

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(7) 繁殖毒性及び催奇形性

1) 繁殖性に及ぼす影響

ラットを用いた 3 世代繁殖試験 (含催奇形性試験)

[資料 No. 19]

試験機関:

報告書作成年:

検体の純度:

供試動物: ラット、試験開始時 4~5 週齢

1 群雌雄各 35 匹 (妊娠雌 5 匹を催奇形性用に使用、1 群雌雄各 5 匹を臨床検査用に使用)

投与後 90 日時に各群雌雄各 5 匹を殺処分し、臨床検査及び臓器重量測定に供した。各世代の B 児出産予定日の 1 日前に各群 5 匹の妊娠雌動物を催奇形性検査に供した。

投与期間: F₀ 世代; 投与開始から F₁B 児動物の離乳後の 30 週間

F_I 世代; F₁B 児動物の離乳時から F_{II}B 児動物の離乳後の 34 週間

F_{II} 世代; F_{II}B 児動物の離乳時から F_{III}B 児動物の離乳後の 32 週間

F_{III} 世代; 離乳まで

投与方法: 検体を 5、25、100 ppm 含有した飼料を自由に摂取させた。なお対照群には基礎飼料のみを与えた。

交配・調整・選抜及び観察・検査項目:

試験の概要を次頁以降の表にまとめた。

一般状態及び死亡率;

母動物の一般症状及び生死を毎日観察した。新生児の一般症状については、母動物 5 例の児動物を対象に出産時から 21 日目まで観察した。

体重・摂餌量・食餌効率・検体摂取量及び飲水量;

1 群雌雄各 25 匹についての体重及び摂餌量を毎週測定し (ただし交配期間中の摂餌量は測定せず)、食餌効率及び検体摂取量も算出した。飲水量は 1 週毎に給水瓶を秤量して算出した。

交配及び妊娠の確認;

投与 90 日後に雌雄 1 対 1 で 7 日間同居させ、膣栓の見られた日を妊娠 1 日目とした。各世代の最初の産児を A 児 (F₁A、F₂A、及び F₃A) とし、離乳後に殺処分し、10 日間の休息期間後、同じ雌雄で再度交配して 2 回目の産児の B 児 (F₁B、F₂B 及び F₃B) とした。兄妹交配は避けた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

繁殖性に関する指標；

交配、妊娠及び哺育期間の観察に基づき、受胎率(%)、妊娠率(%)、生存率(%)、哺育率(%)を算出し、出産時に同腹児の平均児動物数、出生児数、死産児数、性比を観察し、哺育1、4及び21日目に児動物の生存数及び体重を測定した。

$$\text{受胎率 (\%)} = \frac{\text{妊娠した雌動物数}}{\text{交配に用いた雌動物数} * } \times 100$$

Fertility index

* : 交配期間中に死亡した動物を除く

$$\text{妊娠率 (\%)} = \frac{\text{生存児を出産した雌動物数}}{\text{妊娠した雌動物数}} \times 100$$

Gestation index

$$\text{生存率 (\%)} = \frac{\text{哺育4日の生存児数}}{\text{分娩時の生存児数}} \times 100$$

Viability index

$$\text{哺育率 (\%)} = \frac{\text{哺育21日の生存児数}}{\text{哺育4日に選抜した児数}} \times 100$$

Lactation index

催奇形性に関する試験；

B世代の出産予定1日前に5匹の妊娠雌ラットを帝王切開し、黄体数、着床痕数、生存胎児数、死亡胎児数、胚数、吸収胚数、性別、胎盤重量、胎児重量について調べた。胎児は解剖し、アリザリン染色した骨格標本を作製して骨格異常の有無を検査した。また、新生児は哺育21日目にX線検査を行い、骨格異常を検査した。骨格に異常の認められた場合は染色して詳細な検査を行った。

臨床検査；

各世代の1群雌雄各5匹を対象にして投与開始後4、8、13週に下記検査を実施した。また、親動物の殺処分前(投与開始後30~34週)に各群雌雄各5匹についても同様の検査を行った。

血液学的検査；

1晩絶食させた動物の舌下静脈より採血し、ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球数、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)、総白血球数、白血球百分率を測定した。

血液生化学的検査；

採取した血漿を用いてグルタミン酸ピルビン酸転移酵素SGPT(ALT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、血糖、尿素窒素、総蛋白、アルブミン、総コレステロールを測定した。FⅠ及びFⅡ世代の動物ではさらに血漿コリンエステラーゼ、赤血球コリンエステラーゼも測定した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

尿 検 査；

採尿用ケージに収容し、24 時間尿を採取し、尿量、pH、比重、蛋白、グルコース、血液色素、ケトン体の測定及び沈渣の鏡検を行った。採尿中は絶食としたが、水は自由に摂取させた。

特 殊 検 査；

F₀世代の動物は 13 週後に 1 群当り雌雄各 5 匹に対して脳・アセチルコリンエステラーゼ、肝・ブチリルコリンエステラーゼ及び肝・N-デメチラーゼの活性を測定した。

肉眼的病理検査；

血液学的検査に供した 1 群雌雄各 5 匹を投与開始 90 日後に殺処分し、剖検及び次の臓器重量の測定を行った。

繁殖試験に用いた動物は、F₀世代では 30 週後、F_IB 世代では 34 週後、F_{II}B 世代では 32 週後に殺処分及び剖検し、各群雌雄各 5 匹を対象に下記の臓器重量を測定した。F_{III}B 世代の動物は 21 日後に各群雌雄各 10 匹に対して肉眼的病理検査を行った。

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

病理組織学的検査；

F_{III}B 世代の動物から各群雌雄各 10 匹を対象に、常法に従って下記組織の病理標本を作成し、鏡検した。

唾液腺、乳腺、皮膚、腸間膜リンパ腺、甲状腺、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、肝臓、胸腺、心臓、肺、気管、舌、食道、胃、小腸、大腸、膀胱、十二指腸、坐骨神経、骨髓（大腿骨）、骨格筋、精囊、精巣、卵巣、前立腺、子宮、眼、視神経、脳、下垂体

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

試験の概要

世代		期間	交配・調整・選抜	観察・検査項目	
親	児				
F ₀	F _{1A}	生育 (90 日間)	90 日後、各群雌雄各 5 匹を殺処分。	投与終了までの期間、一般状態、生死を毎日観察。体重、摂餌量 (交配中を除く)、飲水量を毎週測定。殺処分動物は臨床検査、剖検、臓器重量を測定。	
		交配 (1 週間)	雌雄 1 対 1 で交配、交尾成立は臍栓で確認 (妊娠 1 日)	毎日臍栓の有無を確認。	
		妊娠			
		A 児出産 哺育 (3 週間)	哺育 4 日目に可能な限り同腹児数を雌雄各 4 匹に調整。	出産状況の観察。出生児数、死産児数、性比、各群 5 同腹児の一般状態観察、哺育 1、4、21 日に児動物の生存数及び体重測定	
		離乳	哺育 21 日目に F _{1A} 児を廃棄		
		休息 (10 日間)			
	F _{1B}	再交配 (1 週間)	1 回目と同じ雌雄で交配	(F _{1A} 児動物に準ずる)	
		妊娠	出産予定 1 日前に雌 5 匹を帝王切開し、催奇形性検査を実施。	催奇形性検査：黄体数、着床痕数、生存胎児数、胚・胎児死亡、吸収、性別、胎児重量、胎盤重量、骨格検査。	
		B 児出産 哺育 (3 週間)	(F _{1A} 児動物に準ずる)	(F _{1A} 児動物に準ずる)	
		離乳	哺育 21 日目に離乳、各腹から次世代親として選抜	哺育 21 日目に全離乳児を X 線で骨格検査。親動物は投与開始後約 30 週で殺処分し、雌雄各 5 匹について臨床検査、剖検、臓器重量測定。特殊検査。	
F _I	F _{IIA}	生育 (90 日間)	投与開始 90 日後に各群雌雄各 5 匹を殺処分。	(F ₀ 世代に準ずる)	
		交配 妊娠 A 児出産 哺育 離乳 休息 再交配	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる、ただし特殊検査は実施しなかった。また、親動物は投与開始後 34 週で殺処分し、臨床検査は投与開始後 31 週に実施した)	
	F _{II B}	妊娠 B 児出産 哺育 離乳			
	F _{II}	F _{III A}	生育 (90 日間)	投与開始 90 日後に各群雌雄各 5 匹を殺処分。	(F ₀ 世代に準ずる)
			交配 妊娠 A 児出産 哺育 離乳 休息 再交配	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)
F _{III B}		妊娠 B 児出産 哺育 離乳	(F ₀ 世代に準ずる)	(F ₀ 世代に準ずる)	
			哺育 21 日目に児動物を殺処分	児動物では各群雌雄各 10 匹を病理組織検査。親動物は投与開始後 32 週で殺処分し、臨床検査は投与開始後 31 週に実施。	

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

結果：繁殖性に関する結果概要を表 1、催奇形性の結果を表 2 に示す。また、臨床検査及び臓器重量において、高用量群に有意差が認められた項目及び検査時期の結果を表 3～6 に示す。

親動物

死亡及び一般状態；

いずれの世代においても明らかな一般症状又は毒性影響はみられず、試験期間中に死亡例もなかった。

体重、摂餌量、食餌効率及び飲水量；

測定時において有意差が散見されたが、検体投与用量および投与期間との関連した傾向は認められなかったことから、いずれの投与群においても検体投与の影響は認められなかった。

血液学的検査；

全世代にわたって統計学的に有意な変化が散見されたが、いずれも一貫性がみられなかったことから、検体投与に関連しないものと考えられた。

血液生化学的検査及び特殊検査；

血糖値は、F0 世代の投与群雌雄において対照群に比較し僅かに上昇したが、この有意差ある変化も用量相関性がなく、また正常範囲内の変化であった。F I B 世代の 100 ppm 群でも増加を認めたが、正常範囲内の変化であった。F I I B 世代では変化を認めなかった。

F I B 世代 8 週検査において、雄の全投与群で SGPT (ALT) 活性の低下が認められた。

[参考] 当該毒性試験機関における各項目における正常範囲は次の通りである。

血糖 (空腹時)	65	～	110	mg/dL
尿素窒素 (BUN)	10	～	25	mg/dL
アルブミン (血漿)	2.1	～	3.5	g/dL
総蛋白 (血漿)	6.0	～	8.0	g/dL
総コレステロール	60	～	120	mg/dL
血漿コリンエステラーゼ				
雄	0.65	～	1.15	U/mL
雌 (加齢とともに増加する)	1.5/3.0	→	2.5/6.0	U/mL
赤血球コリンエステラーゼ	2.0	～	4.0	U/mL
GPT (ALT)	10	～	40	mg/dL
アルカリホスファターゼ (加齢とともに数値は小さくなる)				
雄	70/130	→	45/80	IU
雌	40/80	→	30/60	IU

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

[申請者注]

F0 世代の投与群及び F I B 世代の 100 ppm 群雌雄において血糖値が僅かに上昇したが、この有意差ある変化は用量相関性がなく、また平常範囲内の変化であった。F II B 世代では変化を認めなかった。

F I B 世代 8 週検査において、雄の全投与群で SGPT (ALT) 活性の低下が、F II B 世代の投与開始後 31 週の検査で 100 ppm 群の雌に蛋白の増加及び SGPT (ALT) の減少、雄に赤血球 ChE 及びアルカリホスファターゼの増加がみられ、25 ppm 群の雄でも赤血球 ChE の増加がみられた。しかし雌の蛋白の値が正常範囲よりごく僅かに高かった以外、これらの変化はいずれも正常範囲内であったことから、毒性学的有意性はないものと思われる。

特殊検査；

脳-アセチルコリンエステラーゼ、肝-ブチリルコリンエステラーゼ及び肝-デメチラーゼに関する特殊検査 (F₀ 世代) では対照群に比較し有意な差は認められなかった。

尿検査；

全世代にわたって統計学的に有意な変化が散見されたが、いずれも一貫性がみられなかったことから、検体投与に関連しないものと考えられた。

臓器重量；

全世代にわたって統計学的に有意な変化が散見されたが、いずれも一貫性がみられなかったことから、検体投与に関連しないものと考えられた。

[申請者注] F II B 世代の投与開始後 32 週の検査で 25 及び 100 ppm 群の雄の最終体重が有意に低下したが、25 ppm 群では 13 週時の体重で有意に増加していたが、32 週時では反転し、有意に低下したことから、偶発的変化と考えられる。100 ppm 群では 13 週時でも若干体重減少傾向がみられていたため、検体投与による可能性が考えられたが、同群の動物は投与開始時から対照群より体重が低かったこと、体重変化では影響がなかったことから、毒性学的有意性はないものと考えられた。また、両群の雄では心臓、肺、肝臓の絶対重量の低下がみられ、肺の絶対重量では 100 ppm 群の雌及び 5 ppm 群の雄でも有意に低下したが、相対重量ではいずれも有意差がみられなかったことから、毒性学的有意性はないものと考えられた。相対重量では 25 及び 100 ppm 群の雄の脳重量が有意に増加したが、絶対重量では逆に低下していたことから体重減少によるものであり、毒性学的有意性はないものと思われる。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

肉眼的病理検査；

全世代にわたって投与に関連した剖検所見は認められなかった。

病理組織学的検査；

投与に起因する変化は認められなかった。

繁殖成績；

いずれの世代においても統計学的に有意な受胎率及び妊娠率の変化は認められなかった。100 ppm 群では、F₀ 親及び F_I 親の受胎率が低下したが、F_{II} 親の 2 回目 (B 児) の受胎率は対照群と同等であったことから、投与の影響ではないと判断された。

児動物 いずれの世代においても児動物に対する影響は認められなかった。

胎児—催奇形性試験；

催奇形性試験の所見は正常であり、数例の軽度の異常が主として胸骨 (胎児：化骨、軽度の分割、点状骨化中心、児動物：軽度の開列、過剰骨化等) 及び肋骨 (胎児：12/12、12/13、12/14、13/14、14/14、児動物：10/13、11/13、12/12、12/13、湾曲等) に認められたのみであった。これらの異常は全て試験に用いたラットの系の正常範囲のものであった。

[申請者注] 認められた異常は 25 ppm 群でやや高値を示したが、100 ppm 群では対照群とほぼ同等であったことから検体投与による胎児異常は誘発されなかったと考えられた

したがって、チオシクロラムは催奇形性を有しないと判断される。

以上の結果より、3 世代にわたって本剤を飼料中に混入して投与した場合、100 ppm 投与群で親動物に血糖値の増加が認められたが、この有意差ある変化も用量相関性がなく、また正常範囲内の変化であった。F_IB 世代の 100 ppm 群でも増加を認めたが、正常範囲内の変化であった。F_{II}B 世代では変化を認めなかった。

児動物及び繁殖能に対しては何ら影響がみられなかった。また胎児異常も認められなかった。したがって、無影響量は親動物に対して 25 ppm (F₀：雄 1.88 mg/kg/day、雌 2.17 mg/kg/day；F_I：雄 1.91 mg/kg/day、雌 2.16 mg/kg/day；F_{II}：雄 1.85 mg/kg/day、雌 2.20 mg/kg/day)、児動物、繁殖及び催奇形性については最高投与量の 100 ppm でも影響がなかった。

[申請者注] 100 ppm 群で血液生化学的検査及び臓器重量における変化が認められ、いずれも毒性学的有意性はないものと考えられたため、本試験における無影響量は 25 ppm、無毒性量は 100 ppm (F₀：雄 7.62 mg/kg/day、雌 8.52 mg/kg/day；F_I：雄 7.52 mg/kg/day、雌 8.65 mg/kg/day；F_{II}：雄 7.68 mg/kg/day、雌 9.18 mg/kg/day) と考えられる。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 1-1 繁殖性に関する結果概要

世代		親：F ₀ 児：F ₁ A、F ₁ B				親：F ₁ B 児：F ₂ A、F ₂ B				親：F ₂ B 児：F ₃ A、F ₃ B					
投与群 (ppm)		0	5	25	100	0	5	25	100	0	5	25	100		
全供試動物数：♂/♀		35/35	35/35	35/35	35/35	35/35	35/35	35/35	35/35	35/35	35/35	35/35	35/35		
一般症状															
死亡動物数		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
親動物	体重変化	生育期間	雄	1W											
				3W											
				4W											
				5W											
				8W											
			10W												
			11W												
			12W												
			13W												
			雌	1W											
				3W											
	4W														
	7W														
	9W														
	10W														
	妊娠・哺育	1W	A												
		2W	A												
	摂餌量	雄	1W												
			4W												
			5W												
			12W												
		雌	1W												
			2W												
5W															
9W															
10W															
11W															
13W															
妊娠・哺育	5W	B													

統計処理法：Student の T 検定 ↑↓：P<0.05、↑↓：P<0.01、↑↓：P<0.001。

空欄は投与に関連した影響が特に認められなかったことを示す。

体重変化及び摂餌量において、表中の数値は対照群を 100 とした場合の数を示し、他の項目においては実測値を示す。なお、体重及び摂餌量においては、高用量群に有意差が認められた測定週のみを示す。

W：週。A：各世代の A 児、B：各世代の B 児。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 1-2 繁殖性に関する結果概要

世代		親 : F ₀ 児 : F ₁ A, F ₁ B				親 : F ₁ B 児 : F ₂ A, F ₂ B				親 : F ₂ B 児 : F ₃ A, F ₃ B				
投与群 (ppm)		0	5	25	100	0	5	25	100	0	5	25	100	
親動物	食餌効率	生育期間	雄	1W										
				3W										
				4W										
			5W											
			10W											
			11W											
		雌	1W											
			2W											
			3W											
			4W											
			5W											
			11W											
	妊娠・哺育	1W	A											
			B											
		2W	A											
		4W	A											
	5W	A												
	飲水量 (13週時)		雄											
			雌											
	検体摂取量/生育期間 (mg/kg/day)		雄											
		雌												
剖検所見														
受胎率 (%)		A												
		B												
妊娠率 (%)		A												
		B												
兒動物	生存率 (%)		A											
			B											
	出生児数	総数	A											
			B											
		平均	A											
			B											

統計処理法:食餌効率については Student の T 検定、その他の項目については Student の T 検定及び Wilcoxon, Mann and Whitney の U 検定 ↑ ↓ : P<0.05, ↑ ↓ : P<0.01, ↑ ↓ : P<0.001。

空欄は投与に関連した影響が特に認められなかったことを示す。

食餌効率及び飲水量において、表中の数値は対照群を 100 とした場合の数を示し、他の項目においては実測値を示す。なお、食餌効率においては、高用量群に有意差が認められた測定週のみを示す。

W : 週。A : 各世代の A 児、B : 各世代の B 児。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 1-3 繁殖性に関する結果概要

世代		親 : F ₀ 児 : F ₁ A、F ₁ B				親 : F ₁ B 児 : F ₂ A、F ₂ B				親 : F ₂ B 児 : F ₃ A、F ₃ B							
投与群 (ppm)		0	5	25	100	0	5	25	100	0	5	25	100				
児 動 物	出生時の平均 死亡児数	A															
		B															
	性比 (雄/雌)	A															
		B															
	平均生存児数	雄	哺育 0日	A													
				B													
			4日(調 整前)	A													
				B													
			1日(調 整後)	A													
				B													
		21日	A														
			B														
		雌	哺育 0日	A													
				B													
			4日(調 整前)	A													
				B													
	1日(調 整後)		A														
			B														
	21日	A															
		B															
哺育率(%)		A															
		B															
平均体重 (g)	哺育 1日	A															
		B															
	4日(調 整前)	A															
		B															
	4日(調 整後)	A															
		B															
21日	A																
	B																
病理組織学的 検査		B															

統計処理法 : Student の T 検定及び Wilcoxon, Mann and Whitney の U 検定 ↑ ↓ : P<0.05、↑ ↓ : P<0.01、
↑ ↓ : P<0.001。

表中の数値は実測値を示す。

A : 各世代の A 児、B : 各世代の B 児。— : 調整しなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 2 催奇形性試験の結果

世代		親 : F ₀ 児 : F ₁ B				親 : F ₁ B 児 : F ₂ B				親 : F ₂ B 児 : F ₃ B				
投与群 (ppm)		0	5	25	100	0	5	25	100	0	5	25	100	
親動物	検査親動物数													
	黄体数													
	着床痕数													
	生存胎児数	合計												
		雄												
		雌												
	死亡胎児数													
	吸収胚数													
	平均胎盤重量(g)													
平均胎児重量(g)														
胎児	検査胎児数													
	肋骨の異常	12/12												
		12/13												
		12/14												
		(13/13:正常)												
		13/14												
		14/14												
	胸骨	化骨遅延												
		軽度の分割												
		点状骨化中心												
児動物	検査児数													
	肋骨の異常	10/13												
		11/13												
		12/12												
		12/13												
		彎曲												
		その他												
	胸骨	軽度の開裂												
		過剰骨化中心 ^{*3)}												
		その他の異常												

*1) : 骨折 (ただし、F₁B 100ppm 投与群の児動物の骨折は人為的なもの)、*2) : 左側第 10 肋骨の短縮
 *3) : 5 番目と 6 番目の胸骨分節の間に余分な骨化中心が認められたもの、*4) : 脊椎癒合、*5) : 胸椎骨折
 統計処理法 : Student の T 検定及び Wilcoxon, Mann and Whitney の U 検定 ↑↓ : P<0.05、↑↓ : P<0.01、
 † : P<0.001。
 表中の数値は実測値を示す。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表3 血液学的検査結果

世代			F ₀				F _{1B}				F _{1B}			
投与群 (ppm)			0	5	25	100	0	5	25	100	0	5	25	100
検査動物数：♂/♀			5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
検査項目	性別	検査週												
赤血球	雄	4												
	雌	8												
		13												
Ht	雄	13												
		30*												
HG	雄	13												
	雌	13												
MCV	雄	4												
		13												
	雌	4												
		8												
		13												
MCH	雄	4												
		13												
MCHC	雌	4												
		8												
		30*												
白血球	雄	4												
	雌	4												
桿状球	雄	13												
分葉核	雄	4												
		30*												
	雌	8												
		13												
リンパ球	雌	8												
		13												

統計処理法：Student の T 検定、Wilcoxon, Mann and Whitney の U 検定、Kastenbaum の検定 ↑ ↓ : P<0.05、

↑ ↓ : P<0.01、↑ ↓ : P<0.001。

表中の数値は対照群を 100 とした場合の数を示す。空欄は有意差が認められなかったことを示す。

* : F_{1B} 及び F_{1B} 世代は 31 週に測定。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 4-1 血液生化学的検査結果

世代			F ₀				F _{1B}				F _{1B}			
投与群 (ppm)			0	5	25	100	0	5	25	100	0	5	25	100
検査動物数：♂/♀			5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
検査項目	性別	検査週												
グルコース (mg/dL)	雄	4												
		8												
		13												
		30*												
	雌	4												
		8												
		13												
		30*												
蛋白 (g/dL)	雄	8												
		8												
	雌	13												
		30*												
コレステロール (mg/dL)	雄	4												
		8												
		13												
		30*												
血漿 ChE (U/mL)	雄	4												
		8												
		13												
		30*												
	雌	13												

統計処理法：Student の T 検定、Wilcoxon, Mann and Whitney の U 検定、Kastenbaum の検定 ↑ ↓ : P<0.05、

↑ ↓ : P<0.01、↑ ↓ ↓ : P<0.001。

上段の数値は対照群を 100 とした場合の数 下段の () : 実測値

空欄は有意差が認められなかったことを示す。

* : F_{1B} 及び F_{1B} 世代は 31 週に測定。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 4-2 血液生化学的検査結果

世代			F ₀				F _{1B}				F _{1B}			
投与群 (ppm)			0	5	25	100	0	5	25	100	0	5	25	100
検査動物数：♂/♀			5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
検査項目	性別	検査週												
赤血球 ChE (U/mL)	雄	4												
		30*												
	雌	4												
		8												
		13												
SGPT (ALT) (IU)	雄	4												
		8												
		13												
	雌	4												
		8												
		30*												
ALP (IU)	雄	4												
		8												
		13												
		30*												
	雌	13												
		30*												
BUN (mg/dL)	雄	8												
		4												
	雌	8												
		13												
		4												
		30*												

統計処理法：Student の T 検定、Wilcoxon, Mann and Whitney の U 検定、Kastenbaum の検定 ↑ ↓ : P<0.05、

↑ ↓ : P<0.01、↑ ↓ ↓ : P<0.001。

上段の数値は対照群を 100 とした場合の数
空欄は有意差が認められなかったことを示す。

下段の () : 実測値

* : F_{1B} 及び F_{1B} 世代は 31 週に測定。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

血液生化学的検査における正常範囲

検査項目	性別	世代	検査週	対照群	25ppm 群	100ppm 群	正常範囲
赤血球 ChE	雄	F II B	30*				
ALP	雄	F II B	30*				
蛋白	雌	F II B	30*				
SGPT (ALT)	雌	F II B	30*				

— : 該当なし。

表 5 尿検査結果

世代			F ₀				F I B				F II B			
投与群 (ppm)			0	5	25	100	0	5	25	100	0	5	25	100
検査動物数 : ♂ / ♀			5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
検査項目	性別	検査週												
pH	雄	4												
		30*												
	雌	13												
蛋白	雄	4												
尿量	雌	30*												

統計処理法 : Student の T 検定、Wilcoxon, Mann and Whitney の U 検定、Kastenbaum の検定 ↑ ↓ : P<0.05、

↑ ↓ : P<0.01、↑ ↓ ↓ : P<0.001。

表中の数値は対照群を 100 とした場合の数を示す。空欄は有意差が認められなかったことを示す。

* : F I B 及び F II B 世代は 31 週に測定。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 6-1 臓器重量検査結果

世代			F ₀				F _{1B}				F _{1B}			
投与群 (ppm)			0	5	25	100	0	5	25	100	0	5	25	100
検査動物数: ♂/♀			5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
検査項目	性別	検査週												
	最終体重	雄	13											
30*														
雌		30*												
脾臓	雄	13												
		30*												
	雌	13												
		30*												
腎	雄	13												
		30*												
	雌	13												
		30*												
肝	雄	13												
		30*												
	雌	13												
		30*												
精巣	雄	13												
		30*												
胸腺	雄	13												
		30*												
	雌	13												
		30*												
下垂体	雄	13												
		13												
心臓	雄	13												
		30*												
肺	雄	30*												
		30*												
前立腺	雄	13												
精囊	雄	13												
膵	雄	30*												
		13												
卵巣	雌	30*												
子宮	雌	30*												

統計処理法: Student の T 検定、Wilcoxon、Mann and Whitney の U 検定、Kastenbaum の検定 ↑ ↓ : P<0.05、

↑ ↓ : P<0.01、↑ ↓ : P<0.001。

表中の数値は対照群を 100 とした場合の数を示す。空欄は有意差が認められなかったことを示す。

* : F_{1B} 世代は 34 週、F_{1B} 世代は 32 週に測定。

: F_{1B} 世代の雄の値は参考値として記載。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 6-2 臓器重量検査結果

世代			F ₀				F _I B				F _{II} B			
投与群 (ppm)			0	5	25	100	0	5	25	100	0	5	25	100
検査動物数 : ♂/♀			5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
検査項目	性別	検査週												
相対重量	脾臓	雄	30*											
		雌	13											
	肝臓	雌	13											
		雄	30*											
	胸腺	雌	13											
		雄	13											
	下垂体	雌	30*											
		雄	13											
		雌	13											
	心臓	雄	13											
	精囊	雄	13											
	脳	雄	30*											
		雌	30*											

統計処理法 : Student の T 検定、Wilcoxon, Mann and Whitney の U 検定、Kastenbaum の検定 ↑ ↓ : P<0.05、
↑ ↓ : P<0.01、↑ ↓ : P<0.001。

表中の数値は対照群を 100 とした場合の数を示す。空欄は有意差が認められなかったことを示す。

* : F_IB 世代は 34 週、F_{II}B 世代は 32 週に測定。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2) 催奇形性

ラットにおける催奇形性試験

[資料 No. 20]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： 妊娠雌ラット、約 17 週齢、試験開始時体重範囲；234～354 g
1 群 25 匹

投与期間：妊娠 6 日目～15 日目までの 10 日間
(試験期間； 6 月 16 日～ 7 月 9 日)

投与方法：検体を補正指数 1.16 で純度補正して脱イオン水に溶解し、0、6、20 及び 60 mg/kg の投与用量で妊娠 6 日目から 15 日目までの 10 日間、毎日 1 回強制経口投与した。対照群には脱イオン水のみを投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、最新の体重を基に算出した。なお、投与溶液は毎日調製した。膣栓の有無、又は膣スメアの精子確認を毎日実施し、交配を確認した日を妊娠 0 日目とした。

用量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物；

一般状態及び生死を毎日観察し、妊娠 0、6、9、12、16、20 日目に体重及び摂餌量を測定し、体重増加量も算出した。妊娠 20 日目に帝王切開して黄体数、着床痕数、胚・胎児死亡数（早期、後期）、生存胎児数を検査した。また、着床前及び着床後胚損失率も算出した。

生存胎児；

胎児について体重測定、性別判定後、外表異常検査を行った。
各同腹児の約半数の胎児については Dawson の方法に従って Alizarin Red S 染色による骨格標本作製し、骨格異常の有無を検査した。残りの半数の胎児につい

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ては Bouin 液で固定後、Wilson 薄切法を用いて内臓異常の有無を検査した。また、Woo & Hoar の方法に従って腎乳頭形成の程度も検査した。

結 果：概要を次頁以降の表に示した。

母 動 物；

60 mg/kg/day 群では検体投与に関連し 3 匹が死亡し、生存動物中 6 例で妊娠 14 日及び 15 日の投与前に流産が認められた。投与期間中の体重、体重増加量及び摂餌量において、有意差はみられなかったが、対照群と比べていずれもわずかに減少した。体重増加量ではとくに妊娠 9～12 日及び 12～16 日、摂餌量は妊娠 9～12 日で顕著に低下した。剖検及び着床所見において検体投与の影響はみられなかった。

20 mg/kg/day 群では 1 匹が死亡し、一般症状として昏睡、外鼻孔、口、眼周囲及び前肢の乾燥赤色物質の付着、肛門生殖器湿潤及び便の減少がみられたが、予備試験において 30 mg/kg 群に死亡及び毒性徴候がみられなかったこと、認められた症状は 60 mg/kg 群では発現していないことから、検体投与による変化ではないと思われた。また同動物では体重及び摂餌量も減少し、同群の群平均体重及び摂餌量も減少したが、同動物を除いた場合の群平均値はいずれも対照群と同等であったことから、投与による影響はなかったと判断された。剖検及び着床所見において検体投与の影響はみられなかった。

6 mg/kg/day 群では検体投与の影響は認められなかった。

対照群を含む各群に脱毛（1-6 例）又は痂皮形成（0-2 例）がみられたが、用量相関性がなく、検体投与に関連しない変化であると判断された。

胎 児；

胎児体重、性比、奇形の発生率において検体投与の影響は認められなかった。骨格変異において、60 mg/kg 群で第 5/第 6 胸骨分節未化骨及び第 14 痕跡状過剰肋骨の発生率がやや増加したが、背景データ範囲内であったことから、検体投与の影響ではないと判断された。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに投与したときの母体における無作用量は 20 mg/kg/day であった。また、最高投与量の 60 mg/kg/day でも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ラットにおける催奇形性試験 結果の概要

母動物及び胎児：

投与群 (mg/kg/day)		0	6	20	60	
1群当たり動物数		25	25	25	25	
妊娠動物数						
生存胎児を有した母動物数						
全吸収母動物数						
母動物	一般状態					
	死亡数					
	体重変化 ^D					
	体重増加量 ^D (g)	妊娠 9-12 日*				
		妊娠 12-16 日*				
		妊娠 0-20 日				
	摂餌量 ^D (g/ラット)	妊娠 9-12 日*				
		妊娠 0-20 日				
	剖検所見					
	着床所見	検査母動物数				
		黄体数 ^D				
		着床痕数 ^D				
		早期吸収 ^M				
		後期吸収 ^M				
着床前胚損失率 (%)						
着床後胚損失率 ^M (%)						
生存胎児数 ^D						
死亡胎児数 ^M						
胎児	平均体重 ^D (g)					
	雄胎児数					
	雌胎児数					
	性比(雄の%) ^{#S}					

#：申請者の計算による。*：20mg/kg 群のデータは死亡例を含む。

統計処理法：D；Dunnett の検定、M；Mann-Whitney の U 検定、S；カイ二乗検定。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

奇形・変異胎児を持つ腹数及び奇形・変異胎児を持つ腹ごとの胎児の出現率：

投与群 (mg/kg/day)		0	6	20	60		
胎児	外表検査	検査腹数					
		奇形胎児を持つ腹数					
		奇形	眼瞼開裂を伴う外脳(%)				
			小眼球症/無眼球症(%)				
			巨舌(%)				
			口蓋裂(%)				
			鼻閉(%)				
			曲尾(%)				
	内臓検査	検査腹(胎児)数					
		奇形胎児を持つ腹数					
		変異胎児を持つ腹数					
		奇形	横隔膜ヘルニア(%)				
			変異	腎乳頭:尿管への広がりなし(%)			
	骨格検査	検査腹数					
		奇形胎児を持つ腹数					
		変異胎児を持つ腹数					
		変異	第5/第6胸骨分節未化骨(%)				
			第14痕跡状過剰肋骨(%)				
			第13肋骨化骨遅延(%)				
			胸骨分節不正(%)				
			第7頸肋(%)				
肋骨屈曲(%)							
27前仙骨脊椎(%)							

() : 腹ごとの胎児の奇形/変異の出現率の群平均値

統計処理法 : 奇形/変異胎児を持つ腹数 ; Fischer の正確検定

奇形/変異胎児を持つ腹ごとの胎児の出現率 ; Dunnett の多重比較検定

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

奇形または変異を認めた胎児の発生数：

投与群 (mg/kg/day)		0	6	20	60	
胎児	外表検査	検査動物数				
		奇形胎児数 (腹数)				
		奇形の種類	曲尾 (%)			
			複合異常 (%)			
			小眼球症/無眼球症	発生数 (%)		
		背景データ				
	変異 (%)					
	内臓検査	検査動物数				
		奇形胎児数 (腹数)				
		奇形の種類	横隔膜ヘルニア (%)			
		変異	腎乳頭:尿管への広がりなし (%)			
	骨格検査	検査動物数				
		奇形胎児数 (腹数)				
		第5/第6胸骨分節未化骨	発生数 (%)			
			背景データ			
		第14痕跡状過剰肋骨	発生数 (%)			
			背景データ			
		第13肋骨化骨遅延 (%)				
		胸骨分節不正 (%)				
		第7頸肋 (%)				
		肋骨屈曲 (%)				
	27前仙骨脊椎 (%)					

統計処理法：Fischerの正確検定 ↑↓ : p<0.05, ↑↓ : p<0.01

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ウサギにおける催奇形性試験

[資料 No. 21]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： 妊娠雌ウサギ、13～16 週齢、試験開始時体重；3.5～4.6 kg
1 群 18 匹

投与期間：妊娠 6 日目～18 日目までの 13 日間（ 1 月 19 日～ 2 月 7 日）

投与方法：検体を脱イオン蒸留水に溶解し、0、3、10 及び 30 mg/kg の投与用量で妊娠 6 日目から 18 日目までの 13 日間、毎日 1 回強制経口投与した。対照群には脱イオン蒸留水のみを投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、最新の体重を基に算出した。なお、投与溶液は毎日調製した。交配日を妊娠 0 日目とした。

用量設定根拠；

観察・検査項目：

母動物；

一般状態及び生死を毎日観察した。妊娠 1、6、8、10、14、19、23、29 日目に体重を測定し、摂餌量は体重測定日の間隔ごとに記録した。妊娠 29 日目に帝王切開し、剖検後、黄体数、着床痕数、胚・胎児死亡数（早期、後期、流産）、生存胎児数を検査した。また、着床前及び着床後胚損失率も算出した。

生存胎児；

胎児について体重測定、外表異常検査、性別判定後、内臓及び脳を検査し、Dawson の変法に従って骨格標本作製し、構造奇形、異常、変異について検査した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

結 果：概要を次頁以降の表に示した。

母 動 物；

各群それぞれ1匹ずつ検体投与前に死亡した。

30 mg/kg/day 群では検体投与に関連して5匹が死亡し、流産及びその他原因で各1匹が死亡した。一般症状では落ちつきのなさ、虚脱、振せん、呼吸困難、心拍異常、不規則行動/姿勢が認められ、投与期間中の体重及び摂餌量が減少した。着床所見に対する影響はみられなかった。

10 mg/kg/day 群においても投与初期に体重及び摂餌量において有意差のない軽度の減少がみられたが、10日目以降に変化はみられなかった。投与に関連した死亡、一般症状変化は認められなかった。また、着床所見に対する影響もみられなかった。

3 mg/kg/day 群では検体投与の影響は認められなかった。

【申請者注】

30 mg/kg/day 群では、投与期間中の体重において有意差はないが減少傾向が認められた。摂餌量は妊娠6～7日に有意な減少が、以降においても有意差はないが減少傾向が認められた。

3 mg/kg/day 群では、体重において妊娠14日及び19日に有意に増加が、摂餌量において妊娠10～13日に有意に増加したが、一時的変化であり検体投与の影響とは判断しなかった。

胎 児；

胎児体重、性比、奇形、異常、変異の発生率において検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母体における無毒性量は3 mg/kg/dayであった。また、最高投与量の30 mg/kg/dayでも胎児に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ウサギにおける催奇形性試験 結果の概要

母動物：

投与群 (mg/kg/day)		0	3	10	30		
母 動 物	1 群当たり動物数						
	妊娠動物数						
	生存胎児を有した母動物数						
	一般状態						
	死亡数	投与前					
		投与中					
		流産					
		その他					
		合計					
	投与後の体 重変化 (g)	妊娠 6 日					
		妊娠 8 日					
		妊娠 10 日					
		妊娠 14 日					
		妊娠 19 日					
		妊娠 23 日					
		妊娠 29 日					
	妊娠 6-29 日の体重増加量 (g)						
	投与後の摂 餌量 (g/ウサギ)	妊娠 6-7 日					
		妊娠 8-9 日					
		妊娠 10-13 日					
		妊娠 14-18 日					
		妊娠 19-22 日					
		妊娠 23-28 日					
着 床 所 見	検査母動物数						
	黄体数*						
	着床痕数*						
	早期吸収*						
	後期吸収*						
	流産胚・胎児*						
	着床前胚損失率 (%)*						
	着床後胚損失率 (%)*						
	胚/胎児死亡数*						
	生存胎児数*						

統計処理法：* ; Kruskal-Wallis の検定

#: P<0.05、##: p<0.01 (Dunnett の多重比較検定) : 申請者にて実施

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

奇形・異常胎児を持つ腹数及び奇形・異常胎児を持つ腹ごとの胎児の出現率：

投与群 (mg/kg/day)		0	3	10	30		
平均体重(g) *							
平均雄胎児数**							
平均雌胎児数**							
性比(雄の%) **							
胎 児	奇形	検査腹数					
		奇形胎児を持つ腹数					
		外表 / 内臓	脳瘤				
			頭蓋脊椎破裂				
			前肢屈曲				
			小眼球症				
			脊椎側弯				
			臍ヘルニア				
			食道背方右鎖骨下動脈				
			水頭				
	短指						
	骨格	第2～第5胸骨分節癒合					
	異常	検査腹数					
		外表 / 内臓	腹数				
			発生率(%)				
			角膜混濁				
		骨格	腹数				
			発生率(%)				
			頸肋(両側)				
			頸肋(左)				
過剰胸骨核							
変異		検査腹数					
	骨格	13肋骨発生腹数					
		胸骨分節変異発生腹数					

() : 腹ごとの胎児の奇形/異常/変異の出現率の群平均値
 統計処理法 : * : Kruskal-Wallis の検定、** : Kruskal-Wallis の検定又は Jonckheere の検定
 奇形/異常/変異胎児を持つ腹数 ; Fischer の正確検定
 奇形/異常/変異胎児を持つ腹ごとの胎児の出現率 ; Dunnett の多重比較検定
 ↑ ↓ : p<0.05, ↑↓ : p<0.01

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

奇形または異常を認めた胎児の発生数：

投与群 (mg/kg/day)		0	3	10	30		
胎 児	奇形	検査胎児数					
		奇形胎児数					
		発生率(%)					
		外表 ／ 内臓	脳瘤/小型化				
				頭蓋脊椎破裂			
			前肢屈曲				
			眼球突出				
			脊椎側弯				
			臍ヘルニア				
			食道背方右鎖骨下動脈				
			水頭症				
	短指						
	骨格	第2～第5胸骨分節癒合					
	異常	検査胎児数					
		外表 ／ 内臓	異常胎児数				
			発生率(%)				
			角膜混濁				
		骨格	異常胎児数				
			発生率(%)				
			頸肋(両側)				
頸肋(左)							
過剰胸骨核							
変異		検査胎児数					
	骨格	13肋骨発生数					
		胸骨分節変異発生数					

統計処理法：Fischerの正確検定、↑↓：p<0.05, ↑↓↑↓：p<0.01

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(8) 変異原性

1) DNA 損傷誘発性

細菌を用いた DNA 修復試験

[資料 No. 22]

試験機関:

報告書作成年:

検体の純度:

試験方法: *Bacillus subtilis* の組換え修復機構保持株 (H17) と欠損株 (M45) を用いた。この両株の-80℃保存株を融解後、小型ピペットを用いてB-II寒天培地上に出発点が接触しないようにストリークした。検体は50 mg/mLまでは滅菌蒸留水に溶解し、それ以上の濃度では懸濁状態で用いた。直径10 mmのろ紙に0.02 mL染み込ませ、ストリークの開始点を覆うように置き、37℃で一夜培養後、阻止帯の長さを測定した。試験回数は1連性の1回。陰性対照としてKanamycin、陽性対照としてMitomycin Cを用いた。

用量設定根拠:

結果: Rec-Assay 試験成績

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	阻止域 (mm)		差 (mm)
		M45	H17	
対照 (H_2O)				
SAN-155	100			
	200			
	300			
	400			
	500			
	700			
	1000			
2000				
Kanamycin	10			
Mitomycin C	0.1			

検体は陰性対照として用いたKanamycinと同様に、両株に同程度の生育阻止帯を示した。一方、陽性対照として用いたMitomycin CではH17に比べM45に顕著な生育阻止帯を生じた。

以上の結果から、*B. subtilis* H17株、M45株を用いたRec-assayによるDNA修復試験結果は、陰性であった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2) 遺伝子突然変異原性

細菌を用いた復帰変異試験

[資料 No. 22]

試験機関:

報告書作成年:

検体の純度:!

試験方法:ヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100

株及びトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *hcr* 株を用いて、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9) の存在下及び非存在下で Ames らの方法で変異原性を検定した。試験回数は、TA1535、TA1537、TA1538 及び TA98 株で 2 連性の 1 回、TA100 及び WP2 *hcr* 株で 2 連性の 2 回。

試験濃度は、全ての菌株 1 回目で 0、10、50、100、500、1000、2000、5000 μ g/plate、TA100 及び WP2 *hcr* 株 2 回目で、0、10、50、100、500、1000、2000、5000、10000 μ g/plate で行った。

使用溶媒に関しては、原文に記載なし。

用量設定根拠;

結果: 試験結果を次表に示す。

WP2 *hcr* 株に S-9 Mix の存在の有無にかかわらず復帰変異コロニー数の弱い増加が認められた。また、S-9 Mix の存在下で、非存在下よりもやや高い値を示し、検体は S-9 Mix により、弱く活性化されることが予想された。

一方、TA100 株では S-9 Mix 存在下、1000 μ g/plate の濃度で対照に比べやや高い値が認められた。以上の成績は WP2 *hcr* と TA100 株を用いた反復試験においてもほぼ同様であった。また、それ以外の株ではいずれの場合においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

陽性対照として用いた AF-2、 β -propiolactone、9-aminoacridine、2-nitrofluorene は S-9 Mix の非存在下で、また、2-aminoanthracene は S-9 Mix の存在下で著明な変異原性を示した。

以上の結果より、本検体は S-9 Mix の存在の有無に関わらず、*E. coli*、WP2 *hcr* 株に弱い突然変異誘起性を有するものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表1 復帰変異試験成績

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート (2連平均)						
			塩基置換型			フレームシフト型			
			WP2 <i>hcr</i>	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
溶媒対照 (H_2O)		-							
SAN-155	10	-							
	50	-							
	100	-							
	500	-							
	1000	-							
	2000	-							
	5000	-							
対照 (H_2O)		+							
SAN-155	10	+							
	50	+							
	100	+							
	500	+							
	1000	+							
	2000	+							
	5000	+							
2-アミノ アントラセン	10	-							
	10	+							
陽性対照		-							

* 菌株の生育阻止を認める

a) AF-2 0.25 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

b) β -propiolactone 50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

c) AF-2 0.05 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

d) 9-aminoacridine 200 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

e) 2-nitofluorene 50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

f) AF-2 0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2 WP2 her とTA100株の復帰変異試験成績

薬物	濃度 S-9Mix ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	復帰変異コロニー数/プレート (2連平均)			
		WP2 her		TA100	
		-	+	-	+
溶媒対照 (H_2O)					
SAN-155	10				
	50				
	100				
	500				
	1000				
	2000				
	5000				
	10000				
2-アミノアン トラセン	10				
陽性対照					

* : 菌株の生育阻害を認める

a : AF-2 0.25 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

b : β -propiolactone 50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

細菌を用いた復帰変異試験

[資料 No. 23]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

試験方法：Ames ら (Mutation Research 31 347, 1975) の方法に準拠し、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* TA 1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100 株及びビール酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* D4 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S-9) の存在下及び非存在下で変異原性を評価した。検体は脱イオン水またはジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解した。検体の投与量は、最高投与量においては定量的・定性的に生理学的な効果を認め得る濃度 (500 µg/プレート)、最低投与量においては効果をまったく認めない濃度 (0.1 µg/プレート) とした。平板を 37 °C で 48 時間培養した後、各平板上のコロニー数を数えた。

結果：試験結果を次頁の表に示す。

本検体は、S-9 Mix 存在下及び非存在下のすべての試験において陰性であった。

以上の結果より、本検体は本試験条件下において突然変異誘発性がないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表：復帰変異試験成績

薬物	濃度 (μ g/ plate)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA1535	TA100	D4*	TA1537	TA1538	TA98
溶媒対照 (DMSO)		—	24	67	36	13	14	33
陰性対照		—						
SAN-155	0.1	—						
	1.0	—						
	10.0	—						
	100.0	—						
	500.0	—						
溶媒対照 (DMSO)		+						
陽性対照		+						
SAN-155	0.1	+						
	1.0	+						
	10.0	+						
	100.0	+						
	500.0	+						

* IBY⁶ CONVERTANTS/プレート

- a) Methylnitrosoguanidine 10 μ g/プレート
- b) Quinacrine mustard 10 μ g/プレート
- c) 2-Nitrofluorene 100 μ g/プレート
- d) 2-Anthramine 100 μ g/プレート
- e) 8-Aminoquinoline 100 μ g/プレート
- f) 2-Acetylaminofluorene 100 μ g/プレート
- g) DMNA 100 μ mol/プレート

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

細菌を用いた復帰変異試験

[資料 No. 24]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：チオシクロラムシュウ酸塩 86.3 %

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA 1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100 株) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝活性化酵素系 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を評価した。検体は水に溶解し、10~5000 µg/プレートの範囲の6濃度で実施した。試験は3連制とし、2回行った。

用量設定根拠：

結果：試験結果を次頁の表に示す。

本変異原性試験において、検体は試験した高用量で試験株に対し毒性を示した。しかし、検体を処理したいずれの試験株においても復帰コロニー数の増加は認めなかった。

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

以上の結果より、本検体は本試験条件下において突然変異誘発性がないものと判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表：復帰変異試験成績 1回目

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 (μ g/ plate)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート							
			塩基置換型			フレームシフト型				
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	TA1538		
溶媒対照(水)		—								
検体	10	—								
	50	—								
	100	—								
	500	—								
	1000	—								
	5000	—								
陽性対照 (薬剤名:濃度)		—								
溶媒対照(水)		+								
検体	10	+								
	50	+								
	100	+								
	500	+								
	1000	+								
	5000	+								
陽性対照 (薬剤名:濃度)		+								

T:Toxicity

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

NF : 2-nitrofluorene

9AC : 9-aminoacridine

NF : 2-nitrofluorene

AA : 2-aminoanthracene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表：復帰変異試験成績 2回目

(表中の数値は3反復の平均値)

薬物	濃度 (μ g/ plate)	S-9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照(水)		—							
検体	10	—							
	50	—							
	100	—							
	500	—							
	1000	—							
	5000	—							
陽性対照 (薬剤名:濃度)		—							
溶媒対照(水)		+							
検体	10	+							
	50	+							
	100	+							
	500	+							
	1000	+							
	5000	+							
陽性対照 (薬剤名:濃度)		+							

X: Too many colonies for accurate counting

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

NF: 2-nitrofluorene

9AC: 9-aminoacridine

NF: 2-nitrofluorene

AA: 2-aminoanthracene

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

3) 染色体異常誘発性

チャイニーズハムスターの卵巣細胞を用いた *in vitro* 細胞遺伝学的試験 [資料 No. 25]

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検体の純度:

試験方法:

予備毒性試験;

分裂中期試験;

細胞は予備毒性試験と同様に培養した。培養 24 時間後、培養細胞の 1 セットに S-9 mix を加え、さらに最終濃度が 7.5、37.5、75 $\mu\text{g/mL}$ となるように所定の濃度の検体を加えた。S-9 mix 無添加では、最終濃度が 6、20、40 及び 60 $\mu\text{g/mL}$ となるように検体を加えた。

検体添加 2 時間後、培養液を注意深く除去し、新しい培養培地中に再び入れ、さらに 18 時間培養した。すべての培養細胞はコルヒチン进行处理し、分離、固定後スライドを作製した。スライドは 10 %ギームサで染色した。分裂中期の細胞は 160 倍の倍率で確認し、湯浸対物レンズを用いて 1000 倍で検査した。培養ごとに約 100 個の分裂中期像を調べ、可能な場合はスライド 1 枚あたり最高 25 個とした。

陽性対照としては、直説法ではマイトマイシン C を、代謝活性化法ではフォスファミドを用いた。

試験結果: 試験結果の概要は次の表 1 及び表 2 に示した通りであった。

予備毒性試験;

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

分裂中期試験；

培養した CHO に及ぼすチオシクロラムの影響を、染色体異常の数と型について表 2 に示した。陽性対照であるマイトマイシン C とシクロフォスファミドは両方とも溶媒対照に比べて統計学的に有意に高い異常を持つ分裂中期像の割合を示した。S-9 mix 非存在下では最高濃度 (60 μ g/mL) では非常に細胞毒性が強く、検定できるほど良質な分裂中期像はわずかに 6 個しか認められなかった。代謝活性化系の存在下及び非存在下においてチオシクロラムはいかなる用量レベルとも統計学的に有意な染色体異常を引き起こさなかった。

結論：本 *in vitro* 細胞遺伝学的検定系においてチオシクロラムは染色体の構造異常を引き起こさなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表 1 予備毒性試験結果

S-9mix 有無	試験検体	濃度 (μ g/mL)	有糸分裂指数		
			スライド a	スライド b	平均 %
-	-	-			
	蒸留水 (溶媒)	10 μ l/mL			
	チオシクラム	2.34			
		4.69			
		9.38			
		18.75			
		37.5			
75					
150					
+	-	-			
	蒸留水 (溶媒)	10 μ l/mL			
	チオシクラム	2.34			
		4.69			
		9.38			
		18.75			
		37.5			
75					
150					

表2 分裂中期試験

S-9 mix の有無	試験検体	濃度 (μ g/mL)	観 察 細胞数	発現数/ 100 細胞		染色体異常の型別発現数								染色体異常 細胞数 (-gap)	平均 (%) (-gap)	染色体異常 細胞数 (+gap)	平均 (%) (+gap)
				-gap	+gap	BWF	BF	I	R	SM	A	GT	CHR				
+	-	-	100														
			100														
			100														
			100														
	蒸留水 (溶媒)	10 μ l/mL	100														
			100														
			100														
			100														
	チオシクラム	7.5	100														
			100														
		37.5	100														
			100														
75		100															
		100															
シクロ フォスファミド	20	100															
		100															

統計解析は Fisher' s test を用いた。 *** P<0.001、他は P>0.05

-gap : 染色体ギャップのある細胞を除外した数 +gap : 染色体ギャップのある細胞を含めた数

PWF Chromatid break with fragment

SM Single minute

BF Chromatid break without fragment

A Acentric fragment

I Interchange

GT Greater than 10 aberrations

R Ring

CHR Chromatid gap

表2 分裂中期試験 (続き)

S-9 mix の有無	試験検体	濃度 (μ g/mL)	観 察 細胞数	発現数/ 100 細胞		染色体異常の型別発現数								染色体異常 細胞数 (-gap)	平均 (%) (-gap)	染色体異常 細胞数 (+gap)	平均 (%) (+gap)	
				-gap	+gap	BWF	I	C	R	SM	A	GT	P					CHR
-	-	-	100															
			100															
			100															
			100															
	蒸留水 (溶媒)	10 μ l/ml.	100															
			100															
			100															
			100															
	チオシクロム	6	100															
			100															
			100															
			100															
	シクロ フォスファミド	0.4	2															
			4															
			100															
			100															

統計解析は Fisher' s test を用いた。 *** P<0.001、他は P>0.05

-gap : 染色体ギャップのある細胞を除外した数 +gap : 染色体ギャップのある細胞を含めた数

BWF Chromatid break with fragment

SM Single minute

I Interchange

A Acentric fragment

C Complex rearrangement

GT Greater than 10 aberrations

R Ring

P Pulverised cell

CHR Chromatid gap

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

4) 小核試験

チオシクラムのマウスを用いた小核試験

[資料 No. 26]

試験機関:

報告書作成年:

検体の純度:

供試動物: マウス、10週齢、1群雄6匹

試験方法: チオシクラムを0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム塩(CMC-Na)水溶液に懸濁し、24時間間隔で2回経口投与し、最終投与の6時間後に、骨髓塗抹標本を作製して検鏡した。各標本につき、正染性赤血球と多染性赤血球をそれぞれ1000個観察し小核を有する赤血球数を記録した。陰性対照には0.5%CMC-Na水溶液、陽性対照にはマイトマイシンC(2 mg/kg)を用いた。

用量設定根拠:

結果: 85.3 mg/kg 投与群では4/6が死亡し、42.7 mg/kg 投与群では2回目の投与後に6匹中1匹のマウスに死亡例がみられたことから、42.7、21.4、10.7 mg/kgの3濃度について標本を作製し観察対象とした。
骨髓標本の観察結果を以下の表に示す。

表1 チオシクラムのマウス小核試験結果の要約

薬物	投与量 (mg/kg) × 2	平均体重 (g)	1000個当りの平均小核細胞数	
			正染性赤血球	多染性赤血球
陰性対照*				
チオシクラム				
陽性対照 (マイトマイシンC)				

*: 0.5%CMC-Na水溶液

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2 マウス小核試験の結果

薬物	投与量 (mg/kg) × 2	動物番号	体重 (g)	1000 個当りの平均小核細胞数	
				成熟赤血球	多染性赤血球
陰性対照* (0.5 %CMC-Na 水溶液)		1			
		2			
		3			
		4			
		5			
		6			
		Mean ± S. D.			
陽性対照 (マイマイシン C)	2	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
		6			
		Mean ± S. D.			
チオシクラム	10.7	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
		6			
		Mean ± S. D.			
チオシクラム	21.4	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
		6			
		Mean ± S. D.			
チオシクラム	42.7	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
		6			
		Mean ± S. D.			

* : 動物に投与された溶媒 ; 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム 0.25 ml./10g 体重

** : P<0.01 (t-検定)

*** : 2回目の投与後死亡

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

チオシクロラム投与群の小核出現率はいずれの濃度群においても、成熟（正染性）赤血球及び多染性赤血球ともに有意な出現がみられなかった。一方、陽性対照として用いたマイトマイシンC投与群では高い小核誘発が観察された。

以上の結果より本試験条件下において、チオシクロラムは骨髄中の赤血球に小核を誘起せず、染色体異常を誘発する作用はないものと考えられる。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表1 チオシクラムシュウ酸塩のマウス小核試験結果の要約

標本作製までの時間	化学物質 (投与量)	正染性赤血球に対する 多染性赤血球数の比		多染性赤血球中の 小核誘発頻度		正染性赤血球中 の小核誘発頻度
		平均	P**	平均 0/00***	P**	平均 0/00
24h	溶媒対照* チオシクラム シュウ酸塩 (64 mg/kg) マイマイシンC (8 mg/kg)					
48h	溶媒対照 チオシクラム シュウ酸塩 (64 mg/kg)					
72h	溶媒対照 チオシクラム シュウ酸塩 (64mg/kg)					

* : 1%メチルセルロース水溶液

** : Wilcoxon 検定を用いた統計解析

*** : 細胞 1000 個中の数

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(9) 生体機能への影響に関する試験

マウス、ラット及びウサギにおける薬理試験

[資料 No. 28]

試験機関:

報告書作成年:

検体の純度:

① マウス及びラットの中樞神経系に対する作用

i) マウスの一般状態におよぼす影響

供試動物: マウス、体重 20.0~33.1 g、1 群雄 6 匹

投与方法: 検体を 0.5 %カルボキシメチルセルロースナトリウム塩(CMC-Na)水溶液に懸濁し、0、6.25、25 及び 100 mg/kg を 10 mL/kg の容量で 18 時間絶食させたマウスに強制経口投与し、投与 6 時間後まで Irwin の方法に従って経時的に一般症状を観察した。

結果: 6.25 及び 25 mg/kg の検体投与は、マウスの一般行動に影響を与えなかった。100 mg/kg 群では投与直後より全例に振せんが見られ、1 例では著しい振せんを呈したのち死亡した。投与 6 時間後に 1 例が軽度な振せんを示したが、それ以外は消失していた。3 例に筋弛緩症状(握力、四肢筋緊張及び躯体緊張の低下)がみられたが投与 30 分後には消失した。また全例に反応性の低下がみられ、各 2 例に警戒性の低下及び立ち直り反射の抑制も観察されたが、いずれも投与 4 時間後までに消失した。

ii) マウスの自発運動量に対する影響

供試動物: マウス、体重 20.0~33.1 g、1 群雄 10 匹

投与方法: 検体を 0.5 %CMC Na 水溶液に懸濁し、0、6.25、25 及び 100 mg/kg を 10 mL/kg の容量で強制経口投与し、投与 6 時間後まで自発運動量測定装置を用いて、Automex 法により自発運動量を測定した。

結果: 6.25 及び 25 mg/kg の検体投与は、マウスの自発運動量に対し影響を与えなかった。6.25 mg/kg 群でやや運動量の低下を示したが、25 mg/kg 群では対照群と同等であったため、投与の影響ではないと思われた。100 mg/kg 群では投与 1 時間後まで運動量の減少が認められ、投与後 30 分 ($p < 0.01$)、45 分 ($p < 0.05$) に統計学的有意差(検定方法に関しては、原文に記載なし)もみられたが、その後差異は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

iii) マウスの筋統御系に対する影響

供試動物： マウス、体重 20.0～33.1 g、1 群雄 10 匹

投与方法：検体を 0.5 %CMC Na 水溶液に懸濁し、0、6.25、25 及び 100 mg/kg を 10 mL/kg の容量で 18 時間絶食させたマウスに強制経口投与し、投与前、投与後 0.5、1、2、4 及び 6 時間後に回転棒試験を行った。マウスを毎分 10 回転する回転棒上のにせ、60 秒以内に落下するか否かを観察した。なお事前に訓練を受けて 60 秒以上落下しなかったマウスのみを試験に用いた。

結 果：

投与量 (mg/kg)	60 秒以内に落下した動物数					
	投与前	0.5 時間後	1 時間後	2 時間後	4 時間後	6 時間後
0						
6.25						
25						
100*						

*3 例が死亡したため、7 例のデータを示す。

6.25 及び 25 mg/kg の検体投与は、回転棒法によるマウスの協調運動に影響を与えなかった。100 mg/kg 群では 3 例が死亡した。また、検体投与 30 分及び 1 時間後にそれぞれ 6 例及び 3 例が 60 秒以内に落下し、運動失調が認められた。

iv) マウスに対する鎮痛作用

供試動物： マウス、体重 20.0～33.1 g、1 群雄 10 匹

投与方法：検体を 0.5 %CMC Na 水溶液に懸濁し、0、6.25、25 及び 100 mg/kg を 10 mL/kg の容量で 18 時間絶食させたマウスに強制経口投与し、30 分後に 0.6 %酢酸水溶液 (0.1 mL/10g 体重) を腹腔内投与した。酢酸投与の 10～20 分後に発現する writhing 反応を観察した。

結 果：マウスの酢酸 writhing 反応において、いずれの投与群にも有意差は認められなかった。なお、100 mg/kg 群では 1 例が死亡した。

v) マウスに対する睡眠増強作用

供試動物： マウス、体重 20.0～33.1 g、1 群雄 10 匹

投与方法：検体を 0.5 %CMC Na 水溶液に懸濁し、0、6.25、25 及び 100 mg/kg を 10 mL/kg の容量で 18 時間絶食させたマウスに強制経口投与し、30 分後に hexobarbital Na (90 mg/kg) を腹腔内投与し、正向反射消失を指標に睡眠持続時間を測定した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

結 果：いずれの投与群においても有意差はみられなかったことから、最高投与量の 100 mg/kg までの検体投与はマウスの hexobarbital 睡眠に影響を与えなかった。なお、100 mg/kg 群では検体及び hexobarbital 投与後にそれぞれ 1 例が死亡し、1 例が著しい振せんを示したために測定できなかった。

vi) ラットの体温に対する影響

供試動物： ラット、体重 188.1～206.0 g、1 群雄 6 匹

投与方法：検体を 0.5 %CMC Na 水溶液に懸濁し、0、6.25、25 及び 100 mg/kg を 10 mL/kg の容量で 18 時間絶食させたラットに強制経口投与し、投与 6 時間後まで 1 時間ごとにデジタル温度計を用いて直腸温を測定した。

結 果：25 mg/kg 群において、5 時間後の体温の有意な低下がみられたが、100 mg/kg 群に有意差は認められなかったことから、投与の影響ではないと思われた。

② ウサギの呼吸、循環器系に対する作用

供試動物： ウサギ、体重 2.65～3.20 kg、1 群雄 3 匹

投与方法：検体は 0.5 %CMC Na 水溶液に懸濁し、0、6.25、25 及び 100 mg/kg を 1 mL/kg の容量で 18 時間絶食させたウサギに強制経口投与した。麻酔下のウサギに気管カニューレ及び大腿動脈カニューレを挿入固定し、呼吸、血圧及び心拍数をポリグラフ上に記録した。呼吸及び血圧はそれぞれのカニューレに装着した呼吸ピックアップ及び圧トランジューサーを介して測定し、血圧脈波により駆動した心拍計を介して心拍数を測定した。各測定は、検体投与 1 時間後まで行った。

結 果：最高投与量の 100 mg/kg においても検体の投与は麻酔下のウサギの呼吸、血圧及び心拍数に影響を与えなかった。

③ マウスの自律神経系に対する作用

供試動物： マウス、体重 20.0～33.1 g、1 群雄 10 匹

投与方法：検体を 0.5 %CMC Na 水溶液に懸濁し、0、6.25、25 及び 100 mg/kg を 10 mL/kg の容量で 18 時間絶食させたマウスに強制経口投与し、投与 6 時間後まで 30 分毎に一定照度下で実体顕微鏡下に瞳孔径を測定した。

結 果：マウスの瞳孔径において、最高投与量の 100 mg/kg 群に有意差は認められなかった。なお、100 mg/kg 群では 1 例が死亡した。

以上の試験結果より、100 mg/kg の投与でマウスに死亡が認められ、振せん及び運動失調を主とする影響が認められた。さらに筋弛緩症状、反応性及び警戒性の低下、立ち直り反射の抑制、

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

自発運動量の減少もみられたが、角膜及び耳介反射への影響は認められなかったこと、及び回転棒法で運動失調が認められたことから、いずれも上記主たる影響の二次的影響と考えられた。また、鎮痛作用、睡眠増強作用及び体温に対する影響はみられなかったことから、高位の中樞神経系に対しほとんど作用しないものと考えられた。死亡例の認められなかった 6.25 及び 25 mg/kg 投与では影響は認められなかった。従って、チオシクロラムの生体機能に対する影響は、振せん及び運動失調を主とするものであり、これら以外に中枢神経系、呼吸循環器系、自律神経系に対する作用は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要	
中枢神経系	一般状態 [Irwin法] (マウス)	経口 (0.5% CMC-Na)	0, 6.25, 25, 100	♂ 6	100	25	100 mg/kg : 投与直後より振せん、1例死亡、筋弛緩症状、反応性低下、警戒性低下、立ち直り反射の抑制。
	自発運動量 (マウス)	経口 (0.5% CMC-Na)	0, 6.25, 25, 100	♂ 10	100	25	100 mg/kg : 投与後1時間まで運動量の減少。
	協調運動 (マウス)	経口 (0.5% CMC-Na)	0, 6.25, 25, 100	♂ 10	100	25	100 mg/kg : 3例死亡、30分時に6例が、1時間時に3例が落下。
	鎮痛作用 (マウス)	経口 (0.5% CMC-Na)	0, 6.25, 25, 100	♂ 10	—	100 (鎮痛作用)	鎮痛作用は認められなかった。 100 mg/kg で1例死亡。
	睡眠増強 (マウス)	経口 (0.5% CMC-Na)	0, 6.25, 25, 100	♂ 10	—	100 (睡眠増強)	投与による睡眠増強作用は認められなかった。 100 mg/kg で2例が死亡、1例が振せんを示した。
	体温 (ラット)	経口 (0.5% CMC-Na)	0, 6.25, 25, 100	♂ 6	—	100	影響は認められなかった。
呼吸・循環器系	呼吸、血圧、心拍数 (ウサギ、麻酔下)	経口 (0.5% CMC-Na)	0, 6.25, 25, 100	♂ 3	—	100	影響は認められなかった。
自律神経系	瞳孔径 (マウス)	経口 (0.5% CMC-Na)	0, 6.25, 25, 100	♂ 10	—	100 (瞳孔径)	瞳孔径に対する影響は認められなかった。 100 mg/kg で1例死亡。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

チオシクラム解毒試験

[資料 No. 29]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： ラット、6週齢、体重226～270 g、1群10匹

試験方法：検体を蒸留水液に懸濁して、急性中毒発症の可能性のある経路をかんがみ、胃ゾンデを用いて経口投与とした。用量は、予備試験の結果をもとに、ほぼ全例が死亡する800 mg/kgとした。チオシクラム投与後、薬物を処置した（処置薬物の用量は、治療用量を参考に選択した）。

解毒剤の選択理由；

本剤は環系動物の毒物 nereistoxin の同族化合物であり、容易にイオン原子がはずれて nereistoxin に変化する。nereistoxin は哺乳動物のムスカリン性受容体の刺激作用やニコチン受容体の遮断作用を有することから、抗痙攣薬であるメトカルバモール、フェノバルビタール、及びムスカリン受容体遮断薬であるアトロピン処置の症状（痙攣、流涎）ならびに死亡に対する影響を調べる目的で、解毒剤候補として採用した。

用量設定根拠；

観察項目：検体の経口投与した時の症状並びに死亡発現に対する薬物処置の影響を調べた。症状として明確に判断できた痙攣（攣縮、振せんを含む）と流涎を調べた。観察は、検体投与後、1、6、12、18、24、32、40、48、56、64、72時間目に行った。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

結 果：死亡のまとめは以下の表のとおりである。

処置群	チオシクロラム投与後時間ごとの死亡数											死亡数/ 試験数	死亡発現 時間
	1*	6	12	18	24	32	40	48	56	64	72		
無処置	4					2			1	1		8/10	24±26
メトカルバモール (100mg/kg)	4			1		2					2	9/10	26±29
アトロピン (5mg/kg)	6			2		1		1				10/10	12±17
フェノバルビタール (25mg/kg)	1		2	2	1					1	2	9/10	33±28

*：時間

無処置群では、10例中4例は投与1時間以内に流涎、痙攣を発現して死亡した。さらに別の4例は流涎、痙攣を発現せずに投与24時間から48時間にかけて死亡した。メトカルバモール、アトロピン、フェノバルビタール処置を行ったが、症状、死亡の発現数、発現時間に改善効果は認められなかった。

以上の結果から、本剤の投与後、抗痙攣薬であるメトカルバモール、フェノバルビタール、ムスカリン受容体遮断薬であるアトロピン処置による症状（痙攣、流涎）並びに死亡の発現数、発現時間に改善効果は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2. 代謝物を用いた試験成績

(1) 急性毒性

代謝分解物ネライストキシンのマウスにおける急性経口、皮下並びに腹腔内毒性試験

[資料 No. 30]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： マウス雌雄、4週齢

試験開始時の体重；雄 20～24 g、雌 18～22 g、1群雌雄各 10匹

観察期間：14日間観察

投与方法：1. 経口投与（公比 1.2）、2. 皮下投与（公比 1.15）、3. 腹腔内投与（公比 1.15）の3投与経路で実施した。経口投与では注射用蒸留水を用いて5%溶液を調製し、皮下及び腹腔内投与では生理的食塩水を用いて0.5%溶液を調製し、所定の投与薬量に相当する投与用量をそれぞれの経路で投与した。経口投与は胃ゾンデを用いて胃内に強制投与し、皮下投与は背部皮下に、腹腔内投与は腹腔内にそれぞれ投与した。

観察項目：投与後14日間一般状態及び死亡の観察を行い、死亡例はその都度、生存例は15日目に剖検し、各主要臓器の異常の有無を観察した。

LD₅₀値は、14日間の累積死亡率より Litchfield and Wilcoxon 法にしたがって LD₅₀値と 95%信頼限界を算出した。

結果：雌雄マウスの LD₅₀ 値一覧表

検体名	投与経路	性別	LD ₅₀ 値*	
			LD ₅₀ 値 (mg/kg)	95%信頼限界 (mg/kg)
ネライストキシ ンシュウ酸塩	経口	雄	205	177～237
		雌	194	171～220
	皮下	雄	34	30～38
		雌	37	32～42
	腹腔内	雄	36	32～40
		雌	40	36～45

* Litchfield and Wilcoxon 法

本検体投与による症状は、投与経路、性差に関係なく、投与後自発運動の低下、振せん、挙尾反応、間代性強直性痙攣が認められた。致死は主に、頻呼吸あるいは呼吸困難、間代性強直性痙攣から呼吸停止に至る急性死であった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

剖検所見は、急性死に肺のうっ血を認めた以外、死亡例及び生存例とも各臓器への投与による影響を示唆する所見は認められなかった。

1. 経口投与；

動物種	マウス
投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂ 125、150、180、216、259、311 ♀ 125、150、180、216、259、311
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 205 (177~237) ♀ 194 (171~220)
死亡開始時間 及び終了時間	(開始) 投与後 10 分以内 (終了) 投与後 1 日以内
症状発現時間 及び消失時間	(発現) 投与後 4~5 分 (消失) 投与後 4~5 時間
最大無作用量 (mg/kg)	♂ 125 ♀ 125 (死亡例の認められなかった最高投与量)

死亡例は、いずれの例でも投与後 10~30 分の間に関代性強直性痙攣が観察され、腹臥または横臥位となり苦悶状症状を呈した。

生存例では、自発運動の低下、蹲くまる状態からの振せんが、投与後 1 時間頃から音刺激に対して過敏となった状態がみられたが、投与後 4~5 時間で正常状態に回復した。

死亡例の剖検では、肺のうっ血以外特記すべき変化はなかった。

生存例の剖検では、投与との関連を示す変化は認められなかった。

2. 皮下投与；

動物種	マウス
投与方法	皮下
投与量 (mg/kg)	♂ 26、30、35、40、46 ♀ 26、30、35、40、46
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 34 (30~38) ♀ 37 (32~42)
死亡開始時間 及び終了時間	(開始) 投与後 10 分以内 (終了) 投与後 1 時間以内
症状発現時間 及び消失時間	(発現) 投与後 2~3 分 (消失) 投与後 5~8 時間
最大無作用量 (mg/kg)	♂ 26 ♀ 26 (死亡例の認められなかった最高投与量)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

死亡例は、いずれの例でも間代性強直性痙攣が観察され、腹臥あるいは横臥位となり苦悶状症状を呈し投与後 10 分～1 時間の間に死亡した。

生存例では、自発運動の低下、振せん、間代性痙攣が投与後 20～30 分頃までみられ、音刺激に対しても敏感となり、時には振せん様痙攣を起すこともあったが、投与後 5～8 時間までに正常状態に回復した。

死亡例の剖検では、肺のうっ血以外特記すべき変化はなかった。

生存例の剖検でも各臓器とも特記すべき変化はなかった。

3. 腹腔内投与；

動物種	マウス
投与方法	腹腔内
投与量 (mg/kg)	♂ 26、30、35、40、46 ♀ 26、30、35、40、46
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 36 (32～40) ♀ 40 (36～45)
死亡開始時間 及び終了時間	(開始) 投与後 10 分以内 (終了) 投与後 1 日以内
症状発現時間 及び消失時間	(発現) 投与直後～2 分 (消失) 投与後 6～7 時間
最大無作用量 (mg/kg)	♂ 26 ♀ 26 (死亡例の認められなかった最高投与量)

死亡例は、いずれの例でも挙尾反応をともなう間代性強直性痙攣がみられ、3～4 回痙攣を繰返しながら腹臥あるいは横臥位となり苦悶状症状を呈し投与後 10 分～1 時間の間に死亡した。

生存例では、自発運動の低下、振せん、間代性痙攣、失調性歩行、音刺激に対して敏感となる状態がみられたが、投与後 6～7 時間までに正常状態に回復した。

死亡例の剖検では、肺のうっ血以外特記すべき変化はなかった。

生存例の剖検では、投与との関連を示す変化は認められなかった。

以上の結果から、ネライストキシシユウ酸塩は、経口投与では中程度毒性、皮下及び腹腔内投与では強い毒性であることが示唆された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

代謝分解物ネライストキシンのラットにおける急性経口、皮下並びに腹腔内毒性試験

[資料 No. 31]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： ラット、4週齢、

試験開始時の体重；雄 100～130 g、雌 100～130 g、1群雌雄各 10匹

観察期間：14日間観察

投与方法：1. 経口投与（公比 1.2）、2. 皮下投与（公比 1.15）、3. 腹腔内投与（公比 1.15）の3投与経路で実施した。経口投与では注射用蒸留水を用いて5%溶液を調製し、皮下及び腹腔内投与では生理的食塩水を用いて0.5%溶液を調製し、所定の投与薬量に相当する投与用量をそれぞれの経路で投与した。経口投与は胃ゾンデを用いて胃内に強制投与し、皮下投与は背部皮下に、腹腔内投与は腹腔内にそれぞれ投与した。

観察項目：投与後14日間一般状態及び死亡の観察を行い、死亡例はその都度、生存例は15日目に剖検し、各主要臓器の異常の有無を観察した。

LD₅₀値は、14日間の累積死亡率より Litchfield and Wilcoxon 法にしたがって LD₅₀値と 95%信頼限界を算出した。

結果：雌雄ラットの LD₅₀ 値一覧表

検体名	投与経路	性別	LD ₅₀ 値*	
			LD ₅₀ 値 (mg/kg)	95%信頼限界 (mg/kg)
ネライストキシ ンシュウ酸塩	経口	雄	238	198～286
		雌	209	186～235
	皮下	雄	32	28～37
		雌	31	27～36
	腹腔内	雄	26	23～29
		雌	26	23～30

* Litchfield and Wilcoxon 法

本検体投与による症状は、投与経路、性差に関係なく、投与後自発達動の低下、振せん、挙尾反応、間代性強直性痙攣が認められた。致死は主に、頻呼吸あるいは呼吸困難、間代性強直性痙攣から呼吸停止に至る急性死であった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

剖検所見は、死亡例に肺のうっ血を認めた以外、死亡例及び生存例とも主要臓器への投与による影響を示唆する所見は認められなかった。

1. 経口投与；

動物種	ラット
投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂ 130、156、187、224、269、323 ♀ 130、156、187、224、269、323
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 238 (198~286) ♀ 209 (186~235)
死亡開始時間 及び終了時間	(開始) 投与後 10 分以内 (終了) 投与後 1 日以内
症状発現時間 及び消失時間	(発現) 投与後 5~6 分 (消失) 投与後 4~5 時間
最大無作用量 (mg/kg)	♂ 130 ♀ 130 (死亡例の認められなかった最高投与量)

死亡例は、いずれの例でも間代性強直性痙攣が観察され、投与後 10 分~1 時間の間に死亡した。

生存例は、自発運動の低下、弱い振せん、挙尾反応、間代性強直性痙攣、投与 1 時間後に一過性の自発運動の亢進がみられたが、投与後 4~5 時間までに正常状態に回復した。

死亡例の剖検では、急性死において肺のうっ血以外特記すべき変化はなかった。生存例の剖検では、肺のうっ血がごく少数例に散見されたが、各臓器とも特記すべき変化はなかった。

2. 皮下投与；

動物種	ラット
投与方法	皮下
投与量 (mg/kg)	♂ 20、24、29、35、42、50 ♀ 20、24、29、35、42、50
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 32 (28~37) ♀ 31 (27~36)
死亡開始時間 及び終了時間	(開始) 投与後 10 分以内 (終了) 投与後 1 日以内
症状発現時間 及び消失時間	(発現) 投与後 2~5 分 (消失) 投与後 5~6 時間
最大無作用量 (mg/kg)	♂ 20 ♀ 20 (死亡例の認められなかった最高投与量)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

死亡例は、いずれの例でも間代性強直性痙攣が観察され、投与後 10 分～1 時間の間に死亡した。

生存例では、自発運動の低下、弱い振せん、挙尾反応、間代性あるいは強直性痙攣の繰返し、蹲くまる姿勢、投与 1 時間後頃より一過性の自発運動の亢進ならびに音刺激に対して非常に敏感となるが、投与後 5～6 時間で正常状態に回復した。死亡例の剖検では、急性死、遅延死とも肺のうっ血以外各臓器とも特記すべき変化はなかった。

生存例の剖検では、各臓器とも特記すべき変化はなかった。

3. 腹腔内投与；

動物種	ラット
投与方法	腹腔内
投与量 (mg/kg)	♂ 17、20、23、26、30、35 ♀ 17、20、23、26、30、35
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 26 (23～29) ♀ 26 (23～30)
死亡開始時間 及び終了時間	(開始) 投与後 10 分以内 (終了) 投与後 1 日以内
症状発現時間 及び消失時間	(発現) 投与直後～3 分 (消失) 投与後 5 時間以内
最大無作用量 (mg/kg)	♂ 20 ♀ 17 (死亡例の認められなかった最高投与量)

死亡例は、いずれの例でも強い間代性強直性痙攣が観察され、投与後 10 分～1 時間の間で死亡した。

生存例では、自発運動の低下、振せん、挙尾反応、間代性あるいは強直性痙攣が観察され、投与 1 時間後頃より一過性の自発運動の亢進と音刺激に対して敏感となる反応を示したが、投与後 4～5 時間までに正常状態に回復した。

死亡例の剖検では、肺のうっ血が急性死に認められたが、遅延死には特記すべき変化は認めなかった。

生存例の剖検では、各臓器とも特記すべき変化はなかった。

以上の結果から、ネライストキシシユウ酸塩は、経口投与では中程度毒性、皮下及び腹腔内投与では強い毒性であることが示唆された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

代謝分解物ネライストキシンのラットにおける経皮毒性試験

[資料 No. 32]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： ラット、9週齢

試験開始時の体重；雄 200～220 g、雌 190～210 g、1群雌雄各 10匹

観察期間：14日間観察

投与方法：剪毛した背部（4×5 cm²）に検体を塗布し、24時間後に中性洗剤で洗浄した。

観察項目：投与後14日間、一般状態及び生死の観察を行い、死亡例はその都度、生存例は15日目に剖検し、各主要臓器の異常の有無を観察した。

LD₅₀値は、14日目の累積死亡率から算出した。

結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	♂♀ 1000、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ >5000 ♀ >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	症状発現なし
最大無作用量 (mg/kg)	5000 (死亡例の認められなかった最高投与量)

塗布皮膚面に発赤、紅斑、痂皮形成及び浮腫はまったく認められなかった。塗布後は何ら特記すべき行動異常は認められず、14日間の観察期間中、死亡した例はなかった。生存例を剖検した結果、各臓器とも肉眼的に特記すべき変化は認められなかった。塗布面及び皮下組織においても特記すべき変化はなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(2) 変異原性

代謝分解物ネライストキシンの DNA 修復試験

[資料 No. 33]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

試験方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、賀田らの Rec-assay 法で DNA の損傷の誘発性を検定した。

約 20 mL の Nutrient broth 寒天培地のプレート中央に径 1 cm の孔をあけ、溶融した寒天培地を滴下し、凹状の孔とした。一夜培養した H-17 (用時、0.1 M リン酸緩衝液で 2 倍希釈) 及び M-45 を孔から放射状に接種した。孔に DMSO に溶解した 50 μ L もしくは 100 μ L の検体を入れ、37 $^{\circ}$ C で一夜培養し、阻止帯の長さを測定した。陰性対照として塩酸 (HCl)、水酸化ナトリウム (NaOH) 及びカナマイシンを、陽性対照として 2-(2-フリル)-3-(3-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) を用いた。

結果：結果を次表に示した。ネライストキシンを 8 濃度にわたり処理したところ、1000 μ g から 10000 μ g/プレートにかけて濃度依存的に阻止帯が長くなり、5000 μ g/プレート以上では 3.5 mm 以上の阻止帯差が認められ陽性と判定された (表 1)。陽性対照として用いた AF-2 では 8 mm 以上の明らかな阻止帯の差がみられ、修復欠損株の M45 株では著しい生育阻止が見られた。

以上の結果より、ネライストキシンは本試験系の条件下において、枯草菌 DNA に対し初期損傷を生じる可能性が示唆された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

薬物		濃度 ($\mu\text{g}/\text{well}$)	阻止域 (mm)		差	判定
			H17	M45		
試験区	ネライストキシ シン	0				
		50				
		100				
		500				
		1000				
		5000				
		10000				
		20000				
陰性対照区	NaOH	1N、50 μL				
	HCl	1N、50 μL				
	KM ¹⁾	50				
陽性対照区	AF-2 ²⁾	5				

1) : カナマイシン

2) : 2-(2-フリル)-3-(3-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

代謝分解物ネライストキシンの復帰変異試験

[資料 No. 33]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* TA 1535、TA 100、TA 1537、TA 1538 及び TA98 及びトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *Hcr* を用い、ラット肝から調製した薬物代謝酵素系の存在下及び非存在下で Ames らの方法で変異原性を検定した。
試験回数は2連性の1回。

結果：試験結果を次頁の表に示す。

1) *E. coli* を用いた復帰変異試験

ネライストキシンは S-9 Mix 非存在下、1000 μ g/プレートで疑陽性、5000 μ g/プレートで陽性、S-9 Mix 存在下では、500 μ g/プレートで疑陽性、1000 μ g/プレート以上で陽性と判定された。

2) *S. typhimurium* を用いた復帰変異試験

ネライストキシンは、500 μ g/プレートで TA 1537 (S-9 Mix 存在下)、TA 100 (S-9 Mix 存在下) 及び TA 98 (S-9 Mix 非存在下) が疑陽性を示した。1000 μ g/プレートでは TA 1535 (S-9 Mix 非存在下) が陽性を示した。この他、TA 1535 (S-9 Mix 存在下)、TA 1537 (S-9 Mix 存在下)、TA 100 (S-9 Mix 存在下及び非存在下) 及び TA 98 (S-9 Mix 存在下及び非存在下) が疑陽性を示した。5000 μ g/プレートでは5菌株すべてにおいて S-9 Mix 非存在下において変異原性が認められた。S-9 Mix 存在下では TA 1538 を除く他のすべての菌株が陽性となった。

以上の結果から、ネライストキシンの変異原性は比較的弱いものの幅広いスペクトラムでの活性が認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

復帰変異試験成績 (2連の平均値)

薬物	濃度 (μ g/ plate)	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			
			WP2 hcr	TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98	
溶液対照 (DMSO)	0	—							
ネライス トキシシン	10	—							
	50	—							
	100	—							
	500	—							
	1000	—							
	5000	—							
溶液対照 (DMSO)	0	+							
ネライス トキシシン	10	+							
	50	+							
	100	+							
	500	+							
	1000	+							
	5000	+							
陽性対照区	S-9 Mix を必要 としないもの	名称	AF-2 ¹⁾	ENNG ²⁾	AF-2 ¹⁾	9AC ³⁾	2NF ⁴⁾	AF-2 ¹⁾	
		μ g/plate	0.01	5	0.01	80	2	0.1	
		復帰変異コロ ニー/plate							
	S-9 Mix を必要 とする もの	S-9 Mix	名称						
			μ g/plate						
		—	復帰変異コロ ニー/plate						
	+	復帰変異コロ ニー/plate							

- 1) 2-(2-フリル)-3-(3-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド 3) 9-アミノアクリジン
 2) 1-エチル-2-ニトロ-3-ニトロソグアニジン 4) 2-ニトロフルオレン
 5) 2-アミノアントラセン

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

代謝分解物ネライストキシンのマウスを用いた小核試験

[資料 No. 34]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：

供試動物： マウス、10週齢、1群雄6匹

試験方法：ネライストキシンを蒸留水に溶解してマウスに1回経口投与し、投与30時間後に骨髓塗抹標本を作製して検鏡した。各標本につき、正染性赤血球と多染性赤血球をそれぞれ1000個観察し小核を有する赤血球数を記録した。同時に検体の骨髓抑制の指標となる正染性赤血球と多染性赤血球の比を調べて記録した。陰性対照には蒸留水、陽性対照にはマイトマイシンCを用いた。

用量設定根拠；

結果：結果を次表に示した。

表1 ネライストキシンのマウス小核試験結果の要約

薬物	投与量 (mg/kg)×2	平均体重 (g)	1000個当りの平均小核細胞数	
			正染性赤血球	多染性赤血球
陰性対照 (蒸留水)		39.0	1.0	0.5
チオンクラム	12.8	39.0		
	25.6	38.5		
	51.3	38.9		
陽性対照 (マイトマイシンC)	2.0	38.6	1.2	65.8

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

表2 ネライストキシンのマウス小核試験結果

薬物	投与量 (mg/kg) × 2	動物番号	体重 (g)	1000 個当りの平均小核細胞数	
				成熟赤血球	多染性赤血球
陰性対照* (蒸留水)		1	40.2	2	2
		2	38.0	0	0
		3	39.2	2	0
		4	37.3	1	0
		5	39.3	0	1
		6	39.7	1	0
		Mean ± S. D.	39.0 ± 1.09	1.0 ± 0.9	0.5 ± 0.8
ネライストキシン	12.8	1	39.3		
		2	37.9		
		3	38.7		
		4	39.2		
		5	37.8		
		6	40.9		
		Mean ± S. D.	39.0 ± 1.14		
ネライストキシン	25.6	1	38.5		
		2	39.3		
		3	39.2		
		4	39.0		
		5	38.5		
		6	36.2		
		Mean ± S. D.	38.5 ± 1.15		
ネライストキシン	51.3	1	40.2		
		2	39.7***		
		3	37.4		
		4	39.6		
		5	37.6***		
		6	39.1		
		Mean ± S. D.	38.9 ± 1.17		
陽性対照 (マイトマイシン C)	2.0	1	40.2	1	71
		2	36.2	0	48
		3	39.2	3	73
		4	40.3	1	90
		5	38.4	1	46
		6	37.5	1	67
		Mean ± S. D.	38.6 ± 1.60	1.2 ± 1.0	65.8 ± 1.66**

* : 動物に投与された溶媒 ; 蒸留水 0.25mL/10g 体重

** : t 検定 P<0.01

*** : 投与後に死亡

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

ネライストキシンの最高投与量である 51.3 mg/kg 群では 2 個体に死亡例がみられたが、小核誘発の評価は可能と判断しすべての投与群について骨髓塗抹標本作製して観察に供した。

すべてのネライストキシンの投与群において、正染性赤血球及び多染性赤血球ともに小核をもつ細胞の有意な増加は認められなかった。また、骨髓抑制作用の指標となる正染性赤血球に対する多染性赤血球の比についても有意差は認められず、赤血球の分化に異常はないものと推定された。一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C 投与群では小核の有意な増加が観察された。

以上の結果より、本実験条件下ではネライストキシンはマウス骨髓中の赤血球において小核を誘発せず、染色体異常を誘発する作用はないものと結論された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

3. 製剤を用いた試験成績

(1) 急性毒性

50 %水和剤のラットにおける急性経口毒性試験

[資料 No. 35]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：50 %水和剤

組成；チオシクロラム 50.0 %

鋳物質微粉、界面活性剤等 50.0 %

供試動物：♀ ラット、約5～8週齢、

体重；雄 120～158 g、雌 121～153 g、

1群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察

試験方法：用量範囲設定試験の結果に基づき、投与量は蒸留水中に25～100 mg/mLとし、容量10 mL/kgを強制経口投与した。

動物は検体投与前一夜及び投与後約2時間絶食させた。

試験項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、0日目（投与日）、7日目、14日目、あるいは死亡時に個別別に体重を測定した。

試験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：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	250、354、500、707、1000
LD ₅₀ (mg/kg)	全動物 853 (649～1849) 雄 1005 (430～2348) 雌 696 (490～988)
死亡開始時間 及び終了時間	開始：30分 終了：1日後
症状発現及 び消失時期	発現：30分 消失：1日後
死亡例の認められ なかった最高 投与量 (mg/L)	♂ 500、♀ 354

各群に共通した症状として、後弓姿勢、嗜眠、呼吸の速さの減少、及び全身の振せん、あるいは突発的な全身の振せん、加えて運動失調、及び努力性呼吸が認め

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

られた。その他の症状として、間代性痙攣、硬直性痙攣、立毛、唾液分泌の増加、及び口周りの赤／茶色の汚れが認められた。生存動物は、試験期間を通して正常であったか、あるいは投与後1日から2日目には回復した。

試験期間を通して、生存動物は予期した体重増加を示した。

試験期間中に死亡した動物の剖検で、共通した異常所見として、肺の出血、あるいは肺の異常赤色、肝臓の暗色、及び腎臓の暗色が認められた。その他の異常所見としては、消化管粘膜の出血、あるいは少量出血及び蒼白が認められた。試験終了時に屠殺した動物の剖検では、異常はなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

50 %水和剤のマウスにおける急性経口毒性試験

[資料 No. 36]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：50 %水和剤

組成；チオシクロラム 50.0 %

 鉱物質微粉、界面活性剤等 50.0 %

供試動物： アルビノマウス 、約6～8週齢、
 体重；雄 22～28 g、雌 20～24 g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：用量設定試験の結果に基づき、投与量は蒸留水中に 5～80 mg/mL とし、容量 10 mL/kg を強制経口投与した。

動物は検体投与前 3～4 時間及び投与後約 2 時間絶食させた。

試験項目：中毒症状及び生死を 14 日間観察し、0 日目（投与日）、7 日目、14 日目、あるいは死亡時に個別別に体重を測定した。

試験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：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	50、100、200、400、800
LD ₅₀ (mg/kg)	全動物 311 (221～563) 雄 327 (167～641) 雌 332 (196～562)
死亡開始時間 及び終了時間	開始：30分 終了：2時間
症状発現及 び消失時期	発現：30分 消失：4時間
死亡例の認められ なかった最高 投与量 (mg/kg)	♂ 50、♀ 100

各群に共通した症状として、後弓姿勢、嗜眠、加えて運動失調、眼瞼下垂、呼吸の速さの減少、努力性呼吸、及び全身の振せん、あるいは突発的な全身の振せんが認められた。群ごとの症状として、間代性痙攣、及び異常音を伴った呼吸が認められた。生存動物は、試験期間を通して正常であったか、あるいは投与1日後には回復した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

試験期間を通して、体重増加のみられない動物が認められた。

試験期間中に死亡した動物の剖検の異常所見として、肺の出血、あるいは肺の異常赤色、肝臓の暗色、及び腎臓の暗色が認められた。試験終了時に屠殺した動物の剖検では異常は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

50 %水和剤のラットにおける急性経皮毒性試験

[資料 No. 37]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：50 %水和剤

組成；チオシクラム 50.0 %

鋳物質微粉、界面活性剤等 50.0 %

供試動物：

ラット、約 10～14 週齢、

体重；雄 222～252 g、雌 211～227 g、1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

試験方法：検体は前もって蒸留水で湿らせた皮膚の刈毛部位（総体表面積の 10%：背腰部）に塗布した。処理部位はガーゼ及び粘着包帯で覆った。暴露時間は 24 時間とした。

試験項目：中毒症状（処理部位の反応を含む）及び生死について 14 日間観察し、0 日目（投与日）、7 日目、14 日目あるいは死亡時に個別別に体重を測定した、試験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：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	♂♀ 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	全動物 >2000 雄 >2000 雌 >2000
死亡開始時間及び終了時間	開始：2 時間（♀）
症状発現及び消失時期	全身症状はなし
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/L)	♂ 2000

試験期間を通して、全身毒性の徴候は認められなかった。共通した皮膚症状として、雌の処理部位に緑／黒色の壊死斑、皮膚毛細血管からの出血、淡褐色硬化痂皮、褐色／黒色硬化痂皮、散在性の小痂皮、及び痂皮の形成が認められた。雄では、1 例の処理部位で散在性の小痂皮が認められたのみであった。

1 例の雌動物が第一週に、わずかな体重減少を示した以外は、生存動物は試験期間を通して、予期した体重増加を示した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

試験期間中に死亡した雌動物の剖検で、肺の出血が認められた。試験終了後に屠殺した動物の剖検では、異常は見られなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

4 %粒剤のラットにおける急性経口毒性試験

[資料 No. 38]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：4 %粒剤

組成：

供試動物 ラット、9週齢、

試験開始時の体重；雄 200～210 g、雌 190～200 g、1群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を乳鉢で磨潰し精製水を用いて 50 %懸濁液（500 mg/mL）を調製し、所定の投与薬量に相当する懸濁液量（投与用量）を胃ゾンデで強制経口投与した。

観察項目：投与後 14 日間一般症状及び生死の観察を行い、死亡例はその都度、生存例は 15 日目に解剖し、異常の有無を肉眼的に検査した。

LD₅₀ 値は、投与後 7 日間の死亡率より Litchfield-Wilcoxon 法を用いて算出した。

結果：

動物種	ラット
投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂ 3000、5000 ♀ 3000、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	♂ >5000 ♀ >5000
死亡開始時間 及び終了時間	投与後終了時まで死亡例なし
症状発現時間 及び消失時間	(発現) 投与後 10～15 分 (消失) 投与後 2 時間
最大無作用量 (mg/kg)	♂5000 以上 ♀5000 以上 (死亡例の認められなかった最高投与量)

中毒症状としては、自発運動の低下、軽度の振せんが観察された。

剖検では特記すべき異常は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

4 %粒剤のマウスにおける急性経口毒性試験

[資料 No. 39]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：4 %粒剤

組成；

供試動物： マウス、6週齢、

試験開始時の体重；雄 20～24 g、雌 19～23 g、1群雌雄各 10匹

観察期間：14日間

投与方法：検体を乳鉢で磨潰し精製水を用いて 50 %懸濁液（500 mg/mL）を調製し、所定の投与薬量に相当する懸濁液量（投与用量）を胃ゾンデで強制経口投与した。

観察項目：投与後 14 日間、一般症状及び生死の観察を行い、死亡例はその都度、生存例は 15 日目に解剖し、内部諸臓器の異常の有無を肉眼的に検査した。

LD₅₀値は、投与後 7 日間の死亡率より Litchfield-Wilcoxon 法を用いて算出した。

結果：

動物種	マウス
投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂♀ 2958、3846、5000、6500、8450、10985
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 6900 (5391～8832) ♀ 6220 (5016～7713)
死亡開始時間 及び終了時間	(開始) 投与後 1 時間以内 (終了) 投与後 1 時間以内
症状発現時間 及び消失時間	(発現) 投与後 5～10 分 (消失) 投与後 24 時間以内
最大無作用量 (mg/kg)	♂2958 ♀2958 (死亡例の認められなかった最高投与量)

中毒症状としては、自発運動の低下、静居状態、腹臥位姿勢、振せん、間代性痙攣等の徴候が観察された。

剖検では特記すべき異常は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

4 %粒剤のラットにおける急性経皮毒性試験

[資料 No. 40]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：4 %粒剤

組成：

供試動物：ラット、9週齢、

試験開始時の体重；雄 200～210 g、雌 190～200 g、1群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を精製水で湿らせ、剪毛した動物の背部中央の皮膚(4 cm×5 cm)に 7000 mg/kg 及び 5000 mg/kg を 1 回塗布した。塗布時間は 24 時間とし、皮膚に残った検体は中性洗剤で除去した。

観察項目：皮膚の変化(発赤、紅斑、痂皮形成、浮腫)、一般症状及び動物の生死について 14 日間観察した。生存動物は解剖し、所定の組織について異常の有無を肉眼的に検査した。

結果：

動物種	ラット
投与方法	塗布
投与量 (mg/kg)	♂ 5000、7000 ♀ 5000、7000
LD ₅₀ (mg/kg)	♂ >7000 ♀ >7000
死亡開始時間 及び終了時間	投与後終了時まで死亡例なし
症状発現時間 及び消失時間	特記すべき症状発現は認められなかった。
最大無作用量 (mg/kg)	♂7000 以上 ♀7000 以上

中毒症状、及び皮膚変化はまったく認められなかった。

剖検の結果、いずれの臓器においても肉眼的に特記すべき変化は認められなかった。また、塗布部位の皮膚表面及び皮下組織においても特記すべき変化は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2 %粉剤のラットにおける急性経口毒性試験

[資料 No. 41]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：2 %粉剤

組成；

供試動物：ラット、9週齢、

試験開始時の体重；雄 200～210 g、雌 190～200 g、1群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体は、精製水を用いて 50 %懸濁液 (500 mg/mL) を調製し、所定の投与薬量に相当する懸濁液量 (投与用量) を胃ゾンデで強制投与した。

観察項目：投与後 14 日間一般症状及び生死の観察を行い、死亡例はその都度、生存例は 15 日目に解剖し、各組織及び臓器について異常の有無を肉眼的に検査した。

LD₅₀ 値は、投与後 7 日間の死亡率より Litchfield-Wilcoxon 法を用いて算出した。

結果：

動物種	ラット
投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂ 3000、5000 ♀ 3000、5000
LD ₅₀ (mg/kg)	♂ >5000 ♀ >5000
死亡開始時間 及び終了時間	投与後終了時まで死亡例なし
症状発現時間 及び消失時間	特記すべき症状発現は認められなかった
最大無作用量 (mg/kg)	♂ >5000 ♀ >5000

3000 mg/kg 投与群において、特記すべき行動異常は認められなかった。死亡例もなかった。

5000 mg/kg 投与群において、投与後 10 分で一過性の自発運動低下が認められたが、特記すべき行動異常は認められなかった。死亡例もなかった。

剖検の結果、各臓器とも肉眼的に特記すべき変化は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2 %粉剤のマウスにおける急性経口毒性試験

[資料 No. 42]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：2 %粉剤

組成：

供試動物： マウス、6週齢

試験開始時の体重；雄 20～24 g、雌 19～23 g、1群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体は、精製水を用いて 50 %懸濁液（500 mg/mL）を調製し、所定の投与薬量に相当する懸濁液量（投与用量）を胃ゾンデで強制投与した。

観察項目：投与後 14 日間一般症状及び生死の観察を行い、死亡例はその都度、生存例は 15 日目に解剖し、各組織及び臓器について異常の有無を肉眼的に検査した。

LD₅₀値は、投与後 7 日間の死亡率より Litchfield-Wilcoxon 法を用いて算出した。

結果：

動物種	マウス
投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂ 3846、5000、6500、8450、10985 14281 ♀ 3846、5000、6500、8450、10985 14281
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	♂ 8950 (7716～10382) ♀ 7550 (6138～9287)
死亡開始時間 及び終了時間	(開始) 投与後 1 時間以内 (終了) 投与後 1 時間以内
症状発現時間 及び消失時間	(発現) 投与後 5～10 分 (消失) 投与後 24 時間以内
最大無作用量 (mg/kg)	♂5000 ♀3846 (死亡例の認められなかった最高投与量)

中毒症状としては、自発運動の低下、腹臥位姿勢、静居状態、振せん、間代性痙攣の徴候が観察された。

解剖所見では特に異常は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2 %粉剤のラットにおける急性経皮毒性試験

[資料 No. 43]

試験機関：

報告書作成年：

検体の純度：2 %粉剤

組成；不明（原文に記載なし）

供試動物：ラット、7週齢、

試験開始時の体重；雄 200～220 g、雌 190～210 g、1群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

投与方法：検体を精製水で湿らせ、剪毛した動物の背部中央の皮膚（4 cm×5 cm）に 7000 mg/kg 及び 5000 mg/kg を 1 回塗布した。塗布時間は 24 時間とし、皮膚に残った検体は中性洗剤で除去した。

観察項目：皮膚の変化（発赤、紅斑、痂皮形成、浮腫）、一般症状及び動物の生死について 14 日間観察した。生存動物は解剖し、所定の組織について異常の有無を肉眼的に検査した。

結果：

動物種	ラット
投与方法	塗布
投与量 (mg/kg)	♂ 5000、7000 ♀ 5000、7000
LD ₅₀ (mg/kg)	♂ >7000 ♀ >7000
死亡開始時間 及び終了時間	投与後終了時まで死亡例なし
症状発現時間 及び消失時間	特記すべき症状発現は認められなかった
最大無作用量 (mg/kg)	♂ >7000 ♀ >7000

中毒症状及び皮膚の変化はまったく認められなかった。

剖検した結果は、各臓器とも肉眼的に特記すべき変化は認められなかった。

塗布部位の皮膚面及び皮下組織においても特記すべき変化は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

75 %水和剤のラットにおける急性経口毒性試験

[資料No. 44]

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度：75 %水和剤

組成；チオシクラム 75.0 %

結合剤、界面活性剤等 25.0 %

供試動物： ラット、8～9週齢、

体重；189.69～208.61 g、1群雌5匹

観察期間：15日間

試験方法：固定用量法

投与方法：検体を電子天びんで秤量後、乳鉢を用いて微細な粉末にした後、注射用水を加え懸濁し、用時調製して強制経口投与した。

投与液量は体重1 kgあたり10 mLとした。

投与前に約16時間の絶食と、投与後、約4時間の絶食を行った。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を15日間観察し、投与直前、投与4、8及び15日後に体重を測定した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	50、300
LD ₅₀ (mg/kg)	50 < LD ₅₀ ≤ 300
死亡開始時間及び終了時間	投与後30分から開始 投与後4時間に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後30分から発現 投与後3日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	50

中毒症状としては、流涎、痙攣、下腹部の汚れ、流涙、軟便、体温低下、自発運動の減少、不規則性呼吸、腹臥位、紅涙及び死亡例は認められなかった。

50 mg/kg 投与群の全動物においては、順調な体重増加がみられた。

剖検所見では、特記すべき変化は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

75 %水和剤を用いたラットにおける急性経皮毒性試験

[資料No. 45]

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度：75 %水和剤

組成；チオシクラム 75.0 %

結合剤、界面活性剤等 25.0 %

供試動物：

：ラット、雄8週齢、雌9週齢、

体重；雄 277.3～302.2 g、雌 225.6～250.2 g、1群雌雄各5匹

観察期間：15日間

投与方法：検体を電子天びんで秤量後、乳鉢を用いて微細な粉末にした後、注射用水を加え懸濁し、用時調製して背部に24時間閉塞塗布した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を15日間観察し、投与直前、投与4、8及び15日後に体重を測定した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経皮	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	0、2000	0、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000	>2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現及び消失時間	症状発現例なし	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	2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	2000	2000

雌雄いずれにも臨床的異常及び死亡例はみられなかった。

体重については、雌雄の対照群及び雄の検体投与群では順調な増加がみられた。雌の検体投与群の1例において、投与4日に体重減少がみられたが、投与8日からは順調な増加がみられた。

剖検所見では、特記すべき変化は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

8 %粒剤を用いたラットにおける急性経口毒性試験

[資料No. 46]

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度：8 %粒剤

組成；チオシクラム 8.0 %

増量剤、結合剤等 92.0 %

供試動物： SPFラット、8～9週齢、
体重；167.2～206.7 g、1群雌3匹

観察期間：14日間

試験方法：毒性等級法

投与方法：検体を電子天秤で秤量後、乳鉢を用いて粉碎した後、検体を0.5%メチルセルロース溶液に懸濁して強制経口投与した。

投与液量は体重1 kgあたり10 mlとした。

投与前に約16 時間の絶食と、投与後、約4時間の絶食を行った。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、投与直前と投与1、3、7及び14日後に体重を測定した。死亡動物及び観察期間終了後の全生存動物について剖検を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	300、300、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	300 < LD ₅₀ ≤ 2000
死亡開始時間及び終了時間	投与後4時間から開始 投与後1日に終了
症状発現時間及び消失時間	投与後30分から発現 投与後2日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	300
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	300

中毒症状としては、振戦、流涎、流涙、不規則呼吸、紅涙、腹臥位、粘液便、排便量の減少が認められた。

体重は、2000 mg/kg 投与群の生存1例で1日後まで体重増加抑制が認められたが、その後回復した。

剖検所見では、死亡例及び生存例とも肉眼的異常は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

8 %粒剤を用いたラットにおける急性経皮毒性試験

[資料No. 47]

試験機関：

[G L P 対応]

報告書作成年

検体の純度：8 %粒剤

組成；チオシクラム	8.0 %
増量剤、結合剤等	92.0 %

供試動物：

SPFラット、雄8週齢、雌9週齢、

体重：雄 269.2～290.5 g、雌 224.0～245.3 g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

投与方法：検体を電子天びんで秤量後、ビニールフィルムが付着されたリント布に均一に載せ、注射用水を加えて湿潤し、背部に24時間閉塞貼付した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、投与直前と投与3、7及び14日後に体重を測定した。観察期間終了後のすべての動物について剖検を行った。

結 果：

投与方法	経皮	
	雄	雌
性別		
投与量 (mg/kg)	0、2000	0、2000
LD ₅₀ (mg/kg)	>2000	>2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし	死亡例なし
症状発現及び消失時間	投与後1日から発現 投与後13日に消失	投与後1日から発現 投与後13日に消失
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000	2000

中毒症状としては、発赤、落屑または痂皮形成が認められた。

体重は対照群と比べて有意差は認められなかった。

剖検所見では、すべての動物に肉眼的異常は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

50 %水和剤のウサギを用いた皮膚刺激性試験

[資料 No. 48]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：50 %水和剤

組成；チオシクロラム原体 50.0 %

鋳物質微粉、界面活性剤 50.0 %

供試動物： 白色ウサギ、12～16 週齢、
体重 2.44～2.74 kg、1 群 6 匹

観察期間：7 日間観察

投与方法：検体 0.5 g を 0.5 mL 蒸留水で湿らせて 2.5 cm 四方のガーゼパッチに塗布し、各動物の背腰部の刈毛した非擦過皮膚に貼布した。

4 時間の検体貼布後、処置部位を蒸留水を浸した脱脂綿で洗浄し、皮膚に残った検体を除去した。

観察項目：パッチ除去約 1 時間後及び 24、48、72 時間後及び 7 日後に皮膚の検体処理部位を検査し、刺激性変化（紅斑、痂皮、浮腫）の有無等を観察した。

判定は Draize (1959) の基準に従った。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

結果：観察した刺激性変化の評点は以下の表の通りである。

動物 番号	項目	最高 評点	曝露後時間				
			1時間	24時間	48時間	72時間	7日
1	紅斑・痂皮	4					
	浮腫	4					
2	紅斑・痂皮	4					
	浮腫	4					
3	紅斑・痂皮	4					
	浮腫	4					
4	紅斑・痂皮	4					
	浮腫	4					
5	紅斑・痂皮	4					
	浮腫	4					
6	紅斑・痂皮	4					
	浮腫	4					
合計	紅斑・痂皮	24					
	浮腫	24					
平均	紅斑・痂皮	4.0					
	浮腫	4.0					
	合計	8.0					

パッチを除去して1時間後の観察では、全例の処理部位に明らかな紅斑と、軽度から中等度の浮腫が認められた。

24時間後の観察では、全例の処理部位に極めて軽度から明らかな紅斑と、軽度の浮腫が認められた。

48時間後の観察では、全例の処理部位に極めて軽度から明らかな紅斑と、極めて軽度から軽度の浮腫が認められた。

72時間後の観察では、全例の処理部位に極めて軽度から明らかな紅斑と、3例の処理部位に極めて軽度の浮腫が認められた。

以上の刺激性変化に加えて、1例の処理部位にパッチ除去1時間後に点状出血が認められ、同部位の24、48時間後の観察では、表皮に淡褐色の変化が認められた。

7日目の観察では、全例に落屑、あるいは痂皮の形成だけが認められた。なお腐食作用は認められなかった。

以上の結果から、本検体はウサギの皮膚に対して中等度の刺激性があると判断された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

75 %水和剤を用いたウサギを用いた皮膚刺激性試験

[資料No. 49]

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度：75 %水和剤

組成；チオシクロラム原体	75.0 %
結合剤、界面活性剤等	25.0 %

供試動物：ウサギ 雄、16週齢、
体重；2.56～2.89 kg、1群3匹

観察期間：13日間

投与方法：検体0.5 gを注射用水で湿潤し、剪毛した動物の背中の皮膚(2.5 cm×2.5 cm)に適用し、半閉塞貼付した。
貼付時間は4時間とし、全ての被覆物を取り除いた後、微温湯を用いて検体の残留物を除去した。

観察項目：曝露終了後1、24、48及び72時間に、適用部位の刺激性反応（紅斑、痂皮、浮腫）の有無を観察し、Draizeの基準に従って採点した。
パッチ除去後72時間以降にも皮膚反応が認められたため、12日まで継続して観察した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

結 果：観察した刺激性変化の採点は、以下の表のとおりである

動物 番号	項目	最高 評点	曝露後時間				刺激指数 (個体別)
			1時間	24時間	48時間	72時間	
1	紅斑・痂皮	4					
	浮腫	4					
2	紅斑・痂皮	4					
	浮腫	4					
3	紅斑・痂皮	4					
	浮腫	4					
合計	紅斑・痂皮	12					
	浮腫	12					
平均	紅斑・痂皮	4					
	浮腫	4					

動物 番号	項目	曝露後時間									
		4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	11日	12日	
1	紅斑・痂皮										
	浮腫										
2	紅斑・痂皮										
	浮腫										
3	紅斑・痂皮										
	浮腫										
合計	紅斑・痂皮										
	浮腫										
平均	紅斑・痂皮										
	浮腫										

*：鱗屑

検体除去後1時間から72時間までの観察において、評点1の紅斑及び評点2または1の浮腫が3例全例ともに認められた。これら刺激反応は検体除去後5日まで観察されたが、6日後には消失した。また、刺激反応の二次的変化と考えられる鱗屑が検体除去後4日から11日まで観察された。

以上の結果から、チオシクロム75%水和剤は、ウサギの皮膚に対して軽度刺激性があるものと思われる。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

8 %粒剤を用いたウサギを用いた皮膚刺激性試験

[資料No. 50]

試験機関：

[G L P 対応]

報告書作成年

検体の純度：8 %粒剤

組成；チオシクラム 8.0 %

増量剤、結合剤等 92.0 %

供試動物： SPFウサギ 雄、11週齢、

体重；2.13～2.26 kg、1群雄3匹

観察期間：72時間

投与方法：乳鉢を用いて粉碎した検体0.5 gを剪毛した動物の背中の皮膚(2.5 cm×2.5 cm)に適用し、注射用水で湿潤した後、4時間閉塞貼付した。

観察項目：曝露終了1、24、48、72時間後に刺激性変化(紅斑、痂皮及び浮腫)の有無を観察し、Draize法に従って採点した。

結果：観察した刺激性変化の採点は、以下の表のとおりである

動物番号	項目	最高評点	曝露後時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
1	紅斑・痂皮	4				
	浮腫	4				
2	紅斑・痂皮	4				
	浮腫	4				
3	紅斑・痂皮	4				
	浮腫	4				
合計	紅斑・痂皮	12				
	浮腫	12				
平均	紅斑・痂皮	4				
	浮腫	4				

曝露終了後において、全例に紅斑、浮腫等の皮膚反応は認められなかった。

以上の結果から、チオシクラム8 %粒剤は、ウサギの皮膚に対して刺激性はないものと思われる。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

50 %水和剤のウサギを用いた眼刺激性試験

[資料 No. 51]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：50 %水和剤

組成；チオシクロム原体 50.0 %

鋳物質微粉、界面活性剤等 50.0 %

供試動物：

白色ウサギ、12～16 週齢、

体重 2.63～2.90 kg、予備試験 1 匹、本試験 6 匹

観察期間：3 日間

投与方法：本剤の使用時の安全性を確認する意味で、6 匹のウサギについて検体の 1/1000 希釈液（使用時濃度）を処理した。

右眼の下眼瞼を穏やかに眼球から引き離し、検体の 1/1000 希釈液 0.1 mL をその結膜嚢内に処理した。検体の損失を防ぐため、処理後直ちに約 1 秒、両眼瞼を併せ、その後再び開いた。左眼は無処理対照とした。

洗眼は行わなかった。

眼の損傷及び刺激性の評価をレイズの方法で評点を算出した。

用量設定根拠；

観察項目：1/1000 希釈液試験は、投与後 1、24、48 及び 72 時間に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を左眼を対照として観察した。観察された刺激性所見からドレイズの方法で評点を算出した。

結果：観察した刺激性変化の評点は次頁の表の通りである。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

予備試験結果；

1/1000 希釈液試験の結果；

投与ウサギ 6 匹の個別評価はすべて以下の数値であった。

項 目		投 与 後 時 間			
		1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
角膜	E:混濁程度				
	F:混濁面積 評 点				
虹彩	初期疼痛反応				
	評 点				
結膜	A:発 赤				
	B:浮 腫 C:分泌物 評 点				
総合評点					

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

個別のウサギ及びグループの総合評点は以下の数値であった。

ウサギ番号/性別/体重 kg	個別の総合評点			
	1 時間	24 時間	48 時間	72 時間
No. 107 雌 2.74				
No. 52 雌 2.63				
No. 55 雌 2.78				
No. 96 雄 2.90				
No. 92 雄 2.84				
No. 86 雄 2.87				
グループ総合評点				
グループ平均評点				

眼刺激性の徴候は見られなかった。試験期間を通して、処理眼は正常であった。

以上の結果から、検体の 50 % (w/v) 調製液の場合の、最大評点は 37.0 であり、Kay 及び Calandra の評価方法の修正法に従うと、ウサギの限に対する刺激性は、少なくとも中等度（等級 1~8 のうち 5）であると判定された（1 匹のウサギの結果に基づく）。無希釈検体もまた、ウサギの眼に対して少なくとも中等度の刺激性を持つと推定することが、妥当であると考えられた。検体の 1/1000 希釈液（使用時濃度）の場合の最大群平均評点は 0.0 であり、Kay 及び Calandra の評価方法の修正法に従うと、ウサギの眼に対して刺激性は持たない（等級 1~8 のうち 1）と考えられた。陽性反応は認められなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

4 %粒剤のウサギを用いた眼刺激性試験

[資料 No. 52]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：4 %粒剤

組成；チオシクロム原体 4 %
界面活性剤、鉍物質微粉等 96 %

供試動物： 白色種ウサギ、12～16 週齢、
体重 2.77～2.99 kg、雌雄各 2 匹（非洗眼群 1 匹、洗眼群 3 匹）

観察期間：21 日間観察

投与方法：検体 0.1g を右眼に点眼し、投与後検体のこぼれを防ぐため約 1 秒間閉眼させた。
なお、左眼は無処理対照とした。洗眼群は投与 2～3 分後微温水で洗眼した。

観察項目：非洗眼群は、投与後 1、24、48、72 時間、7、14、21 日目に、洗眼群は、投与後 1、24、48、72 時間（1 匹のみ 7 日目も）に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を Draize 法に従って観察し、採点した。

結果： 観察した刺激性変化の評点は以下の表の通りである。

項 日			最高 評点	投与後時間						
				1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	7 日	14 日	21 日
非洗眼群 (1 匹)	角膜 混濁	程度	4							
		面積	4							
	虹 彩		2							
	結膜	発赤	3							
		浮腫	4							
		分泌	3							
	総合評点 ^a			110						
洗眼群 (3 匹平均)	角膜 混濁	程度	4							
		面積	4							
	虹 彩		2							
	結膜	発赤	3							
		浮腫	4							
		分泌	3							
	総合評点 ^a			110						

a: Draize 法による評価点、角膜混濁程度×面積×5+虹彩×5+（発赤+浮腫+分泌）×2

b: 72 時間で症状のみられた 1 個体を観察

c: 角膜の曇り(dulling of the cornea)

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

非洗眼群では、投与1時間後に角膜の通常の光沢がくもり、投与24、48、72時間後に散在性あるいは瀰漫性の混濁が角膜全体に認められた。虹彩の炎症が投与1、24、48及び72時間に認められた。重度の結膜刺激性が投与1時間後に、中程度の結膜刺激性が投与24、48、72時間後及び7日目に認められた。軽微な結膜刺激性が投与14日目に認められた。投与24、48時間後に結膜下部の蒼白化が、投与24、48、72時間後及び7日目に瞬膜と結膜下部に白濁域が、投与14、21日目に眼底で強膜を覆う膜に白い結節が認められた。その他一般症状として投与後90分の間に、振せん、嗜眠、歩行失調、呼吸困難が認められた。

洗眼群では、角膜または虹彩に影響は認められなかった。中程度の結膜刺激性が、投与1及び24時間後では全例に認められ、1例は投与48時間後までその刺激性が持続した。軽微な結膜刺激性が、投与48時間後で2例に、投与72時間後で1例認められた。

以上の結果から、本剤はウサギの眼に対して非洗眼群では不可逆性の影響が認められたことから、腐食性物質として分類された。

また、洗眼群では、洗眼効果が認められたことから、修正 Kay and Calandra 分類法に従って、軽度の刺激性物質と分類された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

2 %粉剤のウサギを用いた眼粘膜一次刺激性試験

[資料 No. 53]

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検体の純度: 2 %粉剤

組成; チオシクロム原体	2 %
界面活性剤、鋳物質微粉等	98 %

供試動物:

白色種ウサギ、12~16 週齢、
体重 2.84~3.43 kg、雄 7 匹、雌 2 匹 (非洗眼群 6 匹、洗眼群 3 匹)

観察期間: 7 日間観察

投与方法: 検体 0.1 g を右眼に点眼し、投与後検体のこぼれを防ぐため約 1 秒間閉眼させた。
なお、左眼は無処理対照とした。洗眼群は投与 2~3 分後微温水で洗眼した。

観察項目: 非洗眼群は、投与後 1、24、48、72 時間、7 日目に、洗眼群は、投与後 1、24、48、72 時間に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を Draize 法に従って観察し、採点した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

結果：観察した刺激性変化の評点は以下の表の通りである。

項目			最高 評点	適用後時間					
				1時間	24時間	48時間	72時間	7日 ^b	
非洗眼群	動物 番号 1	角膜 混濁	程 度	4					
			面 積	4					
		虹 彩			2				
		結膜	発 赤	3					
			浮 腫	4					
			分泌物	3					
	動物 番号 2	角膜 混濁	程 度	4					
			面 積	4					
		虹 彩			2				
		結膜	発 赤	3					
			浮 腫	4					
			分泌物	3					
	動物 番号 3	角膜 混濁	程 度	4					
			面 積	4					
		虹 彩			2				
		結膜	発 赤	3					
			浮 腫	4					
			分泌物	3					
	動物 番号 4	角膜 混濁	程 度	4					
			面 積	4					
		虹 彩			2				
		結膜	発 赤	3					
			浮 腫	4					
			分泌物	3					
動物 番号 5	角膜 混濁	程 度	4						
		面 積	4						
	虹 彩			2					
	結膜	発 赤	3						
		浮 腫	4						
		分泌物	3						
動物 番号 6	角膜 混濁	程 度	4						
		面 積	4						
	虹 彩			2					
	結膜	発 赤	3						
		浮 腫	4						
		分泌物	3						
平均	角膜 混濁	程 度	4						
		面 積	4						
	虹 彩			2					
	結膜	発 赤	3						
		浮 腫	4						
		分泌物	3						
総合評点 ^a			110						
洗眼群 (3匹平均)	角膜 混濁	程 度	4						
		面 積	4						
	虹 彩			2					
	結膜	発 赤	3						
		浮 腫	4						
		分泌物	3						
総合評点 ^a			110						

a: Draize 法による評価点、角膜混濁×面積×5+虹彩×5+(発赤+浮腫+分泌)×2

b: 72 時間で症状のみられた 5 個体を観察

c: 角膜の曇り (dulling of the cornea)

*: 陽性反応

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

非洗眼群では、角膜の変化として投与1時間後に2例で通常の光沢がくもり、1例で散在性あるいは瀰漫性の混濁が、投与24時間後には4例で散在性あるいは瀰漫性の混濁が、投与48、72時間後に2例で容易に認識できる半透明化が認められた。

虹彩の炎症が投与1時間後で2例に、投与24時間後で4例に、投与48時間後で2例に、投与72時間後で1例に認められた。

中程度の結膜刺激性が投与1及び24時間後で全例に、投与48及び72時間後では5例に認められた。経微な結膜刺激性が1例に投与48時間後まで認められた。処置眼の周囲に検体の残存が、投与72時間後までみられた。

洗眼群では、角膜または虹彩に影響は認められなかった。

中程度の結膜刺激性が、投与1時間後では全例の処置眼に、投与24時間後では1例に認められ、軽微な結膜刺激性が、投与24時間後では2例に、投与48時間後では1例に認められた。

全処置眼の周囲に検体の残存が、投与1時間後までみられた。

以上の結果から、本剤は、修正Kay and Calandra分類法に従って、ウサギの眼に対して、非洗眼群では中程度の刺激性物質として、洗眼群では洗眼効果が認められたことから軽度の刺激性物質として分類された。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

75 %水和剤のウサギを用いた眼刺激性試験

[資料No. 54]

試験機関：

[G L P 対応]

報告書作成年

検体の純度：75 %水和剤

組成；チオシクロム原体	75.0 %
結合剤、界面活性剤等	25.0 %

供試動物：ウサギ 雄、16週齢、
体重；2.50～3.03 kg、1群3匹

観察期間：3日間

投与方法：検体の実使用最高濃度である0.067 %希釈液(1500倍希釈液)0.1 mLを右眼の結膜囊に適用し、3匹は投与30秒後に注射用水で約30秒間、眼に障害を与えない程度の量と流速で洗眼した。3匹については洗眼しなかった。

投与量設定根拠；

観察項目：適用後1、24、48及び72時間に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Draizeの基準に従って採点した。

結果：観察した刺激性変化の採点は、次頁の表のとおりである。
非洗眼群及び洗眼群で、すべての観察時間において、角膜、虹彩及び結膜等の眼刺激性は各群全例で認められなかった。

以上の結果から、チオシクロム75 %水和剤の実使用最高濃度である0.067 %希釈液(1500倍希釈液)は、ウサギの眼粘膜に対して、刺激性がないものと思われる。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

チオシクロム 75 %水和剤の眼刺激性試験 個体別刺激性評点

項目			最高 評点	適用後時間					
				1時間	24時間	48時間	72時間		
非洗眼群	動物 番号 1	角膜 混濁	程 度	4					
			面 積	4					
		虹 彩			2				
		結膜	発 赤	3					
			浮 腫	4					
			分泌物	3					
	動物 番号 2	角膜 混濁	程 度	4					
			面 積	4					
		虹 彩			2				
		結膜	発 赤	3					
			浮 腫	4					
			分泌物	3					
	動物 番号 3	角膜 混濁	程 度	4					
			面 積	4					
		虹 彩			2				
結膜		発 赤	3						
		浮 腫	4						
		分泌物	3						
平均	角膜 混濁	程 度	4						
		面 積	4						
	虹 彩			2					
	結膜	発 赤	3						
		浮 腫	4						
		分泌物	3						
洗眼群 (3匹平均)	角膜 混濁	程 度	4						
		面 積	4						
	虹 彩			2					
	結膜	発 赤	3						
		浮 腫	4						
		分泌物	3						

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

8 %粒剤のウサギを用いた眼刺激性試験

[資料No. 55]

試験機関：

[G L P 対応]

報告書作成年

検体の純度：8 %粒剤

組成；チオシクラム	8.0 %
増量剤、結合剤等	92.0 %

供試動物：ウサギ 雄、11週齢、
体重：2.16～2.33 kg、1群3匹

観察期間：72時間

投与方法：検体0.1 gを右眼の結膜嚢内に適用し、3匹は投与30秒後に注射用水30 mLで約30秒間洗眼した。3匹については洗眼しなかった。

観察項目：適用後1、24、48及び72時間に角膜、虹彩及び結膜の刺激性変化を観察し、Draizeの基準に従って採点した。

結果：観察した刺激性変化の採点は、次頁の表のとおりである。

角膜及び虹彩の刺激性変化は、非洗眼群、洗眼群ともに認められなかった。

結膜の刺激性変化は非洗眼群では、適用1時間後に発赤、浮腫、分泌物が認められたが、これらの変化は適用72時間後には消失した。非洗眼群動物に観察された刺激性変化は軽度のものであった。

洗眼群動物においても、結膜にのみ刺激性変化が認められたが、それらの評点は非洗眼群動物よりも低く、洗眼効果が認められた。

以上の結果から、チオシクラム8 %粒剤は、ウサギの眼粘膜に対して軽度の刺激性があると判断される。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

チオシクロム 8 % 粒剤の眼刺激性試験 個別別刺激性評点

項目			最高 評点	適用後時間				
				1時間	24時間	48時間	72時間	
非 洗 眼 群	動物 番号 1	角膜 混濁	程度	4				
			面積	4				
		虹	彩	2				
		結膜	発赤	3				
			浮腫	4				
			分泌物	3				
	動物 番号 2	角膜 混濁	程度	4				
			面積	4				
		虹	彩	2				
		結膜	発赤	3				
			浮腫	4				
			分泌物	3				
	動物 番号 3	角膜 混濁	程度	4				
			面積	4				
		虹	彩	2				
		結膜	発赤	3				
			浮腫	4				
			分泌物	3				
合計*			330					
平均			110					
洗 眼 群 (3匹平均)	角膜 混濁	程度	4					
		面積	4					
	虹	彩	2					
	結膜	発赤	3					
		浮腫	4					
		分泌物	3					
	合計*			110				

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

(3) 皮膚感作性

50 %水和剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

[資料 No. 56]

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

検体の純度：50 %水和剤

組成；チオシクロラム原体 50.0 %

鉍物質微粉、界面活性剤 50.0 %

供試動物：

モルモット、約 8～12 週齢、

体重 311～430 g、1 群雌 20 匹 64 匹、最低 5 日間の馴化期間

観察期間：32 日間

投与方法：[Buehler 法] 及び [Dermatol 法]

用量設定根拠；

感 作；

試験開始日 (0 日目) に各動物の左腹側部を刈毛した。蒸留水中に 10 % (w/w) の検体 (0.5 mL) を吸湿性リント布 (15 mm×35 mm) にしみ込ませ、適用部位に置き、外科用粘着テープで固定させたのち、これらのパッチをアルミ箔で完全に覆った。縮性粘着性テープでパッチとアルミ箔を固定した。この閉塞被覆の状態を 6 時間維持した。この感作処理操作を試験開始 7 及び 14 日目にも行った。各感作処理の約 24 時間後 (それぞれ 1 日目、8 日目、及び 15 日目) に刺激反応を記録した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

惹 起；

試験開始 28 日目の直前に各動物の右腹側部を刈毛した。検体を蒸留水で 10 % (w/w) の濃度に懸濁させた処理溶液 0.5 mL を吸湿性リント布 (15 mm×35 mm) にしみ込ませ、刈毛した右腹側部に当て、外科用粘着テープで固定した。誘発処理で刺激を生じない最高濃度を用いた結果を確認するために、蒸留水で 5 % (w/w) の濃度に調製した検体を、右腹側部の 10 % 処理溶液を貼付した部位から離れた皮膚部位に同用に貼付処理した。これらのパッチをアルミ箔で閉塞し、粘着テープで固定させた。6 時間後、被覆物をハサミで注意深く切断し取り外した。処理部位の汚れを取り除き、処理部位に消えない黒色のペンでしるしを付けた。29 日目に、バリカンを用いて脇腹の被毛を刈毛した。

観 察 項 目：誘発のための閉塞貼付除去 24 及び 48 時間後に、パッチ貼付処理部位の紅斑及び浮腫の有無などを肉眼的に観察した。

結 果：

感 作；

散在する軽度の発赤及び軽度の浮腫が検体により引き起こされた。固い暗かっ色／黒色の痂皮もまた認められた。

惹 起；

結果は以下の表にまとめた。

群	供試動物数	感作反応動物数								感作性強度		感作陽性率* (%)		
		24 時間後				計	48 時間後				24hr	48hr	24hr	48hr
		皮膚反応評点					皮膚反応評点							
		0	1	2	3	0	1	2	3					
検体	蒸留水中 10% 検体	20												
	検体対照群	20												
	蒸留水中 5% 検体	20												
	検体対照群	20												
陽性対照	DNCB 感作群	10												
	DNCB 対照群	10												

* 感作陽性率 (%) = 皮膚反応が認められた動物数 / 供試動物数 × 100

蒸留水中に 10 % (w/w) 濃度の場合、24 及び 48 時間後の観察で、2 例の感作動物の誘発処理部位に、陽性皮膚反応 (グレード 1 あるいは 2 の発赤) が認められた。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

蒸留水中に5% (w/w) 濃度の場合、24 及び 48 時間後の観察で、1 例の感作動物の誘発処理部位に、陽性皮膚反応（グレード1）が認められた。

以上の結果から、検体チオシクロム 50 %水和剤は、20 例中 2 例まで（申請者註：1 例または 2 例）に陽性皮膚反応を引き起こした。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

75 %水和剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

[資料No. 57]

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

検体の純度：75 %水和剤

組成；チオシクロム原体	75.0 %
結合剤、界面活性剤等	25.0 %

供試動物：モルモット 雄、5週齢、
体重；300～368 g、検体処置群20匹、陰性対照群10匹

観察期間：31日間

試験操作：Buehler 法による。

投与量設定根拠；

感作1；モルモットの肩部位を剪毛・剃毛し、2 cm×2 cmの区画を設け感作部位とした。
検体処置群には100 % (w/v) 検体0.4 mLを2 cm×2 cmのパッチに広げて感作部位に適用し、6時間閉塞貼付した。
陰性対照群には注射用水0.4 mLを2 cm×2 cmのパッチに広げて感作部位に適用し、6時間閉塞貼付した。
処理6時間経過後、パッチを除去し、検体を適用した皮膚を微温湯で十分に湿らせた脱脂綿で清拭した。

感作2及び3；感作1の投与後8及び15日に、同じ肩部の同じ試験区画に感作1と同様の処置を行った。

惹起；感作1の投与後29日に行った。

検体処置群及び陰性対照群の左右腹側部を剪毛・剃毛し、2 cm×2 cmの区画を設け惹起部位とした。
検体処置群及び陰性対照群の惹起部位にそれぞれ100 % (w/v) 検体及び注射用水0.2 mLを、2 cm×2 cmのパッチに広げて左右腹側部に貼付し、6時間閉塞貼付した。
処理6時間経過後、パッチを除去し、検体を適用した皮膚を微温湯で十分に湿らせた脱脂綿で清拭した。再惹起は実施しなかった。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

観察項目：惹起パッチ除去後24及び48時間後に、Magnussonらの皮膚反応の評価表に従って皮膚反応の程度を採点し、検体処置群の皮膚反応を陰性対照群と比較して判定した。また、惹起後の観察時期ごとに各試験群の平均評点を算出するとともに感作率(%)を求め、Magnussonらの「皮膚感作性の分類」に従って感作の程度を分類した。

結果：観察結果を次頁の表に示した。

検体処置群及び陰性対照群は、惹起パッチ除去後24及び48時間の観察で、各惹起部位の感作率はいずれも0%であった。

以上の結果から、チオシクロム75%水和剤の皮膚感作性は陰性である判断される。

チオシクロム75%水和剤の皮膚感作性試験結果

群	感作		惹起	供試動物数	感作反応動物数										陽性率(%)
					24時間					48時間					
					皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計	
					0	1	2	3		0	1	2	3		
検体	第1回:100%検体	100%検体	100%検体	20											
	第2回:100%検体														
	第3回:100%検体				注射用水										
	第1回:注射用水	100%検体	100%検体	10											
	第2回:注射用水														
	第3回:注射用水				注射用水										
*陽性対照	第1回:1.0%CDNB	1.0%CDNB	1.0%CDNB	10											
	第2回:1.0%CDNB														
	第3回:1.0%CDNB	オリーブオイル	10												
	第1回:オリーブオイル	1.0%CDNB	1.0%CDNB	10											
	第2回:オリーブオイル														
	第3回:オリーブオイル				オリーブオイル	10									

*陽性対照群は定期的実施された結果を示す(実施年月日 11月15日～12月23日)。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

8 %粒剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

[資料No. 58]

[G L P 対応]

報告書作成年

検体の純度：8 %粒剤

組成；チオシクラム	8.0 %
増量剤、結合剤等	92.0 %

供試動物：モルモット 雄、5週齢、
体重；319～380 g、1群雄30匹(検体処理群：20匹、陰性対照群：10匹)

観察期間：31日間

試験操作：Buehler 法による。

投与量設定根拠；

感作1；すべての供試動物の肩部を剪毛し、2 cm×2 cmの区画を設け感作部位とした。検体処理群の20匹には50 %被験液0.2 mLを、陰性対照群の10匹には1,3-BG 0.2 mLを6時間閉塞貼付した。初回感作7及び14日後に、各群とも初回感作と同じ部位に同様の処置を行った。

感作2及び3；感作1の投与後7及び14日に、同じ肩部の同じ試験区画に感作1と同様の処置を行った。

惹起；最終感作14日後に、検体処置群及び陰性対照群の左右腹側部を剪毛・剃毛し、2 cm×2 cmの区画を設け惹起部位とした。左腹側部には50 %被験液0.2 mLを、右腹側部には1,3-BG 0.2 mLを6時間閉塞貼付した。

観察項目：惹起貼付除去24及び48時間後に、紅斑及び浮腫の程度を観察した。皮膚反応はMagnusson & Kligmanの基準に従って採点した。

本資料に掲載された情報に係る権利及び内容の責任は日本化薬株式会社にある。

評価；皮膚感作率は、採点された点数のうち評点1以上を示したものを感作陽性動物とし、
 [(評点1以上の皮膚反応を示した動物数/使用動物数)×100]として算出した。

得られた皮膚感作率を以下に示す基準で評価した。

感作率 (%)	グレード	感作の程度
0* ~ 8	I	ごく軽度 (Weak)
9 ~ 28	II	軽度 (Mild)
29 ~ 64	III	中等度 (Moderate)
65 ~ 80	IV	強度 (Strong)
81 ~ 100	V	極度 (Extreme)

* 原報に従えば、感作率0 %でも「ごく軽度」の分類となるが、本試験においては、感作率0 %を「陰性 (皮膚感作性なし)」と分類した。

結果：各観察時間における感作性変化が認められた動物数を以下に示した。

検体処理群及び陰性対照群のすべての動物において評点は0であり、検体の皮膚感作率は0 %と算出され、感作性評価区分はIに分類された。

定期的実施されている陽性対照物質CDNBを用いた試験では、感作率100 %であり、感作性評価区分Vの極度に分類されていることから、本試験での妥当性は確保されている。

以上の結果から、チオシクロム8 %粒剤の皮膚感作性は陰性であると判断される。

チオシクロム8 %粒剤の皮膚感作性試験結果

群	感 作		供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)
				24時間					48時間					
				皮膚反応評点				計	皮膚反応評点				計	
				0	1	2	3		0	1	2	3		
検体	第1回:50 %検体	50 %検体	20											
	第2回:50 %検体													
	第3回:50 %検体			1, 3-BG										
	第1回: 1, 3-BG	50 %検体		10										
	第2回: 1, 3-BG													
	第3回: 1, 3-BG				1, 3-BG									
* 陽性対照	第1回:1.0 %CDNB	1.0 %CDNB	10											
	第2回:1.0 %CDNB													
	第3回:1.0 %CDNB	オリーブオイル												
	第1回:オリーブオイル	1.0 %CDNB		10										
	第2回:オリーブオイル													
	第3回:オリーブオイル				オリーブオイル									

*陽性対照群は定期的実施された結果を示す(実施年月日 7月7日~8月6日)。