %  
有機溶剤、界面活性剤 等 75.0 %
- 供試動物 : NZWウキギ<sup>®</sup>、1群雌雄各4匹
- 観察期間 : 7日間観察(最初の暴露日を0日として起算)
- 投与方法 : 各動物の腰背部10×10cmの皮膚を刈毛し、25%乳剤及び有効成分を含有しないブランク製剤を水を用いて100倍に希釈した希釈液を被験液として各1mlを4cm<sup>2</sup>のガーゼパッチを用いてそれぞれ皮膚に塗布し貼付し、伸縮性粘着包帯で覆い固定した。1日当り6時間、3日間連続して行った。
- 観察項目 : 暴露終了後30分、24時間、以降は最初の塗布から7日目まで1日1回、適用部位の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)の有無を観察した。
- 結果 : 観察した刺激性変化の採点を次表に示す。

有効成分の有無による変化は無く、100倍希釈液ではともにより一部の動物に極めて軽度な刺激性が認められたが、継続性はなく一過性のものであった。

以上の結果から、本剤の100倍希釈液はウキギ<sup>®</sup>皮膚に対して一過性のごく軽度の刺激性を有すると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

動物 番号	項目	最高 評点	暴露後時間									
			1回目		2回目		3回目		5日	6日	7日	
			0.5h	1d	0.5h	1d	0.5h	1d				
ブ ラ ン ク 100 倍 希 釈	1M	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2M	紅斑・痂皮	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	3M	紅斑・痂皮	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4M	紅斑・痂皮	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5F	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6F	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7F	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8F	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	平均	紅斑・痂皮	4	0.25	0.25	0.13	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0.13	0	0	0	0	0	0
25 % 乳 剤 100 倍 希 釈	1M	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2M	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3M	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4M	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5F	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6F	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7F	紅斑・痂皮	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8F	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	平均	紅斑・痂皮	4	0	0	0.13	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

④ ウチギ<sup>®</sup>を用いた眼刺激性試験

(資料No. 11)

試験機関 :

報告書作成年 :

- 検体純度 : 25%乳剤  
〔組成〕 プロクロラズ 25.0 %  
有機溶剤、界面活性剤 等 75.0 %
- 供試動物 : NZWウチギ<sup>®</sup>、9-13週齢、体重2.0-2.8kg、非洗眼群雌6匹
- 観察期間 : 4日間観察 (適用日を0日として起算)
- 投与方法 : 検体0.1mlを直接片方の下眼瞼結膜囊内に投与し、約1秒間眼瞼を閉じ合わせた。反対の眼は無処理対照眼とした。
- 観察項目 : 適用後1時間、及び1、2、3及び4日までの毎日、角膜、虹彩及び結膜の刺激性変化を観察し、Draize法に従って採点した。刺激性の評価は、Kay and Calandraの方法EPAガイドライン (EPA in the Pesticide Assessment Guidelines. Subdivision F 81-4, (November 1982)を参考に行った。  
一般状態についても毎日観察した。
- 結果 : 観察した刺激性変化の採点を次ページの表に示す。  
全動物で重度(評点3)の角膜混濁、軽度(評点1)の虹彩炎及び結膜のびまん性の鮮紅色及び暗赤色の発赤が認められ、眼瞼の一部反転又は半閉鎖を伴う腫脹が併発し、分泌物も確認された。これらの反応が重度であったため、適用後4日で動物を屠殺した。

以上の結果から、本剤はウチギ<sup>®</sup>の眼粘膜に対して重度の刺激性を有すると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

群	項目	最高 評点	適用後時間					
			1時間	1日	2日	3日	4日	
1215F	角膜混濁	4	0	1	2	2	3	
	虹彩	2	0	0	1	1	1	
	結膜	発赤	3	2	2	2	2	2
		浮腫	4	2	2	2	2	3
		分泌物*	3	2	2	2	2	3
1216F	角膜混濁	4	0	0*	2	2	3	
	虹彩	2	0	0	0	1	1	
	結膜	発赤	3	1	2	2	2	3
		浮腫	4	2	1	2	2	3
		分泌物*	3	2	2	1	2	3
1217F	角膜混濁	4	0	1	2	3	3	
	虹彩	2	0	0	0	1	1	
	結膜	発赤	3	2	1	2	2	2
		浮腫	4	2	1	1	1	2
		分泌物*	3	2	1	2	2	1
1218F	角膜混濁	4	0	1	3	3	3	
	虹彩	2	0	1	1	1	1	
	結膜	発赤	3	2	3	3	2	3
		浮腫	4	2	3	3	3	3
		分泌物*	3	1	3	3	2	3
1219F	角膜混濁	4	0	1	1	3	3	
	虹彩	2	0	1	1	1	1	
	結膜	発赤	3	2	2	2	2	2
		浮腫	4	2	1	2	2	2
		分泌物*	3	2	2	1	2	2
1220F	角膜混濁	4	0	1	2	2	3	
	虹彩	2	0	1	1	1	1	
	結膜	発赤	3	1	2	2	2	2
		浮腫	4	2	2	2	3	2
		分泌物*	3	2	2	2	2	2
平均#	角膜混濁	4	0	0.8	2.0	2.5	3.0	
	虹彩	2	0	0.5	0.7	1.0	1.0	
	結膜	発赤	3	1.7	2.0	2.2	2.0	2.3
		浮腫	4	2.0	1.7	2.0	2.2	2.5
		分泌物*	3	1.8	2.0	1.8	2.0	2.3

\*: 農水省ガイドラインには記載なし

#: 申請者が算出した。

※: 角膜の濁りあり

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

⑤ ウキギ<sup>®</sup>を用いた眼刺激性試験(40倍希釈液)

(資料No. 12)

試験機関 :

報告書作成年 :

- 検体純度 : 25%乳剤  
〔組成〕 プロクロラズ 25.0 %  
有機溶剤、界面活性剤 等 75.0 %
- 供試動物 : NZウキギ<sup>®</sup>、8週齢、体重1.74-1.90kg、非洗眼群雄6匹、洗眼群雄3匹
- 観察期間 : 72時間観察
- 投与方法 : 蒸留水を用いて40倍に希釈した被験液0.1mlを右眼の下眼瞼結膜囊内に投与し、約1秒間眼瞼を閉じ合わせた。反対の眼は無処理対照眼とした。洗眼群については3分後微温湯で約1分間洗眼した。また、左眼は無処理対照眼とした
- 観察項目 : 適用後1、24、48及び72時間までの毎日、角膜、虹彩及び結膜の刺激性変化を観察し、Draize法に従って採点した。  
一般状態についても眼の反応観察と同時に実施した。
- 結果 : 観察した刺激性変化の採点を次表に示す。  
非洗眼群では適用後1時間に結膜の発赤及び浮腫が全例に認められたが72時間までに全て消失した。  
洗眼群では適用後1時間に結膜の発赤及び浮腫が全例に認められたが24時間までに全て消失し、洗眼による軽減効果が認められた。  
一般状態としては適用時の発声及び前肢でぬぐう動作が認められた。

以上の結果から、本剤の40倍希釈液はウキギ<sup>®</sup>の眼粘膜に対して軽度の刺激性を有すると判断された。また、洗眼によりその刺激性は軽減するものと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

群	項目	最高 評点	適用後時間					
			1h	24h	48h	72h		
非洗眼群	R13775	角膜混濁	4	0	0	0	0	
		虹彩	2	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
	R13776	角膜混濁	4	0	0	0	0	
		虹彩	2	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
	R13777	角膜混濁	4	0	0	0	0	
		虹彩	2	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	2	0	0	0
	R13778	角膜混濁	4	0	0	0	0	
		虹彩	2	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	1	1	1	0
			浮腫	4	2	0	0	0
	R13779	角膜混濁	4	0	0	0	0	
		虹彩	2	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
R13780	角膜混濁	4	0	0	0	0		
	虹彩	2	0	0	0	0		
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	
		浮腫	4	1	0	0	0	
平均#	角膜混濁	4	0	0	0	0		
	虹彩	2	0	0	0	0		
	結膜	発赤	3	1.0	0.2	0.2	0	
		浮腫	4	1.3	0	0	0	
洗眼群# (3匹平均)	角膜混濁	4	0	0	0	0		
	虹彩	2	0	0	0	0		
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	
		浮腫	4	1	0	0	0	

#: 申請者が算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

⑥ ウキ<sup>®</sup>を用いた眼刺激性試験(100倍希釈液)

(資料No. 13)

試験機関 :

報告書作成年 :

- 検体純度 : 25%乳剤  
〔組成〕 プロクロラス<sup>®</sup> 25.0 %  
有機溶剤、界面活性剤 等 75.0 %
- 供試動物 : NZWウキ<sup>®</sup>、1群8匹、
- 観察期間 : 72時間観察
- 投与方法 : 25%乳剤及び有効成分を含有しないブランク製剤を、水を用いて100倍に希釈して被験液とし、0.1mlを右眼の下眼瞼結膜嚢内に投与して数秒間眼瞼を閉じ合わせた。反対の眼は無処理対照眼とした。5匹は処理後5分、3匹は処理後24時間に約200mlの精製水で洗眼した。
- 観察項目 : 適用後1時間、1、2、3、4及び7日に、角膜、虹彩及び結膜の刺激性変化を観察し、The Code of Federal Regulations of the U.S.A. Title 16, Section 1500.42に従って採点した。
- 結果 : 観察した刺激性変化の採点を表1及び表2に示す。  
25%乳剤100倍希釈液の5分後洗眼群では適用後1時間では全動物の結膜に軽度の炎症が観察された。その後4匹は4日までに消失したが、1匹は7日まで継続した。24時間後洗眼群においても適用後1時間で結膜に軽度の炎症が観察されたが3日までには全て消失した。  
ブランク製剤100倍希釈液においても5分後洗眼群の適用後1時間では全動物に結膜に軽度の炎症が観察されたが、7日には全て消失した。24時間後洗眼群の適用後1時間では全動物に同様の所見が観察され、2日には全て消失した。

以上の結果から、25%製剤及びブランク製剤の100倍希釈液は共にウキ<sup>®</sup>の眼粘膜に対して軽度の刺激性を有すると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表1 25%乳剤 (100倍希釈)

群	項目		最高 評点	適用後時間						
				1h	1日	2日	3日	4日	7日	
5 分 後 洗 眼	9	角膜	混濁	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	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0	0	0
	10	角膜	混濁	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	0	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0	0	0
	11	角膜	混濁	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	0	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0	0	0
	12	角膜	混濁	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	1
			浮腫	4	0	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0	0	0
13	角膜	混濁	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	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	
		分泌物*	3	0	0	0	0	0	0	
平均# (5匹)	角膜	混濁	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	0.6	0.4	0.4	0.2	0.2	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	
		分泌物*	3	0	0	0	0	0	0	
24 時 間 後 洗 眼	角膜	混濁	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	0.67	0.33	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	
		分泌物*	3	0	0	0	0	0	0	

\*: 農水省ガイドラインには記載なし

#: 申請者が算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

表2 ブランク製剤 (100倍希釈)

群	項目		最高 評点	適用後時間						
				1h	1日	2日	3日	4日	7日	
ブ ラ ン ク 製 剤	1	角膜	混濁	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	0	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0	0	0
	2	角膜	混濁	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	0	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0	0	0
	3	角膜	混濁	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	0	0	0	0	0
			分泌物*	3	0	0	0	0	0	0
	4	角膜	混濁	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	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	
		分泌物*	3	0	0	0	0	0	0	
5	角膜	混濁	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	0	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	
		分泌物*	3	0	0	0	0	0	0	
平均# (5匹)	角膜	混濁	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	0.4	0.2	0.2	0.2	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	
		分泌物*	3	0	0	0	0	0	0	
24 時 間 後 洗 眼	角膜	混濁	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	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	
		分泌物*	3	0	0	0	0	0	0	

\*: 農水省がドラインには記載なし

#: 申請者が算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

(3) 皮膚感作性

① モルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料No. 17)

試験機関 :

報告書作成年 :

検体純度 : 25%乳剤  
 [組成] プロクロラズ 25.0 %  
 有機溶剤、界面活性剤 等 75.0 %

供試動物 : ハートレーモルモット、体重360-445g、1群雌20匹

観察期間 : 感作開始から惹起終了後72時間観察まで (26日間)

試験操作 : [Maximisation 法]

処理方法を次表に示す。

群	匹数	処理		
		感作		惹起
		皮内投与	経皮投与	経皮投与
検体投与群	20	①FCA*と水の等量混合液 ②検体0.1%水溶液 ③FCAと水の等量混合液希釈による検体0.1%溶液	検体20%水溶液	(1) 検体1%水溶液 (2) 検体5%水溶液
陰性対照群	20	①FCA*と水の等量混合液 ②水 ③FCAと水の等量混合液	水	(1) 検体1%水溶液 (2) 検体5%水溶液

\* FCA : フォイト完全アジエパント

感作皮内投与 ; 肩甲骨部を4×6 cmの広さに刈毛し、皮内投与液①から③各0.1mlをそれぞれ皮内注射した。

感作経皮投与 : 感作皮内投与後7日に、同部位を刈毛し、感作経皮投与液を飽和させた2×4 cmのパッチを48時間閉塞貼付した。

惹起投与 ; 感作後2週間に、左側腹部を刈毛し、惹起投与液約0.2mlを塗布したパッチ (2×2cm) を24時間閉塞貼付した。

投与量設定根拠 ; 以下の予備検討結果をもとに決定した。

検体を水に懸濁させて0.05、0.1、0.25 % v/v希釈液を調製し、2匹のモルモットに皮内注射したところ、0.25%希釈液では壊死が認められた。また検体を蒸留水に懸濁させて1、10、20、50 % v/v希釈液を調製し、4匹のモルモットに局所施用したところ、20 %以上の濃度で軽度から中等度の紅斑及び浮腫が認められた。従って、感作濃度を皮内注射は0.1 % v/v、局所施用は20 % v/v、惹起濃度は1及び5 % v/vとした。

観察項目 : 惹起貼付除去後24、48及び72時間に適用部位の紅斑及び浮腫の有無などを肉眼的に観察し、採点した。一般状態は毎日観察し、体重は試験開始時及び終了時に測定した。

採点及び評価方法 ; 各観察時に下記の基準に従い採点した。これらが陰性対照群に比較して高値を示し継続性が認められた場合を感作性ありと判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はエフエムシー・ケミカルズ株式会社にある。

皮膚反応の評価表

紅斑及び痂皮の形成

	評価
紅斑を認めず	0
軽度な紅斑	1
はっきりと識別しうる紅斑	2
中等度の紅斑	3
著しい紅斑から軽度な痂皮形成	4

浮腫の形成

	評価
浮腫を認めず	0
軽度な浮腫	1
はっきりと認知される浮腫	2
中等度の浮腫	3
著しい浮腫	4

結果 : 各観察時における結果を次表に示す。

群	処理				匹数	感作反応動物数															陽性動物数	感作率 (%)						
	感作		惹起			皮膚反応評点																						
	皮内投与	経皮投与	経皮投与			24時間後					48時間後					72時間後												
						0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4								
検体投与群	検体0.1%	検体20% 水溶液	検体1% 水溶液	紅斑	20	9	6	5	0	0	12	6	2	0	0	13	4	3	0	0	3	25	10	15				
				浮腫		18	1	1	0	0	18	0	2	0	0	18	0	2	0	0								
			検体5% 水溶液	紅斑		0	5	15	0	0	6	4	10	0	0	9	1	10	0	0					10	75	50	50
				浮腫		15	3	2	0	0	15	3	2	0	0	15	3	2	0	0								
陰性対照群	溶媒	水	検体1% 水溶液	紅斑	20	14	6	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	-	-	-	-				
				浮腫		20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0								
			検体5% 水溶液	紅斑		5	15	0	0	0	13	7	0	0	0	14	6	0	0	0								
				浮腫		20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0								

\* FCA : フォイト完全アジュバント

検体投与群では、陰性対照群よりも明らかに強い反応が認められ、皮膚感作性陽性と判断された。

なお、本試験では陽性対照群を設定しなかったが、別試験として陽性対照物質（ホルマリン）を用いた試験を実施した（1987年6月30日-7月25日）ところ、10匹中8匹に明らかな陽性が認められ、試験系の感受性に問題がないことを確認している。

以上の結果から、本剤の皮膚感作性は陽性であり、中等度の感作性を有すると判断された。