

③ CHL細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料No. 42)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1988 年

検体純度 : %

試験方法 : 雌のチャイニーズハムスターの継代培養肺線維芽細胞株 (CHL 細胞) を用いた。検体を溶解させるための溶媒として DMSO を用いた。試験濃度は非活性化法 24 時間処理では 1.1、3.4、10.4、32.3 及び 100 μ g/ml、48 時間処理では 0.1、0.3、1.0、3.2 及び 10 μ g/ml、さらに活性化法は 3.1、6.3、12.5、25、50 μ g/ml とした。各処理について 2 枚のシャーレを用いた。

観察は各濃度で 100 個 (シャーレあたり 50 個) の分裂中期像を観察し、染色体構造異常をギャップ (染色分体型及び染色体型 ; g)、染色分体型切断 (ctb)、染色分体型交換 (cte)、染色体型切断 (csb)、染色体型交換 (二動原体、環状染色体 ; cse) 及びその他 (断片化など) に分類し記録した。異常細胞の出現率はギャップを含む場合 (TAG) 及び含まない場合 (TA) について算出した。数的異常は出現した倍数体数を記録した。また、細胞の分裂頻度を記録し、相対分裂指数 (RMI : 試験群の分裂頻度 / 溶媒対照群の分裂頻度 \times 100) も算出した。

異常細胞または倍数体の出現頻度は 5%未満を陰性 (-)、5%以上 10%未満を疑陽性 (\pm)、10%以上 20%未満を陽性 (+)、20%以上 50%未満を陽性 (++)、50%以上を陽性 (+++) と判定した。

陽性対照として、マイトマイシン-C を用いた。

用量設定根拠 ;

結果 : 結果を次表に示した。

染色体分析 ; いずれの処理群においても染色体異常細胞頻度の有意な増加は認められなかった。

倍数体頻度 ; 非活性化及び活性化法いずれにおいても倍数体の出現頻度の有意な増加は認められなかった。

分裂頻度；非代謝活性化法での24時間処理群のRMIは87.9-18.8%で、最高処理濃度(100 μ g/ml)のRMIは18.8%であった。また48時間処理群では37.2-23.1%で、0.3 μ g/ml処理群を除きほぼ同程度の分裂抑制が認められた。

活性化法でのS-9Mix存在下におけるRMIは113.2-9.1%で、最高濃度処理群(50 μ g/ml)は9.1%であった。S-9Mix非存在下のRMIは45.2-38.1%でありいずれの処理群でも同程度の分裂抑制が認められた。

以上の結果より、活性化法及び非活性化のいずれの場合も、ほとんどの検体処理群で分裂の抑制が認められ、最高濃度処理群では、62%以上抑制されたが、いずれの検体処理群でも染色体異常細胞頻度及び倍数体頻度の有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では染色体異常細胞頻度の明らかな増加が認められた。

従って、代謝活性化法を含むチャイニーズハムスターの肺由来細胞(CHL細胞)を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験条件下で、本剤の染色体異常誘起性は陰性と判断された。

表 試験結果

薬物	濃度 μg/ml	処理時間	S-9 mix の有無	異常を有する細胞数 ^{a)}						異常細胞率 (%)		判定	b) 倍数体 出現率 (%)	判定	c) 分裂 頻度 (%)	相対 分裂 指数	
				g	ctb	cte	csb	cse	その他	TA	TAG						
無処理	-	24	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	7.4	105.0	
溶媒対照	-			0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	7.0	100
検体	1.1			0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	4.7	66.4
	3.4			0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0.5	-	6.2	87.9
	10.4			0	0	1	0	0	0	1	1	-	0.5	-	5.9	83.9	
	32.3			0	0	0	1	0	0	1	1	-	0.5	-	5.6	80	
	100			0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	1.3	18.8	
陽性対照	0.05			3	12	18	1	0	2	29	31	++	0	-	5.1	72.1	
無処理	-	48	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-	0.5	-	7.2	98.5	
溶媒対照	-			1	0	0	0	0	0	0	1	-	0.5	-	7.4	100	
検体	0.1			0	0	0	0	0	0	0	0	-	1	-	1.8	24.6	
	0.3			0	0	0	0	0	0	0	0	-	0.5	-	2.7	37.2	
	1.0			0	0	0	0	0	0	0	0	-	1	-	1.7	23.1	
	3.2			0	0	0	0	0	1	1	1	-	1	-	1.8	25.1	
	10			1	0	1	0	0	0	1	2	-	0.5	-	2.0	27.2	
陽性対照	0.05			5	26	36	6	4	3	56	57	+++	0.5	-	5.2	71.2	
無処理	-	6 -18	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	0	-	9.3	89.4	
溶媒対照	-			0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	10.4	100	
検体	3.1			0	0	0	0	0	0	0	0	-	0.5	-	4.4	42.4	
	6.3			1	1	1	0	0	0	2	3	-	0	-	4.7	45.2	
	12.5			0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	4.0	38.3	
	25.0			0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	4.3	41.6	
	50			0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	4.0	38.1	
陽性対照	500			2	2	0	0	0	0	2	4	-	0	-	9.8	94.6	
無処理	-	6 -18	+	0	1	0	0	0	0	1	1	-	0	-	11.6	117.4	
溶媒対照	-			1	1	0	0	0	1	2	3	-	0	-	9.8	100	
検体	3.1			0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	9.0	91.5	
	6.3			0	1	0	0	0	0	1	1	-	0	-	10.1	102.7	
	12.5			2	0	0	0	0	0	0	2	-	0.8	-	11.1	113.2	
	25.0			0	0	1	0	0	0	1	1	-	0.5	-	7.7	78.3	
	50			1	3	0	0	0	0	3	3	-	0	-	0.9	9.1	
陽性対照	500			0	16	29	0	0	0	35	35	++	0	-	7.8	79.3	

溶媒対照：ジメチルスルホキシド

陽性対照：マイトマイシン-C

a) : シェル当たり 50 個の分裂中期像の観察を 2 シェル行った結果の総数

b) : シェル当たり 100 個の分裂中期像の観察を 2 シェル行った結果の平均値

c) : シェル当たり 1000 個の細胞の観察を 2 シェル行った結果の平均値

④ マスを用いた小核試験

(資料No. 43)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1988 年

検体純度 : %
供試動物 : ICR(Crj:CD-1)系マス、7週齢、1群雌雄各6匹 (最高投与量群は8匹)
体重 雄 30.2-36.9 g、雌 24.4-29.6 g
試験方法 : 骨髓中の小核を有する多染性赤血球数の出現頻度を指標として、小核誘発性を調べた。検体を1%CMC水溶液に懸濁し0、30、65及び140mg/kgの用量を単回強制経口投与した。投与後24、48及び72時間目に生存していた動物を屠殺し、大腿骨を摘出し、牛胎児血清を用いて骨髓を洗い出し、骨髓細胞の塗抹標本を作製した。骨髓標本は、メタル固定後、ギムザ染色を施し、顕微鏡下で、1動物当たり1000個の多染性赤血球について小核の有無を検査した。また同時に赤血球を観察し、小核を有する赤血球数を記録した。さらに全赤血球中の多染性赤血球の割合を求めた。

用量設定根拠 :

結果 : 骨髓標本の観察結果を次表に示した。
症状としては、140mg/kg群の雌雄に自発運動抑制、皮温下降、腹臥位、運動失調が認められた。これらの症状は投与後24時間までにはほぼ回復した。他の投与群において症状は認められなかった。死亡は、140mg/kg群で雄2匹、雌3匹に認められた。体重は、対照群を含む全投与群の雌雄で、投与後24時間目に減少が認められた。対照群は72時間後には回復したが、140mg/kg群では大部分の動物に投与後48及び72時間目の減少が認められた。
骨髓細胞の塗抹標本の観察では、いずれの検体投与群においても対照群と比較して小核を有する多染性赤血球の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球の統計学的に有意な増加が認められた。

以上の結果から、本剤はマスを用いた小核試験条件下で、染色体あるいは分裂機構に対する損傷性を有しないと考えられた。

表 骨髓標本観察結果

薬物	投与量 mg/kg	骨髓標本 採取時間 (時間)	性	動物 数	生 存 数	小核を有する 多染性赤血球 (%)	小核を有する 正染性赤血球 (%)	全赤血球中の 多染性赤血球 (%)	
溶媒 対照	—	24	雄	6	6	0.18	0.23	49.9	
			雌	6	6	0.25	0.12	56.5	
		48	雄	6	6	0.22	0.11	52.5	
			雌	6	6	0.12	0.09	57.0	
		72	雄	6	6	0.17	0.11	53.3	
			雌	6	6	0.20	0.12	55.6	
検 体	30	24	雄	6	6	0.27	0.07	46.6	
			雌	6	6	0.17	0.08	53.4	
	65	24	雄	6	6	0.15	0.19	55.7	
			雌	6	6	0.15	0.11	52.0	
	140	24	雄	8	8	0.18	0.09	44.4	
			雌	8	7	0.21	0.03	48.7	
		48	雄	8	7	0.20	0.13	43.2	
			雌	8	7	0.27	0.14	48.9	
		72	雄	8	7	0.23	0.12	44.6	
			雌	8	7	0.10	0.06	52.4	
	陽性対照 マイトマイシン-C	3	24	雄	6	6	6.18↑	0.29	34.1
				雌	6	6	5.90↑	0.11	37.2

溶媒対照 : 1%CMC

Kastenbaum & Bowman 検定

↑↓ : p < 0.01

⑤ 細菌を用いたDNA修復試験

(資料No. 44)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1988 年

検体純度 : %

試験方法 : [Rec assay]

枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換修復機構保持株 (H-17rec+) と欠損株 (M-45rec-) の 2 菌株を用い、代謝活性化及び非活性化法によって DNA の損傷の誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて 0、125、250、500、1000、2000 及び 4000 μ g/ディスクの濃度で試験を行った。1 プレートに 2 ディスクを置いた。

陽性対照にはマイトマイシン-C 及び 2-アミノアントラセンを用いた。また陰性対象にはカナマイシンを用いた。

判定基準は、M45rec- と H17rec+ の生育阻止帯の差が 5mm 以上認められた場合に陽性 (+) とした。

用量設定根拠 ;

結果 : 結果を次表に示した。

代謝活性化の有無にかかわらず、検体のいずれの処理濃度でも H-17rec+ 及び M-45rec- の両株にまったく生育阻止が認められなかった。

一方、陽性対照群では両株の間に有意な生育阻止帯の差が認められた。また、陰性対照群では両株にほぼ同程度の生育阻止が認められた。

以上の結果から、代謝活性化法を含む本試験条件下で、本剤の DNA 傷害性は陰性と考えられた。

表 試験結果

薬物	濃度 μg/ディスク	S-9 mix の有無	生育阻止帯 ^{a)} (mm)		差 (mm)	判定
			M45 rec ⁻	H17 rec ⁺		
溶媒対照 (DMSO)	—	—	0	0	0	—
検体	125	—	0	0	0	—
	250	—	0	0	0	—
	500	—	0	0	0	—
	1000	—	0	0	0	—
	2000	—	0	0	0	—
	4000	—	0	0	0	—
陰性対照 (カナマイシン)	5	—	18.5	14.5	4	—
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.01	—	12.5	0	12.5	+
溶媒対照 (DMSO)	—	+	0	0	0	—
検体	125	+	0	0	0	—
	250	+	0	0	0	—
	500	+	0	0	0	—
	1000	+	0	0	0	—
	2000	+	0	0	0	—
	4000	+	0	0	0	—
陽性対照 (2-アミノアントラセン)	10	+	5	0	5	+

表中の数値は2ディスクの平均値

a) : 生育阻止帯が認められた場合は、生育阻止帯の直径からディスクの直径(8mm)を差し引いた値を記載した。

⑥ 細菌を用いたDNA修復試験

(資料No. 45)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1986 年

検体純度 : %

試験方法 : 大腸菌 *Escherichia coli* の組換修復機構保持株 (WP2 株) と欠損株 (WP67 株及び CM871 株) を用い、代謝活性化及び非活性化法によって DNA 損傷誘発性を検定した。ジメチルスルホキシド (DMSO) を溶媒として、0、316、1000、3160、10000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度について 2 連で試験を行った。処理時間は各々 2 及び 18 時間とした。

各濃度で 1 プレートにつき 3 スポットの生存コロニー数を記録し、無処理対照群に対する生存率を算出した。さらに、生存係数 (C_s ; 欠損株の平均生存率 / 保持株の平均生存率) も算出した。

判定は、 C_s が 0.1 以下を陽性、0.3 以下を疑陽性とした。

陽性対照として、マイトマイシン-C 及び 2-アミアントラセンを用い、陰性対照としてアンピシリンを用いた。

用量設定根拠 ;

結果 : 結果を次表に示した。

検体処理をした WP67 株及び CM871 株の生存係数は、2 及び 18 時間処理のいずれにおいても 0.93 以下に減少することはなかった。

一方、陽性対照のマイトマイシン-C 処理群では WP67 株及び CM871 株の生存係数は 1.46×10^{-3} 以下であった。また 2-アミアントラセンは CM871 株に対し S-9mix 存在下でのみ顕著な生育阻害を示し、生存係数は 2 時間処理が 0.014、18 時間処理では 8.33×10^{-3} であった。WP67 株では生育阻害は認められなかった。さらに、陰性対照では WP67 株及び CM871 株は 2 時間後、18 時間後ともに生存係数が 1.0 以下に下がることはなかった。

以上の結果から、代謝活性化法を含む本試験条件下で、本剤の DNA 損傷誘起性は陰性であると考えられた。

表 試験結果

薬物	濃度 μg/ml	処理時間	S-9mix の有無	無処理対照群に対する生存率 (%)			生存係数	
				WP2	WP67	CM871	WP67	CM871
溶媒対照 (DMSO)	—	2	—	93.18	100.80	95.10	1.08	1.02
検体	316		—	87.54	96.34	92.65	1.10	1.06
	1000		—	82.72	96.76	92.26	1.17	1.12
	3160		—	90.77	93.10	93.07	1.03	1.03
	10000		—	89.95	98.78	84.08	1.10	0.93
陰性対照 (アンピシリン)	25		—	0.68	8.83	9.31	12.99	13.69
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.05		—	89.16	0.13	0.022	1.46×10^{-2}	2.47×10^{-4}
溶媒対照 (DMSO)	—		+	100.80	100.80	95.10	1.00	0.94
検体	316		+	101.61	103.24	95.52	1.02	0.94
	1000		+	96.80	102.44	100.83	1.06	1.04
	3160		+	88.75	100.41	98.78	1.13	1.11
	10000		+	96.80	94.32	89.81	0.97	0.93
陽性対照 (2-アミノアントラセン)	5		—	91.57	100.41	93.07	1.10	1.02
			+	93.18	100.80	1.30	1.08	0.014
溶媒対照 (DMSO)	—	18	—	97.35	95.96	100.00	0.99	1.03
検体	316		—	94.30	97.07	99.62	1.03	1.06
	1000		—	96.97	93.76	96.25	0.97	0.99
	3160		—	96.58	94.13	97.01	0.97	1.00
	10000		—	95.44	95.23	94.76	1.00	0.99
陰性対照 (アンピシリン)	25		—	5.55×10^{-4}	9.12×10^{-4}	9.78×10^{-4}	1.64	1.76
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.05		—	95.82	0.021	4.88×10^{-5}	2.19×10^{-4}	5.09×10^{-7}
溶媒対照 (DMSO)	—		+	99.25	100.38	99.62	1.01	1.00
検体	316		+	95.44	105.16	98.13	1.10	1.03
	1000		+	100.00	98.90	97.37	0.99	0.97
	3160		+	101.14	101.85	99.26	1.01	0.98
	10000		+	101.53	102.96	97.75	1.01	0.96
陽性対照 (2-アミノアントラセン)	5		—	102.28	95.59	96.25	0.93	0.94
			+	98.49	95.59	0.82	0.97	8.33×10^{-3}

数値は2プレート(3スポット/プレート)の平均値。
DMSO:ジメチルスルホキシド

(12) 生体機能影響

① ラット、マウス及びびね等を用いた生体機能への影響に関する試験

(資料No. 46a, 46b)

試験機関 :

報告書作成年 : 1987年(資料No. 46a)、1988年(資料No. 46b)

検体純度 : %

一般状態観察

1 マウスの一般状態 (資料No. 46a)

供試動物 : Jcl-ICR系マウス、5週齢、1群雌雄各5匹
体重 雄 22.0-27.9g 雌 18.3-21.7g

試験期間 : 24時間観察

試験方法 : 検体を1%w/vCMC水溶液に懸濁し、16-18時間の絶食後、雄は3、10、30、100及び300 mg/kgを、雌は1、3、10、30及び100mg/kgを単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は20ml/kgとした。観察は投与直後から1時間目までは継続的に、その後は1時間毎に6時間目まで及び24時間目にIrwinの方法に準じて行った。

結果 : 症状として、雄では30mg/kg群で一過性の下痢、自発運動の減少及び呼吸の深大が観察され、100mg/kg群で自発運動の減少、異常姿勢、外的刺激に対する反応の低下、呼吸の深大及び筋力の低下が認められた。300mg/kg群では、上記の症状がさらに強く出現したのに加え、異常歩行、腹筋緊張の低下及び正向反射の消失が現れ、1匹で瀕死の状態が認められた。

雌では3及び10mg/kg群で下痢、30mg/kg群で下痢、異常姿勢、外的刺激に対する反応の低下、自発運動の減少、異常歩行、骨格筋緊張の低下、正向反射の消失及び呼吸の深大が認められた。100mg/kg群では上記症状が強く現れ、100mg/kg群で1匹が死亡した。

2 ラットの一般状態 (資料No. 46a)

供試動物 : Jcl-SD系ラット、5-6週齢、1群雌雄各5匹
体重 雄 150-207g 雌 140-155g

試験期間 : 24時間観察

試験方法 : 検体を1%w/vCMC水溶液に懸濁し、16-18時間の絶食後、雄では10、30、100、300及び1000mg/kgを、雌では3、10、30、100及び300mg/kgを単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は20ml/kgとした。観察は投与直後から1時間目までは継続的に、その後は1時間毎に6時間目まで及び24時間目にIrwinの方法に準じて行った。

結果 : 雄では、10及び30mg/kg群で下痢が認められた。100及び300mg/kg群で下痢の他に異常姿勢、自発運動の減少及び呼吸の深大が認められた。1000mg/kg群では、

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

上記に加え、外的刺激に対する反応の低下、異常歩行、骨格筋緊張の低下、正向反射の消失、皮膚の蒼白化及び強い呼吸の深大が観察され、全動物が死亡した。雌では、3、10及び30mg/kg群で下痢が、100mg/kg群で下痢の他に、外的刺激に対する反応の低下、異常姿勢、自発運動の減少及び呼吸の深大が認められた。300mg/kg群では上記に加え、異常歩行及び骨格筋緊張の低下が認められ、1匹が死亡した。

中枢神経系に関する試験

3 ラットの自発脳波に及ぼす影響 (資料 No. 46a)

供試動物 : Jcl-SD 系ラット、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 155-239g

試験期間 : 60 分間観察

試験方法 : 麻酔下のラットを脳定位固定装置に固定し脳に電極を埋め込み脳波を測定した。検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、安定した脳波が得られた後、3、30 及び 300mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。観察は、検体投与後 60 分間、大脳新皮質知覚野及び運動野、右側海馬の脳波を測定し記録した。また、新皮質知覚野及び運動野より導出された脳波のパワースペクトルデータから α 波及び β 波の占める割合を算出した。

結果 : 結果を表に示す。

表 α 波及び β 波の占める割合 (%)

			投与量 (mg/kg)	0	3	30	300
占める割合 (%)	知覚野	α	45 分	16.6	16.4	16.6	8.2*
			60 分	15.2	15.8	17.4	6.6*
		β	45 分	13.6	14.4	15.2	3.2*
			60 分	12.8	14.0	14.6	0.6*
	運動野	α	30 分	21.6	15.8	18.2	14.0*
			45 分	21.4	16.2	18.6	12.4*
		β	60 分	23.0	14.8*	18.4	9.0*
			45 分	21.0	20.8	18.8	5.2*
60 分	21.0	20.2	16.6	2.8*			

Student's-t 検定

* : 有意差あり ($p < 0.05$)

300mg/kg 群において新皮質知覚野及び運動野脳波は徐波化し、海馬脳波は脱同期した。また、 α 波及び β 波の減少が認められた。

3mg/kg 群の 60 分後の運動野において統計学的に有意な変化が認められたが、この変化はごくわずかで、さらに検体投与前 (投与前 30 分 : 15.2) とほぼ同じであることから、自然変動の範囲内と考えられ薬理学的に意味のある変化とは考えられなかった。

4 マウスの pentobarbital 睡眠時間に及ぼす影響 (資料 No. 46a)

供試動物 : Jcl-ICR 系マウス、6 週齢、1 群雄各 8 匹、体重 25.2-29.2 g

試験方法 : 検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、3、30 及び 100mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。検体投与 60 分後にペンタバルビタール 50mg/kg を尾静脈内に投与し、正向反射の消失から回復までの時間を測定した。

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

結果 : 100mg/kg 群では 50 分後に 2 匹が死亡し、6 匹で試験を行った。睡眠時間に統計学的に有意な変化は認められず、検体による影響は認められなかった。

5 ラットの体温に及ぼす影響 (資料 No. 46a)

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 193-217 g

試験期間 : 6 時間観察

試験方法 : 検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、3、30 及び 300mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。検体投与前及び投与後 1 時間毎に 6 時間まで、肛門より約 4 cm の直腸温を測定した。

結果 : 結果を表に示す。

投与量(mg/kg)		0	3	30	300
体温 (°C)	投与前	37.9±0.0	37.8±0.1	37.9±0.1	37.9±0.1
	1 時間後	37.2±0.1	37.0±0.0	37.2±0.1	36.3±0.2*
	2 時間後	36.8±0.1	36.9±0.1	36.7±0.2	35.8±0.3*
	3 時間後	36.8±0.2	36.6±0.1	36.8±0.1	35.7±0.3*
	4 時間後	36.5±0.2	36.8±0.2	36.6±0.2	35.8±0.4
	5 時間後	36.7±0.1	36.8±0.2	36.9±0.1	36.1±0.4
	6 時間後	36.8±0.1	36.8±0.1	36.9±0.2	35.9±0.5

Student's-t 検定

*: 有意差あり (p<0.05)

30mg/kg では影響は認められなかったが、300mg/kg では投与 1-3 時間後に統計学的に有意な低下が認められた。この低下は 6 時間後まで持続したが、4 時間以後は有意な変化ではなかった。

6 ラットの摂餌量に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 160-185 g

試験期間 : 24 時間観察

試験方法 : 検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、3、30 及び 300mg/kg を 1 回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。検体投与後 6 及び 24 時間目に飼料の残量を測定し、摂餌量を算出した。

結果 : 結果を表に示す。

投与量(mg/kg)		摂餌量(g)	
		6 時間後	24 時間後
溶媒対照		7.6±1.2	29.4±1.2
検体	3	7.8±0.8	27.6±0.9
	30	7.4±1.2	22.0±0.5*
	300	5.4±0.8	9.2±0.9*
Chlorphentermine	100	2.4±1.2*	17.4±2.2*

Student's-t 検定

*: 有意差あり (p<0.05)

30 及び 300mg/kg 群で投与後 24 時間目の摂餌量が有意に減少した。

運動機能系に関する試験

7 麻酔ラットの坐骨神経・腓腹筋標本に及ぼす影響 (資料 No. 46a)

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 159-248 g

試験期間 : 60 分間観察

試験方法 : 麻酔下のラットの坐骨神経を露出し中枢側を切断した。また、同側のアキレス腱を結紮して末梢側を切断した。腱部をトランスジューサーに接続し、坐骨神経を電気刺激し、生じた腓腹筋の収縮をポリグラフに記録した。検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、収縮が安定したところで、3、30 及び 300mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。検体投与後 60 分間、腓腹筋の収縮力を測定した。

結果 : 検体による影響は認められなかった。

8 ラットの自発運動に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 160-182 g

試験期間 : 60 分間観察

試験方法 : 検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、3、30 及び 300mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。オートメクス (Automex®) を用いて測定した。検体投与後 1 時間毎の平均運動量を 6 時間測定し、1 時間毎のカウント数で表示した。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量(mg/kg)		投与後時間(hr)			
		1	2	3	6
溶媒対照		142.8	73.8	135.8	150.2
検体	3	174.6	277.0*	156.0	278.0
	30	177.4	102.0	101.6	242.2
	300	263.4	178.6	76.0*	174.8
Chlorpromazine	100	121.4	68.4	67.2*	105.8

Student's-t 検定

* : 有意差あり (p<0.05)

30mg/kg 群の投与後 2-3 時間目で有意ではないが減少傾向、300mg/kg 群の投与後 3 時間目では有意な減少が認められたが、検体による影響は明らかな変化とは言えなかった。投与群で認められた統計学的に有意な変化は、いずれも一過性の変化であり、さらに溶媒対照の値にも大きな変動が観察されたことを考慮すると、薬理的に意味のある差とは思われなかった。

9 ラットの筋力及び筋協調運動に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 179-197 g

試験方法 : 検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、3、30 及び 300mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。

(1) 筋力試験 (Traction test) : ラットを金網に乗せ、尾を後方に引いた時の張力をバネ秤を用いて測定した。

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

- (2) 筋協調運動(Rotarrod test) : 動物は i) で用いた雄ラットを用いた。ラットを 1 分間に 5 回転の速度で回転する直径 7cm の回転棒上に乗せ、ラットが回転棒から落下するまでの時間を 2 分間測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量(mg/kg)		(1) 筋力(g)	(2) 耐久時間(秒)
溶媒対照		892.0±40.8	120.0±0.0
検体	3	856.0±24.8	120.0±0.0
	30	864.0±69.1	120.0±0.0
	300	700.0±36.3*	120.0±0.0
Diazepam	10	472.0±50.0*	116.0±4.0

Student's-t 検定

* : 有意差あり (p<0.05)

- (1) 筋力試験 : 牽引張力は 300mg/kg 群で統計学的に有意に抑制された。
(2) 筋協調運動: 検体による影響は認められなかった。

呼吸器系及び循環器系に関する試験

10 麻酔ラットの呼吸、血圧、心拍数及び心電図に及ぼす影響 (資料 No. 46a)

供試動物 : Jcl-SD 系ラット、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 151-246 g

試験期間 : 120 分間観察

試験方法 : 麻酔下のラットを用い、呼吸は胸郭の動きを、血圧は大腿動脈内の圧力を、心電図は標準四肢第 II 誘導法にて、心拍数は心電図から知母ターを介して、それぞれポリグラフに記録した。検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、呼吸、血圧、心電図及び心拍数が安定したところで 3、30 及び 300mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。検体投与後 120 分間、呼吸、血圧、心拍数及び心電図を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

対照群を含めていずれの投与群においても呼吸数の増加が認められた。これは麻酔深度の変化の現れと考えられた。一方、投与 120 分後には 30mg/kg 以上の群で、対照群と比較して呼吸数の減少が認められた。これは呼吸機能の抑制と考えられた。

他に、血圧の下降が 30mg/kg 以上の群で、心拍数の減少が 300mg/kg 群で認められた。また 30mg/kg 群の心拍数についても対照群と比較して統計学的有意差が認められたが、この変化はごくわずかであり投与前と比較して大差ないことから自然変動によるものであり、薬理学的意義はないものと考えられた。

投与量(mg/kg)		0	3	30	300
呼吸数 (回/分)	投与前	54.8	59.2	49.4	53.0
	90分後	92.0	84.8	75.2*	98.2
	105分後	104.6	84.4	74.8*	92.4
	120分後	112.0	89.0	81.4*	69.8*
心拍数 (回/分)	投与前	416.0	416.0	380.2	368.8
	20分後	415.8	435.4	385.6	367.2*
	30分後	419.8	444.0	395.8	340.8*
	40分後	421.4	450.6	389.6	313.4*
	50分後	423.2	454.4	380.8	311.0*
	60分後	429.2	449.2	375.8*	307.2*
	75分後	438.6	455.0	373.2*	301.6*
	90分後	451.2	440.6	387.8*	289.8*
	105分後	456.0	446.4	401.6*	276.4*
	120分後	457.8	444.0	410.0*	261.4*
血圧 (mmHg)	投与前	110.8	114.8	123.0	134.8*
	10分後	113.0	123.2	121.8	133.4*
	15分後	113.0	122.2	119.4	125.0*
	40分後	111.2	118.4	103.2	88.8*
	50分後	112.4	114.4	96.6*	85.2*
	60分後	113.4	110.4	94.4*	82.6*
	75分後	115.6	111.8	90.4*	78.8*
	90分後	116.0	111.6	93.6*	76.6*
	105分後	117.6	113.0	94.8*	77.4*
	120分後	118.8	111.2	96.2*	85.4*

Student's-t 検定

*: 有意差あり (p<0.05)

11 麻酔下の血圧、血流量、心拍数、心電図及び自律神経節に及ぼす影響 (資料 No. 46a)

供試動物 : ビーグル犬、5-6 カ月齢、1 群雄各 4 匹、体重 9-11.3kg

試験期間 : 60 分間観察 (血圧、血流量、心拍数及び心電図)

試験方法 : 麻酔下の犬を用い、血圧は左大腿動脈内の圧力を、血流量は右大腿動脈に体内型プローブを装着して電磁血流計で、心電図は標準四肢第 II 誘導法にて、心拍数は心電図からカウンターを介して、また、交感神経上頸神経の節前及び節後線維を電気刺激し生じた瞬膜の収縮を、それぞれポリグラフに記録した。検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、血圧、血流量、心電図、心拍数及び瞬膜が安定したところで 3、30 及び 300mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。検体投与後 60 分間、血圧、血流量、心電図及び心拍数を測定した。検体投与前及び投与後 60 分に節前及び節後神経の電気刺激を行い、瞬膜の収縮を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

3mg/kg 群において統計学的有意差が認められたが、投与前からの変化であり、自然変動の範囲内であると考えられ、薬理学的に意味のある変動とは考えられなかった。

従って、検体による影響は認められなかったと判断した。

投与量 (mg/kg)		0	3	30	300
心拍数 (回/分)	投与前	152.8	106.0*	146.0	99.3
	5分後	151.5	103.5*	143.3	99.0
	10分後	151.0	104.8*	140.3	99.0
	15分後	151.8	103.5*	138.3	98.0
	20分後	151.3	104.0*	137.0	97.3
	30分後	145.3	109.0*	132.0	97.0
	40分後	145.3	109.5*	130.8	96.5
	50分後	145.8	111.3*	130.3	94.3
	60分後	142.5	112.5	127.3	93.3

Student's-t 検定

*: 有意差あり (p<0.05)

12 ウサギの耳介血管灌流量に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : KBL-JW ウサギ、5 ヶ月齢雄、1 群 5 標本、体重 3.5-4.3kg

試験方法 : 麻酔下のウサギの頸動脈より採血した後、耳介を切断した。耳介後動脈にカニューレを挿入し、ウサギの血清を 1% 含むロックーリングル液で耳介を灌流した。静脈より露出する灌流液の滴数をポリグラフに記録した。検体を 99.5% エタノールに溶解し、灌流量が安定したところで 100 及び 300µg/耳介を灌流液中に注入した。対照群には溶媒を 10µg/耳介を注入した。検体注入後 15 分間、濾出灌流量を測定した。

結果 : 100 及び 300µg/耳介注入により灌流量は増加する傾向ではあったが、統計学的に有意な変化ではなく、明らかな変化ではなかった。従って、検体投与による影響はないものと判断した。

13 モルモットの摘出心房筋標本に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Hartley 系モルモット、5-8 週齢、雄、1 群 5 標本、体重 260-390g

試験方法 : モルモットを麻酔し、左右の心房を摘出した。標本は温度を 35°C に保ち、酸素 95% 及び炭酸ガス 5% の混合ガスを通気した Krebs 液の入ったマグナス槽内に浸した。左心房は電気刺激により発生する収縮力を、右心房は自然発生する収縮力を、それぞれをポリグラフに記録した。検体を 99.5% エタノールに溶解し、収縮が安定したところで、槽内濃度が 10 及び 100µM になるように注入した。対照群には 0.1% エタノールを注入した。検体注入後 15 分間、心房筋の収縮力及び収縮頻度を測定した。その後、洗浄しないままイブプロフェン 1µM による収縮の変化を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量 (µM)		収縮力 (g)		収縮頻度 (拍/分)	
溶媒対照 (エタノール)		前	1.2±0.3	125.4±7.3	
		後	0.6±0.2*	122.4±8.0*	
検体	10	前	0.6±0.0	175.6±6.4	
		後	0.3±0.0*	168.6±4.4*	
	100	前	1.0±0.2	118.0±5.9	
		後	0.5±0.1*	115.2±6.5*	

Paired t-検定

*: 有意差あり (p<0.05)

投与量 (μM)		イソプロテレノール 1 μM		
		収縮力 (g)	収縮頻度 (拍/分)	
溶媒対照		前	1.1 ± 0.2	37.4 ± 4.5
		後	0.6 ± 0.1*	29.4 ± 4.7*
検体	10	前	1.2 ± 0.2	55.4 ± 4.2
		後	0.8 ± 0.1*	46.6 ± 4.3
	100	前	1.4 ± 0.2	38.4 ± 5.7
		後	0.7 ± 0.2*	23.2 ± 5.7*
Propranolol	1	前	1.6 ± 0.2	66.2 ± 4.5
		後	1.1 ± 0.2*	50.0 ± 5.3
	10	前	-	70.0 ± 3.9
		後	-	11.4 ± 2.7*

Paired t-検定

*: 有意差あり (p<0.05)

検体投与により、心房筋収縮力の抑制及び収縮頻度の減少、さらにイソプロテレノールによる陽性変力効果及び陽性変時効果も抑制が認められた。しかし、その差は小さく、溶媒対照でも同様の現象が観察されていることから、これらの変化は検体による薬理作用ではないと考えられた。

消化器系に関する試験

14 モルモットの摘出回腸平滑筋標本に及ぼす影響 (資料 No. 46a)

供試動物 : Hartley系モルモット、7-8週齢、雄、1群5標本、体重 330-400g

試験方法 : モルモットを麻酔し、回腸を摘出した。標本は回盲部より約10cm上部の回腸を約2cmの長さに切断した後、温度を35℃に保ち、酸素95%及び炭酸ガス5%の混合ガスを通気したタイロート液の入ったマグ双槽内に浸した。標本をトランスジューサーに吊るし、標本の収縮力をホリグラフに記録した。

検体を99.5%エタノールに溶解し、収縮が安定したところで、槽内濃度が1、3、10、30及び100μMになるように注入した。対照群には0.3及び1%エタノールを注入した。検体注入後15分間、摘出回腸の収縮を測定した。その後、洗浄しないままアセチルコリン0.1μM及びヒスタミン1μMによる収縮を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

エタノール1%濃度は、アセチルコリン及びヒスタミンによる回腸の収縮を抑制した。摘出回腸に対し、検体は100μM以下の濃度で直接影響を及ぼさなかった。またアセチルコリンによる収縮は検体の30μM以上の濃度で、ヒスタミンによる収縮は3μM以上の濃度でそれぞれ抑制された。しかし、これらの抑制効果は溶媒として使用したエタノールが影響を及ぼしている可能性があり、検体の効果はそれほど強いとは考えられなかった。

濃度 (μM)			収縮力 (g)	
			アセチルコリン (0.1 μM)	ヒスタミン (1 μM)
エタノール	0.3%	前	1.8 ± 0.3	2.0 ± 0.2
		後	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.2
	1.0%	前	1.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3
		後	1.0 ± 0.2*	1.4 ± 0.3*
検体	1	前	-	2.4 ± 0.5
		後	-	2.0 ± 0.3
	3	前	-	2.4 ± 0.3
		後	-	1.7 ± 0.2*
	10	前	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.2
		後	1.8 ± 0.3	1.2 ± 0.2*
	30	前	1.8 ± 0.1	2.7 ± 0.3
		後	1.4 ± 0.1*	1.4 ± 0.2*
	100	前	1.9 ± 0.2	2.4 ± 0.3
		後	0.7 ± 0.2*	0.7 ± 0.1*
Atropine	0.01	前	1.3 ± 0.1	-
		後	0.1 ± 0.1*	-
Tripeleennamine	0.01	前	-	2.1 ± 0.3
		後	-	0.9 ± 0.2*

Paired t-検定

*: 有意差あり (p<0.05)

15 ラットの胃液分泌に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Jcl-SD 系ラット、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 179-207 g

試験方法 : 実験は Shay らの方法に準じて行った。検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、3、30 及び 300mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。投与後 60 分目、麻酔下でラットの幽門部を結紮し閉腹した。結紮後 4 時間目、麻酔下で胃を摘出し胃液を採取した。採取した胃液は遠心分離し、上澄みの容量及び pH を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)		胃液	
		量 (ml)	pH
溶媒対照		4.5 ± 0.5	1.4 ± 0.0
検体	3	4.0 ± 0.7	1.7 ± 0.2
	30	3.6 ± 1.1	1.8 ± 0.3
	300	3.7 ± 0.8	3.0 ± 0.6*
Cimetidine	100	2.5 ± 0.5*	3.4 ± 0.7*

Student's-t 検定

*: 有意差あり (p<0.05)

胃液分泌量に検体による影響は認められなかった。300mg/kg 群で pH は有意にアルカリ側に傾いた。

16 マウスの腸管内炭末輸送能に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Jc1-ICR 系マウス、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 27.6-30.0g

試験方法 : 検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、3、30 及び 100mg/kg を単回強制経口与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。投与後 60 分に、1%w/vCMC 水溶液に懸濁した 5%活性炭末 20ml/kg を胃内に投与した。炭末投与後 30 分、麻醉下でマウスの小腸を摘出し、腸管内炭末輸送率を算出した。

$$\text{炭末輸送率} = (\text{胃幽門部から大腸側へ炭末の移動距離} / \text{小腸の全長}) \times 100$$

結果 : 検体による影響は認められなかった。

17 麻醉下ラットの胆汁分泌に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 160-185 g

試験方法 : 麻醉下のラットの胆管内にポリエチレンチューブを挿入し固定した。検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、30 及び 300mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。投与後より胆汁を採取し、累積排泄量を 1 時間毎に 6 時間測定した。

結果 : 検体による影響は認められなかった。

18 ラットの摘出胃平滑筋標本に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、6 週齢、雄、1 群各 5 標本、体重 200-250 g

試験方法 : 麻醉ラットから胃を摘出した。標本は胃底部を短冊型に切断した後、温度を 35°C に保ち、酸素 95% 及び炭酸ガス 5% の混合ガスを通気したタイロッド液の入ったマグナス槽内に浸した。標本をトランスジューサーに吊るし、標本の収縮力をポリグラフに記録した。検体を 99.5%エタノールに溶解し、収縮が安定したところで、槽内濃度が 0.1、1 及び 10 μ M になるように注入した。対照群には 0.01%エタノールを注入した。検体注入後 15 分間、摘出胃の収縮を測定した。その後、洗浄しないままセトニ 0.01 μ M による収縮を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量 (μ M)		収縮力 (g)	
		セトニ (0.1 μ M)	
溶媒対照 (エタノール)		前	3.3 \pm 0.4
		後	3.0 \pm 0.3
検体	0.1	前	2.9 \pm 0.4
		後	2.3 \pm 0.2
	1	前	3.3 \pm 0.3
		後	1.3 \pm 0.3*
	10	前	2.8 \pm 0.2
		後	1.6 \pm 0.4*
Cyproheptadine	0.1	前	4.2 \pm 0.5
		後	0.4 \pm 0.2*

Paired t-検定

*: 有意差あり (p<0.05)

検体は摘出胃標本に直接の影響を及ぼさなかったが、セトニンによる収縮を $1\mu\text{M}$ 以上の濃度で有意に抑制した。

生殖器系に関する試験

19 モルメットの摘出輸精管標本に及ぼす影響 (資料 No. 46a)

供試動物 : Hartley 系モルメット、7-8 週齢、雄、1 群 5 標本、体重 280-390g

試験方法 : モルメットを麻酔し、下腹神経と共に輸精管を摘出した。標本は約 4cm の長さに切断した後、温度を 38°C に保ち、酸素 95% 及び炭酸ガス 5% の混合ガスを通気したタイロート液の入ったマグナス槽内に浸した。標本をトランスジューサーに吊るし、標本の収縮力をポリグラフに記録した。検体を 99.5% エタノールに溶解し、収縮が安定したところで、槽内濃度が 10、30 及び $100\mu\text{M}$ になるうよに注入した。対照群には 0.1、0.3 及び 1% エタノールを注入した。検体注入後 15 分間、摘出輸精管の収縮を測定した。その後、洗浄しないまま下腹神経の電気刺激及びノルアドレナリン $10\mu\text{M}$ による収縮を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

濃度 (μM)			収縮力 (g)	
			ノルアドレナリン $10\mu\text{M}$	電気刺激
溶媒対照 (エタノール)	0.1%	前	3.0 ± 0.3	2.2 ± 0.4
		後	3.0 ± 0.4	2.1 ± 0.5
	0.3%	前	2.6 ± 0.5	2.3 ± 0.4
		後	2.3 ± 0.4	$1.9 \pm 0.5^*$
	1.0%	前	2.7 ± 0.6	2.6 ± 0.3
		後	1.4 ± 0.5	$1.1 \pm 0.2^*$
検体	10	前	2.8 ± 0.4	4.6 ± 0.7
		後	2.6 ± 0.3	4.6 ± 0.4
	30	前	3.0 ± 0.6	2.3 ± 0.3
		後	$2.7 \pm 0.6^*$	$1.9 \pm 0.3^*$
	100	前	4.4 ± 0.5	2.7 ± 0.3
		後	$2.4 \pm 0.3^*$	$1.4 \pm 0.2^*$
Phentolamine	0.1	前	2.8 ± 0.2	-
		後	$1.6 \pm 0.2^*$	-
Hexamethonium	1	前	-	2.8 ± 0.4
		後	-	$1.9 \pm 0.4^*$

Paired t-検定

* : 有意差あり ($p < 0.05$)

溶媒対照のエタノールは、1%濃度(槽内濃度が検体の $100\mu\text{M}$ に相当)で摘出輸精管標本に対し直接影響を及ぼさなかったが、電気刺激による収縮を抑制し、ノルアドレナリンによる収縮を統計学的に有意ではないが抑制した。従って検体 $30\mu\text{M}$ 以上の投与でノルアドレナリン及び電気刺激による収縮の抑制が認められたが、これはエタノールの影響を考慮すると検体の特異的な効果とは考えられなかった。

20 非妊娠ラットの摘出子宮標本に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Jcl-SD 系ラット、9-11 週齢、雌、1 群各 5 標本、体重 204-248 g

試験方法 : ラットを麻酔し子宮を摘出した。標本は約 2cm の長さに切断した後、温度を 35°C に保ち、酸素 95% 及び炭酸ガス 5% の混合ガスを通気したタイロート液の入ったマグナス槽内

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

に浸した。標本をトランスジューサーに吊るし、標本の収縮力をポリグラフに記録した。検体は99.5%エタノールに溶解し、槽内濃度が0.1、1及び10 μ Mになるように注入した。対照群には0.01%エタノールを注入した。検体注入後15分間、摘出子宮の収縮を測定した。その後、洗浄しないままオキトシン1 mU/mlによる収縮を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量 (μ M)		収縮力 (g)	
		オキトシン 1 mU/ml	
溶媒対照		前	4.2 \pm 0.4
		後	3.9 \pm 0.4
検体	0.1	±	4.7 \pm 0.7
		±	4.2 \pm 0.7
	1	±	4.9 \pm 0.6
		±	2.5 \pm 0.4*
	10	±	4.2 \pm 0.5
		±	2.2 \pm 0.3*

Paired t-検定 * : 有意差あり (p<0.05)

検体は10 μ M以下の濃度で摘出子宮平滑筋標本に直接影響を及ぼさなかったが、オキトシン1 mU/mlによる収縮を1 μ M以上の濃度で有意に抑制した。

21 妊娠ラットの摘出子宮標本に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Jc1-SD系妊娠ラット(妊娠14-16日目)、9-11週齢、雌、1群各5標本、
体重 280-324 g

試験期間 : 15分間観察

試験方法 : 妊娠ラットを麻酔し子宮を摘出し、子宮を切開して胎児を取り除いた。標本は幅約0.5 cm、長さ約2 cmの短冊型条片に切断した後、温度を35 $^{\circ}$ Cに保ち、酸素95%及び炭酸ガス5%の混合ガスを通気した。タイロート液の入ったマグナス槽内に浸した。標本をトランスジューサーに吊るし、標本の収縮力をポリグラフに記録した。検体を99.5%エタノールに溶解し、収縮が安定したところで、槽内濃度が0.1、1及び10 μ Mになるように注入した。対照群には0.01%エタノールを注入した。検体注入後15分間、摘出子宮の自動収縮力及び収縮頻度を測定した。

結果 : 検体による影響は認められなかった。

血液に関する試験

22 ウサギの血液に関する試験 (資料 No. 46a)

22.1 凝固系

供試動物 : KBL-JWウサギ、5ヵ月齢、1群雄5匹、体重 3.8-4.2 kg

試験方法 : ウサギの耳静脈より採血した。採取した血液9に対し、3.2%クエン酸ナトリウムを1の割合で添加し、遠心分離を行った。検体を99.5%エタノールに溶解し、血漿1 mlに最終濃度が10、30及び100 μ g/mlになるように添加した。対照群には99.5%エタノール20 μ lを添加した。検体添加血漿を加温後、マイクロアグロメーター(Microcoagulometer)により測定した。プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

結果 : 検体投与による影響は認められなかった。

22.2 溶血性

供試動物 : KBL-JW ウサギ、5ヵ月齢、1群雄5匹、体重 3.8-4.2 kg

試験方法 : ウサギの耳静脈より採血した。検体を 99.5%エタノールに溶解し、EDTA-3K 1mg を加えた血液 1ml に最終濃度が 10、30、100 及び 300 μ g/ml になるように添加した。対照群には 99.5%エタノール 20 μ l を添加した。検体添加血液を加温後、動的赤血球膜物性検査装置 (Coil Planet Centrifuge) により測定した。溶血開始点、溶血最大点、溶血終了点及び溶血帯を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

濃度 (μ g/ml)		溶血開始点 (mOsm)	溶血終了点 (mOsm)
溶媒		118 \pm 3	79 \pm 1
検体	10	119 \pm 3	79 \pm 1
	30	120 \pm 4	80 \pm 2
	100	121 \pm 3	79 \pm 1
	300	125 \pm 3*	82 \pm 1*

Paired t-検定

* : 有意差あり ($p < 0.05$)

300 μ g/ml で溶血開始点及び溶血終了点の高浸透圧側への統計学的に有意な移行が観察された。しかし高濃度処理時のみで明らかな変化であり、特異的な効果とは考えられなかった。

感覚器系に関する試験

23 モルモットの角膜反射及び皮膚攣縮反射に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

(1) 角膜反射

供試動物 : Hartley 系モルモット、4週齢、1群雄5匹、体重 240-290g

試験期間 : 60 分間観察

試験方法 : 検体を 1%w/vCMC 水溶液に 0.1 及び 1%濃度になるように懸濁し、2滴を角膜に滴下した。対照群には溶媒のみを滴下した。滴下後、角膜をポリエチレンチューブ (PE50) で刺激した。滴下後 60 分間、角膜反射の有無を記録した。

結果 : 検体による影響は認められなかった。

(2) 皮膚攣縮反射

供試動物 : Hartley 系モルモット、4週齢、1群雄5匹、体重 270-290g

試験期間 : 60 分間観察

試験方法 : 投与の約 20 時間前に硫化バリウムで背部の脱毛を行った。検体を 1%w/vCMC 水溶液に 0.1 及び 1%濃度になるように懸濁し、0.05ml を皮膚に投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与後、脱毛された背部皮膚を 27ゲージの注射針で刺激した。投与後 60 分間、皮膚攣縮反射の有無を記録した。

結果 : 検体による影響は認められなかった。

24 マウスの侵害刺激に対する反応に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

(1) 尾圧迫法 (Tail-pinch)

供試動物 : Jcl-ICR 系マウス、6週齢、1群雄各 5 匹、体重 28.3-30.0g

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

試験方法 : 検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、3、30 及び 100mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。投与後 60 分に圧を 500 g に調整した動脈カニューレを用いてマスの尾根部を上下にはさみ刺激した (高木らの方法)。侵害刺激に対し、鳴く、うしろを振り向く及び尾根部に噛みつくなどの反応のうち 2 秒以内に 1 つでも認められた場合に侵害刺激に対する反応を陽性とした。

結果 : 酢酸法の結果と共に、下表に示す。

(2) 酢酸法 (Writhing)

供試動物 : Jcl-ICR 系マウス、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 28.0-30.0g

試験方法 : 検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、3、30 及び 100mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20 ml/kg とした。検体投与 55 分後にマスの腹腔内に 0.6% 酢酸を 10ml/kg 投与し、5 分後 (検体投与 60 分後) に、発現する Writhing 反応数を 5 分間測定した (Koster の方法)。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	(1) 抑制数/刺激数	(2) Writhing 反応数
溶媒対照	0/5	7.2±2.9
検体	3	0/5
	30	0/5
	100	2/5
Morphine	30	4/5A
		0.2±0.2*
		0.0±0.0*

Student's t-検定

A : 有意差あり (p<0.05)

Fisher の正確確率検定 * : 有意差あり (p<0.05)

(1) 尾圧迫法

溶媒による影響は認められなかった。

3 及び 30mg/kg 投与では検体による影響は認められなかった。100mg/kg 投与において、刺激に対する反応が抑制される傾向が認められたが、明らかではなかった。

(2) 酢酸法

100mg/kg 群で Writhing 反応数の有意な減少が認められた。

腎機能系に関する試験

25 ラットの尿排泄、尿中電解質排泄、尿 pH 及び尿浸透圧に及ぼす影響 (資料 No. 46b)

供試動物 : Jcl-SD 系ラット、6 週齢、1 群雄各 5 匹、体重 166-188 g

試験期間 : 6 時間観察

試験方法 : 検体を 1%w/vCMC 水溶液に懸濁し、3、30 及び 300mg/kg を単回強制経口投与した。対照群には溶媒のみを投与した。投与容量は 20ml/kg とした。投与後、個別採尿ケージに收容し、1 時間毎に 6 時間にわたって蓄積尿量を測定し、6 時間蓄積された尿について尿中電解質 (Na、K、Cl) の排泄量、pH 及び浸透圧を測定した。

結果 : 結果を次表に示す。

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

投与量 (mg/kg)	尿量(ml)			(mEq/6hr)			浸透圧 (mOsm/kg)	
	1hr	2hr	3hr	Na+	K+	Cl-		
溶媒対照	3.9 ±0.5	4.3 ±0.2	5.1 ±0.6	0.32 ±0.02	0.17 ±0.02	0.21 ±0.01	474.0±22.7	
検体	3	3.2 ±0.7	3.7 ±0.7	4.1 ±0.7	0.21 ±0.06	0.20 ±0.05	0.19 ±0.05	576.0±67.8
	30	1.3* ±0.5	2.2* ±0.3	2.8* ±0.3	0.17* ±0.05	0.24 ±0.05	0.11* ±0.02	800.0±119.7*
	300	1.0* ±0.4	1.5* ±0.5	2.2* ±0.5	0.47 ±0.05	0.42* ±0.03	0.24 ±0.07	952.0±106.8*
Morphine	10	7.1* ±0.4	9.2* ±0.4	10.0* ±0.4	0.96* ±0.05	0.47* ±0.04	0.21 ±0.03	370.0±29.7*

Student's-t 検定

*: 有意差あり (p<0.05)

尿の pH には、統計学的に有意な変化は認められなかった。

尿排泄量は 30mg/kg 以上の投与で投与 1-3 時間後に有意に減少した。これは下痢による脱水が関与していると考えられた。また他に尿中電解質や浸透圧にも変化が認められたが、採取した尿には下痢が混入していたことから、これらで認められた変化は正確なものとは考えられなかった。

以上、本剤により生体が暴露されると中毒症状が現れない用量で下痢が起こり、急性中毒発現量あるいはそれに近い用量より摂餌の抑制、血圧の低下、心拍数の減少、尿排泄量の減少及び呼吸数の減少などが現れる。大量ではこれらの影響が強くなり、中枢神経系及び循環器系の機能が著しく低下する。しかし、重篤な中毒症状が観察される用量でも一般状態観察以外でみられた運動機能、感覚器系機能、消化器系機能及び血液の凝固機能に影響はみられない。また、雌雄の生殖器系臓器に対する直接的な影響はなく、溶血を惹き起こすような性質も認められなかった。

(13) 解毒及び治療

① 急性中毒の救急措置法に関する研究

(資料No. 47a)

試験機関 :

報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %

1 致死量に関する実験

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、1 群雄各 10 匹、体重 151-187 g

試験期間 : 72 時間観察

投与方法 : 検体をコーン油にて調製し、0、81、105、137、178、231、300mg/kg の用量で約 18 時間の絶食後単回強制経口投与した。投与容量は 10ml/kg とした。

結果 : 結果を次表に示す。

薬物	投与量 (mg/kg)	投与後 (時間) 累積死亡数									死亡率 (%)	
		1	2	3	4	5	6	24	48	72		
溶媒対照	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
検体	81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	105	0	0	0	1	1	1	2	2	3	30	
	137	0	0	0	0	0	0	2	4	5	50	
	178	0	0	0	0	0	0	2	7	8	80	
	231	0	0	0	0	0	0	7	9	9	90	
	300	0	0	0	0	0	0	8	9	10	100	
LD ₅₀ 値 (mg/kg) ^{a)}		137										

a) : 最小二乗法

2 致死効果に及ぼす各種治療物質の影響に関する実験

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、1 群雄各 10 匹、体重 153-192 g

試験期間 : 72 時間観察

投与方法 : 検体をコーン油にて調製し、約 18 時間の絶食後単回強制経口投与した。投与容量は 10ml/kg とした。用量は 137mg/kg (LD50) 及び 239mg/kg (LD100) とし、検体投与後 0.25、8、24 及び 48 時間目に、活性炭末の 500 及び 1000mg/kg、活性炭末配合剤 (活性炭末 : 酸化マグネシウム : タンニン酸 = 2 : 2 : 1) の 500 及び 1000mg/kg を胃内に、アトピソンの 1 及び 2mg/kg、マジオンの 10 及び 20mg/kg を静脈内に、それぞれ反復投与した。

結果 : 検体の 137 及び 239mg/kg を胃内に投与したのち何ら処置を行わなかった群 (対照群) の死亡率は、それぞれ 50 及び 100% であった。検体投与後、活性炭末及び活性炭末配合剤の胃内への投与、アトピソン及びマジオンの静脈内への投与を行った群における死亡率は、いずれの投与量においても対照群の場合と同程度であった。

3 致死効果に及ぼす胃洗浄の影響に関する実験

供試動物 : Jcl-SD系ラット、1群雄各10匹、体重154-184g

試験期間 : 72時間観察

投与方法 : 検体をコーン油にて調製し、約18時間の絶食後単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。用量は137mg/kg(LD50)及び239mg/kg(LD100)とし、検体投与後0.5、1、2、4及び8時間目に胃洗浄を行った。洗浄は所定の時間に1回当たり10ml/kgのコーン油で連続5回胃内を洗浄した。

結果 : 検体の137及び239mg/kgを胃内に投与し、投与後8時間目までに胃洗浄を行った全動物において、死亡は認められなかった。

4 人工透析の有用性に関する実験

供試動物 : Jcl-SD系ラット、1群雄各5匹、体重195-215g

試験期間 : 72時間観察

投与方法 : 検体をコーン油にて調製し、約18時間の絶食後単回強制経口投与した。投与量は55.2mg/kg(LD10)及び239mg/kg(LD100)とし、検体投与後0.5、1、2、4、8及び24時間に採血を行った。採取した血液を遠心分離し、得られた血清中の検体濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

結果 : 55.2及び239mg/kgの投与後4時間目までの血清から検体は検出されなかったが、投与後8時間目にはそれぞれ1匹で検出され濃度は139及び141ng/mlであった。また、239mg/kgの投与後24時間では55.2mg/kg群は検出されなかったが、239mg/kg群では生存した2匹から検体が検出され、その濃度は投与後8時間の値より高かった。

なお、ほとんどの動物の血清において検体が検出されなかったため、透析膜の透過性に関する実験は行わなかった。

以上の結果から、本剤が故意、あるいは万一の事故により、生体内に大量に摂取された時の急性中毒の救急措置法として、早期の胃洗浄が極めて有効であることが示唆された。

② 薬物療法に関する研究

(資料No. 47b)

試験機関 :
報告書作成年 : 1992 年

検体純度 : %

1 下痢発現用量に関する実験

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、6 週齢(雄)及び8 週齢(雌)、1 群雌雄各 10 匹、
体重 雄 166-188g、雌 160-188g

試験期間 : 6 時間観察

投与方法 : 検体を 1%CMC 水溶液に懸濁し、雄ラットには 0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、
300mg/kg、雌ラットには 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100mg/kg を単回強
制経口投与した。投与容量は 20ml/kg とした。

床紙を敷いたケージにラットを個別に収容し、床紙及び肛門周囲の下痢による汚れを、
投与前、投与後 15、30、45 分、投与後 1、2、3、4、5、6 時間目に肉眼観察した。

結果 : 結果を次表に示す。

投与量(mg/kg)	下痢出現率 (%)	
	雄	雌
0.01	-	0
0.03	0	0
0.1	10	10
0.3	40	20
1	60	40
3	70	50
10	100	80
30	70	80
100	100	90
300	90	-

下痢は、雄ラット及び雌ラットとともに 0.1mg/kg 群より用量に依存して出現し、
10mg/kg の雄ラットでは 100%、雌ラットでは 80%の動物に観察された。また、下痢の程
度も 0.1 ないし 10mg/kg で用量に依存して強くなった。

下痢は雌雄とも投与の 2 時間後に最高となった。

2 各種止瀉薬の消化管内通過速度に関する実験

供試動物 : Jc1-SD 系ラット、6 週齢(雄)及び8 週齢(雌)、1 群雌雄各 5 匹、
体重 雄 153-180g、雌 171-193g g

試験期間 : 60 分間観察

投与方法 : 次硝酸ビスマス 10g/kg、アトピソ 100mg/kg 及びパペラミド 100mg/kg を、5%カキ汁水溶液に
懸濁した 5%活性炭末 10ml/kg とともに単回強制経口投与した。

投与後 30 及び 60 分に小腸を摘出して腸間内炭末輸送率を算出した。

結果 : 結果を下表に示す。

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

投与後 60 分にはアトピン以外の群で約 90%以上の移動が観察され、いずれにおいても 30 分後に比べ移動距離は延長していた。

投与量			輸送率(%)	
			30 分後	60 分後
次硝酸ビスマス	10g/kg	雌	78.9±2.9	94.8±3.2*
		雄	81.8±1.8	96.2±1.1*
アトピン	100mg/kg	雌	75.6±1.8	83.8±3.1*
		雄	70.1±4.1	75.9±3.1
ロペラミド	100mg/kg	雌	66.4±3.2	95.1±2.9*
		雄	58.5±8.3	89.3±2.9*

3 誘発下痢に及ぼす各種薬物の止瀉効果に関する実験

供試動物 : Jcl-SD 系ラット、6 週齢(雄)及び 8 週齢(雌)、1 群雌雄各 10 匹、
体重 雄 165-190g、雌 176-200g

試験期間 : 60 分間観察

投与方法 : 次硝酸ビスマス 1 及び 10g/kg、ケイ酸アルミニウム 1 及び 10g/kg、アトピン 10 及び 100mg/kg、
パパペリン 10 及び 100mg/kg 並びにロペラミド 1、10 及び 100mg/kg をそれぞれ単回強制経口投与した 60 分後に、検体 10mg/kg をそれぞれ単回強制経口投与した。
投与 30 及び 60 分後に小腸を摘出して腸間内炭末輸送率を算出した。

結果 :

薬物	投与量	下痢出現率(%)	
		雄	雌
対照	10mg/kg	100	80
次硝酸ビスマス	1g/kg	90	100
	10g/kg	60 *	80
ケイ酸アルミニウム	1g/kg	100	80
	10g/kg	100	100
アトピン	10mg/kg	40 *	80
	100mg/kg	0 *	20*
パパペリン	10mg/kg	70	80
	100mg/kg	60 *	90
ロペラミド	1mg/kg	10 *	10*
	10mg/kg	0 *	0*
	100mg/kg	0 *	0*

Fisher 直接確率検定法 (片側) *: $p < 0.05$

アトピンの前処置は、本剤による下痢を 100mg/kg で顕著に抑制したが、アトピンの投与量を考慮すると、本剤による下痢の治療の第一選択薬とはなりえないと考えた。ロペラミドの前処置は、本剤による下痢をほぼ完全に抑制した。

4 誘発下痢に対するロペラミドの治療効果に関する実験

供試動物 : Jcl-SD 系ラット、6 週齢(雄)及び 8 週齢(雌)、1 群雌雄各 10 匹、
体重 雄 176-197g、雌 168-196g

試験期間 : 約 6 時間観察

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

投与方法 : 検体 10mg/kg を単回強制経口投与し、投与 30 及び 60 分後にペラミド 1 及び 10mg/kg を単回強制経口投与した。投与 30 及び 60 分後に小腸を摘出して腸間内炭末輸送率を算出した。

結果 : ペラミドは、検体投与 30 及び 60 分後のいずれの時間に投与した場合にも、投与 1 時間後より検体投与による下痢を抑制した。
その効果の強さは、ペラミド 1 及び 10mg/kg でほぼ同程度であった。また、ペラミドによる下痢抑制パターンは、質的にも量的にも雄と雌で類似していた。

以上の結果から、本剤による下痢の治療に用いる薬物としては、ペラミドが有用と考えられた。

申請者注) 動物種を選択

下痢はラット以外にマウスにおいても認められており、拮抗剤の検討を実施するにあたり、まず動物種を選択を行った。動物種の決定は、すでに実施されている試験の報告書〔生体の機能に及ぼす影響を検討したピリダベンにおける薬理試験（農薬抄録資料 No. 46a）〕の一般状態観察結果を参考とした。その結果、以下に示した理由により下痢作用に拮抗する薬物の検討にはラットを用いることとした。

1. 下痢を発現しない用量が、ラットで確認されていない。
2. 下痢の発現例数が、マウスよりラットに多い。
3. 下痢の発現が、マウスよりラットで継続して認められる。

[生体の機能に及ぼす影響に関する試験]及び[解毒及び治療試験]の総括表

試験項目		投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 (匹/ 群)	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要
一般状態 [Irwin]	マウス	経口 1% CMC	0, 1(雌), 3, 10, 30, 100, 300(雄)	雌雄 5	雄 10 雌 1	雄 30 以上 雌 3 以上	下痢、運動機能の抑制、呼吸 の深大 (マウス: 100mg/kg で 雌 1/5 死亡) (ラット: 1000mg/kg で雄 5/5、 300mg/kg で雌 1/5 死亡)
	ラット		0, 3(雌), 10 30, 100, 300, 1000(雄)		雄 - 雌 -	雄 10 以上 雌 3 以上	
中 枢 神 経 系	自発脳波	ラット	0, 3, 30, 300	雄 5	30	300	新皮質知覚野・運動野脳波の 徐波化、海馬脳波の脱同期
	ペントバルビタール 睡眠時間	マウス	0, 3, 30, 100	雄 8	100	-	影響なし
	体温 [直腸温]	ラット	0, 3, 30, 300	雄 5	30	300	下降
	摂餌量	ラット	0, 3, 30, 300	雄 5	3	30 以上	減少
運 動 機 能 系	坐骨神経 一腓腹筋標本	ラット	0, 3, 30, 300	雄 5	300	-	影響なし
	自発運動	ラット	0, 3, 30, 300	雄 5	300	-	影響なし
	筋力及び 筋協調運動	ラット	0, 3, 30, 300	雄 5	30	300	筋力抑制 筋協調運動への影響なし
呼 吸 器 系 ・ 循 環 器 系	呼吸及び循環	ラット	0, 3, 30, 300	雄 5	3	30 以上	呼吸数減少、血圧下降、 心拍数減少
	循環及び 自律神経節	イヌ	0, 3, 30, 300	雄 4	300	-	影響なし
	耳介血管灌流	ウサギ	0, 100, 300 μ g/ 耳介	雄 5 標本	300	-	影響なし
	摘出心房筋 標本	モルモット	0, 10, 100 μ M	雄 5 標本	100	-	影響なし
消 化 器 系	摘出回腸 平滑筋標本	モルモット	0, 1, 3, 10, 30, 100 μ M	雄 5 標本	1	3	30 以上で抗アセチルコリン作 用 3 以上で抗ヒスタミン作用
	胃液分泌 [幽門結紮法]	ラット	0, 3, 30, 300	雄 5	30	300	影響なし
	腸管内 炭末輸送能	マウス	0, 3, 30, 100	雄 5	100	-	影響なし
	胆汁分泌	ラット	0, 30, 300	雄 5	300	-	影響なし
	摘出胃 平滑筋標本	ラット	0, 0.1, 1, 10 μ M	雄 5 標本	0.1	1	抗セロトニン 作用

試験項目		投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 (匹/ 群)	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要	
生殖 器系	摘出輸精管 標本	モルモット	0, 10, 30, 100 μM	雄 5 標本	10	30 以上	抗NMJ・レタリン作用、下腹神 経刺激収縮抑制	
	摘出子宮平滑筋 標本	ラット	0, 0.1, 1, 10 μM	雌 5 標本	0.1	1 以上	抗キニン作用	
		妊娠ラット	0, 0.1, 1, 10 μM	雌 5 標本	10	—	影響なし	
血 液	血液凝固	ウサギ	0, 10, 30, 100 μg/mL	雄 5	100	—	影響なし	
	溶血	ウサギ	0, 10, 30, 100, 300 μg/mL	雄 5	100	300	溶血作用	
感 覚 器 系	反射	モルモット	点眼・経皮 1% CMC 0, 0.1, 1 %	雄 5	1	—	角膜反射・皮膚攣縮反射 影響なし	
	鎮痛	マウス	経口 1% CMC 0, 3, 30, 100	雄 5	30	100	尾圧迫法：抑制傾向 酢酸法：抑制	
腎機能 〔尿排泄〕		ラット	経口 1% CMC 0, 3, 30, 300	雄 5	3	30 以上	尿量・Na・Cl の減少、浸透圧・ K の増加	
解 毒 及 び 治 療 救 急 措 置	致死量 (3日間観察)	ラット	経口 コーン油	0, 81, 105, 137 178, 231, 300	雄 10	81	105	LD50 137
	各種治療薬の 影響			137, 239	雄 10	—	—	致死抑制効果なし
	胃洗浄の影響			137, 239	雄 10	—	—	死亡なし 胃洗浄は有効
	人工透析の 有用性			55.2, 239	雄 5	—	—	血清中でほとんど検出 されないため、透析膜 の透過性検討せず
使用時安全性に係る追加提出資料(回答)								
下 痢 の 薬 物 療 法	下痢発現用量	ラット	経口 1% CMC	0.01(雌), 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 (雄)	雌雄 10	0.03	0.1	0.1-10 で用量に依存し て出現
	各種薬物の 止瀉効果 (前処理)			10	雌雄 10	—	—	ロペラミドの 1mg/kg 以上 でほぼ下痢を抑制
	ロペラミドの治療 効果			10	雌雄 10	—	—	ロペラミド投与後の 30 及 び 60 分後投与でも下痢 を抑制、治療薬として 有用

(14) その他

① 流涎誘発性検討試験

(資料No. 67)

試験機関 :

報告書作成年 : 1992 年

試験目的 : 仮を用いた反復投与毒性試験で流涎が認められたが、これら試験の観察結果を再検討したところ、用量相関性に乏しく、また個体間の変動が大きいことから、検体の食味に起因する変化である可能性が示唆された。
本試験は、流涎が消化管から吸収された検体の全身影響によるものか、あるいは上部消化管に対する局所的刺激作用によるものかを明らかにする目的で実施した。

検体純度 : %

供試動物 : ビーグル犬、雌、約7-8ヶ月齢、1群各4匹、体重8.8-11.1 (平均9.8) kg

投与期間 : 13週間(1991年1月21日-4月23日)

投与方法 : 投与量は300mg/匹/日(約30mg/kg/日)とした。検体を刺激性検討用の胃溶性ゼラチンカプセルあるいは全身影響検討用の腸溶性ゼラチンカプセルに充填した後、1日1回、13週間にわたって強制経口投与した。対照群には空の胃溶性ゼラチンカプセルのみを同様に投与した。

用量設定根拠 ;

観察・検査項目及び結果 :

観察・検査項目 ; 摂餌量は毎日、体重は週1回測定し、一般状態は毎日観察した。流涎は、投与前並びに投与2、4及び6時間後に観察した。試験終了時には全動物を剖検した。

結果 ; 胃溶性カプセル群では、摂餌量減少、体重増加抑制が認められ、下痢及び嘔吐が最初の2週間に認められた。一方、腸溶性カプセル群では、下痢及び嘔吐が最初の2週間に認められたのみであった。

また、1日に4回詳細に流涎発現の有無を観察したが、いずれの群においても流涎は認められなかった。

以上、本剤の反復投与により、体重への影響が認められたが、流涎は全く認められなかった。従って、13週あるいは1年間反復毒性試験において認められた流涎は、偶発的所見あるいはアトリアクトであり、検体投与に起因した変化ではないと考えられた。

2. 原体中混在物及び代謝物

(1) 急性毒性

① ラットを用いた代謝分解物の急性経口毒性試験

(資料No. 58)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上

供試動物 : SD ラット、約 5 週齢、1 群雌雄各 5 匹
 体重 雄 137-156 g、雌 114-132 g

観察期間 : 14 日間観察

試験方法 : 検体を 1%w/v カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、約 18 時間の絶食後単回強制経口投与した。投与容量は 20ml/kg とした。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、投与日は投与後 1 時間以内に 3 回とその後 2 回、投与 2 日以降は 1 日 2 回、14 日間観察した。体重は投与前日、投与当日(1 日目)、投与 8 及び 15 日後に測定した。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	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	5000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	> 5000	
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間及び消失時間	症状発現例なし	
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000	
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000	

死亡 ; 死亡は認められなかった。

一般状態 ; 異常は認められなかった。

体重 ; 全動物で期待通りの体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

② ラットを用いた代謝分解物の急性経口毒性試験

(資料No. 61)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1990 年

検体純度 : %以上
供試動物 : SDラット、約5週齢、1群雌雄各5匹
体重 雄 94-117g、雌 89-106g
観察期間 : 14日間観察
試験方法 : 検体を1%w/vカルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、約18時間の絶食後単回強制経口投与した。投与容量は20ml/kgとした。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、投与日は投与後1時間以内に3回及びその後2回、投与2日以降は1日2回、14日間観察した。体重は投与前日、投与当日(1日目)、投与8及び15日後に測定した。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	経口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	400、800、2000、3162、5000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg) ^{a)} (95%信頼限界)	2728 (2030-3425)	3086 (2242-3930)
死亡開始時間及び終了時間	3時間-4日	3時間-3日
症状発現時間及び消失時間	15分-10日	30分-*
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	800	2000

a) : Probit 法

* : 観察期間終了日 (投与 15 日後)、800mg/kg 群雌で一部症状が残存している例が認められた。

死亡 ; 死亡数を次表に示す。

投与量 (mg/kg)	400	800	2000	3162	5000
雄	0	0	1	3	5
雌	0	0	0	4	4

一般状態 ; 死亡動物で昏睡、行動不活発、伏臥姿勢、蒼白化、チアノーゼ、運動失調、筋弛緩、不規則性の呼吸、立毛、毛づくろい行動の減少、背彎姿勢、削瘦、散瞳及び下痢が認められた。生存動物では、行動不活発、運動失調、毛づくろい行動の減少、背彎姿勢及び削瘦が認められた。3162及び5000mg/kg群では、さらに呼吸困難、立毛、吻部の色素着色、腹部膨満及び下痢が認められた。

体重 ; 2000 mg/kg 群以上で、投与8日後に用量依存性のある体重増加抑制あるいは体重減少が認められたが、以後順調に増加した。

肉眼的病理検査 ; 死亡動物においては被毛の着色及び胃小腸の異常内容物、さらに腺胃部粘膜の暗色部が少数認められたが、生存動物に異常は認められなかった。

③ マウスを用いた代謝分解物の急性経口毒性試験

(資料No. 68)

試験機関 : (GLP 対応)
 報告書作成年 : 1995 年

検体純度 : %
 供試動物 : ICR (Crj:CD-1) マウス、6 週齢、1 群雌雄各 5 匹
 体重 雄 27.5-35.6 g、雌 20.5-26.4 g
 観察期間 : 14 日間観察
 試験方法 : 検体を 1% Tween 80 水溶液に懸濁し、約 2 時間の絶食後単回強制経口投与した。
 投与容量は 20ml/kg とした。
 観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、投与日は投与後 1、3 及び 6 時間に、翌日以降は 1 日 1 回、14 日間観察した。体重は投与直前、投与 7 及び 14 日後に測定した。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	経口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	2222、3333、5000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	3689 (2637-5161)	4518 (2644-7720)
死亡開始時間及び終了時間	3 時間-6 時間	
症状発現時間及び消失時間	1 時間-1 日	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2222	—

死亡 ; 雄は 3333mg/kg 以上の群、雌は全投与群で死亡が認められた。

一般状態 ; 雌雄ともに自発運動低下、流涎、腹臥位及び呼吸緩徐が認められた。さらに雄でうずくまり姿勢、雌で昏睡が認められた。

体重 ; 全動物で期待通りの体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 死亡動物において腺胃部粘膜剥離及び小腸内黒色内容物が認められたが、生存動物に異常は認められなかった。

④ マウスを用いた代謝分解物の急性経口毒性試験

(資料No. 69)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1995 年

検体純度 : %
供試動物 : ICR (Crj:CD-1) マウス、6 週齢、1 群雌雄各 5 匹
体重 雄 27.3-35.6 g、雌 21.0-27.2 g
観察期間 : 14 日間観察
試験方法 : 検体を 1% Tween 80 水溶液に懸濁し、約 2 時間の絶食後単回強制経口投与した。
投与容量は 20ml/kg とした。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、投与日は投与後 1、3 及び 6 時間に、翌日以降は 1 日 1 回、14 日間観察した。体重は投与直前、投与 7 及び 14 日後に測定した。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	経口	
性別	雄	雌
投与量 (mg/kg)	866、1343、2081、3226、5000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	2175 (1698-2785)	2081 (1490-2907)
死亡開始時間及び終了時間	3 時間-1 日	
症状発現時間及び消失時間	1 時間-1 日	
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	866	1343
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1343	

死亡 : 雌雄ともに 2081mg/kg 以上の群で死亡が認められた。

一般状態 : 雌雄ともに自発運動低下、流涎、外陰部被毛の湿潤、うずくまり姿勢及び呼吸緩徐が認められた。さらに雌では 3226mg/kg 群で腹臥位及びひきずり歩行、5000mg/kg 群で横臥位、痙攣及び昏睡が認められた。

体重 : 全動物で期待通りの体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 : 死亡動物において腺胃部粘膜下出血斑、腺胃部粘膜の類白色化/脆弱化、腺胃部の潰瘍、小腸内黒色内容物、肝臓臓側面の類白色化及び腎臓臓側面の類白色化が認められたが、生存動物に異常は認められなかった。

⑤ マウスを用いた代謝分解物の急性経口毒性試験

(資料No. 71)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1996 年

検体純度 : %

供試動物 : ICR (Crj:CD-1) マウス、6 週齢、1 群雌雄各 5 匹
体重 雄 28.4-34.3 g、雌 22.6-28.3 g

観察期間 : 14 日間観察

試験方法 : 検体を 1% Tween 80 水溶液に懸濁し、約 2 時間の絶食後単回強制経口投与した。
投与容量は 20ml/kg とした。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、投与日は投与後 1、3 及び 6 時間に、翌日以降は 1 日 1 回、14 日間観察した。体重は投与直前、投与 7 及び 14 日後に測定した。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	経口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	1000、1350、1823、2460、3322	
LD ₅₀ 値 (mg/kg) (95%信頼限界)	1878 (1480-2383)	2118 (1699-2640)
死亡開始時間及び終了時間	6 時間-6 日	
症状発現時間及び消失時間	1 時間-6 日	1 時間-5 日
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1000	1350
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1000	1350

死亡 ; 雄は 1350mg/kg 以上の群、雌は 1823mg/kg 以上の群で死亡が認められた。

一般状態 ; 雌雄ともに自発運動低下、よろめき歩行、流涎、呼吸緩徐及びうずくまり姿勢が認められた。さらに雄では腹臥位、昏睡、立毛及び削瘦が認められた。

体重 ; 投与 7 日後に 1000-1823mg/kg 群の雄 4 匹、1823mg/kg 群の雌 1 匹で体重減少が認められたが、投与 14 日後には全動物で体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 死亡動物において腺胃粘膜潰瘍、腺胃壁出血斑、十二指腸壁出血斑、肝臓、腎臓及び脾臓の臓側面の類白色化、腹水及び腹腔内脂肪組織の白点が認められたが、生存動物に異常は認められなかった。

⑥ ラットを用いた代謝分解物の急性経口毒性試験

(資料No. 48)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上
供試動物 : SD ラット、約 5 週齢、1 群雌雄各 5 匹
体重 雄 94-117 g、雌 89-106 g
観察期間 : 14 日間観察
試験方法 : 検体を 1%w/v カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、約 18 時間の絶食後単回強制経口投与した。投与容量は 20ml/kg とした。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、投与日は投与後 1 時間及びその後 2 回、投与 2 日以降は 1 日 2 回、14 日間観察した。体重は投与前日、投与当日(1 日目)、投与 8 及び 15 日後に測定した。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	経口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	> 2000	
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間及び消失時間	症状発現例なし	
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000	
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000	

死亡 ; 死亡は認められなかった。

一般状態 ; 異常は認められなかった。

体重 ; 全動物で期待通りの体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

⑦ マウスを用いた代謝分解物の急性経口毒性試験

(資料No. 49)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上

供試動物 : ICR マウス、約 5 週齢、1 群雌雄各 5 匹、体重 雄 21-24 g、雌 18-20 g

観察期間 : 14 日間観察

試験方法 : 検体を 1%w/v カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、約 18 時間の絶食後に単回強制経口投与した。投与容量は 20ml/kg とした。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、投与日は投与後 1 時間及びその後 2 回、投与 2 日以降は 1 日 2 回、14 日間観察した。体重は投与前日、投与後 1、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	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	> 2000	
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間及び消失時間	症状発現例なし	
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000	
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000	

死亡 ; 死亡は認められなかった。

一般状態 ; 異常は認められなかった。

体重 ; 全動物で期待通りの体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

⑧ ラットを用いた代謝分解物 の急性経口毒性試験

(資料No. 55)

試験機関 : (GLP 対応)
 報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上

供試動物 : SD ラット、約 5 週齢、1 群雌雄各 5 匹、
 体重 雄 132-147 g、雌 102-134 g

観察期間 : 14 日間観察

試験方法 : 検体を 1%w/v カルボキシルセルロース水溶液に懸濁し、約 18 時間の絶食後単回強制経口投与した。投与容量は 20ml/kg とした。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、投与日は投与後 1 時間以内に 3 回とその後 2 回、投与 2 日以降は 1 日 2 回、14 日間観察した。体重は投与前日、投与当日(1 日目)、投与 8 及び 15 日後に測定した。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	経口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	5000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	> 5000	
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	
症状発現時間及び消失時間	症状発現例なし	
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000	
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	5000	

死亡 ; 死亡は認められなかった。

一般状態 ; 異常は認められなかった。

体重 ; 全動物で期待通りの体重増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

(2) 90日間反復経口投与毒性

① ラットを用いた代謝分解物の飼料混入投与による亜急性毒性試験 (資料No. 50)

試験機関 : (GLP 対応)
 報告書作成年 : 1990 年

検体純度 : %以上
 供試動物 : SDラット、4-5 週齢、1 群雌雄各 10 匹
 体重 雄 123-151 g、雌 112-133 g
 投与期間 : 13 週間投与 (1989 年 2 月 9 日-5 月 11 日)
 試験方法 : 検体を 0、65、155 及び 350ppm の濃度で飼料に混入し、13 週間にわたって自由摂取させた。検体を混入した飼料は毎週 1 回調製した。

用量設定根拠 ;

観察・検査項目及び結果 :

一般状態及び死亡率 ; 試験期間中毎日 2 回以上観察した。さらに触診を含む詳細な観察を週 1 回行った。

一般状態に検体投与に関連した所見は認められなかった。

投与 13 週時の採血時、155ppm 群雌の 1 匹が死亡した。しかし、剖検及び病理組織学的検査においても明らかな変化は認められず、検体投与に関連したものとは認められなかった。他に死亡は無かった。

体重 ; 投与開始日 (0 日)、投与期間中は週 1 回及び解剖前に、全生存動物を対象に測定した。体重増加量の変化を次表に示す。

投与量 (ppm)	雄			雌		
	65	155	350	65	155	350
0-13週	108	106	101	92	91	83↓

Student's t-検定 ↑ ↓ : p<0.05
 表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

350ppm 群雌において体重増加量の減少が認められた。65 及び 155ppm 群雌でも対照群と比較して僅かに低下したが、統計学的な差はみられず、検体投与による影響とは考えられなかった。

雄で影響は認められなかった。

摂餌量及び食餌効率 ; 摂餌量を週 1 回測定し、食餌効率も算出した。

食餌効率は摂取量を体重増加量で除することにより算出した。

摂餌量の変化を次表に示す。

投与量 (ppm)	雄			雌		
	65	155	350	65	155	350
1-13週	106	106	103	94	102	97

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

摂餌量に検体投与による影響は認められなかった。

食餌効率の変化を次表に示す。

投与量 (ppm)	雄				雌			
	0	65	155	350	0	65	155	350
1-13週	6.0	5.8 [97]	6.0 [100]	6.1 [102]	9.9	10.1 [102]	11.0 [111]	11.6 [117]

表中の[]の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

155及び350ppm群雌では食餌効率が低下する傾向にあった。体重増加量が350ppm雌で有意に抑制されていることを考慮すると、350ppm群雌の食餌効率の低下は検体投与による影響と考えられた。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)		65	155	350
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	4.60	11.18	25.10
	雌	5.16	13.36	29.81

飲水量；投与1、3、6、9、12週に連続3日間の消費量として記録した。

投与量 (ppm)	雄			雌		
	65	155	350	65	155	350
1-12週	102	101	101	91	102	96

表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。

検体投与による影響は認められなかった。

眼科学的検査；投与開始前に全動物を、投与12週に対照群及び350ppm投与群の動物を対象に実施した。

検体投与による影響は認められなかった。

血液学的検査(末梢血)；投与12週間後に全動物を対象に、一夜絶食後、眼窩静脈叢より採血し、以下の項目について検査した。

ヘマトクリット値(PCV)、ヘモグロビン濃度(Hb)、赤血球数(RBC)、網状赤血球数、総白血球数(WBC)、白血球百分率、血小板数、プロトロンビン時間(PT)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)

対照群と比較して、統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

投与群 (ppm)	雄			雌		
	65	155	350	65	155	350
ヘマトクリット		96↓				
ヘモグロビン	96↓	97↓				
MCHC	100*				103↑	
白血球数		125↑		137↑	143↑	
リンパ球数		131↑			148↑	
プロトロンビン時間		97↓				

Student's t-検定 ↑↓*: p<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑↓: p<0.001
 表中の数値は対照群に対する変動率 (%) を表す。

検体投与による影響は認められなかった。

対照群と比較して統計学的な有意差が散見されたが、これらはいずれも生物学的意義に乏しいかあるいは用量の一貫性が認められなかったことから、毒性学的意義は無いと考えられた。

血液生化学的検査；投与 12 週間後に全動物を対象に、一夜絶食後、眼窩静脈叢より採血し、以下の項目について検査した。

アルカリホスファターゼ (AP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ (OCT)、γ-グルタミルトランスペプチターゼ (GGT)、赤血球コリンエステラーゼ、血漿コリンエステラーゼ、尿素、クレアチニン、グルコース、総ビリルビン、総蛋白、蛋白電気泳動による分画、アルブミン、A/G 比、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、塩素 (Cl)、無機リン (P)

対照群と比較して、統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

投与群 (ppm)	雄			雌		
	65	155	350	65	155	350
GGT						33↓
OCT		142↑				
尿素		88↓		83↓		83↓
クレアチニン				88↓		
総ビリルビン				75↓		
蛋白分画 α1グロブリン				133↑	133↑	
蛋白分画 α2グロブリン				150↑		
ナトリウム				102↑	102↑	102↑
塩素					101↑	
カルシウム				108↑	104↑	
無機リン		110↑		118↑	118↑	

Student's t-検定 ↑↓: p<0.05 ↑↓: p<0.01 ↑↓: p<0.001
 表中の数値は対照群に対する変動率 (%) を表す。

検体投与による影響は認められなかった。

対照群と比較して統計学的な有意差が散見されたが、これらはいずれも生物学的意義の乏しいかあるいは用量の一貫性が認められなかったことから、毒性学的意義は無いと考えられた。

尿検査 ; 投与12週間後、全動物を採尿ケージに1匹ずつ収容し、一晚絶食、絶水条件下で一夜尿を採取した。投与12週及び回復期間終了後、全動物を対象に絶食条件下で一夜尿を採取し、以下の項目について検査した。

外観、尿量、pH、比重、蛋白、還元物質、グルコース、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノ、窒素、血液色素、沈渣の鏡検

対照群と比較して、統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

投与群 (ppm)	雄				雌			
	0	65	155	350	0	65	155	350
尿量								71 ↓
pH*					6.3	6.1	6.2	6.0 ↓
比重							101 ↑	102 ↑

Student's t-検定 ↑ ↓ : p<0.05 ↑↓ : p<0.001
 表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。* : 実測値

350ppm 群雌で比重の増加を伴った尿量減少が認められ、さらにわずかに酸性に傾いた。155ppm 群雌でも比重増加が認められた。しかし、これらはすべて軽微な変化であり、組織学的変化も認められなかったことから、生理学的変動の範囲に入るものであり、毒性学的意義のない変化であると考えられた。

臓器重量 ; 投与13週終了後に全動物を解剖し、以下の臓器重量を測定し、体重比(相対)を算出した。

副腎、脳、精巣上部、心臓、腎臓、肝臓、肺(主幹気管支)、卵巣、下垂体、前立腺、唾液腺、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む)、子宮(頸部を含む)

対照群と比較して、統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

投与群 (ppm)		雄			雌		
		65	155	350	65	155	350
下垂体	相対		75 ↓				
精巣上部	実			111 ↑	-	-	-
肝臓	実						84 ↓
肺	相対						111 ↑

Dunnett's 検定 ↑ ↓ : p<0.05
 表中の数値は対照群に対する変動率(%)を表す。 - : 測定対象外

検体投与による影響は認められなかった。

対照群と比較して統計学的な有意差が散見されたが、これらはいずれも軽微な変化であり、毒性学的意義は無いと考えられた。

肉眼的病理検査；13週投与終了後、全動物を対象に、以下項目について検査した。

全ての外表及び開口部、天然孔、頸部臓器及び組織並びに頭蓋腔、胸腔、腹腔、骨盤腔、骨盤腔ならびに内部臓器

検体投与による影響は認められなかった。

病理組織学的検査；13週投与終了後、対照群及び350ppm群の全動物、採血時の死亡動物を対象に、以下の項目について検査した。また65及び155ppm群の腎臓、肝臓、肺については全動物について検査した。

副腎、大動脈、脳、盲腸、結腸、十二指腸、精巣上体、眼球と視神経、卵管、大腿骨及び膝関節、ハダ腺、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺、肝臓、肺（気管支を含む）、リンパ節（顎部及び腸間膜）、乳腺（腹部、頸部）、骨髓塗末、食道、卵巣、膵臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、坐骨神経、精囊、骨格筋（大腿部）、皮膚、脊髄、脾臓、胸骨・骨髓、胃、精巣、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）、舌、気管、膀胱、子宮（頸部を含む）、膣

主な所見を次表に示す。

投与量 (ppm)		雄				雌			
		0	65	155	350	0	65	155	350
検査動物数		10	0	0	10	10	0	0	10
腸間膜 リンパ節	皮質過形成	1			8↑	5			4

Fisher 直接確率法 ↑↓: $p < 0.01$

表中の数値は発現動物数を示す。

空欄は「0」を示す。

検体投与による影響は認められなかった。

350ppm群雄で腸間膜リンパ節の皮質過形成の発生頻度が有意に高かったが、病変の程度は微弱から軽度なものであり、さらに腸においてこの所見に関連する変化は認められなかったことから、偶発性の変化と考えられた。

以上、本剤のラットを用いた13週間混餌投与による亜急性毒性試験において、350ppm群雌で体重増加抑制及び食餌効率の低下が認められた。

155ppm群では雌雄ともに検体投与による影響は認められなかった。

従って、無毒性量は155ppm（雄11.18mg/kg/日、雌13.36mg/kg/日）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日産化学工業株式会社にある。

(3) 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

① ラットにおける代謝分解物の催奇形性試験

(資料No. 51)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1990 年

検体純度 : %以上

供試動物 : SDラット、約 9-10 週齢、1 群 21-22 匹 (交配数 ; 1 群 22 匹)
体重 198-235g

投与期間 : 妊娠 6-15 日目までの 10 日間投与 (1989 年 2 月 13 日-3 月 9 日)

試験方法 : 検体を 1%メチルセルロース水溶液に懸濁し、5.7、15.0 及び 30.0mg/kg の投与量で、妊娠 6-15 日の 10 日間、毎日 1 回強制経口投与した。投与容量は 10ml/kg とし、投与日の体重に基づいて投与容量を算出した。精子あるいは膣栓確認日を妊娠 0 日とした。対照群には溶媒のみを投与した。

用量設定根拠 ;

観察・検査項目 :

親動物 ; 一般状態及び生死の観察は毎日行った。

体重は妊娠 0、3、6-16 日の毎日、18 及び 20 日に測定した。

摂餌量は妊娠 0-2、3-5、6-9、10-12、13-15 及び 16-19 日の各期間の摂取量を測定した。妊娠 20 日に屠殺後、帝王切開し、黄体数、着床数、吸収胚数、生存胎児と死亡胎児の数及び着床位置、親動物の肉眼的病理検査を行った。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 ; 体重測定、性の判定、外表異常検査、さらに、胎盤重量及び胎盤の異常所見の記録を行った。各同腹児の約 1/2 の胎児については内臓異常の観察後、骨格標本作製し骨格異常の有無を、残りの胎児については内臓異常の有無を検査した。

結果 : 結果を次表に示す。

親動物 ; いずれの群でも死亡は認められなかった。また、検体投与に起因する症状は認められなかった。体重及び摂餌量に影響は認められず、剖検及び子宮内状況検査ではいずれの群においても検体投与に起因する所見は認められなかった。

胎児 ; 胎児重量及び性比に検体投与の影響は認められなかった。

全ての群でいくつか所見が認められたが、それらは通常この系統のラットで認められるものであり、検体投与に起因する奇形・異常・変異は認められなかった。

以上、本剤のラットを用いた器官形成期強制経口投与による催奇形性試験において、30.0mg/kg/日以下の用量で親動物及び胎児に検体投与による影響は認められなかった。従って、本試験における無毒性量は親動物及び胎児共に 30.0mg/kg/日と判断され、最高投与量の 30.0 mg/kg/日でも催奇形性は認められなかった。

投与量 (mg/kg/日)		0	5.7	15.0	30.0	
1群当たりの動物数		22	22	22	22	
親動物	死亡動物数	0	0	0	0	
	非妊娠動物数	0	1	1	0	
	妊娠動物数	22	21	21	22	
	妊娠率 (%) ^{a)}	100	95	95	100	
	一般状態	特記すべき症状なし				
	体重増加量 (g)	(0-6日)	32	36[113]	35[109]	33[103]
		(6-20日)	125	131[105]	133[106]	124[99]
	摂餌量 (g/ラット/日)	(0-2日)	24	24[100]	25[104]	24[100]
		(3-5日)	26	27[104]	28[108]	26[100]
		(6-9日)	27	28[104]	28[104]	27[100]
		(10-12日)	30	30[100]	31[103]	29[97]
		(13-15日)	29	30[103]	30[103]	29[100]
		(16-19日)	30	31[103]	31[103]	30[100]
	剖検所見		検体投与に起因する所見なし			
着床所見	検査親動物数	22	21	22	22	
	黄体数	15.2	15.9	15.6	15.6	
	着床数	14.1	14.5	14.3	14.2	
	早期吸収胚数	0.73	0.67	0.50	0.64	
	後期吸収胚数	0.05	0.05	0.09	0.05	
	総吸収胚数	0.77	0.71	0.59	0.68	
	生存胎児数	13.4	13.8	13.7	13.5	
	着床前吸収胚率(%)	6.9	8.7	8.7	9.3	
	着床後吸収胚率(%)	5.5	4.9	4.1	4.8	
	着床前胚率(%)	11.6	7.9	5.4	11.4	
	着床後胚率(%)	6.1	7.1	6.1	9.6	
	胎盤重量(g)	0.49	0.50	0.52	0.47	

分散分析、Student's t-検定及びMann-Whitney U-検定

a) : 妊娠率 (%) は、申請者が報告書の Appendix3 を基に算出した値。

[]内の数値は対照群に対する変動率(%)

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

投与量 (mg/kg/日)		0	5.7	15.0	30.0		
検査親動物数		22	21	22	22		
平均生存胎児体重(g)		3.56	3.48	3.51	3.45		
生存胎児の性比(雄:雌)		145:149	133:156	152:149	151:147		
検査胎児数(腹)		294(22)	289(21)	301(22)	298(22)		
胎児	外表	検査胎児数	294	289	301	298	
		内訳	異常胎児 (%) ^{b)}	0.3			
			鎖肛 (%)	0.7			
			糸状尾 (%)	0.7			
			羊水の暗調化 (%)				4.5
胎児	内臓	検査胎児数	148	145	152	151	
		内訳	一側性小眼症 (%)				0.8
			心臓の血管異常 (%)			0.7	
			甲状腺小葉縮小 (%)		0.8	0.7	2.7
			膀胱拡張 (%)				0.6
			各種臓器出血 (%) ^{c)}	32.8	46.9	43.7	50.1
			皮下浮腫 (%)	13.7	17.7	20.3	24.3
胎児	骨格	検査胎児数	146	144	143 ^{e)}	147	
		内訳	異常胎児 (%) ^{d)}			0.6	
			後頭骨の骨化遅延	11.0	12.8	16.0	19.7
			前頭骨の不連続未骨化部				0.8
			頸肋				0.6
			肋骨(14/14)				0.6
			非対称性骨盤		0.7	1.5	1.6

分散分析、Student's t-検定及びMann-Whitny U-検定

b) : 腰部脊椎の形成不全、手根部の彎曲等

c) : 申請者が報告書のAppendix7を基に算出した値

d) : 胸廓、肩甲骨及び後肢の異常と全身の化骨遅延をもつ小胎児

e) : 1腹(親動物No.63)の胎児6匹は、標本作製時の事故のため検査できず。

注) : 空欄は異常なし

(4) 変異原性

① 細菌を用いた代謝分解物の復帰突然変異試験

(資料No. 59)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上

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 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下及び非存在下で Ames の方法で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) に懸濁させ処理した。

本試験の濃度範囲を0、50、158、500、1580及び5000 μ g/プレートとし、全ての菌株及び全ての用量について3枚ずつのプレートを用い、試験は2回繰り返し行った。

陽性対照としてベンゾ[a]ピレン (BaP)、2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (SA)、2-アミノアントセン (2AA)、9-アミノアクリジン (9Aa)、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン (ENNG) を用いた。

用量設定根拠 ;

結果 : 結果を次表に示す。

検体は、活性化法を含め、50-5000 μ g/プレートの濃度で、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。5000 μ g/プレートでは全菌株において、復帰変異コロニー数の減少が少なくとも1回は認められた。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。

以上の結果から、本剤は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発能を有し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日産化学工業株式会社にある。

表 試験結果 (1回目)

薬物	濃度 μg/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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	115	19	20	32	9	
検体	50	-	113	17	20	33	9	
	158	-	113	20	21	35	8	
	500	-	115	20	21	34	7	
	1580	-	115	20	21	29	7	
	5000	-	83	18	17	25	4	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	115	18	20	34	8	
検体	50	+	114	18	22	36	8	
	158	+	113	20	21	35	7	
	500	+	115	18	21	34	7	
	1580	+	108	18	20	28	7	
	5000	+	86	15	18	23	3	
陽性 対照	BaP	5	-	109			29	7
	2NF	1	-				299	
	SA	0.5	-	486	515			
	2AA	2	-		17			
		5	-			17		
	9Aa	50	-					283
	ENNG	2	-			159		
	BaP	5	+	780			629	319
2AA	2	+		371				
	5	+			210			

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

DMSO : ジメチルスルホキシド

BaP : ベンゾ[a]ピレン

2NF : 2-ニトロフルオレン

SA : アジ化ナトリウム

2AA : 2-アミノアントラセン

9Aa : 9-アミノアクリジン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

表 試験結果 (2回目)

薬物	濃度 μg/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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	-	-	115	21	22	36	8	
検体	50	-	117	21	22	38	8	
	158	-	117	20	21	35	7	
	500	-	116	20	21	37	7	
	1580	-	114	20	19	36	7	
	5000	-	113	12	19	24	7	
溶媒対照 (DMSO)	-	+	115	19	22	37	8	
検体	50	+	114	19	21	37	7	
	158	+	114	19	22	38	8	
	500	+	115	21	21	36	7	
	1580	+	114	19	21	35	7	
	5000	+	113	11	21	38	6	
陽性 対照	BaP	5	-	109			29	6
	2NF	1	-				286	
	SA	0.5	-	469	644			
	2AA	2	-		19			
		5	-			21		
	9Aa	50	-					904
	ENNG	2	-			126		
	BaP	5	+	693			434	255
2AA	2	+		450				
	5	+			142			

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

DMSO : ジメチルスルホキシド

2NF : 2-ニトロフルオレン

2AA : 2-アミノアントラセン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

BaP : ベンゾ[a]ピレン

SA : ソル化ナトリウム

9Aa : 9-アミノアクリジン

② 細菌を用いた代謝分解物の復帰突然変異試験

(資料No. 62)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1990 年

検体純度 : %以上

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 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法で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) に懸濁させ処理した。

本試験の濃度範囲をサルモネラ菌では0、25、79、250、790、2500 μ g/プレート、大腸菌では0、50、158、500、1580、5000 μ g/プレートの用量として、全ての菌株及び全ての用量について3枚ずつのプレートを用い、試験は2回繰り返し行った。

陽性対照としてベンゾ[a]ピレン (BaP)、2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (SA)、2-アミアントラセン (2AA)、9-アミアクリジン (9Aa)、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン (ENNG) を用いた。

用量設定根拠 ;

結果 : 結果を次表に示す。

検体は、活性化法を含め、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。一方、陽性対照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。

以上の結果から、本剤は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発能を有しないものと判断された。

試験結果 (1回目)

1) サルネリ菌株

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異コロニー数				
			塩基置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	—	—	114	18	36	7	
検体	25	—	114	17	34	7	
	79	—	113	16	37	7	
	250	—	111	16	35	7	
	790	—	115	17	31	7	
	2500	—	108	12	32	7	
対照 (DMSO)	—	+	113	18	36	8	
検体	25	+	112	17	37	6	
	79	+	114	17	34	8	
	250	+	115	16	35	7	
	790	+	112	16	35	6	
	2500	+	94	7	16	4	
陽性対照	BaP	5	—	112		32	7
	2NF	1	—			463	
	SA	0.5	—	367	395		
	2AA	2	—		14		
	9Aa	50	—				387
	BaP	5	+	898		401	197
	2AA	2	+		390		

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

DMSO:ジメチルスルホキシド

BaP:ベニゾ[a]ピレン

2NF:2-ニトロフルオレン

SA:アゾ化ナトリウム

2AA:2-アミノアントラセン

9Aa:9-アミノアクリジン

2) 大腸菌株

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異 コロニー数
			塩基置換型 (WP2 uvrA)
対照 (DMSO)	—	—	24
検体	50	—	25
	158	—	25
	500	—	27
	1580	—	27
	5000	—	22
対照 (DMSO)	—	+	25
検体	50	+	26
	158	+	24
	500	+	24
	1580	+	24
	5000	+	16
陽性対照 2AA	5	—	23
ENNG	2	—	91
2AA	5	+	266

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

DMSO:ジメチルスルホキシド

2AA:2-アミノアントラセン

ENNG:N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソアミン

試験結果 (2回目)

1) サルモネラ菌株

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異コロニー数				
			塩基置換型		フレームシフト型		
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	—	—	113	16	32	7	
検体	25	—	114	17	32	7	
	79	—	114	15	31	8	
	250	—	112	15	33	7	
	790	—	114	14	32	7	
	2500	—	112	13	30	6	
対照 (DMSO)	—	+	112	16	32	7	
検体	25	+	113	13	32	6	
	79	+	113	15	32	7	
	250	+	115	13	33	6	
	790	+	111	15	30	6	
	2500	+	113	14	28	7	
陽性対照	BaP	5	—	10		35	5
	2NF	1	—			183	
	SA	0.5	—	394	318		
	2AA	2	—		17		
	9Aa	50	—				231
	BaP	5	+	326		309	218
	2AA	2	+		280		

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

DMSO:ジメチルスルホキシド

BaP:ベンゾ[a]ピレン

2NF:2-ニトロフルオレン

SA:アジ化ナトリウム

2AA:2-アミノアントラセン

9Aa:9-アミノアクリジン

2) 大腸菌株

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異 コロニー数
			塩基置換型 (WP2 uvrA)
対照 (DMSO)	—	—	22
検体	50	—	24
	158	—	21
	500	—	20
	1580	—	22
	5000	—	20
対照 (DMSO)	—	+	23
検体	50	+	24
	158	+	21
	500	+	21
	1580	+	21
	5000	+	20
陽性対照 2AA	5	—	20
ENNG	2	—	102
2AA	5	+	125

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

DMSO:ジメチルスルホキシド

2AA:2-アミノアントラセン

ENNG:N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソクアニジン

③ 細菌を用いた代謝分解物の復帰突然変異試験

(資料No. 70)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1995 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、TA1538、TA100、TA1535、TA1537 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法で復帰変異原性を検定した。

検体は蒸留水に溶解して処理した。

本試験の濃度範囲を0、50、158、500、1580及び5000 μ g/プレートとし、全ての菌株及び全ての用量について3枚ずつのプレートを用い、試験は2回繰り返した。

陽性対照としてベンゾ[a]ピレン (BaP)、2-ニトロフルオレン (2NF)、アゾ化ナトリウム (SA)、2-アミノアントラセン (2AA)、9-アミノアクリジン (9Aa)、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン (ENNG) を用いた。

用量設定根拠 ;

結果 : 結果を次表に示す。

検体は、活性化法を含め、50-5000 μ g/プレートの濃度で、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。一方、陽性対照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。

以上の結果から、本剤は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発能を有し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日産化学工業株式会社にある。

試験結果 (1回目)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異コロニー数						
			塩基置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1538	TA1537	
対照 (蒸留水)	—	—	106	14	521	31	18	7	
検体	50	—	118	10	49	28	15	8	
	158	—	120	14	42	30	17	7	
	500	—	115	10	42	29	14	7	
	1580	—	107	12	49	249	14	7	
	5000	—	116	10	47	24	12	8	
対照 (蒸留水)	—	+	116	12	44	29	12	11	
検体	50	+	125	12	51	27	13	12	
	158	+	123	14	55	30	14	8	
	500	+	110	12	54	26	15	10	
	1580	+	110	11	48	32	11	9	
	5000	+	101	8	43	31	11	9	
陽性 対照	BaP	5	—	86			21	11	12
	2NF	1	—				113		
		2	—					298	
	SA	2	—	559	435				
	2AA	2	—		21				
		10	—			46			
	9Aa	80	—						2112
	ENNG	2	—			416			
	BaP	5	+	954			504	267	214
2AA	2	+		201					
	10	+			884				

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

2NF : 2-ニトロフルオレン

2AA : 2-アミノアントラセン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン

BaP : ベンゾ[a]ピレン

SA : アジ化ナトリウム

9Aa : 9-アミノアクリジン

試験結果 (2回目)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異コロニー数						
			塩基置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1538	TA1537	
対照 (蒸留水)	—	—	116	14	51	27	12	12	
検体	50	—	111	16	47	27	8	12	
	158	—	104	10	48	31	10	11	
	500	—	112	13	46	30	10	8	
	1580	—	114	12	47	29	10	11	
	5000	—	109	14	45	23	11	8	
対照 (蒸留水)	—	+	110	15	51	28	12	12	
検体	50	+	118	13	48	25	10	9	
	158	+	107	11	40	31	10	9	
	500	+	113	13	43	25	10	10	
	1580	+	119	12	48	29	8	8	
	5000	+	109	13	43	23	10	10	
陽性 対照	BaP	5	—	116			21	15	9
	2NF	1	—				140		
		2	—					319	
	SA	2	—	855	619				
	2AA	2	—		17				
		10	—			57			
	9Aa	80	—						1937
	ENNG	2	—			368			
BaP	5	+	733			560	200	174	
2AA	2	+		283					
	10	+			956				

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

2NF : 2-ニトロフルオレン

2AA : 2-アミノアントラセン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

BaP : ベンゾ[a]ピレン

SA : ソル化ナトリウム

9Aa : 9-アミノアクリジン

④ 細菌を用いた代謝分解物の復帰突然変異試験

(資料No. 72)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1996 年

検体純度 : %

試験方法 : ヒスタジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA1538、TA100、TA1535、TA1537 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法で復帰変異原性を検定した。

検体は蒸留水に溶解して処理した。

本試験の濃度範囲を0、50、158、500、1580及び5000 μ g/プレートとし、全ての菌株及び全ての用量について3枚ずつのプレートを用い、試験は2回繰り返し行った。

陽性対照としてベンゾ [a]ピレン (BaP)、2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (SA)、2-アミノアントラセン (2AA)、9-アミノアクリジン (9Aa)、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン (ENNG) を用いた。

用量設定根拠 ;

結果 : 結果を次表に示す。

検体は、活性化法を含め、50-5000 μ g/プレートの濃度で、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。一方、陽性対照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。

以上の結果から、本剤は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発能を有しないものと判断された。

試験結果 (1回目)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異コロニー数						
			塩基置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1538	TA1537	
対照 (蒸留水)	—	—	117	13	55	29	14	10	
検体	50	—	109	14	52	28	9	8	
	158	—	100	12	50	29	12	8	
	500	—	111	12	44	22	13	12	
	1580	—	100	13	45	21	11	7	
	5000	—	110	12	46	22	14	7	
対照 (蒸留水)	—	+	117	14	56	34	15	12	
検体	50	+	110	10	43	32	13	8	
	158	+	102	17	58	27	11	9	
	500	+	117	13	46	28	11	8	
	1580	+	99	17	48	29	10	10	
	5000	+	106	11	38	27	11	7	
陽性 対照	BaP	5	—	119			34	13	10
	2NF	1	—				131		
		2	—					258	
	SA	2	—	681	860				
	2AA	2	—		14				
		10	—			58			
	9Aa	80	—						2980
	ENNG	2	—			563			
	BaP	5	+	561			487	201	149
2AA	2	+		440					
	10	+			1072				

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

2NF : 2-ニトロフルオレン

2AA : 2-アミノアントラセン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

BaP : ベンゾ[a]ピレン

SA : アジ化ナトリウム

9Aa : 9-アミノアクリジン

試験結果 (2回目)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異コロニー数						
			塩基置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1538	TA1537	
対照 (蒸留水)	—	—	114	16	60	29	13	10	
検体	50	—	117	14	60	25	15	9	
	158	—	100	16	49	25	9	9	
	500	—	106	12	50	27	11	9	
	1580	—	108	16	38	26	11	7	
	5000	—	94	14	50	21	11	0	
対照 (蒸留水)	—	+	117	17	9	30	13	10	
検体	50	+	124	11	57	32	16	9	
	158	+	119	12	63	36	10	8	
	500	+	111	17	58	25	11	10	
	1580	+	111	13	54	25	11	10	
	5000	+	97	11	43	29	12	10	
陽性 対照	BaP	5	—	114			34	15	10
	2NF	1	—				150		
		2	—					328	
	SA	2	—	659	769				
	2AA	2	—		16				
		10	—			59			
	9Aa	80	—						4111
	ENNG	2	—			664			
	BaP	5	+	434			564	184	192
2AA	2	+		455					
	10	+			893				

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

2NF : 2-ニトロフラゼン

2AA : 2-アミノアントラセン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソクシアニン

BaP : ベンゾ[a]ピレン

SA : ソジウムアゾ化ナトリウム

9Aa : 9-アミノアクリジン

⑤ 細菌を用いた代謝分解物の復帰突然変異試験

(資料No. 52)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上

試験方法 : ヒスジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で Ames の方法で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) に懸濁させ処理した。

本試験の濃度範囲を0、50、158、500、1580及び5000 μ g/プレートとし、全ての菌株及び全ての用量について3枚ずつのプレートを用い、試験は2回繰り返し行った。

陽性対照としてベンゾ[a]ピレン (BaP)、2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (SA)、2-アミノアントラセン (2AA)、9-アミノアクリジン (9Aa)、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン (ENNG) を用いた。

用量設定根拠 ;

結果 : 結果を次表に示す。

検体は、活性化法を含め、50-5000 μ g/プレートの濃度で、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。一方、陽性対照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。

以上の結果から、本剤は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発能を有しないものと判断された。

試験結果 (1回目)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異コロニー数					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	—	—	121	20	20	33	9	
検体	50	—	118	20	19	34	9	
	158	—	120	20	19	33	8	
	500	—	119	20	21	34	8	
	1580	—	120	20	20	34	8	
	5000	—	114	18	21	30	7	
対照 (DMSO)	—	+	115	19	21	33	9	
検体	50	+	114	19	21	35	8	
	158	+	114	22	19	34	9	
	500	+	115	19	20	35	7	
	1580	+	119	19	18	35	8	
	5000	+	116	19	17	37	8	
陽性 対照	BaP	5	—	115			30	7
	2NF	1	—				224	
	SA	0.5	—	449	578			
	2AA	2	—		20			
		5	—			19		
	9Aa	50	—					699
	ENNG	2	—			130		
	BaP	5	+	742			440	231
2AA	2	+		326				
	5	+			123			

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

DMSO : ジメチルスルホキシド

BaP : ベンゾ[a]ピレン

2NF : 2-ニトロフルオレン

SA : アシ化ナトリウム

2AA : 2-アミノアントラセン

9Aa : 9-アミノアクリジン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

試験結果 (2回目)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異コロニー数					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	—	—	112	20	22	33	8	
検体	50	—	113	21	23	32	7	
	158	—	111	21	22	33	8	
	500	—	112	21	21	32	7	
	1580	—	111	21	22	31	8	
	5000	—	99	21	19	29	8	
対照 (DMSO)	—	+	111	20	23	35	8	
検体	50	+	112	20	20	35	8	
	158	+	111	19	21	37	7	
	500	+	112	19	21	36	7	
	1580	+	111	19	21	32	8	
	5000	+	109	14	11	22	7	
陽性 対照	BaP	5	—	108			29	6
	2NF	1	—				210	
	SA	0.5	—	548	629			
	2AA	2	—		18			
		5	—			20		
	9Aa	50	—					341
	ENNG	2	—			127		
	BaP	5	+	1075			757	286
2AA	2	+		427				
	5	+			150			

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

DMSO : ジメチルスルホキシド

BaP : ベンゾ[a]ピレン

2NF : 2-ニトロフルオレン

SA : アジ化ナトリウム

2AA : 2-アミノアントラセン

9Aa : 9-アミノアクリジン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソクアジシン

⑥ 細菌を用いた代謝分解物の復帰突然変異試験

(資料No. 56)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上

試験方法 : ヒスジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 uvrA 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9mix) の存在下及び非存在下で Ames の方法で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) に懸濁させ処理した。

本試験の濃度範囲を0、50、158、500、1580及び5000 μ g/プレートとし、全ての菌株及び全ての用量について3枚ずつのプレートを用い、試験は2回繰り返し行った。

陽性対照としてベンゾ[a]ピレン (BaP)、2-ニトロフルオレン (2NF)、アジ化ナトリウム (SA)、2-アミノアントラセン (2AA)、9-アミノアクリジン (9Aa)、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (ENNG) を用いた。

用量設定根拠 ;

結果 : 結果を次表に示す。

検体は、活性化法を含め、50-5000 μ g/プレートの濃度で、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を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。

以上の結果から、本剤は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発能を有しないものと判断された。

試験結果 (1 回目)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異コロニー数					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	—	—	116	20	25	45	8	
検体	50	—	114	19	23	47	8	
	158	—	113	19	23	49	8	
	500	—	112	20	22	42	8	
	1580	—	101	20	20	39	7	
	5000	—	52	7	15	28	4	
対照 (DMSO)	—	+	115	19	23	42	8	
検体	50	+	114	17	25	42	9	
	158	+	114	20	24	42	7	
	500	+	117	20	23	38	7	
	1580	+	72	19	21	37	7	
	5000	+	56	16	22	24	5	
陽性 対照	BaP	5	—	111			39	5
	2NF	1	—				280	
	SA	0.5	—	580	465			
	2AA	2	—		17			
		5	—			22		
	9Aa	50	—					377
	ENNG	2	—			117		
	BaP	5	+	719			396	340
2AA	2	+		325				
	5	+			128			

表中の復帰変異コロニー数は3枚のプレートの平均値

DMSO : ジメチルスルホキシド

2NF : 2-ニトロフルオレン

2AA : 2-アミノアントラセン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

BaP : ベンゾ[a]ピレン

SA : アジ化ナトリウム

9Aa : 9-アミノアクリジン

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

試験結果 (2回目)

薬物	濃度 μg/プレート	S-9mix の有無	プレート当り復帰変異コロニー数					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
対照 (DMSO)	—	—	114	18	25	37	9	
検体	50	—	112	17	23	34	7	
	158	—	112	18	21	35	7	
	500	—	113	17	23	34	8	
	1580	—	112	17	22	31	7	
	5000	—	44	13	21	20	5	
対照 (DMSO)	—	+	112	17	26	37	8	
検体	50	+	114	17	23	34	8	
	158	+	114	17	23	36	7	
	500	+	113	17	24	32	7	
	1580	+	111	13	24	33	8	
	5000	+	50	12	24	32	3	
陽性 対照	BaP	5	—	107			33	7
	2NF	1	—				167	
	SA	0.5	—	399	302			
	2AA	2	—		14			
		5	—			31		
	9Aa	50	—					232
	ENNG	2	—			135		
	BaP	5	+	673			335	224
2AA	2	+		352				
	5	+			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

DMSO : ジメチルスルホキシド

BaP : ベンゾ[a]ピレン

2NF : 2-ニトロフロレン

SA : アジ化ナトリウム

2AA : 2-アミノアントラセン

9Aa : 9-アミノアクリジン

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン

⑦ マスを用いた代謝分解物 の小核試験

(資料No. 53)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上

試験動物 : ICR 系マス、約 5-6 週齢、1 群雌雄各 5 匹 (対照群及び 3000mg/kg 群は 15 匹)
体重 雄 22.5-30.3 g、雌 18.5-24.0 g

試験期間 : 3 日間観察

試験方法 : 検体を 1%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、0、300、1000 及び 3000mg/kg の用量で単回強制経口投与した。投与容量は 30ml/kg とした。

全群について投与 24 時間後に、さらに対照群及び 3000mg/kg 投与群については投与 48 及び 72 時間後に、生存動物を屠殺して骨髓を採取し、メイグリュワルト・ギムザ染色により骨髓塗抹標本を作製した。各標本について、最低赤血球 2000 個を観察し、小核を有する赤血球数を計数した。また、多染性赤血球数と成熟赤血球数の比を算出した。

その他、一般状態及び生死の観察を毎日行い、体重は投与及び屠殺の直前に測定した。

用量設定根拠 ;

結果 : 一般状態に異常は認められず、死亡も認められなかった。体重の減少及び増加抑制が認められたが、極めて僅かであり検体投与による毒性を示すものとは考えられなかった。

骨髓標本観察結果を次表に示す。

雌雄いずれにおいても、検体投与群と溶媒対照群で小核を有する多染性赤血球数に差は認められなかった。

一方、陽性対照群では小核を有する多染性赤血球数が有意に増加した。

以上の結果から、本剤は本試験条件下で、マスの骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体あるいは分裂機構に対する損傷性は陰性であると考えられた。

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

薬物	投与量 mg/kg	骨髓標本 採取時間 (時間)	性	動物 数	生 存 数	小核を有する 多染性赤血球 (%) ^{a)}	小核を有する 成熟赤血球 (%) ^{a)}	多染性赤血球 数と成熟赤血 球数の比
溶媒 対照	—	24	雄	5	5	1.9	0.9	0.9
			雌			0.8	0.2	0.8
		48	雄			3.0	0.1	0.7
			雌			0.6	0.6	0.8
		72	雄			1.6	0.0	0.9
			雌			1.0	0.2	0.8
検体	300	24	雄			0.7	1.5	0.9
			雌			0.9	0.7	1.0
	1000	24	雄			1.2	0.2	0.9
			雌			1.2	1.3	0.9
	3000	24	雄			0.3	0.9	1.0
			雌			0.2	0.2	0.8
		48	雄	1.9	0.7	0.9		
			雌	0.5	0.7	1.0		
		72	雄	1.0	0.8	0.9		
			雌	0.9	0.3	0.9		
	陽性 対照	30	24	雄	54.5 ^{**}	0.4	0.7	
				雌	66.7 ^{**}	0.8	0.5	

溶媒対照：1%CMC 陽性対照：クロラムフェニル

Mann-Whitney 検定 **：p<0.01

a)：赤血球 1000 個当たりの頻度

⑧ 細菌を用いた代謝分解物のDNA修復試験

(資料No. 60)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上

試験方法 : 大腸菌 *Escherichia coli* の組換修復機構保持株 (WP2 株) と欠損株 (WP67 株及び CM871 株) を用い、代謝活性化及び非活性化法によって DNA 損傷誘発性を検定した。検体を DMSO に懸濁し、0、100、316、1000、3160、10000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度について 2 連で試験を行った。処理時間は各々 2 及び 18 時間とした。各濃度で 1 プレートにつき 3 スポットの生存コロニー数を記録し、無処理対照群に対する生存率を算出した。さらに、生存係数 (C_s ; 欠損株の平均生存率 / 保持株の平均生存率) も算出した。

判定は、 C_s が 0.1 以下を陽性、0.3 以下を疑陽性とした。

用量設定根拠 ;

結果 : 試験結果を次表に示す。

検体は 3 菌株に対してほとんど毒性を示さなかった。いずれの菌株においても S-9mix の有無に関わらず、生存率は 101.03% (2 時間処理)、あるいは 79.86% (18 時間以下) より下がることはなかった。欠損株における生存係数は、2 あるいは 18 時間処理のいずれにおいても 0.94 以下になることはなかった。

一方、陽性対照群では、生存率及び生存係数に有意な低下が認められた。

以上の結果から、代謝活性化法を含む本試験条件下で、本剤の DNA 損傷誘起性は陰性と判断された。

表 試験結果

薬物	濃度 μg/ml	処理 時間	S-9mix の有無	無処理対照群に対する 生存率 (%)			生存係数	
				WP2	WP67	CM871	WP67	CM871
溶媒対照 (DMSO)	—	2	—	106.38	139.17	122.60	1.31	1.15
検体	100		—	105.88	134.31	120.66	1.27	1.14
	316		—	101.03	132.37	116.25	1.31	1.15
	1000		—	101.03	133.98	122.60	1.33	1.21
	3160		—	105.11	132.37	119.83	1.26	1.14
	10000		—	106.38	131.71	119.01	1.24	1.12
	陰性対照 (アンピシリン)		25	—	9.08	62.78	9.78	6.91
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.05		—	98.73	1.23	2.0×10^{-2}	1.2×10^{-2}	2.0×10^{-4}
溶媒対照 (DMSO)	—		+	102.82	146.60	119.29	1.43	1.16
検体	100		+	106.64	144.33	120.66	1.35	1.13
	316		+	104.59	144.33	123.42	1.38	1.18
	1000		+	105.88	144.02	121.21	1.36	1.14
	3160		+	103.83	146.27	127.27	1.41	1.23
	10000		+	107.41	145.63	116.25	1.36	1.08
	陽性対照 (2-アミノアントラセン)	5	—	101.29	131.71	122.60	1.30	1.21
		+	97.46	98.70	3.22	1.01	3.3×10^{-2}	
溶媒対照 (DMSO)	—	18	—	105.28	105.07	113.81	1.00	1.08
検体	100		—	96.40	100.00	110.48	1.04	1.15
	316		—	93.28	95.73	112.01	1.03	1.20
	1000		—	96.88	91.20	108.95	0.94	1.12
	3160		—	97.12	102.40	110.48	1.05	1.14
	10000		—	79.86	88.53	110.99	1.11	1.39
	陰性対照 (アンピシリン)		25	—	2.5×10^{-4}	1.0×10^{-3}	8.3×10^{-4}	4.00
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.05		—	76.01	0.11	1.7×10^{-4}	1.4×10^{-3}	2.2×10^{-6}
溶媒対照 (DMSO)	—		+	113.42	123.47	109.97	1.09	0.97
検体	100		+	110.32	121.33	111.75	1.10	1.01
	316		+	107.91	118.40	110.48	1.10	1.02
	1000		+	113.91	116.53	108.44	1.02	0.95
	3160		+	113.91	115.47	112.28	1.02	0.99
	10000		+	107.91	116.27	104.34	1.08	0.97
	陽性対照 (2-アミノアントラセン)	5	—	70.50	94.40	114.82	1.34	1.63
		+	97.37	102.13	3.20	1.05	3.3×10^{-2}	

数値は2プレート(3スポット/プレート)の平均値。

DMSO:ジメチルスルホキシド

⑨ 細菌を用いた代謝分解物のDNA修復試験

(資料No. 63)

試験機関 : (GLP 対応)
報告書作成年 : 1990 年

検体純度 : %以上

試験方法 : 大腸菌 *Escherichia coli* の組換修復機構保持株 (WP2 株) と欠損株 (WP67 株及び CM871 株) を用い、代謝活性化及び非活性化法によって DNA 損傷誘発性を検定した。検体を DMSO に懸濁し、0、100、316、1000、3160、10000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度について 2 連で試験を行った。処理時間は各々 2 及び 18 時間とした。各濃度で 1 プレートにつき 3 スポットの生存コロニー数を記録し、無処理対照群に対する生存率を算出した。さらに、生存係数 (C_s ; 欠損株の平均生存率 / 保持株の平均生存率) も算出した。

判定は、 C_s が 0.1 以下を陽性、0.3 以下を疑陽性とした。

用量設定根拠 ;

結果 : 試験結果を次表に示す。

検体は 2 時間処理において、3 菌株に対してほとんど毒性を示さず、S-9mix の有無に関わらず、生存率は 59.04% 以下にはならなかった。18 時間処理では全ての菌株において著明な生存菌数の減少が認められたが、欠損株における生存係数は、2 あるいは 18 時間処理のいずれにおいても 0.63 以下になることはなかった。

一方、陽性対照群では、生存率及び生存係数に有意な低下が認められた。

以上の結果から、代謝活性化法を含む本試験条件下で、本剤の DNA 損傷誘起性は陰性と判断された。

表 試験結果

薬物	濃度 μg/ml	処理 時間	S-9mix の有無	無処理対照群に対する 生存率 (%)			生存係数	
				WP2	WP67	CM871	WP67	CM871
溶媒対照 (DMSO)	—	2	—	103.53	101.68	100.00	0.98	0.97
検体	100		—	98.56	99.50	99.44	1.01	1.01
	316		—	98.56	96.81	98.88	0.98	1.00
	1000		—	92.02	93.80	97.90	1.02	1.06
	3160		—	71.33	91.29	84.87	1.28	1.19
	10000		—	59.04	84.75	72.41	1.44	1.23
陰性対照 (アンピシリン)	25		—	0.60	5.66	6.05	9.43	10.08
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.05		—	71.73	1.31	1.9×10^{-2}	1.8×10^{-2}	2.6×10^{-4}
溶媒対照 (DMSO)	—		+	96.99	130.98	106.87	1.35	1.10
検体	100		+	92.81	128.97	108.97	1.39	1.17
	316		+	94.11	117.76	105.46	1.25	1.12
	1000		+	92.81	113.57	104.62	1.22	1.13
	3160		+	88.09	111.89	96.22	1.27	1.09
	10000		+	91.49	116.08	94.54	1.27	1.03
陽性対照 (2-アミノアントラセン)	5	—	67.67	94.97	98.46	1.40	1.46	
		+	82.99	91.96	0.12	1.11	1.4×10^{-3}	
溶媒対照 (DMSO)	—	18	—	95.90	95.29	102.70	0.99	1.07
検体	100		—	96.46	95.18	92.25	0.99	0.96
	316		—	80.34	82.85	90.81	1.03	1.13
	1000		—	64.77	53.81	86.67	0.83	1.34
	3160		—	53.50	34.75	65.59	0.65	1.23
	10000		—	28.98	33.30	58.19	1.15	2.01
陰性対照 (アンピシリン)	25		—	1.9×10^{-3}	7.8×10^{-3}	2.2×10^{-2}	4.11	11.58
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.05		—	93.57	1.4×10^{-2}	7.8×10^{-4}	1.5×10^{-4}	8.3×10^{-6}
溶媒対照 (DMSO)	—		+	98.04	86.21	111.89	0.88	1.14
検体	100		+	72.51	85.20	107.03	1.18	1.48
	316		+	67.38	81.17	101.81	1.20	1.51
	1000		+	65.15	69.95	97.11	1.07	1.49
	3160		+	66.82	42.26	87.38	0.63	1.31
	10000		+	58.34	37.67	69.73	0.65	1.20
陽性対照 (2-アミノアントラセン)	5	—	82.86	93.27	76.40	1.13	0.92	
		+	83.41	82.96	0.16	0.99	1.9×10^{-3}	

数値は2プレート(3スポット/プレート)の平均値。

DMSO: ジメチルスルホキシド

⑩ 細菌を用いた代謝分解物のDNA修復試験

(資料No. 54)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上

試験方法 : 大腸菌 *Escherichia coli* の組換修復機構保持株 (WP2 株) と欠損株 (WP67 株及び CM871 株) を用い、代謝活性化及び非活性化法によって DNA 損傷誘発性を検定した。検体を DMSO に懸濁し、0、100、316、1000、3160、10000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度について 2 連で試験を行った。処理時間は各々 2 及び 18 時間とした。

各濃度で 1 プレートにつき 3 スポットの生存コロニー数を記録し、無処理対照群に対する生存率を算出した。さらに、生存係数 (C_s ; 欠損株の平均生存率 / 保持株の平均生存率) も算出した。

判定は、 C_s が 0.1 以下を陽性、0.3 以下を疑陽性とした。

用量設定根拠 ;

結果 : 試験結果を次表に示す。

検体は 3 菌株に対して弱い毒性を示したが、いずれの菌株においても S-9mix の有無に関わらず、生存率は 60% (2 時間処理)、あるいは 80.99% (18 時間) より下がることはなかった。欠損株における生存係数は、2 あるいは 18 時間処理のいずれにおいても 0.69 以下になることはなかった。

一方、陽性対照群では、生存率及び生存係数に有意な低下が認められた。

以上の結果から、代謝活性化法を含む本試験条件下で、本剤の DNA 損傷誘起性は陰性と判断された。

表 試験結果

薬物	濃度 μg/ml	処理 時間	S-9mix の有無	無処理対照群に対する 生存率 (%)			生存係数	
				WP2	WP67	CM871	WP67	CM871
溶媒対照 (DMSO)	—	2	—	78.12	101.08	95.76	1.29	1.23
検体	100		—	87.55	95.67	60.00	1.09	0.69
	316		—	85.07	83.39	69.40	0.98	0.82
	1000		—	68.15	76.18	65.45	1.12	0.96
	3160		—	83.07	66.06	70.00	0.80	0.84
	10000		—	77.61	84.10	77.87	1.08	1.00
陰性対照 (アンピシリン)	25		—	4.63	17.26	3.51	3.73	0.76
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.05		—	78.12	1.08	1.1×10^{-2}	1.4×10^{-2}	1.4×10^{-4}
溶媒対照 (DMSO)	—		+	121.40	79.42	68.78	0.65	0.57
検体	100		+	97.52	83.39	68.49	0.86	0.70
	316		+	87.07	78.34	66.05	0.90	0.76
	1000		+	85.58	77.97	60.00	0.91	0.70
	3160		+	95.52	82.67	67.58	0.87	0.71
	10000		+	102.00	94.93	74.85	0.93	0.73
陽性対照 (2-アミノアントラセン)	5	—	73.13	53.78	62.73	0.74	0.86	
		+	74.12	68.59	2.73	0.93	3.7×10^{-2}	
溶媒対照 (DMSO)	—	18	—	106.35	107.04	95.10	1.01	0.89
検体	100		—	90.96	100.93	103.13	1.11	1.13
	316		—	97.75	111.27	100.91	1.14	1.03
	1000		—	100.00	107.52	100.91	1.08	1.01
	3160		—	104.53	96.70	99.57	0.93	0.95
	10000		—	90.96	102.82	115.19	1.13	1.27
陰性対照 (アンピシリン)	25		—	2.5×10^{-4}	1.5×10^{-3}	9.9×10^{-4}	6.00	3.96
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.05		—	82.35	0.12	3.4×10^{-4}	1.5×10^{-3}	4.1×10^{-6}
溶媒対照 (DMSO)	—		+	97.28	111.27	98.23	1.14	1.01
検体	100		+	93.67	100.48	100.91	1.07	1.08
	316		+	80.99	99.52	100.46	1.23	1.24
	1000		+	91.85	104.23	100.46	1.13	1.09
	3160		+	95.49	110.79	107.61	1.16	1.13
	10000		+	96.85	112.68	104.47	1.16	1.08
陽性対照 (2-アミノアントラセン)	5	—	98.21	105.63	112.51	1.08	1.15	
		+	99.10	98.59	3.97	0.99	4.0×10^{-2}	

数値は2プレート(3スポット/プレート)の平均値。

DMSO : ジメチルスルホキシド

⑪ 細菌を用いた代謝分解物のDNA修復試験

(資料No. 57)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体純度 : %以上

試験方法 : 大腸菌 *Escherichia coli* の組換修復機構保持株 (WP2 株) と欠損株 (WP67 株及び CM871 株) を用い、代謝活性化及び非活性化法によって DNA 損傷誘発性を検定した。検体を DMSO に懸濁し、0、100、316、1000、3160、10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度について 2 連で試験を行った。処理時間は各々 2 及び 18 時間とした。各濃度で 1 プレートにつき 3 スポットの生存コロニー数を記録し、無処理対照群に対する生存率を算出した。さらに、生存係数 (C_s ; 欠損株の平均生存率 / 保持株の平均生存率) も算出した。

判定は、 C_s が 0.1 以下を陽性、0.3 以下を疑陽性とした。

用量設定根拠 ;

結果 : 試験結果を次表に示す。

検体は 3 菌株に対して弱い毒性を示したが、いずれの菌株においても S-9mix の有無に関わらず、生存率は 61.07% (2 時間処理)、あるいは 56.59% (18 時間以下) より下がることはなかった。欠損株における生存係数は、2 あるいは 18 時間処理のいずれにおいても 0.65 以下になることはなかった。

一方、陽性対照群では、生存率及び生存係数に有意な低下が認められた。

以上の結果から、代謝活性化法を含む本試験条件下で、本剤の DNA 損傷誘起性は陰性と判断された。

表 試験結果

薬物	濃度 μg/ml	処理 時間	S-9mix の有無	無処理対照群に対する 生存率 (%)			生存係数	
				WP2	WP67	CM871	WP67	CM871
溶媒対照 (DMSO)	—	2	—	99.68	96.58	99.74	0.97	1.00
検体	100		—	99.68	91.59	95.57	0.92	0.96
	316		—	101.24	69.16	99.47	0.68	0.98
	1000		—	97.48	72.58	95.32	0.74	0.98
	3160		—	97.80	80.99	97.91	0.83	1.00
	10000		—	95.60	62.00	96.10	0.65	1.01
陰性対照 (アンピシリン)	25		—	7.99	69.48	14.13	8.70	1.77
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.05		—	89.96	1.43	3.9×10^{-2}	1.6×10^{-2}	4.3×10^{-4}
溶媒対照 (DMSO)	—		+	100.30	91.59	98.44	0.91	0.98
検体	100		+	97.18	89.10	98.69	0.92	1.02
	316		+	93.42	95.33	98.18	1.02	1.05
	1000		+	87.78	82.24	91.16	0.94	1.04
	3160		+	94.66	63.23	92.99	0.67	0.98
	10000		+	93.42	61.07	86.49	0.65	0.93
陽性対照 (2-アミノアントラセン)	5	—	99.68	99.38	98.44	1.00	0.99	
		+	100.94	43.93	13.76	0.44	0.14	
溶媒対照 (DMSO)	—	18	—	96.81	94.97	103.29	0.98	1.07
検体	100		—	97.68	79.89	82.94	0.82	0.85
	316		—	85.26	71.78	74.03	0.84	0.87
	1000		—	82.07	64.52	68.99	0.79	0.84
	3160		—	76.59	56.98	56.59	0.74	0.74
	10000		—	70.23	57.82	62.21	0.82	0.89
陰性対照 (アンピシリン)	25		—	3.3×10^{-4}	8.0×10^{-4}	5.3×10^{-4}	2.42	1.61
陽性対照 (マイトマイシン-C)	0.05		—	52.02	0.12	1.3×10^{-4}	2.3×10^{-3}	2.5×10^{-6}
溶媒対照 (DMSO)	—		+	102.01	126.24	99.62	1.24	0.98
検体	100		+	93.64	96.36	83.34	1.03	0.89
	316		+	83.53	87.43	69.97	1.05	0.84
	1000		+	77.46	73.74	69.97	0.95	0.90
	3160		+	78.32	74.29	70.73	0.95	0.90
	10000		+	79.76	67.59	69.77	0.85	0.87
陽性対照 (2-アミノアントラセン)	5	—	100.57	97.49	81.20	0.97	0.81	
		+	99.41	92.17	1.69	0.93	1.7×10^{-2}	

数値は2プレート(3スポット/プレート)の平均値。

DMSO : ジメチルスルホキシド

3. 製剤

3-1. 20%水和剤

(1) 急性毒性

① ラットを用いた20%水和剤の急性経口毒性試験

(資料No. 9)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%水和剤

[組成] ピリダベン 20%

界面活性剤、鉱物質微粉 等 80%

供試動物 : SDラット、5週齢、1群雌雄各10匹

体重 雄 102-123 g、雌 90-109 g

観察期間 : 21日間観察

投与方法 : 検体は蒸留水に懸濁し、一夜絶食後単回強制投与した。投与容量は4.1-20.0 ml/kgの範囲であった。対照群には蒸留水を20ml/kg投与した。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を投与日は1、3及び6時間後、投与2日以降は1日1回観察した。体重は投与当日、投与後1、3、5、7、14及び21日目に測定した(投与当日=0日目)。

死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果 :

投与方法	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 1036, 1347, 1751, 2276, 2959, 3846, 5000	
LD ₅₀ 値 ^{a)} (mg/kg) (95%信頼限界)	3350 (2807-3998)	3020 (2485-3670)
死亡の開始及び終了時期	3時間-12日	3時間-11日
症状発現及び消失時期	1時間-19日	3時間-19日
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1751	1347

a) : Litchfield & Wilcoxon 法

死亡 ; 死亡は雄で2276mg/kg以上の群、雌で1751mg/kg以上の群で認められた。

一般状態 ; 下痢に伴う下腹部ないし全身被毛の汚れ、消瘦、よろめき歩行及び行動の不活発化が認められた。

体重 ; 投与後7日目まで減少が認められたが、投与後21日目では投与当日の値と比べて増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 死亡動物に内容物貯留による胃の膨満及び胃粘膜の黒色点が認められた。生存動物に異常は認められなかった。

② マウスを用いた20%水和剤の急性経口毒性試験

(資料No. 10)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%水和剤

[組成] ピリタベン 20%

界面活性剤、鉱物質微粉 等 80%

供試動物 : ICR (Crj:CD-1) マウス、5 週齢、1 群雌雄各 10 匹

体重 雄 24.2-31.7 g、雌 19.2-27.9 g

観察期間 : 21 日間観察

投与方法 : 検体は蒸留水に濃度 250mg/ml になるように懸濁し、一夜絶食後強制投与した。投与容量は 4.1-20.0ml/kg の範囲であった。対照群には蒸留水を 20ml/kg 投与した。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を投与日は 1、3 及び 6 時間後、投与 2 日以降は 1 日 1 回観察した。体重は投与当日、投与後 1、3、5、7、14 及び 21 日目に測定した (投与当日=0 日目)。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果 :

投与方法	経口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0、1036、1347、1751、2276、2959、3846、5000	
LD ₅₀ 値 ^{a)} (mg/kg)	2911	2600
(95%信頼限界)	(2355-3597)	(2117-3193)
死亡の開始及び終了時期	6 時間-5 日	3 時間-8 日
症状発現及び消失時期	1 時間-8 日	
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	1347	

a) : Litchfield & Wilcoxon 法

死亡 ; 雌雄ともに 1751mg/kg 以上の群で認められた。

一般状態 ; 行動不活発化、よろめき歩行、正向反射の遅れ、昏睡及び立毛が認められた。

体重 ; 検体によると思われる減少は認められなかった。

肉眼的病理検査 ; 死亡動物に胃粘膜の黒色点が認められた。生存動物に異常は認められなかった。

③ ラットを用いた20%水和剤の急性経皮毒性試験

(資料No. 11)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%水和剤

[組成] ピリダベン 20%

界面活性剤、鉱物質微粉 等 80%

供試動物 : SD ラット、7 週齢、1 群雌雄各 10 匹

体重 雄 226-264 g、雌 176-214 g

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体は蒸留水で湿らした後、4×5cm の範囲に刈毛及び剃毛した動物の背部に塗布した。塗布後 24 時間目、検体は中性洗剤を用い微温湯にて除去した。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死は投与日 1、3 及び 6 時間後、投与 2 日以降からは 1 日 1 回観察した。体重は塗布当日、塗布後 1、3、5、7 及び 14 日目に測定した (投与当日=0 日目)。試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果 :

投与方法	経皮	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0, 1000, 2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	> 2000	
死亡の開始及び終了時期	死亡例なし	
症状発現及び消失時期	症状なし	
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	

死亡 ; 死亡は認められなかった。

一般状態 ; 異常は認められなかった。

体重 ; 検体による影響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。

④ ラットを用いた20%水和剤の急性吸入毒性試験

(資料No. 12)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%水和剤

[組成] ピリダベン 20%

界面活性剤、鉱物質微粉 等 80%

供試動物 : Fischer (F-344/DuCrj) 系ラット、8 週齢、1 群雌雄各 10 匹

体重 雄 188-211 g、雌 132-146 g

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体をダストファイダーで粉塵とし、全身暴露型吸入チャンバーで 4 時間連続暴露した。設定濃度は暴露に使用した検体消費重量と総通気量にて算出し、実際濃度は秤量法及び高速液体クロマトグラフ (有効成分の濃度) を用いて測定した。

暴露条件 ; チャンバー容積 380 L
 通気量 約 100 L/分
 チャンバー内温度 24.0-25.5 °C
 チャンバー内湿度 52-70 %
 チャンバー内酸素濃度 約 21 %

設定濃度 (mg/L)	5.64、7.07、7.96、14.36、29.86									
実際濃度 (mg/L)	1.13、1.64、1.88、2.46、3.93									
有効成分濃度 (mg/L)	0.31、0.43、0.50、0.64、1.00									
空気力学的 質量中位径 ^{a)} (μ m)	5.4									
粒子径 ^{b)} (μ m)	0	0.43	0.65	1.1	2.1	3.3	4.7	7.0	11.0	11.0 以上
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.43	0.65	1.1	2.1	3.3	4.7	7.0	11.0	11.0	15.4
%	0.1	0.1	0.3	1.8	9.0	28.9	31.8	12.5	15.4	15.4

a) : 報告書の Appendix1 を基に申請者が算出

b) : 報告書の Appendix2 を基に申請者が算出

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、暴露中は暴露開始から 10 分、30 分、1 時間後及びその後 1 時間間隔で、暴露終了後は 10 分後から 1 時間間隔で 4 時間まで観察した。
 そして、翌日 (暴露後 1 日) は 2 回、その後は 1 日 1 回行った。
 体重は暴露直前、暴露後 1、3、5、7 及び 14 日目に測定した (暴露当日=0 日目)。
 死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果 :

投与方法	吸 入	
	雄	雌
暴露濃度 (mg/L)	1.13、1.64、1.88、2.46、3.93	
LC ₅₀ 値 ^{a)} (mg/L) (95%信頼限界)	1.68 (1.38-2.05)	1.44 (1.26-1.64)
死亡の開始及び終了時期	暴露中 3 時間- 暴露後 4 時間	暴露中 3 時間- 暴露後 1 日
症状発現及び消失時期	暴露中 10 分-*	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/L)	1.13	< 1.13

a) : Litchfield & Wilcoxon 法

* : 観察期間終了日 (暴露後 14 日目)、雄の 1.13 及び 1.64 mg/L 群、雌の 1.13、1.64 及び 1.88 mg/L 群では、一部の症状が残存していた。

死亡 ; 死亡数を次表に示す。

投与量 (mg/L)	1.13	1.64	1.88	2.46	3.93
雄	0	5	9	7	10
雌	3	4	9	10	10

一般状態 ; 暴露開始直後より閉眼及び遅くて深い呼吸が認められたが、暴露当日中から暴露終了後 1 日目までにほぼ回復した。また、暴露終了後から暴露当日中より、口鼻周囲の赤褐色汚れ、陰部周囲の濡れ、立毛及び雄で眼球色の暗調化が認められたが、暴露後 11 日目までにほぼ回復した。その他、陰部周囲の被毛の汚れ、耳介の発赤、雌で眼周囲の赤褐色または黒色汚れ及び眼周囲の脱毛が認められた。

体重 ; 暴露後 1 日目に全動物で著しく減少し、その後も暴露後 3-7 日目まで減少が続いたが、以後に全動物で著しく増加した。

肉眼的病理検査 ; 死亡動物で肺水腫、肺赤色化、気管内白色泡沫液、気管内白色粉状物、ガスによる胃の膨満がほぼ全群の雌雄で高頻度に認められた。生存動物で一般状態観察で確認されている外部変化以外には異常は全く認められなかった。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

① ウギを用いた20%水和剤の皮膚刺激性試験

(資料No. 22)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%水和剤

[組成] ピリダベン 20%

界面活性剤、鉱物質微粉 等 80%

供試動物 : ニューゼーランド白色ウギ、12 週齢、雌 6 匹

体重 雌 2.56-2.85 kg

観察期間 : 3 日間観察

投与方法 : 検体 0.5 g を蒸留水で湿らせた後、1 インチ平方 (約 6cm²) の範囲に刈毛及び剃毛した動物の背部に塗布した。塗布時間は 4 時間とし、皮膚に残った検体は水で洗い流した。

観察・検査項目 : 塗布時間終了後 1、24、48 及び 72 時間目に塗布部位の刺激性変化 (紅斑、痂皮、浮腫) の有無等を観察した。判定の基準は、農林水産省指針(1985)及び Draize 法に従った。体重測定は投与時および観察終了時に行った。

結果 : 観察された刺激性変化の採点を次表に示す。

動物番号	項目	最高評点	塗布終了後時間 (時間)				平均刺激性評点
			1	24	48	72	
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
平均*	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
平均刺激性評点の合計						0	
皮膚一次刺激性指数 (P. I. I.)						0.0	

*申請者が個別採点表より算出した

皮膚刺激性変化は、いずれの動物及び時期においても認められなかった。

また、全動物で順調な体重増加が認められた。

以上の結果から、本剤はウギの皮膚に対して刺激性を有しないと判断された。

② ウサギを用いた20%水和剤の眼刺激性試験

(資料No. 19)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%水和剤

[組成] ピリダベン 20%

界面活性剤、鉱物質微粉 等 80%

供試動物 : ニュージーランド[®] 白色ウサギ、14 週齢、雌

非洗眼群 6 匹 洗眼群 6 匹 (2 群×3 匹)、体重 2.76-3.21 kg

観察期間 : 7 日間観察

投与方法 : 検体 0.1 g を左眼に点眼し、右眼は無点眼対照とした。

点眼後洗眼を行わない群(A)、点眼後 2-3 分後に洗眼を行う群(B)、点眼後 24 時間後に洗眼を行う群(C)の 3 群を設定した。洗眼は 30 秒-1 分間微温湯にて行った。

観察・検査項目 : 点眼後 1、3 時間目及び 1、2、3、4、7 日目に、角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察した。判定の基準は、農林水産省指針(1985)及び Draize 法に従った。

体重は検体投与時及び観察終了時に測定した。

結果 : 観察された刺激性変化の評点を次表に示す。

角膜及び虹彩の刺激性変化は、何れの動物においても認められなかった。

結膜の刺激性変化として、点眼後 1 から 3 時間目には、少数の血管の明らかな充血(発赤程度 1)が全動物で、正常よりわずかな腫脹(浮腫程度 1)が各群の数匹で、若干の分泌物増量(分泌程度 1)が非洗眼群及び点眼 2-3 分後洗眼群の 1-2 匹の動物で認められた。これら結膜の刺激性変化は、何れも点眼後 3 日目までに回復した。

体重に関しては、点眼 2-3 分後に洗眼を行った B 群の 2 匹の動物で減少が認められたが、観察期間中の一般状態に異常は認められず、検体投与に起因したのではないと考えられた。

以上の結果から、本剤はウサギ眼粘膜に対して、極めて軽度から軽度の刺激性を有するものと判断された。

また、点眼 24 時間後の洗眼効果は明確には認められなかったが、点眼 2-3 分後の洗眼は眼粘膜に対する刺激性変化の回復を若干早める効果を持つと考えられた。

群	観察項目		最高 評点	点眼後時間							
				1時間	3時間	1日	2日	3日	4日	7日	
A. 非洗眼	動物 番号 1	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	0	0
			面積 ^{a)}	4	0	0	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	1	0	0	0	0
			浮腫	4	0	1	0	0	0	0	0
			分泌物 ^{a)}	3	0	0	0	0	0	0	0
	動物 番号 2	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	0	0
			面積 ^{a)}	4	0	0	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	1	1	0	0	0
			浮腫	4	1	1	1	1	0	0	0
			分泌物 ^{a)}	3	0	1	0	0	0	0	0
	動物 番号 3	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	0	0
			面積 ^{a)}	4	0	0	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	1	1	0	0	0
			浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0
			分泌物 ^{a)}	3	0	0	0	0	0	0	0
	動物 番号 4	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	0	0
			面積 ^{a)}	4	0	0	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	1	1	0	0	0
			浮腫	4	1	1	1	0	0	0	0
			分泌物 ^{a)}	3	0	0	0	0	0	0	0
動物 番号 5	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	0	0	
		面積 ^{a)}	4	0	0	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	1	1	1	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	
		分泌物 ^{a)}	3	0	0	0	0	0	0	0	
動物 番号 6	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	0	0	
		面積 ^{a)}	4	0	0	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	1	1	0	0	0	0	
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0	
		分泌物 ^{a)}	3	1	0	0	0	0	0	0	
合計		660	20	22	18	10	0	0	0		
平均		110	3.33	3.67	3.00	1.67	0	0	0		

a) : 農林水産省指針では要求されていない観察項目

群	観察項目		最高 評点	点眼後時間						
				1時間	3時間	1日	2日	3日	4日	7日
B. 2-3分後 洗眼群 (3匹平均)	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	0	0
		面積 ^{a)}	4	0	0	0	0	0	0	0
		虹彩	2	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1.00	1.00	0.67	0	0	0	0
		浮腫	4	0.33	0	0	0	0	0	0
		分泌物 ^{a)}	3	0.33	0	0	0	0	0	0
		合計	110	3.33	2.00	1.33	0	0	0	0
C. 24時間後 洗眼群 (3匹平均)	角膜	混濁	4	0	0	0	0	0	0	0
		面積 ^{a)}	4	0	0	0	0	0	0	0
		虹彩	2	0	0	0	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1.0	1.0	1.0	0.3	0	0	0
		浮腫	4	0.3	0.3	0	0	0	0	0
		分泌物 ^{a)}	3	0	0	0	0	0	0	0
		合計	110	2.67	2.67	2.00	0.67	0	0	0

a) : 農林水産省指針では要求されていない観察項目

(3) 皮膚感作性

① モルモットを用いた20%水和剤の皮膚感作性試験 (資料No. 26)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%水和剤

[組成] ピリダベン 20%

界面活性剤、鉱物質微粉 等 80%

供試動物 : ハートレイ系モルモット、7 週齢、1 群雌 25 匹、体重 354-483 g

観察期間 : 25 日間観察

投与方法 : Maximization 法

1) 予備試験

2) 本試験

感作 ; 肩甲骨部を刈毛及び剃毛し、2×4cm の処理部位を設けた。

皮内……①FCA (フロイトの完全アジエバント)、②5%検体滅菌生理食塩水溶解液及び③5%検体 FCA、それぞれを 0.1ml (左右 2 ヲ所) 皮内注射した。

経皮……皮内感作後 6 日に同部を再び刈毛し、10%ラウリル硫酸ナトリウム (ワリン基剤) を塗布した。翌日、25%検体ワリン混合物を 48 時間塗布した。

惹起 ; 経皮感作後 13 日目、左右の腹側部を刈毛及び剃毛した。翌日、左腹側部に 25%検体ワリン混合物を、右腹側部にワリンを 24 時間塗布した。

陽性対照物質 (DNCB : ジニトロクロロベンゼン) についても同様の処理を行った。

観察・検査項目 : 惹起後 24、48 及び 72 時間目に適用部位の紅斑及び浮腫の有無を肉眼的に観察した。さらに、試験開始時 (皮内感作日) 及び試験期間終了時に体重を測定した。

採点及び評価方法 ; 各観察時に下記に示す基準に従い採点した。検体及び陽性対照群において各々の対照群に認められた最高評点より上の評点を示したものを感作陽性動物とした。

紅斑及び浮腫	点数
肉眼的変化なし	0
散在性の軽度の紅斑	1
中等度及び瀰漫性の紅斑	2
強度の紅斑及び浮腫	3

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	動物数	処 理			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	0	1	2	3	0	1	2	3		
検体投与群	25	①FCA* ②5%検体滅菌生理食塩水 ③5%検体 FCA	25%検体ワセリン混合物	25%検体ワセリン混合物	20	4	0	1	16	5	2	2	16	5	1	3	9	36
	25	①FCA ②滅菌生理食塩水 ③5%検体 FCA	ワセリン	25%検体ワセリン混合物	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
陽性対照群	10	①FCA ②0.1%DNCB 流動パラフィン懸濁液 ③0.1%DNCB FCA	1%DNCBワセリン	0.5%DNCBワセリン	0	1	4	5	1	0	3	6	1	4	2	3	10	100
	10	①FCA ②流動パラフィン ③FCA	ワセリン	0.5%DNCBワセリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*FCA: フロイント完全アジュバント

検体対照群に紅斑及び浮腫は認められなかった。

検体投与群では、紅斑及び浮腫が 25 匹中 9 匹に認められ、皮膚感作率は 36%であった。

陽性物質投与群では、陽性反応が全動物で観察された。

また、全動物で順調な体重増加が認められた。

以上の結果から、本剤はモットを用いた Maximization 法における皮膚感作性試験において、中等度の皮膚感作性を有するものと判断された。

② モルメットを用いた20%水和剤の皮膚感作性試験

(資料No. 27)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1990 年

検体 : 20%水和剤

[組成] ピリダベン 20%

界面活性剤、鉱物質微粉 等 80%

供試動物 : ハートレイ系モルメット、約 8-10 週齢、1 群雌雄各 10 匹

体重 雄 357-467 g、雌 332-406 g

観察期間 : 31 日間観察

投与方法 : Buehler 変法

1) 予備試験

2) 本試験

感作 ; 左腹側部を刈毛及び剃毛し、約 5×5cm の処理部位を設けた。刈毛及び剃毛は塗布開始の前日、塗布後 7 及び 14 日目に行った。

検体は蒸留水で 50% の濃度になるように調製し、0.25ml を 2×2cm の濾紙に吸収させ、塗布した (塗布当日=1 日目)。以後、8 及び 15 日目にも塗布した。

塗布時間は 1 回につき約 6 時間とした。

惹起 ; 経皮感作後 28 日目、右の腹側部を刈毛及び剃毛し、約 5×5cm の処理部位を設けた。翌日 (経皮感作後 29 日目)、検体を蒸留水で 10 及び 50% の濃度になるように調製し、0.25ml を 2×2cm の濾紙に吸収させ塗布した。

塗布時間は 6 時間とした。陽性対照物質 (DNCB : ジニトロクロベンゼン) についても同様の処理を行った。

観察・検査項目 : 惹起後 24 及び 48 時間目に適用部位の紅斑または腫脹の有無を肉眼的に観察した。さらに、死亡の有無の観察及び毎週 1 回体重を測定した。

採点及び評価方法 ; 各観察時に下記に示す基準に従い採点した。評点 1 以上を陽性とし、20 匹のうち 2 匹以上で陽性反応が認められた場合、感作性ありと判断した。

反応なし	0
非常に軽度な散在性紅斑	±
軽度な瀰漫性紅斑	1
中等度な瀰漫性紅斑	2
強度な瀰漫性紅斑及び痂皮形成	3

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	動物数	処 理		感作反応動物数										陽性動物数	感作率 (%)	
				皮膚反応評点												
		感作	誘発	24 時間					48 時間							
				0	±	1	2	3	0	±	1	2	3			
検体投与群	雌雄計 20	50%検体水溶液	50%検体水溶液	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
			10%検体水溶液	19	1	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
検体対照群	雌雄計 20	蒸留水	50%検体水溶液	19	1	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	
			10%検体水溶液	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	
陽性物質投与群	雌雄計 10	3%DNCB エタノール液	0.1% DNCB アセトン液	2	5	3	0	0	4	3	3	0	0	6	60	
陽性物質対照群	雌雄計 10	—	0.1% DNCB アセトン液	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	

— : 処理せず

検体対照群及び検体投与群ではいずれの動物にも有意な反応（わずかな紅班またはより明確な反応）は認められなかった。

陽性物質投与群では、陽性反応が 10 匹中 6 匹で観察された。

死亡はなく、体重にも影響は認められなかった。

以上の結果から、本剤はモレットを用いた Buehler 変法における皮膚感作性試験において、皮膚感作性は陰性であると判断される。

3-2. 20%フロアブル

(1) 急性毒性

① ラットを用いた20%フロアブルの急性経口毒性試験 (資料No. 13)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%フロアブル

〔組成〕 ピリダベン 20 %

水、界面活性剤 等 80 %

供試動物 : SDラット、6週齢、1群雌雄各10匹、
体重 雄 170-203 g、雌 129-162 g

観察期間 : 21日間観察

投与方法 : 検体を脱イソ水に懸濁し一夜絶食後、単回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとした。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を投与当日(0日目)は投与後1、3及び6時間後に、翌日から1日1回、21日間観察した。体重は投与当日(0日目)、投与後1、3、5、7、14及び21日目に測定した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果 :

投与方法	経口	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	0、1347、1751、2276、2959、 3846、5000、6500	0、1347、1751、2276、2959、 3846
LD ₅₀ 値 ^{a)} (mg/kg) (95%信頼限界)	3090 (2506-3811)	3162 (2495-4009)
死亡の開始及び終了時期	1時間-16日	1時間-9日
症状発現及び消失時期	1時間-19日	1時間-16日
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1347	

a) : Litchfield & Wilcoxon 法

死亡 ; 雌雄ともに1751mg/kg以上の群で認められた。

一般状態 ; 行動不活発化、腹臥姿勢、昏睡、体温低下、深く遅い呼吸、立毛、眼瞼下垂、よろめき歩行、下痢によると思われる肛門周囲の被毛汚れ、削瘦、鼻周囲の赤色付着物、背彎姿勢及びつま先歩行が認められた。

体重 ; 検体投与群で明らかな体重増加抑制が認められた。増加抑制は、投与後1週間以内で最も顕著で用量依存性が認められたが、投与後2ないし3週には回復した。

肉眼的病理検査 ; 死亡動物に小腸粘膜の水腫、盲腸粘膜の充血及び肺の暗赤色斑が多数、胃粘膜の暗赤色斑、小腸粘膜の充血、腹水及び無気肺が少数認められた。生存動物に異常は認められなかった。

② マウスを用いた20%フオアブルの急性経口毒性試験

(資料No. 14)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%フオアブル

[組成] ピリダベン 20 %

水、界面活性剤 等 80 %

供試動物 : ICR 系 (Crj:CD-1) マウス、5 週齢、1 群雌雄各 10 匹

体重 雄 26.4-34.9 g、雌 20.2-27.8 g

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 検体を脱イソ水に懸濁し、2-3 時間の絶食後単回強制経口投与した。投与容量は 10ml/kg とした。

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を投与当日 (0 日目) は投与後 1、3 及び 6 時間後に、翌日から 1 日 1 回、14 日間観察した。体重は投与当日 (0 日目)、投与後 1、3、5、7 及び 14 日目に測定した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果 :

投与方法 性別	経 口	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0、1300、1690、2197、 2856、3713	0、769、1000、1300、1690、 2197、2856、3713
LD ₅₀ 値 ^{a)} (mg/kg) (95%信頼限界)	2198 (1744-2769)	2042 (1628-2561)
死亡の開始及び終了時期	1 時間-9 日	1 時間-2 日
症状発現及び消失時期	1 時間-9 日	1 時間-10 日
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	1300	769

a) : Litchfield & Wilcoxon 法

死亡 ; 1690mg/kg 以上の雄、1000mg/kg 以上の雌で死亡が認められた。

一般状態 ; 行動不活発化、腹臥姿勢、正向反射の遅れを伴う衰弱状態、昏睡、体温低下、深く遅い呼吸、立毛、眼瞼下垂、散瞳及びよろめき歩行が認められた。

体重 ; 雄の検体投与群、雌の 2856 及び 3713mg/kg 群で、投与後 1 週間以内に減少が認められたが、投与後 2 週には回復した。

肉眼的病理検査 ; 死亡動物に胃粘膜の暗赤色斑、血様胃内容物、小腸粘膜の充血及び水腫、肺の暗赤色斑及び無気肺が少数認められた。生存動物に異常は認められなかった。

③ ラットを用いた20%フロアールの急性経皮毒性試験

(資料No. 15)

試験機関 : (GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%フロアール

[組成] ピリダベン 20 %
水、界面活性剤等 80 %

供試動物 : SDラット、8週齢、1群雌雄各10匹
体重 雄 273-308 g、雌 178-225 g

試験期間 : 14日間観察

試験方法 : 検体は希釈せず濾紙にのせ、4×5cmの範囲に刈毛及び剃毛した動物の背部に塗布した。塗布後24時間目、検体は中性洗剤を用い微温湯にて除去した。

試験項目 : 一般状態及び生死は投与後1、3及び6時間目、翌日からは1日1回観察した。体重は塗布当日(0日目)、塗布後1、3、5、7及び14日目に測定した。試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果 :

投与方法	経皮	
	雄	雌
投与量 (mg/kg)	0、1000、2000	
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	> 2000	
死亡の開始及び終了時期	死亡例なし	
症状発現及び消失時期	症状なし	
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000	
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000	

死亡 ; 死亡は認められなかった。

一般状態 ; 特記すべき異常は認められなかった。

体重 ; 投与後1日に雌雄ともに体重の減少が認められたが対照群でも同様に認められた。また投与後5日以降はいずれの動物も増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

④ ラットを用いた20%フオアブルの急性吸入毒性試験

(資料No. 16)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1989 年

検体 : 20%フオアブル

[組成] ピリダベン 20 %
水、界面活性剤 等 80 %

供試動物 : Fischer (F-344/DuCrj) 系ラット、8 週齢、1 群雌雄各 10 匹
体重 雄 187-214 g、雌 129-149 g

観察期間 : 14 日間観察、0.73mg/kg 群の雄 2 匹は 28 日間観察
(1989 年 5 月 16 日-6 月 20 日)

投与方法 : 検体は二流体アトマイザーでミストとした。

動物は全身暴露型吸入チャンパー内に置き 4 時間連続して 1 回暴露した。

設定濃度は暴露に使用した検体消費重量と総通気量から算出し、実際濃度は高速液体クロマトグラフを用いて測定した。

暴露条件 ; チャンパー容積 380 L
通気量 約 100 L/分
チャンパー内温度 21.5-25.5 °C
チャンパー内湿度 33-85 %
チャンパー内酸素濃度 約 21 %

設定濃度 (mg/L)	0.70、0.98、1.18、2.95、6.76、8.13、14.43								
実際濃度 (mg/L)	0.15、0.23、0.31、0.54、0.73、0.97、1.48								
空気力学的 質量中位径 ^{a)} (μm)	4.3								
粒子径 ^{b)} (μm)	0 -	0.43- 0.65	0.65 -	1.1 -	2.1 -	3.3 -	4.7 -	7.0 -	11.0 以上
%	0.0	0.0	0.9	5.1	18.7	36.0	24.6	7.3	7.3

a) : 報告書の Appendix1 を基に申請者が算出

b) : 報告書の Appendix2 を基に申請者が算出

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、暴露中は 1 時間の間隔で、暴露後は暴露終了直後及びその後 1 時間間隔で 4 時間まで翌日は 1 日 2 回、それ以降は 1 日 1 回観察した。
さらに雄の 0.73mg/L 群の 2 匹については 28 日間観察した。
体重は暴露当日 (0 日目)、暴露後 1、3、5、7 日目及びその後は 1 週間毎に測定した。
死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果

投与方法	吸入	
	雄	雌
暴露濃度 (mg/L)	0.15、0.23、0.31、0.54、0.73、0.97、1.48	
LC ₅₀ 値 ^{a)} (mg/L) (95%信頼限界)	0.95 (0.75-1.20)	0.23 (0.14-0.38)
死亡の開始及び終了時期	暴露中 2 時間- 暴露後 9 日	暴露中 2 時間- 暴露後 8 日
症状発現及び消失時期	暴露中 1 時間-*	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/L)	0.31	< 0.15

a) : Litchfield & Wilcoxon 法

* : 観察期間終了日 (暴露後 14 及び 28 日目)、雄の 0.73 及び 0.97mg/L 並びに雌の 0.97 mg/L 群では、一部の症状が残存していた。

死亡 ; 雄で死亡は 0.54mg/L 以上から認められたが、雌では全投与群で死亡が認められた。

一般状態 ; 暴露中には閉眼、遅くて深い呼吸及び背部被毛の汚れが、暴露終了後から暴露後 4 時間までの間には、上記症状に加えて口鼻周囲の赤褐色汚れ、自発運動の低下、腹臥姿勢、よろめき歩行、陰部及び肛門の濡れ及び汚れが認められた。暴露後 1 日目以降には、上記症状に加えて耳介の発赤、眼周囲の赤褐色汚れ、雄で粗毛、眼球色の暗調化及び眼周囲の脱毛が認められた。

体重 ; 暴露後 1 日目に全動物で減少し、その後も雌雄の一部では減少が続いたが、暴露後 14 日目までにはほとんどが増加した。

肉眼的病理検査 ; 死亡動物に鼻吻部被毛の汚れ、陰部及び肛門周囲の汚れ、背部被毛の汚れ、肺水腫、肺の赤色化、気管内白色泡沫液、雄でガスによる胃の膨満及び雌で副腎の赤色ないし黒色斑散在が認められた。生存動物では、陰部及び肛門周囲の汚れが雄で、肺の赤色化が雌雄で認められた。

観察期間を延長した 0.73mg/L 群雄の 2 匹では、暴露後 14 日目まで体重減少が継続し、暴露後 21 日目以降増加した。症状としては、自発運動の低下、よろめき歩行が暴露後 21 日目以降まで継続して認められたが、暴露後 28 日目までに回復した。剖検所見 (暴露後 29 日目) に異常は認められなかった。

⑤ ラットを用いた100倍希釈20%フオアブルの急性吸入毒性試験

(資料No. 17)

試験機関 :

(GLP 対応)

報告書作成年 : 1990 年

検体 : 20%フオアブル

[組成] ピリダベン 20 %

水、界面活性剤 等 80 %

供試動物 : Fischer (F-344/DuCrj)系ラット、8週齢、1群雌雄各5匹

体重 雄 178-194 g、雌 138-141 g

観察期間 : 14日間観察

投与方法 : 検体は純水で100倍に希釈した後、二流体アトマイザーでミストとした。

動物は全身暴露型吸入チャンバー内に置き4時間連続して1回暴露した。

設定濃度は暴露に使用した検体消費重量と総通気量から算出し、実際濃度は高速液体クロマトグラフを用いて測定した。

暴露条件 ; チャンバー容積 380 L
 通気量 約 100 L/分
 チャンバー内温度 21.0-22.0 °C
 チャンバー内湿度 69-96 %
 チャンバー内酸素濃度 約 20 %

投与方法	吸 入								
	雄					雌			
設定濃度 (mg/L)	23.50								
実際濃度 (mg/L)	7.32								
空気力学的 質量中位径 ^{a)} (μm)	2.6								
粒子径 ^{b)} (μm)	0	0.43	0.65	1.1	2.1	3.3	4.7	7.0	11.0
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.43	0.65	1.1	2.1	3.3	4.7	7.0	11.0	以上
%	0.6	2.7	13.1	22.6	20.5	17.7	12.7	4.9	5.2

a) : 申請者が報告書の Appendix 1 を基に算出した値

b) : 申請者が報告書の Appendix 2 を基に算出した値

観察・検査項目 : 一般状態及び生死を、暴露中は1時間間隔、暴露終了後は直後及びその後1時間間隔で4時間まで、翌日は2回、それ以降は1日1回観察した。
 体重は暴露当日(0日目)、暴露後1、3、5、7及び14日目に測定した。
 死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

結果 :

投与方法 性	吸 入	
	雄	雌
実際濃度 (mg/L)	7.32	
LC ₅₀ 値 (mg/L) (95%信頼限界)	> 7.32	
死亡の開始及び終了時期	死亡例なし	
症状発現及び消失時期	暴露開始直後-暴露後 3 日	
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/L)	7.32	

死亡 ; 雌雄ともに死亡は全く認められなかった。

一般状態 ; 全動物において暴露中に閉眼が、暴露後 1-2 日目に耳介の発赤が認められた。その他に、暴露当日中に肛門周囲軟便付着、雌で肛門周囲汚れ及び口鼻周囲赤褐色汚れが認められた。これらの症状は暴露後 3 日にはすべて消失した。

体重 ; 全動物で暴露後 1 日目に減少したが、暴露後 3 日目以降は増加した。投与後 1 日に雌雄ともに体重の減少が認められたが対照群でも同様に認められた。また投与後 5 日以降はいずれの動物も増加が認められた。

肉眼的病理検査 ; 異常は認められなかった。

以上のことから、検体(100 倍希釈液)のラットに対する急性吸入毒性は、7.32mg/L の暴露条件下において極めて弱いと判断された。