

テブコナゾールの経口投与によるウサギを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-34)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1985年

検体の純度：
供試動物：ヒマラヤ(CHBB:HM)妊娠ウサギ (1群15匹を交配)
(雌体重；2049～2563g)
投与期間：13日間 妊娠6～18日(試験期間：1984年4月～5月)

投与方法：

検体を、0.5%クレモホア水溶液に懸濁し、5mL/kgの容量で0(対照群)、3、10及び30mg/kgの投与量を妊娠6日目から18日目までの13日間毎日1回経口投与した。なお、対照群には0.5%クレモホアEL水溶液を同様に投与した。

交配および妊娠0日：

無処理の雌1匹のウサギを雄1匹と同居させ肉眼的に交尾の確認を行った。交尾の確認された日を妊娠0日とした。

観察・検査項目：

親動物；妊娠0日から29日まで全動物について一般状態を毎日観察した。妊娠29日に帝王切開した。体重は妊娠期間中及び投与期間中の増加量を計算した。帝王切開時には、肉眼的病理検査、着床数、死亡吸収胚数、生存胎児数、矮小児、胎盤重量について調べた。

生存胎児；性別、体重、外表、内臓、骨格異常の観察を行った。

試験結果：

概要を表にまとめた。

1. 母動物に対する所見

1) 症状及び死亡率

検体投与に関連すると考えられる症状は観察されなかった。

対照群の1例が妊娠20日目に死亡したが、その他の死亡例は認められなかった。

2) 体重

投与期間中において、有意差は認められない程度のわずかな増体重の低下傾向がみられ、30mg/kgで顕著であった。しかしながら、妊娠期間を通じてみた場合、

対照群と検体投与群で増体重に差は認められず、むしろ用量に関連して増加傾向がみられ、その増加量は 30mg/kg 群で最大であった。

2. 子宮内発育に対する所見

30mg/kg 群の着床後死胚数が対照群に比べて統計学的に有意に増加した。しかし、対照群においても 30mg/kg 群においても背景データ (0.76±1.76) より低値であったことから、検体投与によるものとは考えられなかった。

一方、一腹あたりの胎児体重に有意差はみられなかった。また骨格検査に異常はみられなかった。その他、着床数、生存胎児数、雄の胎児数、内臓あるいは外表奇形胎児数、矮小児数についても、投与群で対照群の値との間に有意な差は認められなかった。

結果の表

投与用量 (mg/kg/日)		0	3	10	30
交配動物数		15	15	15	15
受胎動物数		14	14	14	15
妊娠維持動物数		14	14	14	15
母動物	一般症状	-	-	-	-
	死亡数	1	0	0	0
	体重変化(投与期間)(g) a	80.0	82.6	74.9	59.5
	体重変化(妊娠期間)(g) a	260.2	272.4	323.6	300.4
	★ 検査母動物	14	14	14	15
	着床 着床数(一腹の平均) a	6.4	7.1	7.9	7.1
	所見 着床後死胚数(一腹の平均) a	0.2	0.6	0.5	↑0.8
胎児	生存胎児数(一腹の平均) a	6.2	6.5	7.4	6.3
	雄の胎児数(一腹の平均) a	2.9	2.9	3.5	3.3
	生存胎児体重(g) (一腹の平均) a	39.28	40.22	39.32	40.85
	奇形#(一腹の平均) a	0	0.07	0.07	0.07
矮小児(<25g) (一腹の平均) b		0.08	0.14	0.14	0.07

a : Wilcoxon の順位和検定(↓↑:p<0.05)

b : Chi 二乗あるいは Fisher 検定(↑:p<0.05)

: 3 及び 10mg/kg 群 : 関節湾曲症各 1 例、10mg/kg 群 : 肋骨の癒合 1 例。

以上の結果より、本検体を妊娠ウサギに 30mg/kg までの用量で投与したとき、母動物及び胎児に何ら影響は認められなかった。従って、親、胎児ともに無毒性量 (NOAEL) は 30mg/kg/日以上であった。

催奇形性作用は認められなかった。

テブコナゾールの経口投与によるウサギにおける催奇形性および母動物毒性試験
(毒性資料 No. 原体-35)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：第一試験 1995 年

第二試験 1995 年

検体の純度：
供試動物： チンチラ (CHbb:CH ハイブリッド、SPF) 妊娠ウサギ
第一試験 (1 群 16 匹を交配) (雌:16-18 週齢 体重;3199~4620g)
第二試験 (1 群 5 匹を交配) (雌:29-32 週齢 体重;3290~4745g)

投与期間： 13 日間 妊娠 6~18 日
(試験期間:第一試験;1992 年 3 月 16 日~4 月 30 日、
:第二試験;1993 年 6 月 23 日~7 月 13 日)

投与方法：

検体を 0.5%クレモホア水溶液に懸濁し 5mL/kg 体重の投与容量で毎日 1 回経口投与した。投与量は第一試験、第二試験とも 0、10、30 および 100mg/kg とした。

交配および妊娠 0 日：

無処理の雌ウサギ 1 匹を雄 1 匹と交配させ、交配確認日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目：

親動物：

親動物は妊娠 0 日から屠殺までの間、一般状態は毎日最低 2 回、体重は毎日測定した。摂餌量は第二試験では妊娠 6、11、15 および 19 日目に、第一試験ではさらに 24 および 28 日目に測定した。

第一試験では、母動物は妊娠 28 日目に屠殺し、肉眼的病理検査を行い、黄体数、着床数、着床前/後死胚数、死亡胎児数、生存胎児数、矮小児、胎盤重量について調べた。

第二試験では、母動物は妊娠 19 日目に屠殺して肉眼的病理検査を行った。第一試験同様に黄体数、着床数、着床後死胚数、死亡胎児数、生存胎児数について調

べた。また、肝臓、脾臓、腎臓および副腎の重量を測定し、対体重比を算出した。これらの臓器の病理組織学的検査（HE および Oil Red O 染色）も行った。交配後 6 および 12 日目に検体投与前に非絶食下で、また 19 日目の屠殺前に採血し、血液学的検査および血液生化学的検査をおこなった。また、剖検時に肝臓を採取し、生化学的検査を行った。

以下の項目について検査・測定した。

〔血液学的検査項目〕

赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、血小板、網状赤血球数および網状赤血球百分率、白血球数および白血球百分率、ハインツ小体、正赤芽球

〔血液生化学的検査項目〕

グルコース、尿素、クレアチニン、ビリルリン、脂質、コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、カルシウム、リン、ナトリウム、カリウム、塩素、アルブミン、蛋白、グロブリン、A/G 比

〔肝組織中での検査項目〕

N-デメチラーゼ、O-デメチラーゼ、チトクローム P-450、トリグリセリド

生存胎児；

第一試験の母動物から妊娠 28 日目に帝王切開により得た生存胎児について、摘出時に性別、体重、外表奇形を観察した。剥皮後各児の頭部の化骨の状態を検査した。それぞれ約半数の胎児の頭部を分離しトリクロル酢酸とホルマリン液に固定し WILSON 法により頭部の内部を検査した。頭部を除去した胎児および残りの半数の胎児はアリザリンレッドで染色後骨格検査に供した。

試験結果：

1. 母動物に対する所見

1) 一般状態および死亡

両試験とも、検体投与に関連する死亡および臨床症状はみられなかった。第一試験で 10mg/kg 群の 1 例、第二試験で対照群の 1 例が途中死亡した。死後検査において投与に関連した所見はみられず、偶発的なものと考えられた。

2) 体重

両試験とも 100mg/kg 群で一時的な体重減少が第一試験では妊娠 6-8 日目、第二試験では妊娠 6-12 日目にみられた。その後体重は増加に転じたが、その他の群に比べ低値で推移した。いずれも統計学的有意差は伴わなかった。その他の群は対照群と差がみられなかった。

3) 摂餌量

両試験とも 100mg/kg 群で妊娠 6-11 日目に一時的な摂餌量の低下（第一試験；対照の 70%、第二試験；対照の 74%）がみられ第一試験については有意差をともなってみられた。その他の群は対照群と差がみられなかった。

4) 血液学的検査/血液および肝臓生化学的検査（第二試験）

いずれの検査時期および群においても、毒性的に意義のある変化は認められなかった。100mg/kg 群で血小板数が妊娠 12 および 19 日目に対照群と比べ有意に増加したが、関連する他の血液学的検査項目および病理組織学的検査項目に変化がなく、毒性的に意義のある変化とは考えられなかった。

血液学的検査結果（変化のみられた項目）

試験群 (mg/kg 体重)	10	30	100	
			12 日	19 日
検査時期				
血小板数			↑161	↑232

表中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

↑↓ : p<0.01 (Dunnett 検定による)

5) 子宮内発育に対する所見

概要を表に示した。

試験群	0mg/kg		10mg/kg		30mg/kg		100mg/kg		
	①	②	①	②	①	②	①	②	
一群当り動物数	16	5	16	5	16	5	16	5	
受胎動物数	16	5	15	4	16	5	14	3	
妊娠維持動物数	16	4	15	4	14	5	14	3	
流産動物数	0	0	0	0	0	0	0	0	
全吸収胚動物数	0	1	0	0	2	0	1	0	
死亡数	0	1	1	0	0	0	0	0	
着床所見	検査親動物数	16	4	15	4	14	5	14	3
	黄体数*	11.9	11.5	12.3	11.8	11.4	12.6	11.9	10.7
	着床数*	11.3	11.0	11.3	11.0	10.4	12.0	11.7	7.3
	生存胎児数*	8.8	10.5	9.5	9.5	7.8	9.8	8.5	7.0
	死亡胎児数	0	0	0	0	0	0	0	0
	着床後死胚数*	2.5	0.5	1.9	1.5	2.6	2.2	3.2	0.3
	胎盤重量(g)*	5.3		5.3		5.1		5.1	

①第一試験 ②第二試験 *一腹毎の平均 (Dunnett 検定あるいは Fischer 検定を実施した。)

第一試験では 100mg/kg 群で着床後死胚数が有意ではないものの軽度に増加し検体投与によるものと考えられた。その他の項目でみられた変動は毒性的な意義はないと考えられた。第二試験では変化はみられなかった。

6) 剖検

両試験ともいずれの群においても、投与に関連した所見は認められなかった。

7) 臓器重量および対体重比(第二試験)

いずれの群においても、投与に関連した変化は認められなかった。

8) 病理組織学的検査(第二試験)

肝臓の単細胞壊死が投与群でみられたが、壊死病変は 30mg/kg に 1 例みられたのみであり、投与との関連性は明らかではなかった。

病理組織学的検査で変化のみられた項目

試験群 (mg/kg 体重)		0	10	30	100	
臓器	所見/検査例数	4	5	5	5	
肝臓	単細胞壊死	総数	1	5	5	5
		程度 1	1	5	4	5
		程度 2	0	0	1	0
	限局性壊死	0	0	1	0	

所見がみられた例数

3. 胎児のデータ (第一試験)

胎児の性比は同等であった。一方 100mg/kg 群で胎児体重が軽度ながら有意に低下した。

外表および内臓検査では、100mg/kg 群において 5 腹中の 5 例の胎児に異常所見がみられた。このうち無頭症(わずかな下顎と巨舌および脳の痕跡が確認された)と二分脊椎を併発していた 1 例、髄膜瘤、二分脊椎および臍帯ヘルニアを併発していた 1 例、および髄膜瘤と臍帯ヘルニアを併発していた 1 例は投与によるものと考えられた。その他の所見は本系統のウサギに通常みられるものであることから、投与によるものとは考えられなかった。

30mg/kg 群では外表検査所見を有する胎児が 5 例みられたが、認められた所見はいずれも本系統のウサギに通常みられるものであり、同一施設で実施したウサギにおける催奇形性試験(毒性資料 No. 原体-33)において、本投与量で胎児に何ら外表および内臓所見がみられていないことから、偶発的なものと考えられた。

10mg/kg 群では影響はみられなかった。

骨格検査では、骨格奇形の発生頻度に投与の影響は明らかではなかった。100mg/kg 群で化骨遅延の有意差を伴った増加がみられ、胎児体重の低下によるものと判断された。30mg/kg 群の化骨の程度には対照群との差はみられなかった。10mg/kg 群でみられた化骨遅延は軽度であり、この群での一腹胎児数が多かったこと(対照群:8.8、10mg/kg 群:9.5)によるものであって検体投与の影響とは考えられなかった。

以上、母動物では100mg/kg 群で摂餌量と体重の一時的な減少がみられた。胎児については100mg/kg 群で胎児体重の低下とこれに伴う化骨遅延の増加、奇形を示す例の増加がみられた。従って無毒性量は母動物、および胎児動物の両方について30mg/kg/日と判断された。

生存胎児における所見

投与用量 (mg/kg 体重/日)		0	10	30	100	
検査母動物数		16	15	14	14	
総胎児数		141	142	109	119	
生存胎児数		141	142	109	119	
死亡胎児数		0	0	0	0	
体重 (g)		31.5	32.0	31.6	↓ #30.0	
体重 雄 (g)		31.9	32.2	32.0	30.1	
体重 雌 (g)		31.1	31.7	31.6	29.9	
性比 (雄の%)		51.1	56.3	47.7	47.9	
検査胎児数		141	142	109	119	
外表/内蔵検査で異常所見を有した総数		0	2	↑5	↑5	
外表異常	矮小児	0	2	2	2	
	片側横隔膜	0	0	1	2	
	短指症/指趾欠損症	0	0	2	1	
	四肢の位置異常	0	0	3	3	
	二分脊椎	0	0	1	2	
	臍帯ヘルニア	0	0	0	2	
	二分頭蓋/頭蓋形成不全/髄膜瘤	0	0	1	2	
	無頭症	0	0	0	1	
内臓検査*頭蓋(頭蓋骨陥没/脳の突出)		0	0	0	2	
骨格異常	化骨遅延	第六胸骨	0	0	1	↑4
		13肋骨(左)	71	↑89	↑79	60
		13肋骨(右)	82	95	↓78	62
		指骨(第二中手骨、左)	113	↑125	82	↓107
		指骨(第一基節骨、左)	78	84	53	↑87
		指骨(第二中節骨、左)	79	↑96	66	↑92
		指骨(第三中節骨、左)	71	↑91	59	↑89
		指骨(第四中節骨、左)	127	134	96	↓115
		指骨(第五基節骨、左)	10	↑21	9	↑24
		指骨(第一中手骨、右)	112	125↑	83	104
	指骨(第一基節骨、右)	79	82	55	↑87	
	指骨(第二中節骨、右)	83	97	69	↑91	
	指骨(第三中節骨、右)	82	↑97	64	↑90	
	指骨(第五基節骨、右)	10	↑21	8	↑19	
	趾骨(第一中節骨、左)	28	33	28	↑42	
	趾骨(第二中節骨、左)	29	31	27	↑37	
	趾骨(第三中節骨、左)	40	43	35	↑49	
	趾骨(第一中節骨、右)	28	36	24	↑43	
	趾骨(第二中節骨、右)	27	35	25	↑40	
	奇形	椎体あるいは椎弓の欠損	4	4	1	2
椎骨の奇形(アレイ型/二分脊椎)		0	1	0	2	
胸骨の化骨異常		0	0	1	2	
余剰の椎骨		0	0	0	1	
肋骨の異常(痕跡、短小、癒合)		4	4	1	3	

*Wilson法により頭部のみ検査、↑↓: p<0.05 ◆◆: p<0.01 (Fischer検定)、↓#: p<0.05 (Dunnett検定)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料 No. 原体-36)

[GLP 対応]

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

テブコナゾールの経口投与によるマウスを用いた催奇形性試験

(毒性資料No.原体-37)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1988年

1988年（追加試験）

検体の純度：

試験動物：NMRI系マウス 1群交尾雌 25匹（追加試験；1群交尾雌 10匹）

（試験開始時 雌 28g～39g，追加試験 雌 24g～40g）

試験期間：妊娠6～15日（試験期間；1986年1月～4月，追加試験；1987年6月から7月）

投与方法：

検体を0.5%クレモホアEL水溶液に懸濁し、10mL/kgの容量で0（対照群）、10、30、100mg/kgの投与量を、妊娠6日目から15日目までの10日間毎日1回経口投与した。母毒性を確認するための追加試験では0、10、20、30、100mg/kgの用量を設定し、本試験群と同様に投与した。

なお、対照群には0.5%クレモホアEL水溶液を同様に投与した。

交配及び妊娠0日

交配は2～3匹の雌と1匹の雄を約4時間同居させた。交配後3～4時間に膈栓が認められたら、この日を妊娠0日とみなした。

観察・検査項目：

親動物；妊娠0日から18日まで全動物について一般状態を観察した。妊娠18日に帝王切開した。体重は妊娠期間中及び投与期間中の増加量を計算した。帝王切開時には、肉眼的病理検査、着床数、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数、矮小児、胎盤重量について調べた。

追加試験では、本試験と同様に一般状態を観察し、妊娠16日にエーテル麻酔下で屠殺し、無作為に選んだ各群5匹について臨床生化学検査、臓器重量及び肝組織中のトリグリセリドの測定を行った（後頁参照）。

生存胎児；性別、体重、外表異常の観察を行った。

各同腹児群の約70%の胎児については骨格標本作製し骨格異常の有無を検査し、残りの胎児については内臓異常の有無を検査した。

試験結果：

本試験の結果は表 1 に示す。

1) 母動物

全投与群ともに一般症状、体重増加等には影響は認められなかった。

2) 胎児

30mg/kg 群と 100mg/kg 群で矮小児が増加した。100mg/kg 群で、発育遅延児数の増加、わずかな胎児体重の低下、軽度の胎盤重量の増加及び奇形胎児数の増加が認められた。

表 1. 本試験の試験結果

投与量 mg/kg		0	10	30	100
交尾動物数		25	25	25	25
受胎動物数		24	23	23	20
妊娠動物数		24	22	23	20
母動物	総吸収胚雌数	0	1	0	0
	一般症状				
	死亡率				
	体重				
	剖検所見				
	着床数 ★	10.6	11.2	10.7	11.4
	着床後胚数数 ★	0.8	1.0	0.5	1.3
	生存胎児数 ★	9.8	10.2	10.2	10.1
胎盤重量 (g) ★	0.10	0.10 [‡]	0.10	↑0.11	
胎児	体重 (g) ★	1.36	1.37	1.37	1.30
	生存胎児数数 ★	9.8	10.2	10.2	10.1
	雄生存胎児数 ★	5.0	5.5	4.9	4.8
	雌生存胎児数 ★	4.8	4.7	5.3	5.3
	吸収死胚 ★	0.8	1.0	0.5	1.3
	奇形児 ★	0.04	0.18 [‡]	0.0	↑0.65
	骨格変異 ★	0.08	0.05 [‡]	0.17	0.40
	矮小児 ★	0.21	0.18 [‡]	↑+0.91	↑+1.20
	外表奇形	重複奇形 ¹⁾ : 1			
	短尾				1
	骨格奇形				
	肋骨癒着		1		1
	椎骨の不对称				1
	脊椎の形成異状				2
	尾椎の湾曲				1
	頭頂骨の部分的無形成				1
	内臓奇形				
口蓋裂		4		6	
小顎		1		1	
脳室拡張				1	

*: $p < 0.05$ (U検定による)

↑+: $p < 0.05$ (χ^2 検定による)

★: 一匹の受胎動物あたり (‡: 総吸収胚 1 例を除いて算出)

空欄: 異常なし

1): 裂顔/顎/口蓋、四肢の形成障害、脊柱と肋骨の変形、短尾

[母毒性を確認するための追加試験]

観察項目

一般症状、体重増加量

臓器重量；肝、脾、腎、副腎

血液学的検査；赤血球数，白血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット，血小板数，MCV(平均赤血球容積)，平均赤血球血色素量(MCH) 平均赤血球血色素濃度(MCHC)

血液生化学的検査；アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)，アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)，アルカリホスファターゼ(ALP)，グルタミン酸脱水素酵素(GLDH)，ビリルビン(BIL)，コレステロール(CHOL)，尿素，クレアチニン，総蛋白，トリグリセリド

病理組織学的検査；

摘出した肝は10%ホルマリン液に固定した。パラフィン切片(HE染色)と凍結切片(ORO染色)は固定後に処理した。

結果

1. 一般症状、体重増加、死亡

いずれの投与群においても、中毒症状、死亡例は認められなかった。また体重増加においても検体投与群と対照群で差は認められなかった。

2. 臓器重量

対照群に比べ統計学的に実重量に有意な差はいずれの臓器においても認められなかった。しかしながら、肝対体重比については増加傾向が認められた。肝を除いた他の臓器については、対体重比においても対照群に比し差は認められなかった。

統計学的に有意な差のあった臓器(肝対体重比(申請者により実施))

mg/kg/日	10	20	30	100
体重				
肝体重比				↑121

↑↓：p<0.01 (Dunnett 検定による；申請者により実施)

3. 血液学的検査

以下のように統計学的に有意な差が認められたが程度は軽度であり、投与に関連したものとは断定することはできなかった。

項目	mg/kg	10	20	30	100
ヘマトクリット				↓93	↓94
MCH			↓95		
MCV			↓93	↓96	↓95
MCHC				↑106	
血小板					↑120
白血球				↓77	

表中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
 ↓ : p<0.05、↓↓ : p<0.01 ↓↓↓ : p<0.005 (Welch の t-検定検定による)

4. 血液生化学的検査

10mg/kg 群の ALAT の増加、30mg/kg 群の ASAT と ALAT の増加など統計学的に有意な差が散見されたが、用量に関連した変化が見られず、いずれも偶発性的の変化と考えられた。

項目	mg/kg	10	20	30	100
ALAT		↑154		↑143	
ASAT				↑214	
GLDH			↑171		
BIL		↑171	↑136	↑106	
尿素		↑131			↑120
CHOL			↑151		

表中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
 ↑ ↓ : p<0.05、↓ ↓↓ : p<0.01 ↓↓↓ : p<0.005 (Welch の t-検定検定による)
 () : 統計学的に有意差なし

5. 肝ホモジネート中のトリグリセリドの量

100mg/kg で統計学的に有意な増加がみられた。

項目	mg/kg	10	20	30	100
トリグリセリド					↑264

6. 剖検

肝臓の退色化を示す動物の頻度の増加が 100mg/kg 群で増加した

所見数

項目	mg/kg	0	10	20	30	100
肝臓退色化		1	0	0	1	4

6. 病理組織学的検査

HE 染色では 100mg/kg 群の全ての動物で肝細胞質内に空胞化が観察され、凍結切片を用いた ORO 染色で明らかになったように、高濃度の脂肪が認められた。さらに肝細胞の脂肪化は 20mg/kg と 30mg/kg で対照群と比較して軽度に増加したが、10mg/kg 群にこの所見は認められなかった。

その他の所見は投与との関連を有さなかった。従ってそれらは自然発生的と考えられた。

肝臓での主な所見

項目	mg/kg		0	10	20	30	100
空胞化			1	0	0	1	4
脂肪化 (ORO 染色)	程度 0		3	2		1	
	程度 1		2	3	4	2	
	程度 2				1	2	
	程度 3						4
	程度 4						1

程度 1 ; minimal, 程度 2 ; slight, 程度 3 ; moderate 程度 4 ; marked, 程度 5 ; massive

このように、追加試験の結果から、30mg/kg が明らかな母動物の毒性量であり、20mg/kg はその限界量であると考えられた。

以上の結果から、30mg/kg 以上で母体毒性が認められ、その結果 30mg/kg では胎児毒性（矮小児の増加）が、100mg/kg では奇形を有する胎児数が増加した。従って、無毒性量は母動物、胎児共に 10mg/kg/日であった。100mg/kg/日で催奇形性作用が疑われた。

テブコナゾールの経口投与によるマウスにおける催奇形性および母動物毒性試験
(毒性資料 No. 原体-38)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：第一試験 1995 年
第二試験 1995 年

検体の純度：

供試動物：NMRI (KFM-HAN) 雌妊娠マウス SPF (8 週齢以上 体重；21～33g)
第一試験：主群 (1 群 35 匹を交配) 衛生群 (1 群 10 匹を交配)
第二試験：主群 (1 群 30 匹を交配) 衛生群 (1 群 7 匹を交配)

投与期間：10 日間 妊娠 6～15 日

投与方法：

検体を 0.5% クレモホア水溶液に懸濁し 10mL/kg 体重の投与容量で毎日 1 回経口投与した。

投与量：第一試験；0、10、30 および 100mg/kg
第二試験；0、1 および 3mg/kg

交配および妊娠 0 日：

無処理の雌マウス 1 匹を雄 1 匹 (第二試験は雄 1 匹対雌 2 匹) と一晚同居させ交配させた。膣スメアに精子あるいは膣栓が確認された日を妊娠 0 日とした。

観察・検査項目：

親動物；

第一試験、第二試験ともに親動物は妊娠 0 日から屠殺までの間、一般状態は毎日最低 2 回、体重は毎日測定し、摂餌量は妊娠 6、11、16 および 18 (主群) 日目に測定した。

第一試験

[主群]

妊娠 18 日目に帝王切開し胎児を摘出した。帝王切開時には、肉眼的病理検査、黄体数、着床数、着床前/後死胚数、死亡胎児数、生存胎児数、矮小児、胎盤重量について調べた。生存胎児を有する雌の子宮重量を測定し、補正体重増加量を算出した。肝臓、脾臓、腎臓および副腎重量を測定し、これらの臓器は病理

組織学的検査が必要な場合に備え中性ホルマリン液中に保管した。

[衛星群]

妊娠 16 日目に非絶食下で解剖前に眼窩後叢から採血し、以下の項目について血液一般検査*および血液生化学的検査**、肝組織中の検査***を行った。さらに肉眼的病理検査を実施し、黄体数、着床数、着床前/後死胚数、胎児数について調べた。また、肝臓、脾臓、腎臓および副腎の重量を測定し、対体重比を算出した。

血液学的検査* ; 赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、血小板、網状赤血球数、赤芽球、白血球数および白血球百分率、赤血球形態

血液生化学的検査** ; グルコース、尿素、クレアチニン、ビリルリン、脂質、コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GLDH)、アルカリホスファターゼ(ALP)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(γ -GT)、カルシウム、リン、ナトリウム、カリウム、塩素、アルブミン、蛋白、グロブリン、A/G 比

肝組織中の検査*** ; N-デメチラーゼ(N-DEM)、O-デメチラーゼ(O-DEM)、チトクローム P-450、トリグリセリド

第二試験

[主群]

脾臓と腎臓、胎盤の重量を測定しなかったことを除き、第一試験の主群と同様に検査した。

[衛星群]

脾臓と腎臓の重量測定および血液一般、血液生化学検査および肝組織を用いた生化学的検査を実施しなかったことを除き、第二試験の衛星群と同様に検査した。

生存胎児 ;

第一試験、第二試験のそれぞれ主群の母動物から妊娠 18 日目に帝王切開により得た生存胎児について、摘出時に性別、体重、外表奇形を観察し、その後各腹のそれぞれ約半数の胎児をブアン氏液とアルコールに固定した。前者は WILSON 法により内臓検査を実施し、後者はアリザリンレッドで染色後骨格検査に供した。

衛星群の胎児については検査を実施しなかった。

試験結果：

1. 母動物に対する所見

1.1. 一般状態および死亡

第一、第二試験いずれにおいても検体投与に起因したと考えられる症状および死亡は主群、衛星群共に認められなかった。

第一試験では対照群(衛星群)、30mg/kg 群(主群)および 100mg/kg 群(衛星群)、第二試験では 1mg/kg の各 1 例が途中で死亡したが、誤投与、血液採取に起因したものであり、また剖検において投与に関連した所見はみられず、偶発的なものと考えられた。

1.2. 体重および摂餌量

第一、第二試験共に、摂餌量に投与の影響はみられなかった。

体重では第一試験の主群 100mg/kg 群のみ妊娠 6 日から 16 日でわずかな体重増加抑制が認められた。その他の群の体重推移は対照群と差がみられなかった。

1.3. 血液学的検査（第一試験、衛星群の動物で実施）

妊娠 16 日目において、100mg/kg 群で網状赤血球数(相対/絶対)のわずかな増加がみられ、網状赤血球の蛍光強度比率が低から高にわずかにシフトしていた。このことは赤血球新生の亢進を示唆しており、脾臓重量の軽度な増加とも関連していると考えられた。

30mg/kg 以下の群ではこの変化はみられなかった。

血液学的検査結果（変化のみられた項目）

試験群 (mg/kg)		0	10	30	100
検査例数		5	5	5	5
網状赤血球数 *		/		111	128
蛍光強度比率	高	7.7	8.8	9.5	↑ 14.8
	中	24.0	25.2	26.7	27.2
	低	68.3	66.0	63.8	↓ 58.0

*表中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
 ↑ ↓ : p < 0.05 (Dunnett 検定による)

1.4. 血液生化学検査（第一試験、衛星群の動物で実施）

妊娠 16 日目において、ASAT、ALAT のわずかな増加が 100mg/kg で、ALP のわずかな増加が 30mg/kg 以上の群で認められたが、対照群に比べ統計学的に有意な差が認められたのは 30mg/kg の ALP のみであった。検体による肝臓への影響が示唆されていることから、この変化は検体に起因した変化と考えられた。

血液生化学検査(統計学的に有意な差が認められた項目)

投与用量 (mg/kg)	10	30	100
ASAT			(116)
ALAT			(166)
ALP		↑ 171	(152)

↑:p<0.05 (Dunnett 検定) ()は統計学的に有意差なし
 表中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

1.5. 肝組織中での検査(第一試験、衛星群の動物で実施)

妊娠 16 日目において実施した肝臓ホモジネートを用いた生化学的検査では P-450、N-DEM 活性は 30 および 100mg/kg 群で、O-DEM 活性は 100mg/kg 群で統計学的に有意に増加した。トリグリセリドも統計学的に有意ではないものの 100mg/kg 群で増加する傾向がみられた。

肝組織中での検査(統計学的に有意な差が認められた項目)

投与用量 (mg/kg)	10	30	100
P-450		▲ 251	▲ 396
N-DEM		▲ 289	▲ 375
O-DEM		146	▲ 324
トリグリセリド			(168)

▲:p<0.01 (Dunnett 検定) ()は統計学的に有意差なし
 表中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
 基質/N-デメチラーゼ: アミノピリン、O-デメチラーゼ: 4-ニトロアニソール

1.6. 臓器重量および対体重比

100mg/kg 群の主群で、肝臓の対体重比および脾臓の実重量と対体重比が増加し、衛星群の肝臓の実重量および対体重比が有意に増加した。30mg/kg 群では衛星群で肝体重比が統計学的に有意に増加した。これらは投与によるものと考えられた。その他の群では肝臓、脾臓に投与による変化はみられなかった。また肝臓、脾臓以外の臓器に影響は認められなかった。

臓器重量(統計学的に有意差のみられた項目)

投与用量 (mg/kg)	1		3		10		30		100	
	主	衛星	主	衛星	主	衛星	主	衛星	主	衛星
肝臓										
実重量										▲ 137
対体重比								↑ 113	▲ 120	▲ 129
脾臓										
実重量	/	/	/	/						▲ 135
対体重比	/	/	/	/						▲ 145

↑:p<0.05、▲:p<0.01 (Dunnett 検定) ()は統計学的に有意差なし
 表中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
 /; 測定せず

1.7. 子宮内発育に対する所見

概要を表に示した。

以下に示す様に、主群の 100mg/kg 群では着床後死胚数が増加し、一腹あたりの生存胎児数が減少していた。

その他の群では、対照群に比べ差は認められなかった。

第一試験

	0mg/kg		10mg/kg		30mg/kg		100mg/kg	
	主群	衛星群	主群	衛星群	主群	衛星群	主群	衛星群
一群当り動物数	35	10	35	10	35	10	35	10
受胎動物数	30	8	28	8	27	5	26	9
妊娠維持動物	29	7	28	8	24	5	26	9
流産動物数	1	0	0	0	0	0	0	0
全吸収胚動物数	0	1	0	0	3	0	0	0
着床所見*								
検査親動物数	29	7	28	8	24	5	26	9
黄体数	11.9	12.3	12.5	15.1	13.0	11.8	12.5	15.4
着床数	11.9	12.3	12.6	15.1	13.0	11.8	12.5	15.4
着床後死胚率 [#]	8.4	4.7	8.0	10.7	12.5	18.6	▲35.3	▲27.3
着床後死胚数	1.0	0.6	1.0	1.6	1.6	2.2	↑4.4	4.2
生存胎児数	10.9	11.7	11.5	13.5	11.4	9.6	↓8.1	11.2
死亡胎児数	0.0		0.0		0.1		0.1	
胎盤重量(g)	0.09	/	0.10	/	0.08	/	0.09	/

*一腹毎の平均, [#]; (着床数-生存胎児数)/着床数

Steel 検定 (↑ ↓ : p<0.05) Fisher 検定 (▲; : p<0.01), Dunnett 検定を実施

第二試験

	0mg/kg		1mg/kg		3mg/kg	
	主群	衛星群	主群	衛星群	主群	衛星群
一群当り動物数	30	7	30	7	30	7
受胎動物数	22	6	20	7	19	7
妊娠維持動物	21	6	20	6	18	7
流産動物数	0	0	0	0	0	0
全吸収胚動物数	1	0	0	1	1	0
着床所見*						
検査親動物数	21	6	20	6	18	7
黄体数	12.0	14.0	↑14.1	10.2	12.4	11.6
着床数	11.0	14.0	13.1	10.2	11.7	11.6
着床後死胚率 [#]	8.3	6.0	8.4	9.8	11.4	3.7
着床後死胚数	0.9	0.8	1.1	1.0	1.3	0.4
生存胎児数	10.0	13.2	12.0	9.2	10.3	11.1
死亡胎児数	0		0		0	

*一腹毎の平均, [#]; (着床数-生存胎児数)/着床数

Steel 検定 (↑ : p<0.05), Fisher 検定, Dunnett 検定を実施

*一腹毎の平均 ↑ : p<0.05 (Dunnett 検定による)

1.8. 剖検

いずれの群においても、投与に関連した所見は認められなかった。

1.9. 病理組織学的検査(衛星群)

肝臓の脂肪蓄積(スダン黒染色)および空胞化の程度(HE 染色)の増強が 30 および 100mg/kg 群で、10mg/kg 群では空胞化の程度の増加がみられ、これら肝臓の変化は投与に関連したものと考えられた。副腎に脂質性色素の沈着が全群でみられ、その程度が投与群でやや増強したが、統計学的有意差を伴わず、用量との関連も明瞭でないことから検体投与との関連はないものと考えられた。

主な病理組織学的所見

試験群 (mg/kg)		第一試験				第二試験			
		0	10	30	100	0	1	3	
肝臓	検査数	5	5	5	4	7	7	7	
	総数	5	5	5	4	0	0	0	
	脂肪蓄積 ¹⁾	程度 1	2	1	0	0	0	0	0
		程度 2	2	4	3	0			
		程度 3	1	0	2	2			
		程度 4	0	0	0	2			
	検査数	10	10	10	10	7	7	7	
	総数	3	5	5	4	0	0	0	
	空胞化 ²⁾	程度 1	3	0	0	0	0	0	0
		程度 2	0	4	4	0			
程度 3		0	1	1	3				
程度 4		0	0	0	1				
副腎	検査数	10	10	10	10	7	7	7	
	総数	10	7	10	10	0	0	0	
	脂質性色素 ²⁾	程度 1	2	1	1	1	0	0	0
		程度 2	3	2	3	0			
		程度 3	4	3	4	8			
程度 4		1	1	2	1				

¹⁾ スダン黒染色 ²⁾ HE 染色 (Dunnett 検定)

2. 胎児のデータ (主群)

概要を表にまとめた。

全群の胎児の性比は同等であった。100mg/kg 群の雄胎児体重がわずかに低下した。

外表検査および内臓検査では、100mg/kg 群で異常所見を有する胎児数が有意に増加した。30mg/kg 群では所見を有する胎児がわずかに増加した項目もみられたが、検体投与との関連は明白ではなかった。10、3 および 1mg/kg 群では投与による影響はみられなかった。

骨格検査 (異常および化骨遅延) においても、100mg/kg 群で所見を有する胎児数がいくつかの項目で有意に増加した。30mg/kg 群でも、化骨遅延のわずかな増加がみられた。10mg/kg 群でみられた化骨遅延は軽度であり、投与の影響とは考えられなかった。3 および 1mg/kg 群では投与による影響はみられなかった。

生存胎児における所見

投与用量 (mg/kg)		第一試験				第二試験		
		0	10	30	100	0	1	3
検査母動物数		29	28	24	26	21	20	18
総胎児数		316	322	275	213	211	239	186
生存胎児数		315	321	273	211	211	239	186
死亡胎児数		1	1	2	2	0	0	0
体重 雄 (g)		1.2	1.2	1.1	1.0**	1.3	1.3	1.3
体重 雌 (g)		1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.3*	1.3**
性比 (雄の%)		55.6	56.1	53.5	58.8	49.8	51.9	58.1
外表異常	検査胎児数	315	321	273	211	211	239	186
	前肢に疣様形成物	1	2	4	↑7	0	0	0
	外脳症	0	3	2	↑11	0	0	0
	開眼(両側および片側)	0	2	2	↑7	0	0	0
	口蓋裂	0	1	2	↑8	0	3	1
	矮小児(<0.6g)	0	1	2	3	0	1	0
内臓異常	検査胎児数	151	154	130	99	101	115	87
	口蓋裂	1	1	1	↑6	0	3	0
	無頭蓋症(部分的)	0	1	2	↑7	0	0	0
	眼球の欠損(両側および片側)	0	1	1	0	0	0	0
骨格異常	検査胎児数	164	167	143	122	110	124	99
	化骨遅延							
	頭蓋骨(両側性、頭頂骨)	1	5	3	↑5	0	0	0
	頸椎(第五)	13	↑29	16	↑18	4	7	2
	第六胸骨	51	49	50	↑70	22	20	16
	指骨(第二指基節骨、左)	8	↑18	↑21	↑27	6	5	1
	指骨(第四趾基節骨、左)	10	↑21	↑24	↑25	5	7	1
	奇形							
	胸骨の化骨異常	9	15	7	↑15	9	13	8
	肋骨の癒合	1	0	2	3	0	0	0
	頭蓋骨の欠損(無頭蓋症を含む)	0	2	1	↑4	0	0	0
	余剰の椎骨	0	1	1	1	3	0	1
頭蓋骨の異常	0	3	↑4	0	0	1	0	
椎骨の欠損	0	0	0	↑8	0	0	0	

Dunnett 検定 (*: p<0.05, ** : p<0.01) 、Fischer 検定(↑ : p<0.05, ↑↓ : p<0.01)

以上、100mg/kg 群では着床後死胚数の増加、一腹あたりの生存胎児数の減少、胎児の外表、内臓および骨格異常所見例と化骨遅延の増加がみられた。また母動物では肝臓および脾臓重量の増加、ALP および ASAT、ALAT、P-450、N-DEM、O-DEM 活性の上昇、網状赤血球の軽度な増加および病理組織学的検査において肝臓の空胞化と脂肪蓄積の程度に増強がみられた。

30mg/kg 群では、胎児に軽度の化骨遅延がみられ、母動物の肝臓に対体重比の増加および肝臓の脂肪蓄積と空胞化、ALP、P-450、N-DEM 活性の上昇がみられた。

10mg/kg 群では肝臓の空胞化に程度の増強がみられた。

従って無毒性量は母動物については 3mg/kg/日、胎児動物については 10mg/kg/日と判断された。

テブコナゾールの経皮投与によるマウスを用いた催奇形性試験

(毒性資料No.原体-39)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1990年

検体の純度：

試験動物：NMRI系(KFM-HAN)マウス 1群交尾雌 25匹、
(試験開始時 雌8週齢，交尾日体重；22～38g)

試験期間：妊娠6～15日(試験期間1988年12月～1989年8月)

投与方法：

検体は4%CMC水溶液に懸濁し、2.5mL/kgの容量で0(対照群)、100、300、1000mg/kgの投与量を、妊娠6日目から15日目までの10日間毎日1回6時間経皮投与した。臍栓を認めた日を妊娠0日とし、妊娠18日目に動物を屠殺し、検査した。6時間の暴露終了後、処理部の皮膚を微温湯で洗浄した。皮膚反応を毎投与前にDraize法により観察した。

交尾後から屠殺までの間、母動物について一般症状は毎日観察し、体重も毎日測定し、摂餌量は妊娠6、11、16、18日に測定した。

動物の屠殺時には、黄体数、着床数、死亡胚・死亡胎児数、生存胎児数について検査した。生存胎児については、摘出時に性別、体重、外表奇形を観察し、その後各腹のそれぞれ約半数の胎児をブアン氏液とアルコールに固定した。前者はWILSON法により内臓検査を実施し、後者はアリザリンレッドで染色後骨格検査に供した。

母動物は胎児摘出後、肉眼的異常の有無を記録した。

母動物に対する影響を確認するための試験を追加実施した(後頁記載)。

1) 母動物

母動物の一般症状、皮膚症状、死亡、体重増加及び補正体重増加量、剖検所見に検体に起因する変化はみられなかった。また皮膚の局所所見も認められなかった。

2) 子宮内発育

着床数、着床後死胚数、生存胎児数、胎児体重には検体に起因する変化はみられなかった。

外表検査では、いずれの群でも口蓋裂、外脳症、後肢の位置異常、曲尾がみられた。その内1000mg/kg群の口蓋裂の発生頻度は対照群の7胎児に対し、12胎児と軽度ながら増加した。口蓋裂はこの系のマウスでは最も頻繁に自然発生する奇形であることが知られており、本試験で見られた口蓋裂の増加は特異的な奇形を誘発したものではないものと考えられた。一方、内臓検査では、外表検査でみられた所見以外に異常は認められなかった。骨格検査では、頭蓋骨欠損、胸骨分節不対称、過剰遊離肋骨及び過剰肋骨がみられた。1000mg/kgで統計的に有意に

増加した過剰肋骨を除き、全ての差は、正常の変動範囲内で偶発的であると判断された。

試験結果：

投与量 mg/kg		0	100	300	1000	
交尾動物数		34	30	34	30	
受胎動物数		26	25	26	27	
妊娠維持動物数		25	25	24	25	
母動物	一般症状					
	死亡率					
	早産				1	
	総吸収死胚雌数	1		2	1	
	体重					
	摂餌量					
	剖検所見					
	着床所見	黄体数 ★	14.4	15.4	15.9	13.7
		着床数 ★	12.7	14.4	15.0	12.1
		着床後死胚数 ★	0.6	↑1.2	1.0	0.7
生存胎児数 ★		12.0	13.3	14.0	11.4	
雌/雄		147/154	166/166	151/186	137/148	
胎児	体重 (g)	1.2	1.2	1.1	1.2	
	外表異常					
	口蓋裂	6	8	4	11	
	口蓋裂/外脳	1			1	
	口蓋裂/曲尾	1				
	後肢位置異常	1	1	1	2	
	外脳		1		1	
	曲尾			1		
	骨格異常					
	頭蓋骨欠損 ¹⁾	1				
	胸骨分節不対称	3	1	1	2	
	過剰遊離肋骨			1		
	骨格変異					
	過剰肋骨(左)	92 (58%)	106 (62%)	105 (60%)	107 (74%) ↑ ⁺	
	(右)	76 (48%)	100 (58%) ↑	91 (52%)	105 (72%) ↑ ⁺	

1) 外脳症の胎児 ★：一匹の妊娠維持動物あたり 空欄：異常なし
 ↑：p<0.05 (Dunnett 検定による) ↑⁺：p<0.05 (Fisher 検定による)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

--

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(13) 変異原性

テブコナゾールの細菌を用いた DNA 修復試験

(毒性資料 No. 原体-40)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検体の純度：
試験系：細菌（枯草菌：H17 株、M45 株）
試験方法：

(1) 検体の調製方法

使用溶媒として検体には DMSO を使い、20 μ L に必要量を含有するよう調製した。検体は 19.531 μ g/ディスクまで抗菌作用を認めたため、20 μ g/ディスクを最高濃度と決定し、以下公比 2 で 7 用量を設定した。

(2) rec-assay (孢子法)

DNA 損傷の誘起作用を調べるために、*B. subtilis* の野生株である組換修復機構保持株 (H17) と損傷株 (M45) の孢子を用いた。

両菌株の孢子は、孢子浮遊液として 4 $^{\circ}$ C で保持しているものを使用した。約 45 $^{\circ}$ C に保った孢子法用のニュートリエントアガー 1L あたり 10mL の割合で孢子浮遊液を加え、攪拌後シャーレに 10mL ずつ分注し、室温で固化させた。代謝活性化させる場合は、S-9* の 0.1mL をシャーレに分注してから孢子法用ニュートリエントアガーをシャーレに 10mL ずつ分注し、冷蔵庫で固化させた。

S-9*； 7 週令雄の SD 系ラット肝ホモジネートから得た。誘導物質としてフェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンを使用

次に検体あるいは対照物質を含む試料 20 μ L をしみ込ませたディスク（直径 8mm の円形濾紙）を 1 プレートに 2 枚置き、37 $^{\circ}$ C のふ卵器で 24 時間培養した。代謝活性化させる場合は、ディスクに補酵素液を 20 μ L、検体あるいは対照物質を含む試料 20 μ L をしみ込ませ同様な操作を行った。そして、両菌株の阻止円の直径を測定し、ディスクの直径を差し引いたものを生育阻止円 (mm) の直径とした。その結果、両菌株の生育阻止円の直径の差が 5mm 以上の場合を陽性と判断した。

対照物質として以下についても同時に試験した：

陽性対照物質；マイトマイシン C (MMC) 及び 2-アミノアントラセン (2-AA)

陰性対照物質；硫酸カマイシン (KM)

試験結果：

物質	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	- S - 9			+ S - 9		
		阻止円 (mm)		差 (mm)	阻止円 (mm)		差 (mm)
		H17	M45		H17	M45	
検 体	0.313	0	0	0	0	0	0
	0.625	0	0	0	0	0	0
	1.25	0	0	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0
	20	6	6	0	1	2	1
マイトマイシン C (MMC)	0.005	0	11	11			
	0.01	0	14	14			
2-アミノアントラセン (2-AA)	5	0	0	0	0	9	9
	20	0	0	0	0	11	11
硫酸カナマイシン (KM)	0.5	3	3	0			
	1.0	2	3	1			
ジメチルスルホキシド (DMSO)	(20 μL)	0	0	0	0	0	0

表にみられるように、検体は 20 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ においては、代謝活性化の有無にかかわらず、両菌株に対しわずかな生育阻害が認められたが、0.313~10 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ の濃度においては代謝活性化の有無にかかわらず両菌株ともに生育阻害が全く認められず、判定は陰性であった。

対照物質の成績は、本試験が検体の結果を評価するに十分な試験条件で実施されたことを保証するものであった。

従って、本剤には DNA 損傷の誘起作用は認められなかった。

テブコナゾールの細菌を用いた DNA 修復試験 (pol test)

(毒性資料 No. 原体-41)

試験機関：

報告書作成年： 1983 年

検体の純度：

試験系： 細菌 (大腸菌：K12 p3478 株、W3110 株)

試験方法：

(1) 検体の調製方法

使用溶媒として検体にはジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。検体は 10000 μ g/プレート を最高濃度と決定し、以下公比 2 で 5 用量を設定した。

陰性対照物質であるクロラムフェニコールは DMSO に溶解した。陽性対照物質であるメチルメタンサルホナート (MMS) はそのまま用いた。

(2) pol-test

DNA 損傷の誘起作用を調べるために、大腸菌の野生株である組換修復機構保持株 (W3110) と欠損株 (K12 p3478) を用いた。

両菌株は、 -80°C で保存しているものを使用した。約 37°C に保った培養液 5mL あたり菌保存液を 0.1mL の割合で加え、約 30 分間培養した。この菌液と、代謝活性化させる場合は、S-9 mix* を含むニュートリエントアガーをシャーレに分注し、固化させた。

S-9*； 雄のSD系ラット(200-300g)の肝ホモジネートから得た。誘導物質として Aroclor 1254 を使用した。

次に検体あるいは対照物質を含む検体をしみ込ませたディスク (円形濾紙) を 1 プレートに 2 枚置き、 37°C の孵卵器で 24 時間培養した。MMS は 10 μ L を用いた。

そして両菌株の阻止円の直径を測定し、ディスクの直径を差し引いたものを生育阻止円 (mm) の直径とした。そして両菌株の生育阻止円の直径の差が 2mm 以上の場合を陽性と判定した。

試験結果：

物質	濃度 µg/ディスク	- S-9 mix			+ S-9 mix		
		阻止円 (mm)		差 (mm)	阻止円 (mm)		差 (mm)
		欠損株	野生株		欠損株	野生株	
溶媒対照	0	0	0	0	0	0	0
検体	625	0	0	0	0	0	0
	1250	0	0	0	0	0	0
	2500	0	0	0	0	0	0
	5000	0	0	0	0	0	0
	10000	0	0	0	0	0	0
クロラムフェニコール ¹⁾	30	21.7	28.4	-6.7	23.2	28.2	-5.0
メチルメタンサルホナート	10	54.9	43.4	+11.5	59.0	42.1	+16.9

1) DMSO に溶解

表にみられるように検体は、625~10000µg/ディスクにわたる全濃度において S-9 mix の存在の有無にかかわらず両菌株ともに生育阻害が全く認められず、変異原性は陰性であった。陽性対照メチルメタンサルホナートは、明らかな変異原性を示した。

従って、本剤には DNA 損傷作用は認められなかった。

テブコナゾールの細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 No. 原体-42)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1991年

検体の純度：

試験系：細菌（サルモネラ菌〈TA98株、TA100株、TA1535株、TA1537株〉、
大腸菌〈wp 2 uvrA株〉）

試験方法：

(1) 検体の調製方法

濃度設定試験の結果から各菌株の濃度を設定し、使用溶媒として検体には DMSO を用い、最終的に 0.1ml に必要量を含むよう調整した。

(2) Ames 試験（プレインキュベーション法）

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の4株及びトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli*) の1株を用い、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導したラット肝から調製した薬物代謝酵素系の非存在下及び存在下で Ames らの方法により変異原性を検定した。

各濃度とも3プレートを用いた。試験は再現性をみるために2回行った。復帰変異コロニー数が2倍以上で用量相関性を示した場合を変異原性陽性と判定した。

試験結果：

表1、2の結果で示したように、2回の試験とも代謝活性化の有無にかかわらず溶媒対照の復帰変異コロニー数の2倍以上でかつ用量相関性のある増加ほどの菌株においても認められなかった。

一方、2回の試験とも、陽性対象として用いた AF-2¹⁾、NaN₃²⁾、9-AA³⁾では溶媒対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加が認められ、また、2-AA⁴⁾は S-9 Mix を加えることにより代謝活性化され、試験に用いた全ての株に著明な復帰変異を誘起した。

従って、検体の復帰突然変異原性は陰性であった。

1) : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2) : Sodium azide

3) : 9-Amino-acridine, 4) : 2-Aminoanthracene

表 1. 復帰変異試験成績 (第 1 回目) (3 反復の平均値)

物質	検体濃度	復帰変異コロニー数/プレート					復帰変異コロニー数/プレート				
		塩基対置換型			7レムソフト型		塩基対置換型			7レムソフト型	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537	TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
		S9mix -					S9mix +				
DMSO	/	109	5	11	25	7	110	7	11	30	8
検体	①	113	6	12	27	5	109	8	13	32	6
	②	115	6	13	26	5	123	9	13	34	7
	③	109	6	12	25	6	105	6	12	34	10
	④	99	6	19	26	5	107	7	14	30	7
	⑤	70*	1*	11	11*	0*	85*	8	10	30	2*
	⑥	48*	0*	8*	0*	0*	70*	2*	4*	11*	3*
陽性 対照	/	a) 408	b) 100	c) 382	d) 430	e) 1884	f) 760	g) 167	h) 499	i) 235	g) 99

表 2. 復帰変異試験成績 (第 1 回目) (3 反復の平均値)

物質	検体濃度	復帰変異コロニー数/プレート					復帰変異コロニー数/プレート				
		塩基対置換型			7レムソフト型		塩基対置換型			7レムソフト型	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537	TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
		S9mix -					S9mix +				
DMSO	/	109	10	13	22	5	116	12	13	34	10
検体	①	115	10	10	28	6	113	8	11	39	8
	②	108	10	9	29	6	102	10	15	37	8
	③	102	9	10	33	5	104	9	15	34	8
	④	102	9	10	28	6	115	12	11	32	9
	⑤	53*	4*	11	21*	1*	100	7*	10	31	4*
	⑥	40*	2*	12*	4*	1*	64*	6*	7*	15*	1*
陽性 対照	/	a) 415	b) 111	c) 302	d) 437	e) 1824	f) 714	g) 193	h) 440	i) 254	g) 109

DMSO: 溶媒対照

検体試験濃度 (µg/プレート)

WP2 以外: ①15.625, ②31.25, ③62.5, ④125, ⑤250, ⑥500

WP2/S9mix -: ①31.25, ②62.5, ③125, ④250, ⑤500, ⑥1000,

WP2/S9mix +: ①156.25, ②312.5, ③625, ④1250, ⑤2500, ⑥5000

1): () 内は -S9 Mix の WP2uvrA における濃度、

2): () 内は +S9 Mix の WP2uvrA における濃度

*: 生育阻害 (): 平均値

a) AF-2 0.01µg/プレート b) NaN₃ 0.5µg/プレート c) AF-2 0.04µg/プレート
d) AF-2 0.1µg/プレート e) 9-AA 80.0µg/プレート f) 2-AA 1.0µg/プレート
g) 2-AA 2.0µg/プレート h) 2-AA 20.0µg/プレート i) 2-AA 0.5µg/プレート

テブコナゾールの細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 No. 原体-43)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1983年

検体の純度：

試験系：サルモネラ菌 (TA98 株、TA100 株、TA1535 株、TA1537 株)

試験方法：プレートインコーポレーション法

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 Salmonella typhimurium (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) の 4 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) の非存在下及び存在下で Ames らの方法を用いて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、1 回目は 20~12500 μ g/プレートの範囲の 5 濃度で、2 回目は 75~1200 μ g/プレートの 5 濃度で実施した。陽性対照物質 tryptaflavine 及び 2-Aminoanthracene は DMSO で調製した。Endoxan は脱イオン水で調製した。試験は 4 反復で行った。

試験結果：

表 1、2 に示したように、2 回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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に溶媒対照の 2 倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いた tryptaflavine、2-Aminoanthracene 及び Endoxan は溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断される。

表 1. 1 回目試験 (表中の数値は 4 反復の平均値)

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		
			TA1535	TA100	TA1537	TA98	
溶媒対照	0	—	4	72	5	12	
検体	20	—	4	61	4	9	
	100	—	7	74	3	13	
	500	—	2	52	1	7	
	2500	—	b	0	0	4b	
	12500	—	p	p	p	p	
溶媒対照	0	+	14	89	3	19	
検体	20	+	13	94	3	16	
	100	+	13	105	9	17	
	500	+	9	65	0	13	
	2500	+	7b	b	b	b	
	12500	+	p	p	p	p	
陽性対照	Endoxan	145	—	9	72	51	
			+	76	206	500	
	2-AA	3	—	9	89	12	12
			+	186	490	122	1307
	T. flavin	50	—				17
			+				426

*TA1535; 145μg/プレート, TA100; 290μg/プレート

陽性対照物質 2-アミノアントラセン及びトリパフラビンは DMSO に溶解した。エンドキサンは脱イオン水に溶解した。

b: 背景細菌叢の減少、p: 沈殿析出

Endoxan : エンドキサン

2-AA : 2-アミノアントラセン

T. flavin : トリパフラビン

表 2. 2 回目試験 (表中の数値は 4 反復の平均値)

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		
			TA1535	TA100	TA1537	TA98	
溶媒対照	0	—	4	87	7	18	
検体	75	—	5	76	8	21	
	150	—	5	77	6	18	
	300	—	9	77	5	24	
	600	—	6	46	4	10	
	1200	—	2b	b	0	b	
溶媒対照	0	+	15	121	13	21	
検体	75	+	14	96	11	22	
	150	+	16	97	11	25	
	300	+	16	104	8	20	
	600	+	13	74	8	24	
	1200	+	11b	b	b	b	
陽性 対照	Endoxan	145/290*	—	10	85	69	
			+	199	396	1410	
	2-AA	3	—	13	148	23	50
			+	352	1219	189	566
	T. flavin	50	—				39
			+				1506

*TA1535;145μg/プレート, TA100;290μg/プレート

陽性対照物質 2-アミノアントラセン及びトリパフラビンは DMSO に溶解した。エンドキサンは脱イオン水に溶解した。

B: 背景細菌叢の減少

Endoxan : エンドキサン

2-AA : 2-アミノアントラセン

T. flavin : トリパフラビン

テブコナゾールの細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 No. 原体-44)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1988年

追加報告書作成年：1988年

検体の純度：

試験系：サルモネラ菌 (TA98 株、TA100 株、TA1535 株、TA1537 株、TA1538 株)

試験方法：プレートインコーポレーション法

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537) の4株を用いた試験、及びTA1538株を用いた追加試験において、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 mix)の非存在下及び存在下で Ames らの方法を用いて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、1回目は37.5~2400 μ g/プレートの範囲の7濃度で、2回目は39.5~450 μ g/プレートの7濃度で実施した。陽性対照物質もDMSOに溶解した。試験は4反復で行った。2回目の試験はS-9 mix中の肝ホモジネート濃度を1/3にした場合の試験も行った。TA1538株を用いた追加試験は2回目の試験条件下のみで行った。

試験結果：

表1、2に示したように、2回の試験共に検体を用いた全用量において代謝活性化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に溶媒対照の2倍以上で、かつ用量相関性を伴った増加は認められなかった。一方、600 μ g/プレート以上の濃度において、生育阻害が認められた。

一方、陽性対照として用いたS-9 mix非存在下でのアジ化ナトリウム(NaN₃)、ニトロフラントイン(NF)、4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン(4-NPDA)では、溶媒対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、S-9 mix存在下条件下での2-アミノアントラセン(2-AA)は、試験に用いたすべての菌株に明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、検体は本試験条件下において、復帰変異誘発作用は有さないものと判断される。

表 1. 1 回目試験 (表中の数値は 4 反復の平均値)

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		
			TA1535	TA100	TA1537	TA98	
溶媒対照	0	—	13	82	8	17	
検体	37.5	—	10	97	7	16	
	75.0	—	12	92	8	15	
	150.0	—	12	94	7	21	
	300.0	—	13	74	4	16	
	600.0	—	b	b	b	b	
	1200.0	—	0	0	0	b	
	2400.0	—	0	0	0	0	
溶媒対照	0	+	16	137	7	34	
検体	37.5	+	12	115	7	31	
	75.0	+	17	105	8	27	
	150.0	+	15	112	11	35	
	300.0	+	10	79	7	30	
	600.0	+	b	b	b	19	
	1200.0	+	0	b	0	b	
	2400.0	+	0	0	0	0	
陽性対照	NaN ₃	10	—	754			
	NF	0.2	—		186		
	4-NPDA	10/0.5*	—			62	111
	2-AA	3	+	336	989	30	1305

b: 背景細菌叢の減少

*: TA1537; 10μg/プレート, TA98; 0.5μg/プレート

陽性対照物質は全て DMSO に溶解した。

NaN₃ : アジ化ナトリウム

NF : ニトロフラントイン

4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン

2-AA : 2-アミノアントラセン

表 2. 2 回目試験及び TA1538 を用いた追加試験

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			
			TA1535	TA100	TA1537	TA98	TA1538	
溶媒対照	0	—	18	113	7	20	13	
検体	39.5	—	17	127	7	19	13	
	59.3	—	14	136	8	25	11	
	88.9	—	15	133	8	21	10	
	133.3	—	15	119	6	29	12	
	200.0	—	17	98	5	17	10	
	300.0	—	19	84	6	18	9	
	450.0	—	19	88	4	17	b	
溶媒対照	0	+	19	164	8	41	23	
検体	39.5	+	20	146	9	33	20	
	59.3	+	15	146	8	40	24	
	88.9	+	20	131	7	41	20	
	133.3	+	15	164	9	47	22	
	200.0	+	13	97	7	39	29	
	300.0	+	10	114	5	37	25	
	450.0	+	9	101	4	21	17 [*]	
溶媒対照	0	+ [*]	16	139	8	43	22	
検体	39.5	+ [*]	15	147	9	35	22	
	59.3	+ [*]	14	162	9	37	24	
	88.9	+ [*]	12	166	7	40	20	
	133.3	+ [*]	10	184	9	49	16	
	200.0	+ [*]	7	111	5	27	16	
	300.0	+ [*]	9	83	4	34	13	
	450.0	+ [*]	7	77	4	28	11 [*]	
陽性対照	NaN ₃	10	—	811				
	NF	0.2	—		416			
	4-NPDA	10/0.5 ^{**}	—			125	166	126
	2-AA	3	+	313	1821	53	1415	363
	2-AA	3	+ ^{**}	194	2404	281	1334	1378

TA1538 以外の菌株の数値は 1 試験区 (4 反復) の平均値

TA1538 は S-9 mix+ は 2 試験区、S-9 mix- は 4 試験区の平均値、^{*} は 1 試験区の平均値

b: 背景細菌叢の減少

*: 肝ホモジネート濃度を 1/3 にした S-9 mix を用いた。

** : TA1537: 10 μg/プレート, TA98 及び TA1538: 0.5 μg/プレート

NaN₃ : アジ化ナトリウム、NF : ニトロフラントイン、4-NPDA : 4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン、2-AA : 2-アミノアントラセン

陽性対照物質は全て DMSO に溶解した。

テブコナゾールの CHO 細胞-HGPRT (前進突然変異) 法による in vitro 変異原性 誘発試験

(毒性資料 No. 原体-45)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年 : 1988 年

検体の純度 :

試験系 : チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞 (CHO-K1-BH₄)

試験方法 :

CHO 培養細胞の HGPRT 座における突然変異原性を in vitro 条件下で評価した。検体の濃度は S9 mix 非存在下では 80 μ g/mL から 100 μ g/mL の範囲内で、S9 mix 存在下では 12.5 μ g/mL から 200 μ g/mL の範囲とし、各々 6 濃度を設定した。その他、陰性対照群 (無処理) 1 群、溶媒対照群 1 群、陽性対照群として、エチルメタンスルホネート (EMS ; 非代謝活性化)、メチルクロルアントラセン (MCA ; 代謝活性化) それぞれ 1 群を設定した。検体および陽性対照物質の調製にはジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

試験用量設定の根拠

ペトリ皿それぞれに 200 個の細胞を播種し、検体濃度は S9 mix 非存在下では 5 μ g/mL から 125 μ g/mL の範囲内で 7 濃度、S9 mix 存在下では 3.9 μ g/mL から 1.0mg/mL (溶解限界濃度) の範囲で 9 濃度を設定し 3 時間暴露して細胞毒性を観察した。その結果、細胞生存率の減少 (全細胞を死滅) が 0-90% の範囲である検体濃度で変異原性試験を実施した。

コロニー形成率と突然変異試験

フラスコあたり 4×10^6 細胞の CHO 細胞を、250mL のフラスコの培養用培地に入れた。接着後 (16~24 時間後) に、細胞を低血清量 (5%) の培地を用い、非代謝活性下及び代謝活性下条件で 2 時間各濃度の検体に暴露させた。各対照群は同じ条件下で培養した。その後、単層細胞を PBS で洗浄してトリプシン処理した。これをフラスコ中の培地に約 1.5×10^6 細胞の密度で、また 3 枚のペトリ皿それぞれに 200 個の細胞を、再播種した。ペトリ皿で 7 日間培養し、コロニー数を算定することにより細胞毒性を判定した。

一方、フラスコに再播種した細胞は、細胞増殖と誘発変異株の発現のために培養

し、3日と6日に継代した。最初の継代では、各処理群および対照群の2個の培養を各々2個の250mLのフラスコに、約 1.5×10^6 個の細胞を再播種し、6日間培養した。突然変異株細胞分離のために、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の6-チオグアニン(6-TG)を添加したヒポキサンチン無含有培養液のペトリ皿(合計8-10皿)に 2×10^5 個の細胞を播種した。さらに、3枚のペトリ皿には各用量群のコロニー形成率を求めるために、ペトリ皿あたり200個の細胞を播種した。約5%炭酸ガスを含んだ加湿された空気中で、 37°C で7-8日間の培養後、コロニーを固定してギムザ液で染色した。突然変異株分離用のペトリ皿では6-TG抵抗性コロニー数を、コロニー形成率測定用ペトリ皿ではコロニー数を測定した。ただし、50個以下の細胞から形成されるコロニーは除外した。

試験結果：

1. 非代謝活性化条件における突然変異原性試験

非活性化条件下で3試験を実施した。その結果、2反復で行った3番目の試験において相対生存率を指標とした細胞毒性が用量相関的に観察され、最高濃度では全ての細胞が死滅した。最初の1試験でも細胞毒性が見られた。一方、すべての試験の統計学的解析において、処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。

陽性対照群のEMSは、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。従って、検体は本非活性化試験において非変異原性物質と判断された。

2. 代謝活性化条件における突然変異原性試験

活性化条件下で $200\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度を採用して3試験を実施した。いずれの試験でも最高濃度では全ての細胞が死滅した。すべての試験の統計学的解析において、処理した濃度のいずれにも突然変異の頻度に有意な増加は認められなかった。

従って、検体は本代謝活性化試験において非変異原性物質と判断された。

陽性対照物質のMCAは、すべての試験で明らかに変異原性を誘発した。

以上の結果より、本検体は代謝活性化の有無にかかわらず、CHO-HPRT 前進突然変異原性試験において非変異原性物質であると判断された。

非代謝活性化

群	濃度 μg/mL	試験①					試験②				
		生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー形 成率%	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー 形成率%	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対照	0	158±12	125.4	19	83.2±6	11.4	149±12	115.5	21	60.2±2	17.4
溶媒対照 (DMSO)	0	126±9	100.0	32	79.7±2	20.1	129±8	100.0	15	54.7±3	13.7
陽性対照 EMS	900	101±3	80.2	98	72.3±3	67.8**	84±2	65.1	106	50±13	106.0**
検体	80.0	144±8	114.3	48	78.2±4	30.7	108±2	83.7	12	59.7±9	10.1
	90.0	160±10	127.0	26	87.0±6	14.9	135±16	104.7	9	45.7±4	9.9
	92.5	130±4	103.2	52	101±1	25.7	132±10	102.3	13	69.7±4	9.4
	95.0	145±5	115.1	34	77.2±11	22.0	181±12	140.3	13	60.7±3	10.7
	97.5	132±15	104.8	50	98.3±6	25.4	192±9	148.8	14	64.7±9	10.9
	100.0	117±22	92.9	8	60.2±8	7.4	166±3	128.7	2	59.7±8	1.7
群	濃度 μg/mL	試験③									
		生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー 形成率%	変異率 ×10 ⁻⁶					
陰性対照	0	196±3	108.9	1 3	89±3 77.2±10	0.7 2.4					
溶媒対照 (DMSO)	0	180±5	100.0	1 4	78.2±17 72.5±9	0.8 3.4					
陽性対照 EMS	900	138±12	76.7	114 157	49.3±5 57.2±14	144.5** 171.5**					
検体	80.0	160±31	88.9	2 4	75.3±11 80±4	1.7 3.1					
	90.0	201±14	111.6	3 1	73.2±6 82.5±8	2.6 0.8					
	92.5	150±17	83.3	3 1	84.8±15 73.2±3	2.2 0.9					
	95.0	201±4	111.6	2 3	86.5±10 79.3±9	1.4 2.4					
	97.5	167±11	92.7	8 5	91.5±11 81.7±5	5.5 3.8					
	100.0	147±6	81.7	3 4	67.7±2 67.7±11	2.8 3.7					

A: 溶媒対照に対する百分率

B: 試験①及び②は 10 ペトリ皿のコロニーの合計、試験③は 8 ペトリ皿のコロニーの合計

EMS : エチルメタンスルホネート

統計学的処理 : ** p>0.01(Kastenbaum and Bowman,1970)

代謝活性化

群	濃度 μg/mL	試験①					試験②				
		生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー形 成率%	変異率 ×10 ⁻⁶	生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー 形成率%	変異率 ×10 ⁻⁶
陰性対照	0	128±10	81.5	24	81.2±10	16.4	180±16	140.6	13	58.8±6	11.1
溶媒対照 (DMSO)	0	157±8	100.0	41	103.3±12	19.8	128±12	100.0	25	69.2±7	18.1
陽性対照 MCA	5	126±10	80.3	72	60.5±9	59.5**	128±12	100.0	240	62.7±3	191.5**
検体	12.5	149±26	94.9	31	0±0	#	123±11	96.1	41	70.7±7	29.0
	25.0	140±19	89.2	39	74±1	29.3	163±20	127.3	28	70±7	20.0
	50.0	107±6	68.2	11	61.3±6	9.0	146±11	114.1	29	67±9	21.6
	100.0	177±21	112.7	36	64.5±7	27.9	127±10	99.2	20	64.5±7	15.5
	150.0	195±13	124.2	29	68.5±17	23.5	140±21	109.4	42	89.3±6	26.1
	200.0	-	-	-	-	-	-	4±2	3.1	-	-
群	濃度 μg/mL	試験③									
		生存 細胞数	相対 増殖 ^A	総変異 株数 ^B	コロニー形 成率%	変異率 ×10 ⁻⁶					
陰性対照	0	225±38	112.5	2 5	103±2 111.3±7	1.2 2.8					
溶媒対照 (DMSO)	0	200±13	100.0	2 3	101.2±7 83.3±3	1.2 2.3					
陽性対照 MCA	5	199±10	99.5	41 52	78.8±3 78.5±7	32.5** 41.4**					
検体	12.5	212±40	106.0	4 9	90.3±6 87.2±6	2.8 6.5					
	25.0	221±37	110.5	5 3	87.8±11 79.8±3	3.6 2.3					
	50.0	164±13	82.0	4 6	97.2±6 101±8	2.6 3.7					
	100.0	161±13	80.2	14 2	93.3±4 95.5±10	9.4 1.3					
	150.0	15±4	7.5	- -	- -	- -					
	200.0	-	-	- -	- -	- -					

A: 溶媒対照に対する百分率

B: 試験①及び②は10ペトリ皿のコロニーの合計、試験③は8ペトリ皿のコロニーの合計

#: コロニー形成率が0であったため、算出できなかった。 -: 全細胞の消滅

MCA : メチルクロルアントラセン

統計学的処理 : ** p>0.01(Kastenbaum and Bowman,1970)

テブコナゾールのラット初代肝培養細胞を用いた in vitro 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験
(毒性資料 No. 原体-46)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1987年

検体の純度：96.5%

試験系：ラット肝臓の初代培養細胞

試験方法

ラットの初代肝培養細胞を用い、in vitro 系において検体あるいはその代謝物の DNA に及ぼす影響を、UDS を指標として評価した。これは、核内の粒子数を計測し、DNA に対する障害の存在とその程度を推定することによった。25.5 μ g/mL \sim 0.504 μ g/mL の用量において UDS を評価した。

1. 供試液の調製

検体及び陽性対照の 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

2. 肝細胞の単離

無処理の F344 系雄ラット 1 例をコラゲナーゼ液を用いて生体位灌流し、肝を摘出してから肝細胞を単離調製した。

3.

4. UDS 検査用標本の作製と観察

単離した肝細胞は、牛胎児血清を添加した Williams E 培養液 (WME) で培養した。まず、単層細胞を得るために、培養皿に 0.5×10^6 個の肝細胞を加え、1.5 \sim 2 時間 5% 炭酸ガス下の加湿された空気中で 37 $^{\circ}$ C で培養した。培養皿中にカバーガラスを置き、その後 WME での洗浄によりカバーガラスに未接着の細胞を除去した。単層細胞を得てから、所定の検体液とともに牛胎児血清と 5 μ Ci/mL の 3 H-チミジンを含む培養液で 18 \sim 19 時間培養した。実験は各用量 5 回実施し、そのうち 2 回は細胞毒性の評価に用いた。培養後、培養皿を WME で 2 回洗い、さらに 20 \sim 24 時間培養し、トリパンブルー色

素を排除した細胞数を鑑定した。一方、UDS 試験では培養後チミジン含有 WME で 2 回洗い、さらに 20～24 時間培養した後、1%クエン酸ナトリウムでの核の膨化処理に続いて、氷酢酸と純エタノール混液(1:3)での細胞の固定を行い、水洗後に 24 時間以上風乾した。オートラジオグラフィ処理のために、カバーガラスをスライドガラスの上に細胞層を上にして置き、NTB-2 写真用乳剤での処理を行い、暗箱中において 4°C で 7～10 日間の保持感光後に現像した。さらに、スライドガラスをヘマトキシリンエオシンで染色した。各動物、各濃度あたり 3 枚のスライドガラスを作製し、各スライドガラスごとに 50 細胞を観察した。従って、各濃度あたり 150 細胞を評価した。³H-チミジンの取り込みを反映する細胞中の粒子を、ZEISS 顕微鏡に接続した TV カラーモニターを用いて計測した。

試験結果：

核粒子数、6 個以上及び 20 個以上の粒子を有する核数、生存率の要約を表に示した。

試験群	核当たりの 粒子数*	6 個以上の粒子 を有する核数	20 個以上の粒子 を有する核数	生存率 (%) **
溶媒対照群 (DMSO: 1%)	0.99	2.7	0.0	100.0
陽性対照群 2-AAF: 0.1µg/mL	11.55	78.0	12.0	84.1
検体 25.2µg/mL	0.79	2.0	0.0	55.8
10.1	1.05	2.7	0.0	79.0
5.04	1.10	2.0	0.0	95.6
2.52	0.77	2.0	0.0	100.9
1.01	0.93	2.0	0.0	104.1
0.504	0.83	2.0	0.0	97.5

*: 3 培養の平均値、** : 溶媒対照に比した一定面積中の生存細胞数
DMSO : ジメチルスルホキシド, 2-AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

ラットの初代肝細胞を検体の 25.2µg/mL から 0.504µg/mL の用量において UDS を評価した。UDS を評価した用量範囲において細胞毒性が認められた (生存率: 55.8～104.1%)。曝露によって UDS を示唆する兆候は認められず、用量相関性のある結果も得られなかった。

従って、検体はラット初代肝培養細胞において、DNA 修復合成を誘発しなかったものと評価した。

テブコナゾールの染色体異常誘発作用を評価するための ヒトのリンパ球の培養における in vitro 細胞遺伝学的試験

(毒性資料 No. 原体-47)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1988年

検体の純度：
試験系： 健常人の血液のリンパ球
試験期間： 72時間（1987年2月23日～27日：培養・処理・標本作成）
試験方法：

・検体の調製方法

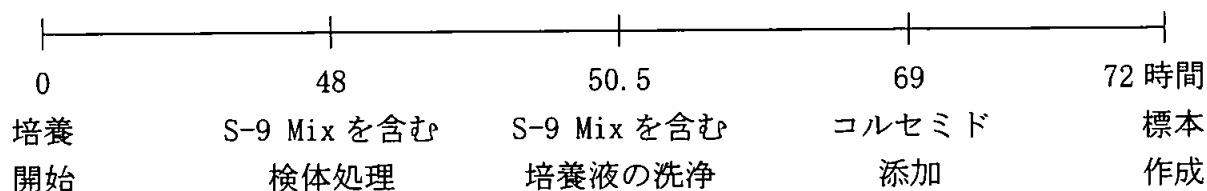
検体はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解した。陽性対照の Mitomycin C（MMC）及び Cyclophosphamide（CYCL）はハンクス液に溶解した。

・染色体異常試験

健常人の血液 10mL 当り 0.5mL の抗凝血剤 Liquemin（Roche）を混合し、注射器でそのうち 2 mL を吸い上げる。0.6mL まで沈降した透明層を捨て、次の層 0.2mL を含む残部 9 mL 染色体培地 B（Seromed, phytohaemagglutinin 含有）の入っている培養フラスコに移し、37°C で培養した。

培養開始 48 時間後に検体を代謝活性化のための S-9 Mix 存在下では 30、100 及び 300µg/mL、S-9 Mix 非存在下では 3、10 及び 30µg/mL の濃度になるように培養液に加えた。陰性対照群は DMSO のみを加えた。陽性対照群は S-9 Mix 非存在下では MMC を、S-9 Mix 存在下では CYCL を各々 0.15 及び 15µg/mL の濃度になるよう添加した後、試験は下記手順のように処理を行い各培養液毎に 2～3 枚の標本作製した。

実験の実施手順



染色体異常の評価は各濃度毎に約 200 個の中期細胞の染色体を観察した。染色体の分類はギャップ、切断、断片、欠失、交換、重複異常とした。

試験結果：

1. 分裂頻度

S-9 Mix 非存在下

検体投与群の細胞分裂頻度は陰性対照群に比べ減少しなかったが、陽性対照群は陰性対照群よりも減少を示した。

S-9 Mix 存在下

検体投与群の 100 μ g/mL 以上では用量相関を示す細胞分裂頻度の低下を示し、300 μ g/mL では細胞の断片がみられた。また、陽性対照群では細胞分裂頻度の減少を認めた。

表 1. 細胞分裂頻度

試験群	濃度 μ g/mL	S-9 Mix の 有無	検査した 核数	細胞分裂	
				絶対数	割合 (%)
陰性対照	0	-	4000	48	100.0
検体投与	3		4000	84	175.0
	10		4000	96	200.0
	30		4000	55	114.6
陽性対照	0.15		4000	26	52.2*
陰性対照	0	+	4000	88	100.0
検体投与	30		4000	88	100.0
	100		4000	56	63.6*
	300		細胞破片のみ		
陽性対照	15		4000	46	52.3*

* : $P < 0.01$ (χ^2 検定)

陰性対照群： S-9 Mix 非存在及び存在ともに DMSO

陽性対照群： S-9 Mix 非存在下は mitomycin C、存在下は cyclophosphamide

2. 染色体の評価

S-9 Mix 非存在下

検体に異常の出現頻度の増加はみられなかった。評価に重要なパラメーター（ギャップを含める場合と含めない場合の異常を有する中期細胞及び交換を有する中期細胞）に関して、統計学的に有意な変動は認められなかった。

陽性対照群は異常割合に、明らかで統計学的に有意な増加を引き起こした。

S-9 Mix 存在下

検体は 30 と 100 μ g/mL の量で染色体異常数の増加をもたらさなかった。評価に重要なパラメーター（ギャップを含める場合と含めない場合の異常を有する中期細胞及び交換を有する中期細胞）に関して、統計学的に有意な増加は認められなかった。300 μ g/mL の量では細胞毒性のため中期細胞は得られなかった。

陽性対照群は異常割合に明らかで統計学的に有意な増加をもたらした。

表 2. 染色体異常細胞数

試験群	濃度 µg /mL	S-9 Mix の 有無	評価 細胞数	ギャップを 含む 異常細胞数		ギャップを 含まない 異常細胞数		交換		倍数体		
				n	%	n	%	n	%	n	X	%
陰性対照	0	-	200	14	7.0	7	3.5	0	0	1	400	0.3
検体投与	3		200	12	6.0	7	3.5	0	0	0	400	0
	10		200	8	4.0	4	2.0	0	0	1	400	0.3
	30		200	11	5.5	7	3.5	0	0	0	400	0
陽性対照	0.15		200	109*	54.5	67*	33.5	12*	6.0	1	400	0.3
陰性対照	0	+	200	22	11.0	12	6.0	0	0	0	400	0
検体投与	30		200	24	12.0	8	4.0	0	0	0	400	0
	100		200	14	7.0	4	2.0	0	0	0	300	0
	300		細胞破片のみが認められた									
陽性対照	15		200	82*	41.0	53*	26.5	8*	4.0	0	400	0

* : P<0.01 (χ^2 検定)、 X : 検査した数

陰性対照群 : S-9 Mix 非存在及び存在ともに DMSO

陽性対照群 : S-9 Mix 非存在下は mitomycin C、存在下は cyclophosphamide

結論 :

検体は S-9 Mix 非存在下および存在下とも構造的にも数的にも染色体異常誘発作用を示さなかった。

テブコナゾールのチャイニーズハムスターの卵巣由来培養細胞を用いた
in vitro 姉妹染色分体交換試験

(毒性資料 No. 原体-48)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1987年

検体の純度：

試験系：チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞 (CHO-CCL 61)

試験方法：

検体の 30 μ g/mL まで (S-9 mix 非存在下) または 120 μ g/mL まで (S-9mix 存在下) の用量を用い、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)由来培養細胞の染色体異常を in vitro 条件下において姉妹染色分体交換系で評価した。

検体はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、陽性対照物質であるトリエチレンメラミン(TEM; 非代謝活性化)とシクロホスファミド(CP; 代謝活性化)は蒸留水に溶解した。

検体の濃度として、S-9 mix 非存在下では 4、8、15 及び 30 μ g/mL、一方 S-9 mix 存在下では、15、30、60 及び 120 μ g/mL を SCE の評価に供した。その他、陰性対照群(無処理)1 群、溶媒対照群 1 群(DMSO)、陽性対照群として、TEM(0.025 μ g/mL)群、CP(2.5 μ g/mL)群それぞれ 1 群を設定した。

操作

非代謝活性化

培養は2反復で実施した。フラスコあたり 5×10^5 個の CHO 由来細胞を牛胎児血清を加えた培養液で16~24時間培養した。その後、所定量の検体を入れ、さらに2時間後に2-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU:最終濃度0.01mM)を添加し、30時間培養した。回収の2時間前に培養液をPBSで洗浄し、コルセミド(0.1 μ g/mL)とBrdU(最終濃度0.01mM)を含む新鮮な培養液を加え培養を継続した後、分裂中期細胞を回収した。その後、細胞を0.075MのKCl低張液で処理し、メタノール・氷酢酸(3:1)混合液で1晩固定し、スライドガラス上に滴下し、風乾した。

代謝活性化

培養は2反復で実施した。フラスコあたり 5×10^5 細胞の CHO 由来細胞を牛胎児血清を加えた培養液で16~24時間培養した。その後、所定濃度の検体とS-9Mixを含む培養液で2時間、37°Cで培養した。その後、細胞をPBSで洗浄し、2-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU:最終濃度0.01mM)を含む培養液を添加した。さらに30時間培養した。回収の2時間前に培養液をPBSで洗浄し、コルセミド(0.1 μ g/mL)を加え培養を継続した後、分裂中期細胞を回収した。その後、細胞を0.075MのKCl低張液で処理し、メタノール・氷酢酸(3:1)混合液で1晩固定し、スライドガラス上に滴下し、風乾した。

SCEの分染と観察

スライドガラスにヘキスト33258(緩衝液中に5 μ g/mL)を滴下し、10分間染色し、さらにギムザ染色し、風乾した。SCEの観察は2回目について各培養あたり25の中期分裂細胞で顕微鏡下で行った。また、100個の中期分裂細胞について分裂回数も評価した。

結果及び考察

1. S-9 mix 非存在下における SCE

非活性化条件下で 4、8、15 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 濃度を試験した。

30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では溶媒対照に比べ、細胞サイクルがわずかに遅延した。全ての用量において SCE は統計学的有意に増加しなかった。

陽性対照群の TEM は、明らかに陽性反応を示した。

2. S-9 mix 存在下における SCE

代謝活性化条件下では 15、30、60 及び 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 濃度を試験した。

120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では細胞毒性のために、中期分裂細胞が得られなかった。60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では溶媒対照に比べ、細胞サイクルが遅延した。

全ての用量において SCE は統計学的有意に増加しなかった。

陽性対照物質の CP は、明らかな陽性反応を示した。

以上の結果に基づき、本検体は、S-9 mix の存在下あるいは非存在下にかかわらず、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いた in vitro 姉妹染色分体交換試験系において陰性であるものと結論した。

S-9 mix 非存在下

用量	検査 細胞数	細胞分裂動態 (%) [#]			SCE/染色体	SCE 平均値±SD
		M1	M2	M3		
無処理対照	25	4	64	32	0.78	14.76±3.63
	25	10	34	56	0.77	
溶媒対照	25	10	80	10	0.87	16.00±5.14
	25	14	82	4	0.81	
検体 4.0µg/mL	25	12	78	10	0.66	13.18±4.60
	25	28	68	4	0.71	
8.0	25	16	84	0	0.80	14.94±3.59
	25	8	90	2	0.77	
15	25	12	88	0	0.83	15.52±4.85
	25	16	84	0	0.81	
30	25	68	32	0	0.88	16.62±4.42
	25	74	26	0	0.87	
陽性対照 (TEM)	25	36	64	0	5.58	106.44±12.13**
0.025µg/mL	25	40	60	0	5.71	

** : P.<0.01 (Student t-test)

: Cell Cycle Kinetics: 100 個の中期細胞中

S-9 mix 存在下

用量	検査 細胞数	細胞分裂動態 (%) [#]			SCE/染色体	SCE 平均値±SD
		M1	M2	M3		
無処理対照	25	4	72	24	0.80	14.90±4.61
	25	4	70	26	0.76	
溶媒対照	25	4	64	32	0.79	15.98±5.38
	25	0	66	34	0.89	
検体 15µg/mL	25	2	80	18	0.76	15.46±5.76
	25	6	62	32	0.87	
30	25	2	66	32	0.79	15.80±5.01
	25	6	48	46	0.88	
60	25	58	42	0	0.81	16.36±5.00
	25	68	32	0	0.91	
120	25	0	0	0	-	-
	25	0	0	0	-	
陽性対照 (CP)	25	0	84	16	1.95	36.44±6.22**
2.5µg/mL	25	2	82	16	1.86	

** : P.<0.01 (Student t-test)

: Cell Cycle Kinetics: 100 個の中期細胞中

テブコナゾールのマウスを用いた小核試験

(毒性資料No. 原体-49)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：1985年

検体の純度：

試験動物：NMRIマウス、8-12週齢、1群雌雄各5匹、陽性対照群雌雄各5匹、
体重雌雄 23~38g、

試験方法：検体を1%クレモホア水溶液に懸濁した。

試験1；検体2000mg/kgの用量を1回強制経口投与した。

投与後24、48及び72時間目に動物を屠殺し、大腿骨より骨髓塗抹標本作製した。

試験2；試験1において多染性及び正染性赤血球数が少なかったため、48及び72時間目の評価ができなかったことから、試験2は500mg/kgを投与し、投与後24、48及び72時間目に動物を屠殺し、大腿骨より骨髓塗抹標本作製した。

試験3；試験2において48時間目の評価できなかったことから、試験3は200mg/kgを投与し、投与後48時間目に動物を屠殺し、大腿骨より骨髓塗抹標本作製した。

陽性対照群にはエンドキサン29mg/kgを、陰性対照群には溶媒として用いた1%クレモホア水溶液を同様に投与した。陰性及び陽性対照群は投与後24時間に屠殺し、骨髓塗抹標本作製した。試験3では陽性対照は48時間とした。

塗抹標本はSchmid法により作製し、以下の項目を鏡検した。

(i) 各動物につき、1000個の多染性赤血球(PCE)における小核を有する多染性赤血球(MNPCE)出現頻度

(ii) 各動物につき、多染性赤血球1000個当たり正染赤血球数

(iii) 各動物につき、1000個の正染性赤血球(NCE)における小核を有する正染赤血球数

評価は、小核を有する多染性赤血球数が統計学的に有意に増加した場合を陽性と判定した。

試験結果：結果を次頁に示した。

死亡例は認められなかった。

2000mg/kg群では、溶媒対照群と比較し24時間目で小核を有する多染性赤血球数の有意な増加は認められなかった。

多染性赤血球及び正染性赤血球比が異常値を示し、投与により赤血球生成阻害が認められた。

500mg/kg群では、溶媒対照群と比較し24及び48時間目で小核を有する多染性赤血球数の有意な増加は認められなかった。また、2000mg/kg群と同様500mg/kg群でも赤血球生成阻害が認められた。

200mg/kg群では、溶媒対照群と比較し48時間目で小核を有する多染性赤血球数の有意な増加は認められなかった。赤血球生成阻害が認められた。

陽性対照であるエンドキサンでは、小核を有する多染性赤血球の有意な増加が認められた。赤血球生成阻害はいずれの試験でも認められなかった。

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

試験結果

	薬物	投与量 (mg/kg)	処理 時間	性	動物 数	MNPCEの出現頻 度/1000細胞	PCE/NCE 1000細胞	MNCEの出現頻 度/1000細胞
試験 1	陰性対照 (1%クレモホル液)	—	24	雌 雄	10	1.1	726	1.0
	検体	2000	24	雌 雄	10	1.9	2050**	1.5
			48	雌 雄	10	—*	7458#	2.7
			72	雌 雄	10	—*	3243#	3.0
	陽性対照 (エンドキサン)	29	24	雌 雄	10	12.1**	771	2.1
試験 2	陰性対照 (1%クレモホル液)	—	24	雌 雄	10	2.2	637	1.7
	検体	500	24	雌 雄	10	2.5	2084	1.8
			48	雌 雄	10	—*	3540#	2.5
			72	雌 雄	10	1.8	3886#	1.6
	陽性対照 (エンドキサン)	29	24	雌 雄	10	13.7**	509	2.5
試験 3	陰性対照 (1%クレモホル液)	—	48	雌 雄	10	2.5	487	1.7
	検体	200	48	雌 雄	10	1.5	1640**	1.0
	陽性対照 (エンドキサン)	29	24	雌 雄	10	14.4**	605	1.0

—* : 多染性及び正染性赤血球数が少なかったため評価できず

** : $p < 0.01$ (Wilcoxon検定)

: 数値が大きすぎて計算外

MNPCE : 多染性赤血球1000個あたりの小核を有する細胞数

MNCE : 正染性赤血球1000個あたりの小核を有する細胞数

テブコナゾールの突然変異誘発性の評価のための雄マウスにおける優性致死試験

(毒性資料 No. 原体-50)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年月日： 1986 年

検体の純度 :
供試動物 : NMRI 系マウス (試験開始時約 8 ~12 週令) 1 群雄 50 匹、雌 600 匹
交配期間 : 雄動物 ; 48 日間交配

投与方法：

検体を、1%クレモホア水溶液に懸濁し、雄動物に 10mL/kg の容量で 0 (対照群) 及び 2000mg/kg の投与量を 1 回経口投与した。投与した雄マウスを 4 日間毎に 1 匹の無処置雌マウスと交配させ、これを 12 回計 48 日間交配させた。この交配期間の終了時には、理論的には投与時に睾丸に存在した精子がすべて受精に用いられたことになる。各雌マウスの交配期間の中間時点から 15 日目に屠殺し、子宮を観察し、黄体数、着床数、生存胚数及び死亡胚数を計測した。

試験結果：

1) 一般症状

雄マウスには 2000mg/kg の一回経口投与後、障害的な症状を呈することなく、死亡例も認められなかった。

2) 優性致死試験

交配 時期	妊娠率(%)		黄体数*		着床数*		着床前死亡*		生存胚数*		死亡胚数*	
	対照群	投与群	対照群	投与群	対照群	投与群	対照群	投与群	対照群	投与群	対照群	投与群
1**	82	76	13.5	13.6	11.9	11.9	1.61	1.66	11.3	11.2	0.61	0.74
2	74	80	13.6	13.7	12.9	12.4	0.70	1.35	11.8	11.3	1.05	1.07
3	72	84	13.6	14.0	13.0	13.3	0.58	0.62	12.3	12.6	0.72	0.69
4	74	84	13.5	13.5	12.6	12.5	0.86	1.05	11.9	11.7	0.76	0.81
5	82	84	13.1	13.2	12.3	12.3	0.76	0.93	11.5	11.4	0.83	0.90
6	74	80	13.8	14.0	13.1	12.4	0.70	1.65	12.5	11.5	0.65	0.88
7	86	74	13.6	13.4	12.8	12.7	0.79	0.68	11.9	11.6	0.91	1.11
8	84	76	14.6	14.1	14.3	12.9	0.31	1.16	13.3	12.1	0.95	0.82
9	79.6	78	14.3	13.7	13.6	12.8	0.67	0.92	12.8	11.8	0.87	1.03
10	76	78	13.2	14.6	12.4	14.1	0.82	0.49	11.9	13.4	0.50	0.79
11	82	68	13.7	13.6	12.8	13.0	0.88	0.62	12.2	12.2	0.61	0.88
12	76	72	13.6	14.0	12.5	13.4	1.08	0.56	11.4	12.7	1.11	0.75
計	78.5	77.8	13.7	13.8	12.9	12.8	0.81	0.98	12.1	12.0	0.80	0.87

*妊娠雌動物当たり。

**各交配時期について、各 50 匹の雌動物を交配に用いた。

投与群の妊娠母動物の妊娠率、黄体数、着床前死亡数、生存胚数及び死亡胚数は対照群と同等であり、検体の影響は認められなかった。

以上の結果より、本検体には突然変異誘発作用はないものと判断される。

(14) 生体機能への影響

テブコナゾールにおける薬理試験

(毒性資料 No. 原体-51)

試験機関 :

報告書作成年 : 1992 年

検体の純度 :

試験期間 : 1991 年 7 月 4 日 ~ 1992 年 7 月 31 日

試験方法

マウス、ラット、ウサギに検体を 1% クレモホア EL 水溶液に懸濁し調製した。投与方法は経口投与とし、投与前は前夜より絶食させた。

試験項目および試験結果 :

1. 中枢神経系に対する作用

1) マウスの一般行動

供試動物 : ICR 系 (Cr1-CD1) 雌雄マウス, 5 週齢, 17.3 ~ 25.5g, 1 群雌雄各 3 匹

投与方法

マウスに検体を 0、150 (雌のみ)、500、1500 および 5000mg/kg の用量で経口投与した。検体投与前、投与後 10、30 分、1、3、6 時間、1 日および 2 日目に Irwin 法に従い、一般行動観察を行った。

結果

雄の 500 ~ 1500mg/kg と雌の 150 および 500mg/kg 投与では検体の作用はみられなかった。雄の 5000mg/kg および雌の 1500mg/kg 以上の投与では認知力、運動性、筋緊張の低下、呼吸数の減少および運動失調等が、投与後 10 分から、3 ~ 6 時間をピークとして、2 日後まで認められた。雌の 5000mg/kg では投与 2 日後に 1 例が死亡した。

2) ウサギの一般行動

供試動物 : 日本白色種雄ウサギ, 10 ~ 11 週齢, 2.66 ~ 2.97kg, 1 群雄各 3 匹

投与方法

ウサギに検体を 0、150、500 および 1500mg/kg の用量で経口投与した。検体投与前および投与後 10、30 分、1、3、6 時間、1 日および 2 日目に Irwin 法に従い、一般行動観察を行った。

結果

150 および 500mg/kg 投与では検体による明らかな作用はみられなかった。1500mg/kg の投与では投与 10 分から行動抑制と反応性の低下がみられ、投与 3 日後に 1 例が死亡した。なお、500mg/kg の投与では摂餌および飲水量の減少を伴った体重増加の抑制がみられた。

3) マウスの自発運動量

供試動物：ICR 系(Crl-CD1)雄マウス，5 週齢，20.9～25.5g，1 群雄各 5 匹

投与方法

マウスに検体を 0、150、500、1500 および 5000mg/kg の用量で経口投与した。検体投与前、投与後 10、30 分 1、2、3、4、5 および 6 時間に回転カゴ法に従い、自発運動量を計測した

結果

150 および 500mg/kg 投与では検体による明らかな影響はみられなかった。1500 および 5000mg/kg の投与では投与 30 分～1 時間に運動量の低下を認め、それ以降は 6 時間後まで明らかな自発運動の抑制が認められた。

4) ウサギの体温

供試動物：日本白色種雄ウサギ，10～11 週齢，2.66～2.97kg，1 群雄各 3 匹

投与方法

ウサギに、検体を 0、150、500 および 1500mg/kg の用量で経口投与した。検体投与前および投与後 10、30 分、1、3、6 時間、1 日および 2 日目にサーミスタ型直腸体温計で直腸温を測定した。

結果

150 および 500mg/kg 投与では検体による明らかな作用はみられなかった。1500mg/kg の投与では投与 3～6 時間後に対照群に比較し、一過性の体温下降がみられ、投与 1 日後には 3 例中 2 例で体温の上昇傾向が認められた。

2. 呼吸・循環器系に対する作用

1) 無麻酔ウサギの呼吸数・心拍数

供試動物：日本白色種雄ウサギ，10～11 週齢，2.66～2.97kg，1 群雄各 3 匹

投与方法

ウサギに、検体を 0、150、500 および 1500mg/kg の用量で経口投与した。検体投与後 10、30 分、1、3、6 時間、1 日および 2 日目に胸部の動きから呼吸数を聴診にて心拍数を測定した。

結果

無麻酔ウサギの呼吸数および心拍数に対して、150mg/kg 投与では検体の作用はみられなかった。500 と 1500mg/kg の投与では、30 分後からそれぞれ 1 時間と 6 時間まで、一過性の呼吸数の増加が認められたが、1500mg/kg

の投与では投与1日から逆に呼吸数の著しい減少がみられた。

心拍数は1500mg/kgの投与で30分後に著しい心拍数の増加が認められ、以降その状態は6時間後まで継続した。

2) 麻酔ウサギの呼吸・血圧・心拍数

供試動物：日本白色種雄ウサギ，10～11週齢，2.66～2.97kg，1群雄各3～4匹
投与方法

ウレタン麻酔下（1.5g/kg s.c.）で胸部に呼吸ピックアップを取り付け呼吸運動を、頸動脈に装着した圧トランスデューサーを介して血圧をポリグラフに記録した。そして安定した状態を確認後、検体を0、150、500および1500mg/kgを静脈内投与し以後3～6時間にわたり連続して記録した。

結果

麻酔ウサギの呼吸・血圧・心拍数に対して、150および500mg/kgの投与では検体による明らかな作用はみられなかった。1500mg/kgの投与では呼吸の亢進およびその後の抑制がみられ、投与1～4時間後に血圧下降、投与30分後に心拍の減少がみられた。

3) 麻酔ウサギの心電図

供試動物：2) で用いたウサギを使用，1群雄各3～4匹
投与方法

ウレタン麻酔下（1.5g/kg s.c.）で四肢に電極を取り付け、第I誘導心電図をポリグラフに記録した。そして安定した状態を確認後、検体を0、150、500および1500mg/kgを静脈投与し、以後3～6時間にわたり連続して記録した。

結果

心電図に対して、150および1500mg/kg投与では特異的な変化は認められなかった。

3. 自律神経系に対する作用

1) ウサギの瞳孔径

供試動物：日本白色種雄ウサギ，10～11週齢，2.66～2.97kg，1群雄各3匹
投与方法

ウサギに、検体を0、150、500および1500mg/kgの用量で経口投与した。検体投与前および投与後10、30分、1、3、6時間、1日および2日目にノギスにて瞳孔径を測定した。

結果

瞳孔径に対して、すべての投与群はいずれの検査時期とも検体による明らかな変化は認められなかった。

4. 体性神経系に及ぼす影響

1) ラットの腓腹筋収縮

供試動物：SD系(Cr1-CD)雄ラット，7～8週齢，292～365g，1群雄各3～4匹
投与方法

検体を0、1500および5000mg/kgの用量で経口投与した。経口投与直後にウレタン麻酔(1.0g/kg i.p.)を行い、大腿部で坐骨神経を露出し、刺激電極を装着した。つぎに腓腹筋を半ばまで剥離し、張力トランスデューサーを介して収縮をポリグラフに記録した。電気刺激条件は、パルス幅0.1 msec.、刺激間隔0.1 Hz、電圧3Vとした。記録は投与後2～3時間にわたって連続的に行った。

結果

腓腹筋収縮に対して、1500および5000mg/kg投与では明らかな変化は認められなかった。

2) ラットの筋弛緩

供試動物：SD系(Cr1-CD)雄ラット，7～8週齢，183～214g，1群雄各5匹
投与方法

検体を0、150、500、1500および5000mg/kgの用量で経口投与した。検体投与前および投与後30分、1、3、6時間および1日目に動物が傾斜板からすべり落ちる限界角度を測定した。

結果

筋弛緩に対して、150～1500mg/kg投与では明らかな変化はみられなかった。5000mg/kgの投与では投与後1時間から6時間にかけて、落下限界角度の減少傾向がみられた。

5. 消化管に及ぼす影響

1) ウサギの生体位腸管

供試動物：日本白色種雄ウサギ，10～11週齢，2.66～2.97kg，1群雄各3～4匹
投与方法

ウレタン麻酔下(1.5g/kg s.c.)において腸管内にバルーンを挿入し、圧トランスデューサーに接続して腸管運動をポリグラフに記録した。安定した状態を確認後、検体を0、150、500および1500mg/kgの用量で経口内投与し、以後連続して3～6時間にわたり記録した。

結果

生体位腸管に対して、すべての投与群とも検体による明らかな作用は認められなかった。

2) ラットの炭末輸送能

供試動物：SD系(Cr1-CD)雄ラット，7～8週齢，183～219g，1群雄各5匹

投与方法

ラットに検体を0、150、500、1500および5000mg/kgの用量で経口投与した。検体投与後3時間および24時間後にそれぞれ10%炭末液(1ml/100g)を経口投与し、投与後30分に動物を屠殺し、全小腸を摘出してその全長と炭末の移動距離を測定し、炭末移動率を求めた。

結果

150および500mg/kg投与では検体による明らかな作用はみられなかった。1500mg/kg以上の投与では投与3時間後に用量相関的で有意な炭末移動率の増加傾向が認められたが、投与1日後では有意な増加はみられなかった。

3) ラットの胆汁排泄

供試動物：SD系(Cr1-CD)雄ラット，7～8週齢，240～271g，1群雄各3匹

投与方法

ラットに検体を0、150、500、1500および5000mg/kgの用量で経口投与した。その1日後にウレタン麻酔下で開腹後総胆管カニューレを挿入し、胆汁を2時間採取して分泌量と固形成分量を測定した。

結果

胆汁排泄に対して、150および500mg/kg投与では検体による明らかな作用はみられなかった。1500および5000mg/kgの投与では用量相関的で有意な排泄量の増加が認められたが、固形成分量では明らかな変化はみられなかった。

6. 腎機能に及ぼす影響

1) ラットの尿排泄

供試動物：SD系(Cr1-CD)雄ラット，7～8週齢，190～217g，1群雄各5匹

投与方法

ラットに検体を0、150、500、1500および5000mg/kgの用量で経口投与しその直後と投与後1日および2日に、動物を採尿ケージに収容して、4時間の尿を各々採取した。なお、採尿の1時間前と直前に2.5mL/100gの生理食塩水を強制経口投与した。そして、尿量、外観を観察し、比重を屈折計で、尿中の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- を電解質分析装置を用い測定した。また、尿試験紙を用いてpH、潜血、糖、蛋白、ケトン体、ビリルビン、亜硝酸塩およびウロビリノーゲンを定性的に測定した。

結果

尿排泄に対して、150mg/kgの投与では各項目において検体による変動はみられなかった。500mg/kgの投与では投与1日後にpHの低下と電解質の減少、また1500mg/kgの投与ではpHの低下、尿量の減少および糖・蛋白・潜

血の陽性例が投与1日又は2日目に認められた。1500mg/kg では1例、5000mg/kg では全例のラットが投与翌日に死亡した。

7. 血液に及ぼす影響

1) ラット血液の溶血

供試動物：SD系(Cr1-CD)雄ラット，7～8週齢，225～252g，1群雄各5匹

投与方法

ラットに検体を0、150、500、1500および5000mg/kgの用量で経口投与した。投与3時間および1日後に麻酔下で腹部大動脈より採血し、Parpart法に準じ0.1～0.6%リン酸緩衝液加食塩水溶液各5mLに分注し、遠心分離後の上清の吸光度(波長540nm)を分光光度計で測定し、溶血度を求めた。

結果

いずれの投与群も溶血作用を示すような有意な変動は認められなかった。

2) ラットの血液凝固

供試動物：SD系(Cr1-CD)雄ラット，7～8週齢，183～219g，1群雄各5匹

投与方法

ラットに検体を0、150、500、1500および5000mg/kgの用量で経口投与した。投与後3時間および1日後に後大静脈より採血し、クエン酸ソーダ加血漿を分離してプロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

結果

血液凝固に対して、150～1500mg/kgの投与ではいずれの検査時とも検体による有意な変動はみられなかった。5000mg/kgの投与では投与1日後に活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。

以上の結果から、致死量に近い用量では、中枢神経系の抑制、呼吸循環系の一過性の亢進とその後の機能低下、さらには腎機能低下などがみられた。推定最小致死量の10分1量では各生体機能への影響を示唆する所見はみられず、本検体の一般薬理作用といえる特異的な作用は認められなかった。

本試験の結果ならびに別に実施された急性毒性試験の結果は、本検体の経口、経皮および吸入経路からの急性毒性は非常に弱いことを示しており、本検体が散布作業に伴って暴露された場合や誤って摂取された場合に、急性中毒が発現する可能性は極めて低いと推測された。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

項目 (試験動物)	投与 経路	投与量 mg/kg	動物数 /群	無作用量 mg/kg	作用量 mg/kg (死亡例)	結果の概要
中枢神経系	マウスの一般行動 Irwin 法	経口 0, 150, 500, 1500, 5000	♂♀ 3	500	1500 (♀1/3)	運動性の低下等
	ウサギの一般行動 Irwin 法	経口 0, 150, 500, 1500	♂ 3	150	500 (♂1/3)	行動抑制等
	マウスの自発運動 回転カゴ法	経口 0, 150, 500, 1500, 5000	♂ 5	500	1500	運動量の低下
	ウサギの体温 直腸温	経口 0, 150, 500, 1500	♂ 3	150	500	一過性の下降
呼吸・循環系	ウサギの呼吸数	経口 0, 150, 500, 1500	♂ 3	150	500	一過性の下降後上昇
	ウサギの心拍数	経口 0, 150, 500, 1500	♂ 3~4	500	1500	心拍数の増加
	麻酔ウサギの 呼吸・血圧・心拍	静注 (麻酔) 0, 150, 500, 1500	♂ 3~4	500	1500	呼吸は亢進後抑制、 血圧下降、心拍減少
	麻酔ウサギの 心電図	静注 (麻酔) 0, 150, 500, 1500	♂ 3~4	500	1500	—
自律神経系	ウサギの瞳孔	経口 0, 150, 500, 1500	♂ 3	1500	—	—
体性神経系	ラットの 腓腹筋収縮	経口 (麻酔) 0, 1500, 5000	♂ 3~4	5000	—	—
	ラットの筋弛緩 傾斜板法	経口 0, 150, 500, 1500, 5000	♂ 5	1500	5000	落下限界角度の減少傾向
消化管	麻酔ウサギの 生体位腸管	経口 (麻酔) 0, 150, 500, 1500	♂ 3~4	1500	—	—
	ラットの 炭末輸送能	経口 0, 150, 500, 1500, 5000	♂ 5	500	1500	炭末移動の増加
	ラットの胆汁排泄	経口 (麻酔) 0, 150, 500, 1500, 5000	♂ 3	500	1500	胆汁排泄量の増加
腎機能	ラットの尿排泄	経口 0, 150, 500, 1500, 5000	♂ 5	500	1500 (♂1/5) 5000 (♂5/5)	pH の低下、 尿量の減少
血液	ラットの溶血	経口 0, 150, 500, 1500, 5000	♂ 5	5000	—	—
	ラットの血液凝固 時間	経口 0, 150, 500, 1500, 5000	♂ 5	1500	5000	PTT の延長

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.原体-52)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

毒性資料 No. 原体-53)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は、バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料 No. 原体-54)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料No.原体-55)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。
