

8. 繁殖性に及ぼす影響および催奇形性

(1) フラメトピル原体のラットを用いた繁殖性試験

(資料 8-1)

試験機関：財団法人 残留農薬研究所

報告書作成年：1994年[GLP 対応]

検 体：フラメトピル原体

試験動物：Crj:CD (SD)ラット，1群雄 24 匹，雌 24 匹、投与開始時 5 週齢

体重：雄 139~154g，雌 112~128g

投与期間：F0 世代、F0 親動物への投与開始から F1 児離乳時までの 18 週間；F1 世代、F1 児離乳時から F2 児離乳時までの 18 週間

(1992年4月10日~1992年12月17日)

投与方法：検体を 0、100、1000 及び 3000 ppm を含有した飼料を自由に摂取させた。投与用量は用量設定試験の結果に基づいて設定した。

方法及び試験項目：試験の概要を次頁の表にまとめた。

一般状態及び死亡率；全投与期間を通じて全動物の一般状態及び生死を毎日観察した。

交配及び妊娠の確認；交配は、雌の性周期を膣スメアの観察によって確かめ、発情前期または発情期の状態にある雌を夕刻に同じ群の雄のケージに移し、1対1で同居させて行なった。翌朝膣栓の有無及び膣垢中の精子の有無を調べ、いずれかを認めた場合に交尾が行われたものとし、その日を妊娠 0 日とした。交配期間を 3 週間とし、その間交尾が確認されるまで、この手順を繰り返した。妊娠の確認は出産の有無及び剖検時に子宮内の着床痕の有無を調べることによつて行なった。

繁殖性に関する指標；交配、妊娠及び哺育期の観察に基づき、次の指標を算出した。

親動物：

正常性周期 = 交配前期または発情期を示した雌の百分率

雄交尾率 = (交尾を認めた雄数 / 交配に用いた雄数) × 100

雌交尾率 = (交尾を認めた雌数 / 交配に用いた雌数) × 100

授胎率 = (雌を妊娠させ得た雄数 / 交尾を認めた雄数) × 100

妊娠率 = (妊娠雌数 / 交尾を認めた雌数) × 100

出産率 = (正常出産雌数 / 妊娠雌数) × 100

妊娠期間 = 妊娠0日から分娩確認日 (哺育0日) までの日数

着床数 = 子宮内の着床痕の数

精子数 = 精巣上体尾当りの数及び精巣上体尾1g当りの数

精子形態 = 正常形態精子数の百分率

児動物 :

平均産児数 = 総産児数 / 正常出産雌数

性比 = 総雄産児数 / 総産児数

哺育0日の生存率 = (哺育0日の生存児数 / 産児数) × 100

哺育4日の生存率 = (哺育4日の生存児数 / 哺育0日の生存児数) × 100

哺育21日の生存率 = (哺育21日の生存児数 / 哺育4日に選抜した児数) × 100

病理組織学的検査 ; 対照群と高用量群の雌雄の親動物について、卵巣、子宮、膈、精巣、精巣上体、精囊、前立腺及び下垂体の病理組織学的に検査した。また、低用量群と中間用量群の交尾または妊娠不成立の雌雄の組の動物について同様の器官を検査した。さらに、標的臓器である肝臓を全ての試験群の全親動物について検査した。

試験の概要：

世代	期間 (週)	作業手順	試験項目
F0	育成 (10) 交配 (3) 妊娠 (3)	一般状態の観察(投与期間中毎日) 体重及び摂餌量測定 (育成期間中は雌雄とも週1回、繁殖期間中の雄は隔週) 性周期観察 (交配1週間前から) 交配、交尾の確認 体重測定(雌、妊娠0、7、14及び20日) 摂餌量測定(雌、妊娠0、7、14及び20日)	一般状態、死亡 体重、体重増加量、摂餌量 性周期 交尾率 授胎率、妊娠率
	出産 哺育 (3) 離乳	出産状況の観察 体重測定(母動物、哺育0、7、14及び21日；哺育児、哺育0、4、7、14及び21日) 摂餌量測定(母動物、哺育0、7、14及び21日) 同腹児数調整(哺育4日、原則として雌雄各4匹、同腹児数8匹以下はそのまま) 選抜されなかった哺育4日の哺育児の剖検 哺育21日	出産率、妊娠期間 出産児数、性比 哺育0日の哺育児生存率 哺育児の一般状態、体重 哺育4日の哺育児生存率 哺育児の剖検所見 哺育21日の哺育児生存率
F1	育成 (10) 交配 (3) 妊娠 (3)	継代用動物(F1)の選抜 (全群を通じて最も多く出産のみられた日を含むようにして4日間の期間中に産した腹から行い、各腹から各性につき1匹または2匹を、コンピュータが発生した乱数に従って無作為に選抜) 選抜されなかった F1 離乳児の剖検 F0 親動物の剖検、臓器重量測定、精子検査及び病理組織学的検査	離乳児の剖検所見 親動物の剖検所見、臓器重量、病理組織学的所見、着床数 精子数および精子の形態
	出産 哺育 (3) 離乳	(兄妹交配は避けた) F0世代に準ずる	F0世代に準ずる
F2		F2離乳児の剖検 F1親動物の剖検、臓器重量測定、精子検査及び病理組織学的検査	F1世代に準ずる F0世代に準ずる

結果：

世代		F0 親、F1 児				F1 親、F2 児				
投与量 (ppm)		対照	100	1000	3000	対照	100	1000	3000	
動物数	雄	24	24	24	24	24	24	24	24	
	雌	24	24	24	24	24	24	24	24	
親動物	一般状態	—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし	
	死亡動物数	0	0	1 (雄)	0	1 (雄)	0	0	0	
	体重	雄	—	影響なし	影響なし	抑制(投与期間を通して▼)	—	抑制(投与第2週と第3週↓)	抑制(投与開始時~第8週▽)	抑制(投与開始時、投与期間を通して▼)
		雌	—	影響なし	抑制(投与第1週、第3週と哺育21日を除く全期間↓)	抑制(投与期間を通して▼)	—	抑制(投与第1~4週、妊娠7、14、20日、哺育7、14、21日と剖検日↓)	抑制(投与開始時、投与期間を通して▽)	抑制(投与開始時、投与期間を通して▼)
	体重増加量	雄	—	影響なし	影響なし	抑制(投与期間を通して▼)	—	抑制(投与第1~第4週↓)	抑制(投与第1~第8週↓)	抑制(投与期間を通して▼)
		雌	—	影響なし	抑制(投与第2~第10週と剖検日↓)但し、哺育21日は▲	抑制(投与期間を通して↓)但し、哺育21日は▲	—	抑制(投与第1~第3週と妊娠20日↓)	抑制(投与第1週~妊娠20日と剖検日↓)但し、哺育21日は↑	抑制(投与期間を通して▽)但し、哺育21日は△
	摂餌量	雄	—	影響なし	影響なし	抑制(投与第1週と第3~第6週↓)	—	抑制(投与第2週、第6週と第7週↓)	抑制(投与第1~第3週、第5週と第6週↓)	抑制(投与期間を通して▽)
		雌	—	影響なし	抑制(妊娠14-20日と哺育14-21日を除く全期間↓)	抑制(投与期間を通して▼)	—	抑制(妊娠0-7、7-14日、哺育7-14、14-21日↓)	抑制(投与第5~第10週、妊娠0-7、7-14日及び哺育7-14、14-21日↓)	抑制(投与第1週を除く全期間▼)
	検体摂取量(育成期間の平均、mg/kg/日)	雄	—	6.82	69.3	207	—	8.34	85.9	271
		雌	—	7.96	77.5	225	—	9.64	96.1	286
	性周期(%)		100	100	100	100	100	100	100	
	雄交尾率(%)		100	100	100	100	95.8	95.8	100	100
	雌交尾率(%)		100	100	100	100	95.8	95.8	100	100
	授胎率(%)		100	100	100	91.7	100	95.7	95.8	100
妊娠率(%)		100	100	100	91.7	100	95.7	95.8	100	
出産率(%)		100	100	100	100	100	100	100	100	
妊娠期間(日)		22.2	22.3	22.1	22.0	22.1	22.3	22.1	22.1	
着床数		15.9	16.0	14.7↓	13.0▼	15.7	14.1	14.5	11.4▼	
精子数	精巢上体尾当り	182	187	185	201	207	211	192	160▽	
	精巢上体尾1g当り	614	611	609	664	617	711	642	605	
正常形態精子出現率(%)		94.4	93.4	93.3	93.0	96.5	96.6	96.4	96.5	

(注) Student または Aspin-Welch の t 検定：↑↓：p≤0.05、△▽：p≤0.01、▲▼：p≤0.001、

結果 (続き) :

世代		F0 親、F1 児				F1 親、F2 児					
投与量 (ppm)		対照	100	1000	3000	対照	100	1000	3000		
動物数	雄	24	24	24	24	24	24	24	24		
	雌	24	24	24	24	24	24	24	24		
親動物	剖検所見		—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	雄：影響なし 雌：肝臓の大型化(10例*)と暗調化(3例)	
	臓器重量	下垂体	雄	—	影響なし	絶対重量↓ 体重比↓	絶対重量▼ 脳重量比▼	—	絶対重量↓ 体重比▽ 脳重量比↓	絶対重量▼ 体重比▼ 脳重量比▽	絶対重量▼ 体重比▼ 脳重量比▼
			雌	—	影響なし	絶対重量▽ 脳重量比↓	絶対重量▼ 体重比↓ 脳重量比▼	—	影響なし	絶対重量↓	絶対重量▼ 体重比↓ 脳重量比▼
		肝臓	雄	—	影響なし	体重比△	絶対重量↑ 体重比▲	—	影響なし	影響なし	絶対重量▽ 体重比▲
			雌	—	影響なし	体重比△	体重比▲	—	影響なし	体重比▲	絶対重量△ 体重比▲ 脳重量比▲
	その他の臓器		—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし	
病理組織学的所見		—	影響なし	影響なし	肝臓の小葉中心性肝細胞肥大(雌雄全例*)と胆管増生(雌10例*)	—	影響なし	影響なし	肝臓の小葉中心性肝細胞肥大(雌雄全例*)と胆管増生(雌19例*)		
児動物	出産児数		13.3	14.7	13.5	11.9	14.4	13.3	13.9	10.6▼	
	性比		0.528	0.537	0.512	0.492	0.443	0.442	0.461	0.478	
	哺育0日の生存率(%)		93.6	97.0	93.4	96.7	96.6	98.4	98.3	94.7	
	哺育4日の生存率(%)		99.4	96.5	98.4	96.7	97.9	97.8	98.6	96.9	
	哺育21日の生存率(%)		100	99.0	100	100	99.5	100	100	97.7	
	一般状態		—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし	
	同腹生存児体重		—	抑制(雌雄とも哺育4日~21日↓)	抑制(雌雄とも哺育4日~21日▽)	抑制(雌雄とも哺育0日~21日▼)	—	影響なし	抑制(雄:哺育4日~21日、雌:哺育7日~21日↓)	抑制(雌雄とも哺育0日~21日▽)	
	剖検所見(哺育4日)		—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし	
	剖検所見(離乳時)		—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし	

(注) Student または Aspin-Welch の t 検定 : ↑ ↓ ; p ≤ 0.05、△▽ : p ≤ 0.01、▲▼ : p ≤ 0.001、

Fisher の直接確率計算法 : * ; p ≤ 0.001

親動物では、F0世代で1000ppm以上の投与群において、雌雄とも体重、体重増加量及び摂餌量に有意な低値がみられた。また、臓器重量は絶対重量、体重比または脳重量比に、肝臓には有意な高値が、下垂体には有意な低値がみられた。さらに、3000ppm投与群では病理組織学的検査で雌雄とも肝臓の小葉中心性肝細胞肥大の発現頻度が、また、雌では胆管増生の発現頻度も有意に高かった。なお、1000ppm投与群で雄動物が1例死亡したが、剖検で口腔内に飼料と血様物の貯留、肺に赤色斑散在と気腫が認められ、病理組織学的検査では鼻腔や肺に中等度から強度の出血および気管支や肺胞内に外来性異物がみられたことから、飼育ケージ内の事故によるものと考えられ、検体投与によるものではなかった。F1世代では低用量の100ppm投与群においても、雌雄の体重、体重増加量及び摂餌量に有意な低値が認められた。また、臓器重量も雄で下垂体の絶対重量、体重比及び脳重量比に低値がみられた。1000ppm以上の投与群で体重、体重増加量、摂餌量及び臓器重量にF0世代と同様の変化がみられた。さらに、3000ppm投与群では剖検で雌に肝臓の大型化の発現頻度に有意な高値と病理組織学的検査で雌雄にF0世代と同様の変化がみられた。なお、対照群の雄動物の死亡1例は剖検で頭蓋骨の骨折が認められ、1000ppm投与群のF0雄でみられた死亡と同様、飼育ケージ内の事故によるものであった。

繁殖能力に関しては、F0世代で1000及び3000ppm投与群の着床数が有意に低かった。F1世代では3000ppm投与群においてのみ着床数に有意な低値がみられた。この投与群で精巢上体尾当りの精子数に統計学的に有意な低値がみられたが、精巢上体尾1g当りの値には有意差がみられていないことから、これは体重及び精巢上体重量の低値に伴った二次的な変化と考えられた。その他の繁殖能力の指標にはいずれの投与群においても影響はみられなかった。

児動物では、100ppm投与群でF1哺育児の体重に有意な低値がみられたが、F2哺育児では検体投与の影響はみられなかった。1000ppm以上の投与群では、F1及びF2哺育児とも体重が有意に低かった。さらに、3000ppm投与群では着床数の有意な低値に伴ってF2産児数も有意に低かった。

以上の結果から、今回の試験では検体の100ppmの投与によってF1哺育児の雌雄の体重とF1親動物の雌雄の体重、体重増加量及び摂餌量に有意な低値がみられ、一般毒性学的な無毒性量を得ることができなかった。一方、繁殖能力への影響は100ppmでは認められなかったが、1000ppmでF0雌親動物にのみ着床数の有意な低値が、3000ppmでF0及びF1雌親動物とも着床数の有意な低値及びそれに伴うF2産児数の有意な低値がみられた。

(2) フラメトピル原体のラットを用いた繁殖性試験 (追加試験)

(資料 8-2)

試験機関：財団法人 残留農薬研究所

報告書作成年：1994年[GLP 対応]

検 体：フラメトピル原体

試験動物：Crj:CD (SD)ラット, 1群雄 24 匹, 雌 24 匹、投与開始時 5 週齢

体重：雄 139~159g, 雌 116~136g

投与期間：F0 世代、F0 親動物への投与開始から F1 児離乳時までの 18 週間；F1 世代、F1 児離乳時から F2 児離乳時までの 18 週間

(1993年2月12日~1993年10月19日)

投与方法：検体の 0、10、30 及び 100 ppm を含有した飼料を自由に摂取させた。投与用量は、先に実施された繁殖性試験(資料 8-2)の結果に基づいて設定した。先に実施された繁殖性試験では、0、100、1000 及び 3000ppm の濃度の検体を含む飼料を 1 群雌雄各 24 匹の Crj:CD (SD)ラットに摂取させ、繁殖能力に及ぼす影響を 2 世代にわたって検討した。その結果、最低用量の 100ppm 投与群においても、F1 哺育児の雌雄の体重と F1 親動物の雌雄の体重、体重増加量及び摂餌量に有意な低値がみられ、一般毒性学的な無影響量を得ることができなかった。

そこで今回の試験では、再現性の有無を確認するために、先の試験の低用量である 100ppm を高用量とし、中間用量と低用量にはそれぞれ 30 及び 10ppm を設定した。

方法及び試験項目：試験の概要を次頁の表にまとめた。

一般状態及び死亡率；全投与期間を通じて全動物の一般状態及び生死を毎日観察した。

交配及び妊娠の確認；交配は、雌の性周期を膣スメアの観察によって確かめ、発情前期または発情期の状態にある雌を夕刻に同じ群の雄のケージに移し、1対1で同居させて行なった。翌朝膣栓の有無及び膣垢中の精子の有無を調べ、いずれかを認めた場合に交尾が行われたものとし、その日を妊娠 0 日とした。交配期間を 3 週間とし、その間交尾が確認されるまで、この手順を繰り返した。妊娠の確認は出産の有無及び剖検時に子宮内の着床痕の有無を調べることにより行なった。

繁殖性に関する指標；交配、妊娠及び哺育期の観察に基づき、次の指標を算出した。

親動物：

正常性周期 = 交配前期または発情期を示した雌の百分率

雄交尾率 = (交尾を認めた雄数 / 交配に用いた雄数) × 100

雌交尾率 = (交尾を認めた雌数 / 交配に用いた雌数) × 100

授胎率 = (雌を妊娠させ得た雄数 / 交尾を認めた雄数) × 100

妊娠率 = (妊娠雌数 / 交尾を認めた雌数) × 100

出産率 = (正常出産雌数 / 妊娠雌数) × 100

妊娠期間 = 妊娠 0 日から分娩確認日 (哺育 0 日) までの日数

着床数 = 子宮内の着床痕の数

精子数＝精巢上体尾当りの数及び精巢上体尾1g当りの数

精子形態＝正常形態精子数の百分率

児動物：

平均産児数＝総産児数／正常出産雌数

性比＝総雄産児数／総産児数

哺育0日の生存率＝（哺育0日の生存児数／産児数）×100

哺育4日の生存率＝（哺育4日の生存児数／哺育0日の生存児数）×100

哺育21日の生存率＝（哺育21日の生存児数／哺育4日に選抜した児数）×100

試験の概要：

世代	期間 (週)	作業手順	試験項目
F0	育成 (10) 交配 (3) 妊娠 (3)	一般状態の観察(投与期間中毎日) 体重及び摂餌量測定 (育成期間中は雌雄とも週1回、繁殖期間中の雄は隔週) 性周期観察 (交配1週間前から) 交配、交尾の確認 体重測定(雌、妊娠0、7、14及び20日) 摂餌量測定(雌、妊娠0、7、14及び20日)	一般状態、死亡 体重、体重増加量、摂餌量 性周期 交尾率 授胎率、妊娠率
	出産 哺育 (3) 離乳	出産状況の観察 体重測定(母動物、哺育0、7、14及び21日；哺育児、哺育0、4、7、14及び21日) 摂餌量測定(母動物、哺育0、7、14及び21日) 同腹児数調整(哺育4日、原則として雌雄各4匹、同腹児数8匹以下はそのまま) 選抜されなかった哺育4日の哺育児の剖検 哺育21日	出産率、妊娠期間 出産児数、性比 哺育0日の哺育児生存率 哺育児の一般状態、体重 哺育4日の哺育児生存率 哺育児の剖検所見 哺育21日の哺育児生存率
F1	育成 (10) 交配 (3) 妊娠 (3)	継代用動物(F1)の選抜 (全群を通じて最も多く出産のみられた日を含むようにして4日間の期間中に出産した腹から行い、各腹から各性につき1匹または2匹を、コンピュータが発生した乱数に従って無作為に選抜) 選抜されなかった F1 離乳児の剖検 F0親動物の剖検、臓器重量測定及び精子検査	離乳児の剖検所見 親動物の剖検所見、臓器重量、着床数、精子数及び精子の形態
	出産 哺育 (3) 離乳	(兄妹交配は避けた) F0世代に準ずる	F0世代に準ずる
F2		F2離乳児の剖検 F1親動物の剖検、臓器重量測定及び精子検査	F1世代に準ずる F0世代に準ずる

結果：

世代		F0 親、F1 児				F1 親、F2 児				
投与量 (ppm)		対照	10	30	100	対照	10	30	100	
動物数	雄	24	24	24	24	24	24	24	24	
	雌	24	24	24	24	24	24	24	24	
親動物	一般状態	—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし	
	死亡動物数	0	0	0	0	0	0	1(雄、切迫屠殺)	1(雄、切迫屠殺)	
	体重	雄	—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし
		雌	—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし
	体重増加量	雄	—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし
		雌	—	影響なし	影響なし	抑制(妊娠14日↓)	—	影響なし	影響なし	影響なし
	摂餌量	雄	—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし
		雌	—	影響なし	影響なし	抑制(妊娠0-7、7-14、14-20日↓)	—	影響なし	影響なし	抑制(哺育0-7、7-14日↓)
	検体採取量(育成期間の平均、mg/kg/日)	雄	—	0.684	2.05	6.82	—	0.860	2.52	8.49
		雌	—	0.794	2.44	8.03	—	0.971	3.00	10.13
	性周期(%)		100	100	100	100	100	100	100	100
	雄交尾率(%)		100	100	100	100	100	95.8	95.8	100
	雌交尾率(%)		100	100	100	100	100	95.8	95.8	100
	授胎率(%)		100	100	100	100	95.8	87.0	87.0	91.3
	妊娠率(%)		100	100	100	100	95.8	87.0	87.0	91.7
	出産率(%)		100	100	100	100	100	100	100	100
妊娠期間(日)		22.2	22.3	22.1	22.3	22.1	22.3	22.1	22.2	
着床数		15.2	15.3	15.6	14.7	14.9	15.7	15.6	14.3	
精子数	精巢上体尾当り	197	199	189	200	171	197	191	186	
	精巢上体尾1g当り	624	655	627	629	598	669	673	608	
正常形態精子出現率(%)		94.0	93.9	95.2	94.6	94.8	96.3	96.7	96.0	
剖検所見		—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし	
臓器重量		—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし	

(注) Student または Aspin-Welch の t 検定：↓；p≤0.05

結果 (続き) :

世代		F0 親、F1 児				F1 親、F2 児			
投与量 (ppm)		対照	10	30	100	対照	10	30	100
児 動 物	出産児数	14.0	14.3	14.3	13.4	14.0	14.5	14.5	13.0
	性比	0.458	0.468	0.500	0.478	0.526	0.455 ↓	0.557	0.509
	哺育0日の生存率 (%)	96.9	92.8	96.3	97.1	97.4	97.7	96.9	97.5
	哺育4日の生存率 (%)	98.4	99.1	97.1	96.9	98.5	99.0	99.0	98.1
	哺育21日の生存率 (%)	100	100	100	100	100	100	98.8	99.4
	一般状態	—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし
	同腹生存児体重	—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし
	剖検所見 (哺育4日)	—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし
	剖検所見 (離乳時)	—	影響なし	影響なし	影響なし	—	影響なし	影響なし	影響なし

(注) Student または Aspin-Welch の t 検定: ↓ ; p ≤ 0.05

親動物では、100ppm 投与群の雌において、F0 世代で妊娠期間中の体重増加量と摂餌量に、また、F1 世代では哺育期間中の摂餌量に有意な低値がみられた。なお、F1 世代で 30 及び 100ppm 投与群において、それぞれ 1 匹の雄動物を瀕死のため試験期間途中で屠殺したが、原因はいずれも飼育ケージ内での事故によるものと考えられ、検体投与によるものではなかった。

繁殖能力に関しては、F0 及び F1 世代とも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。

児動物では、F1 及び F2 児とも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。先に実施された繁殖性試験(資料 8-1)で 100ppm 投与群の F1 哺育児の体重に有意な低値がみられたが、F2 哺育児の体重は対照群とほぼ同じであり、今回の追加試験でも F1 及び F2 哺育児の体重に対照群との間で有意な差はみられず、再現性がなかったことから、先に実施された試験の F1 哺育児の体重の低値は検体投与の影響とは考えられなかった。

以上の結果と先に実施した繁殖性試験の結果を合わせて考えると、2世代にわたって本剤を飼料中に混入して投与した場合、一般毒性学的無毒性量は親動物及び児動物に関して30及び100ppm、繁殖能力に関する無毒性量は100ppmとそれぞれ判断された。また、無毒性量に関して検体摂取量を算出すると、親動物に対する一般毒性学的な無毒性量の30ppmは、雄で2.05mg/kg/日、雌で2.44mg/kg/日、繁殖能力に関する無毒性量の100ppmは、雄で6.82mg/kg/日、雌で7.96mg/kg/日に相当する。

親動物と児動物の最大無作用量について [試験責任者の補足見解] :

先に実施した繁殖性試験(資料8-1、略;試験1)において、100ppm群のF0世代では雌雄とも検体投与の影響は認められなかったものの、F1世代では雄の育成期間中と、雌の育成および繁殖期間中に体重、体重増加量または摂餌量の有意な低値がみられた。そのほかにF1雄の下垂体の絶対重量、体重比重量および脳重量比重量にも有意な低値がみられた。

今回の追加試験(資料8-2、略;試験2)においても、100ppm群で摂餌量がF0雌の妊娠期間中とF1雌の哺育期間中に有意に低かったほか、F0雌の妊娠期間中の体重増加量にも有意な低値がみられた。以上のように、100ppm群の親動物の体重、体重増加量、摂餌量および下垂体重量の変化は、F0世代とF1世代に一貫して認められたものではなく、比較的軽度なものであったが、2回の試験の結果を総合すると、これらの変化のすべてを検体投与の影響ではないとすることはできなかった。従って、100ppmは親動物に影響を及ぼす用量と判断し、親動物に対する最大無作用量は30ppmとした。

児動物については、試験1では哺育児体重が3000ppmおよび1000ppm群でF1およびF2児ともに有意な低値がみられたのに対して、100ppm群ではF1児に統計学的な有意差(雌雄とも哺育4-12日)がみられたが、試験1のF2児と試験2のF1およびF2児には対照群との間で有意な差はみられなかった。試験1におけるF1哺育児の体重(表1)を当該試験機関の背景対照データ(表2)と比較すると、試験1の対照群の値は背景対照データの上限とほぼ同じか、あるいは上限値を上回っていた。

一方、検体投与群についてみると、100ppm群の値はすべて背景対照データの平均値に近い値であったが、1000ppm群の値は一部(雄で哺育7と14日、雌で哺育14日)、3000ppm群の値はすべて背景対照データの下限値を下回っていた。

これらのことから、1000ppm以上の投与群のF1哺育児体重の有意な低値は検体投与に起因すると考えられたが、100ppm群のF1哺育児の体重にみられた統計学的な有意差については、対照群の高値に関連した偶発的なもので、検体投与の影響とは考えられなかった。

以上の理由により、100ppmは児動物に対する無毒性量と判断した。

表1 繁殖性試験におけるF1哺育児の体重

投与用量 (ppm)	雄、哺育:					雌、哺育:				
	0日	4日	7日	14日	21日	0日	4日	7日	14日	21日
0	6.9 ^a	11.6 ^a	18.0	36.1 ^a	60.6	6.6 ^a	11.1 ^a	17.2	34.9	58.1 ^a
100	6.6	10.5 ^b	16.5 ^b	34.3 ^a	58.2 ^a	6.2	10.0 ^a	15.8 ^a	33.0 ^a	55.6 ^a
1000	6.7	10.2 ^c	15.8 ^c	31.8 ^c	53.2 ^c	6.3	9.8	15.2 ^c	30.6 ^c	51.3 ^c
3000	6.2 ^c	8.8 ^c	12.7 ^c	24.7 ^c	40.8 ^c	5.9 ^c	8.6 ^c	12.6 ^c	24.5 ^c	40.3 ^c

a : 対照群と比較して $p \leq 0.05$ で統計学的有意差あり

b : 対照群と比較して $p \leq 0.01$ で統計学的有意差あり

c : 対照群と比較して $p \leq 0.001$ で統計学的有意差あり

* : 背景対照データの上限值と同じか、それを上回る値

表2 F1哺育児の体重(g)の背景対照データ(1985-1992年に実施した7試験より)

哺育:	0日	4日	7日	14日	21日
雄 範囲	6.4-6.9	10.1-11.2	15.9-18.2	32.4-36.1	52.0-61.1
平均値	6.5	10.6	16.9	34.2	56.4
雌 範囲	6.0-6.5	9.6-10.7	15.1-17.4	31.0-34.8	49.9-58.1
平均値	6.1	10.1	16.2	32.9	53.8

(2) フラメトピル原体のラットにおける催奇形性試験

(資料8-3)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1992年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル原体

試験動物：SD系雌ラット(交配開始時10週齢、体重；212～319g)、1群22匹

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、0、20、60および200mg/kgの投与レベルで妊娠6日^{a)}から15日までの10日間、毎日1回経口投与した。

なお、対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

a) 膣垢中に精子を確認した日を妊娠0日として起算した。

試験項目：

母 獣；一般症状および死亡の有無を毎日観察した。体重は、妊娠0、6、9、12、15および20日に測定し、さらに投与開始日(妊娠6日)の体重を基準にして各測定日の体重増加量を算出した。また、摂餌量は妊娠6、9、12、15および20日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差を求めて算出した。

動物は妊娠20日に屠殺後、帝王切開した。腹部ならびに胸部の主要臓器を剖検し、黄体数を数えると共に、子宮を切開して着床数、死亡胚・児の位置および数ならびに生存胎児数を調べた。

生存胎児；体重を測定し、外形異常の有無および性別を観察した。その後、同腹児の約1/2例はアリザリンレッドS染色を施して骨格観察を行い、残りの胎児はブアン液で固定後、内臓観察を行った。

試験結果：結果の概要は次頁の表に示す通りである。

母 獣；死亡はなかった。200mg/kg群の1例で自発運動減少および流涙がみられた。

60mg/kg以上の群で体重増加抑制ならびに摂餌の抑制が認められた。剖検の結果には検体投与によると考えられる影響はみられなかった。帝王切開の結果、20および200mg/kg群の黄体数に有意な低値がみられたが、黄体形成にかかわる排卵は投与開始以前の事象であり、検体投与の影響とは考え難く、偶発的なものであると考えられた。その他の子宮内所見には検体投与によると考えられる影響はみられなかった。

生存胎児；体重が200mg/kg群の雄で低値であり、雌で低値傾向であった。化骨進行度は200mg/kg群の雌雄で遅延傾向が示唆された。内臓変異である胸腺頭部遺残の発現頻度が60mg/kg群で高値傾向であり、200mg/kg群では高値であったほか、過剰冠状動脈口が200mg/kg群で高値であった。外形および骨格には検体投与による影響はみられなかった。

以上の結果、フラメトピル原体は母獣に対して最高投与量である200mg/kgまでの投与では妊娠の維持に影響はなかったが、60mg/kg以上で体重増加抑制ならびに摂餌抑制を示したため、母獣に対する無毒性量は20mg/kgと考えられた。

胎児に対しては、最高投与量である200mg/kgまでの投与では胚・児致死作用ならびに催奇形作用を示さなかった。しかしながら、60mg/kg群より内臓変異の発現頻度の上昇傾向がみられ、さらに200mg/kg群においては胎児の発育遅延も認められ、胎児に対する無毒性量は20mg/kgであると考えられた。

投与量 (mg/kg/day)		対照	20	60	200	
1群当り動物数		22	22	22	22 ^{a)}	
母 獸	母 獸 数	22	22	22	21	
	一般症状				自発運動減少 流涙(1例)	
	体 重			増加抑制		
	摂 餌 量			軽度抑制	抑制	
	剖 検					
	子 宮 内 所 見	平均黄体数	18.4	▽ ^{b)} 17.0	18.0	▽ ^{b)} 17.0
		平均着床致 (率)	16.3(88.6)	15.4(90.6)	16.4(91.1)	15.6(91.3)
		死亡胚・児率	4.2	3.2	4.4	6.1
平均生存胎児数		15.6	14.9	15.6	14.6	
胎 児	体 重 (g)	雄	3.28	3.32	3.40	▽ ^{b)} 2.99
		雌	3.11	3.17	3.20	2.91
	性 比 ^{c)}	45	52	49	47	
	外形奇形 (%)	1 ^{d)} (0.3)	0	0	0	
	骨格奇形 (%)	0	0	0	0	
	骨格軽度異常 (%)	0	1 ^{e)} (0.6)	0	0	
	骨格変異 ^{f)} (%)	10(5.6)	10(5.9)	5(2.8)	14(9.2)	
	化骨進行度 ^{g)}	雄	7.4	7.4	7.6	6.8
		雌	7.1	7.3	7.3	6.7
	内臓奇形 (%)	0	0	0	2 ^{h)} (1.4)	
内臓軽度異常 ⁱ⁾ (%)	26(15.8)	17(10.7)	28(17.0)	16(10.9)		
内臓変異 ^{j)} (%)		10(6.1)	10(6.3)	20(12.1)	41(27.9)	
	胸腺頸部遺残	5	5	13	▲ ^{k)} 28	
	過剰冠状動脈口	2	5	5	△ ^{k)} 12	

- a) : 非妊娠1例を含む。 b) : 有意差の検定は t 検定を行った (▽ ; p<0.05)。
 c) : (雄胎児数/生存胎児数)×100 d) : 眼瞼開存、下顎欠損および無口の合併症
 e) : 腰椎弓化骨不全と坐骨欠損の合併症
 f) : 仙椎前椎骨数25、頸肋、胸椎体分離、14肋骨、13肋骨短小がみられた。
 g) : 仙尾椎体化骨数
 h) : 側脳室拡大(1)、心室中隔欠損(1)
 i) : 腎乳頭欠損、尿管拡張、尿管蛇行、肺動脈分岐異常がみられた。
 j) : 胸腺頸部遺残、過剰冠状動脈口、左臍帯動脈がみられ、有意差のあるものについて
 型別例数を示した。
 k) : 有意差の検定は各々の発現頻度に対してMann-WhitneyのU検定を行った。
 (△ ; p<0.05、▲ ; p<0.01)

太枠内は検体投与の影響であることを示す。
 空欄は特記すべき変化がないことを示す

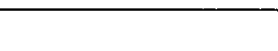
(2) フラメトピル原体のウサギにおける催奇形性試験

(資料8-4)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1992年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル原体

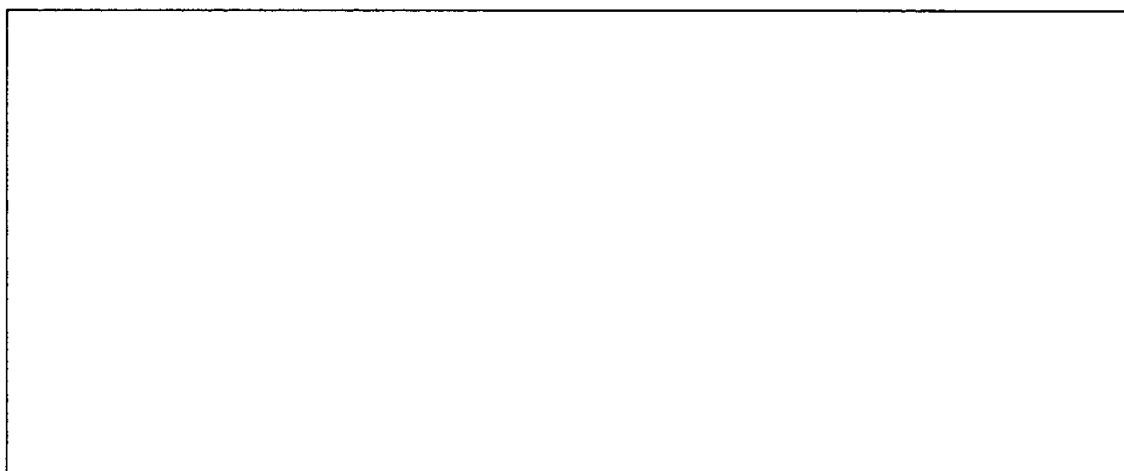


試験動物：JW-NIBS系雌ウサギ(人工授精開始時6ヵ月齢、体重；2.82~3.44kg)、1群15匹

投与方法：検体を0.5%メチルセルロース水溶液で懸濁し、0、10、30および100mg/kgの投与レベルで妊娠7日^{a)}から19日までの13日間、毎日1回経口投与した。

なお、対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

a) 人工授精を実施した当日を妊娠0日として起算した。



試験項目：

母 獣；一般症状および死亡の有無を毎日観察した。体重は、妊娠0、7、10、13、16、19、22、25および28日に測定し、さらに投与開始日(妊娠7日)の体重を基準にして、以降の各測定日の体重増加量を算出した。また、摂餌量は妊娠0日を除く、各体重測定日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差を求めて算出した。

動物は妊娠28日に屠殺後、帝王切開し、腹部ならびに胸部の主要臓器を剖検した。卵巣および子宮については、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・児の位置および数ならびに死亡時期を調べた。

生存胎児；体重を測定し、外形異常の有無を観察した後、外形異常を除く、全例の内臓観察および性別判別を行った。その後、アリザリンレッドS染色を施して骨格観察を行った。

試験結果：結果の概要は次頁の表に示す通りである。

母 獣；死亡および流早産はなく、症状においても異常はみられなかった。100mg/kg群で投与初期から体重増加が抑制され、摂餌量は投与期間中は低値であった。

剖検および子宮内所見において、検体投与による影響はみられなかった。

生存胎児；体重、性比、外形観察および化骨進行において検体投与の影響はみられなかった。骨格観察では、軽度異常である頭頂骨化骨不全の発現頻度が30mg/kg群で高値を示したが、用量依存性のない発現（コラン・ア・ミツジ 傾向検定の結果による）であることから、偶発的なものと考えられた。内臓観察では、奇形である後大静脈の左奇静脈内還流の発現頻度が100mg/kg群で高く、統計学的に有意であった。この異常は後大静脈の右奇静脈内還流と発生機序が同じ異常型としてとらえることができ、これらの発現例数を合計すると、各投与群とも対照群と統計学的な差はなくなり、後大静脈の左右奇静脈内還流の発現が検体投与に起因するものとは考え難かった。また、左前大静脈欠損の発現頻度が10mg/kg群で高値を示したが、用量相関性のないことから（コラン・ア・ミツジ 傾向検定の結果による）偶発的な発現と考えられた。その他、骨格観察および内臓観察において、検体投与によると考えられる影響は認められなかった。

以上の結果、フラメトピル原体の100mg/kgは母獣の体重増加および摂餌を抑制する量であったことから、母獣への無毒性量は30mg/kgと考えられた。また、胚・胎児に対しては、最高用量である100mg/kgにおいても胚・児致死作用および催奇形性作用は認められず、胎児の胎内発育にも影響はなかったことから、無毒性量は100mg/kgと考えられた。

投与量(mg/kg/day)		対照	10	30	100	
1群当り動物数		15	15	15	15 ^{a)}	
母	母 獣 数	15	15	15	14	
	一般症状					
	体 重				増加抑制	
	摂 餌 量				低 値	
	剖 検					
獣	子宮内所見	平均黄体数	10.7	9.9	9.1	9.4
		平均着床致 (率)	7.8(73.1)	7.8(78.5)	7.3(79.6)	7.4(79.4)
		死亡胚・児率	12.8	17.9	10.1	17.3
		平均生存胎児数	6.8	6.4	6.5	6.1
胎	体 重 (g)	雄	37.8	39.5	35.9	35.9
		雌	36.6	38.0	36.7	36.7
	性 比 ^{c)}	58	53	45	47	
	外形奇形 (%)	1 ^{c)} (1.0)	0	0	1 ^{d)} (1.2)	
	骨格奇形 (%)	0	0	0	0	
	骨格軽度異常 ^{e)} (%)	25(24.8)	33(34.4)	33(33.7)	16(18.8)	
	頭頂骨化骨不全	2	8	△ ^{f)} 8	2	
	骨格変異 ^{g)} (%)	40(39.6)	29(30.2)	38(38.8)	28(32.9)	
	化骨進行度 ^{h)}					
	児	内臓奇形 ⁱ⁾ (%)	6(5.9)	4(4.2)	5(5.1)	6(7.1)
左前大静脈欠損			0	△ ^{f)} 4	2	1
後大静脈の左右奇静脈内還流(①+②)		2	0	3	4	
①左奇静脈内還流		0	0	2	△ ^{f)} 4	
②奇静脈内還流		2	0	1	0	
内臓軽度異常 ⁱ⁾ (%)		6(5.9)	6(6.3)	10(10.2)	2(2.4)	
内臓変異 ^{j)} (%)		44(43.6)	42(43.8)	34(34.7)	35(41.2)	

- a) : 非妊娠1例を含む。 b) : (雄胎児数/生存胎児数)×100 c) : 欠指 d) : 眼瞼開存
 e) : 鼻骨分離、頭頂骨分離または化骨不全、舌骨体欠損、頸椎体・弓癒合、頸椎過剰突起、胸骨核癒合または非対称、中節骨(指)および基節骨(指)欠損がみられ、有意差のあった異常型のみ型別例数を示した。
 f) : 有意差の検定は各々の発現頻度に対してMann-WhitneyのU検定を行った(△; p<0.05)。
 g) : 舌骨体分離、舌骨弓湾曲、仙椎前椎骨数27、頸肋、頸椎体変形、仙尾椎体変形または偏位、13肋骨、胸骨核分離がみられた。
 h) : 仙尾椎化骨数、中節骨(指)化骨数、基節骨(指)化骨数、第5・第6胸骨核未化骨率、第1指列中手骨未化骨率、第5趾列中節骨未化骨率および距骨未化骨率
 i) : 心臓の心室中隔欠損、右心室低形成または動脈幹遺残、肝臓の外側右葉嚢胞散在、肺動脈低形成および閉鎖、左肺動脈起始異常、左前大静脈欠損、後大静脈の左奇静脈内還流または奇静脈内還流がみられ、有意差のあった異常型のみ型別例数を示した。
 j) : 小腸憩室または小隆起、虫垂分岐、胆嚢低形成または位置異常、脾臓低形成、左奇静脈遺残がみられた。
 k) : 過剰冠状動脈口、肺分葉異常、右鎖骨下動脈走行異常、後大静脈走行異常がみられた。

空欄は特記すべき変化のないことを示す。
 太枠内は薬剤の影響であることを示す。

9. 変異原性

(1) フラメトピル原体の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料9-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

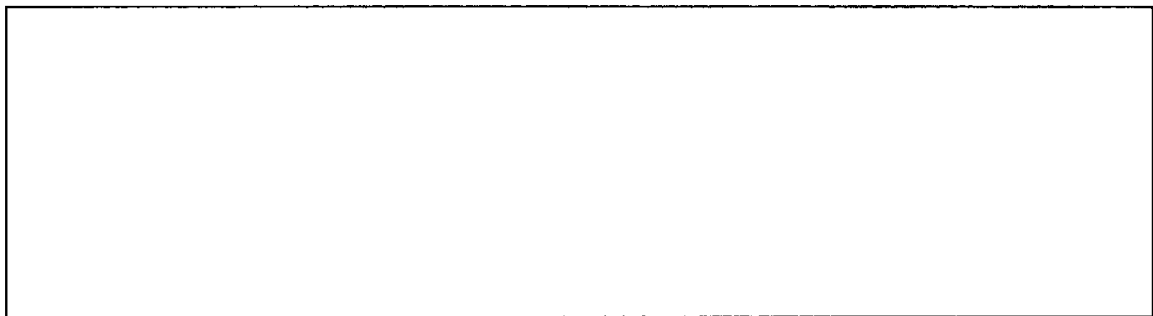
報告書作成年：1992年〔GLP対応〕

検 体：フラメトピル原体



試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*, TA100、TA98、TA1535、TA1537、TA1538株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2uvrA株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9Mix) の存在下および非存在下でAmesらの方法で変異原性を検討した。

溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。



試験結果：試験結果を次頁にまとめた。

S9Mix存在下および非存在下ともに検体処理群の復帰変異コロニー数が溶媒対照値の2倍を越えて濃度依存的に増加することはなかった。

一方、S9Mix非存在下および存在下の各菌株に対する陽性対照である2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン、2-ニトロフルオレン、*N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン、ベンゾ(a)ピレンおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の明瞭な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下では、フラメトピル原体には変異原性はないと結論した。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S9Mix	復帰変異コロニー数/プレート ^{a)}						
			塩基対置換型			フレームシフト型			
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA1538	
溶媒対照 ^{b)}		-	88	12	26	24	10	13	
			88	9	17	26	8	14	
フラトピ [®] ル 原体	156	-	87	10	16	28	5	12	
			86	12	18	22	9	13	
	313	-	89	12	21	30	6	11	
			87	16	17	29	8	14	
	625	-	84	13	17	24	9	12	
			94	7	21	29	5	15	
	1250	-	98	10	18	25	7	14	
			85	10	17	31	9	13	
	2500	-	100	8	20	35	7	11	
			85	9	18	21	7	17	
	5000	-	101*	9*	20	32	7*	15*	
			81*	13*	14*	26*	T	T	
	陽性対照		-	307 ^{c)}	386 ^{d)}	447 ^{e)}	333 ^{f)}	389 ^{g)}	406 ^{h)}
				341	290	577	243	782	550
溶媒対照 ^{b)}		+	87	8	40	46	13	33	
			96	13	26	47	19	23	
フラトピ [®] ル 原体	156	+	95	13	38	41	21	25	
			85	11	30	36	20	26	
	313	+	100	12	41	50	27	22	
			95	12	33	41	19	30	
	625	+	93	13	36	44	19	26	
			92	9	38	41	17	25	
	1250	+	106	10	33	49	23	26	
			99	14	36	46	17	22	
	2500	+	111	10	31	36	22	24	
			108	11	33	37	14	31	
	5000	+	115	17	35	57	20*	25	
			114*	10*	35	40	14*	29*	
	陽性対照		+	733 ⁱ⁾	153 ^{j)}	446 ^{k)}	404 ⁱ⁾	99 ⁱ⁾	110 ⁱ⁾
				537	141	434	316	117	114

a) : 数値は3枚のプレートの平均値、上段は試験 I、下段は試験 II の結果を示す。

b) : ジメチルスルホキシド

c) : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド 0.01 $\mu\text{g}/$ プレート

d) : アジ化ナトリウム 0.5 $\mu\text{g}/$ プレート

e) : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン 2 $\mu\text{g}/$ プレート

f) : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド 0.1 $\mu\text{g}/$ プレート

g) : 9-アミノアクリジン 80 $\mu\text{g}/$ プレート

h) : 2-ニトロフルオレン 2 $\mu\text{g}/$ プレート

i) : ベンゾ(a)ピレン 5 $\mu\text{g}/$ プレート

j) : 2-アミノアントラセン 2 $\mu\text{g}/$ プレート

k) : 2-アミノアントラセン 10 $\mu\text{g}/$ プレート

* : 生育阻害作用が認められた

— : 検体の析出が認められた

T : 生育阻害作用のため復帰変異コロニー数の計測不可

(2) フラメトピル原体のチャイニーズハムスター肺由来の培養細胞(CHL/IU)を用いた

in vitro 染色体異常試験

(資料9-2)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1992年[GLP対応]

検体：フラメトピル原体

試験方法：チャイニーズハムスター肺由来の培養細胞(CHL/IU)を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S9Mix)の存在下(代謝活性化法)および非存在下(直接法)で検体を処理した後、染色体標本を作製し、顕微鏡下で観察した。

検体の処理時間はS9Mix存在下では6時間、非存在下では24および48時間とした。

試験結果：試験結果を次頁にまとめた。

S9Mixの存在下および非存在下共に増殖が顕著に抑制され、分裂指数は低下した。染色体異常については、S9Mix存在下および非存在下(48時間処理群)で構造異常細胞が誘発され、S9Mix存在下では倍数体細胞も誘発された。

検体濃度を3用量に設定してS9Mix存在下および非存在下(48時間処理)で再度試験を実施したところ、再現性が確認された。また、代謝活性化法と同じくS9Mix非存在下で検体で6時間処理した試験も実施したところ、検体による染色体異常誘発はS9Mixにより抑制される傾向が認められた。

尚、陽性対照であるマイトマイシンC(S9Mix非存在下)およびシクロホスファミド(S9Mix存在下)処理群においては、いずれも染色体異常の出現頻度の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下では、フラメトピル原体はCHL/IU細胞に対して染色体異常誘発性があると結論した。

S9 Mix	時間 ^{a)} (h)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	増殖率 (%)	分裂 指数 (%)	構造異常 ^{b)}							異常細胞 ^{c)} (%)		判 定 ^{b)}	数的 異常 倍数 体 (%)	判 定 ^{b)}		
					N	gap	ctb	cle	csb	cse	oth	+g	-g					
+	6-18	無処理	100.1	7.3	200	1	4	0	0	0	0	2.0	2.0	-	0.5	-		
		溶媒対照 ^{d)}	100	8.5	200	1	0	1	0	0	0	1.0	0.5	-	0.0	-		
		50	98.4	- ^{e1)}	- ^{e1)}													
		75	95.1	- ^{e1)}	- ^{e1)}													
		100	90.8	- ^{e1)}	- ^{e1)}													
		150	89.1	- ^{e1)}	- ^{e1)}													
		200	79.5	7.4	- ^{e2)}													
		300 ^{e)}	79.7	5.7	- ^{e2)}													
		400 ^{e)}	73.7	5.8	200	0	3	0	0	0	0	1.5	1.5	-	5.0	±		
		600 ^{e)}	59.8	2.6	200	1	7	15	0	0	0	9.0	8.5	±	3.5	-		
		800 ^{e)}	60.3	2.8	200	1	24	31	0	0	0	16.5	16.5	+	6.0	±		
		陽性対照 ^{f)}	-	3.2	100 ^{g)}	1	33	94	0	0	1	62.0	62.0	+	0.0	-		
+	6-18	無処理	100.2	4.0	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	-	0.5	-		
		溶媒対照 ^{d)}	100	4.4	200	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	-	0.5	-		
		400 ^{e)}	77.6	4.1	200	1	1	3	0	1	0	3.0	2.5	-	3.5	-		
		600 ^{e)}	65.4	2.9	200	1	6	11	0	2	0	7.0	6.5	±	6.0	±		
		800 ^{e)}	46.7	1.6	200	0	18	37	0	0	1	16.0	16.0	+	7.0	±		
		陽性対照 ^{f)}	-	2.7	100 ^{g)}	3	22	65	0	0	0	49.0	47.0	+	0.0	-		
-	6-18	無処理	102.6	2.5	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	-	0.5	-		
		溶媒対照 ^{d)}	100	4.0	200	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	-	0.5	-		
		400 ^{e)}	73.5	3.0	200	0	0	4	0	1	0	2.5	2.5	-	3.0	-		
		600 ^{e)}	53.0	1.7	200	1	24	51	0	0	2	19.5	19.0	+	8.0	±		
		800 ^{e)}	37.9	1.0	150 ^{h)}	0	24	45	0	1	1	24.7	24.7	+	5.0	±		
		陽性対照 ^{f)}	-	2.6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	0.5	-		
-	24-0	無処理	100.4	3.6	200	1	1	2	0	0	0	2.0	1.5	-	0.5	-		
		溶媒対照 ^{d)}	100	4.5	200	0	6	2	0	0	0	3.5	3.5	-	0.0	-		
		37.5	58.0	2.2	200	1	3	5	0	0	0	4.5	4.0	-	0.5	-		
		50	51.0	1.3	200	0	4	4	0	0	0	4.0	4.0	-	1.0	-		
		75	48.5	0.4	100 ^{g)}	2	0	1	0	0	0	3.0	1.0	-	1.0	-		
		100	47.6	0.6	- ^{e2)}													
		150	45.4	0.3	- ^{e2)}													
		200	43.2	0.3	- ^{e2)}													
		300 ^{e)}	38.3	1.2	- ^{e2)}													
		400 ^{e)}	37.9	0.2	- ^{e2)}													
		600 ^{e)}	8.8	- ^{e1)}	- ^{e1)}													
		800 ^{e)}	3.7	- ^{e1)}	- ^{e1)}													
陽性対照 ^{f)}	-	2.5	100 ^{g)}	1	40	39	0	0	0	48.0	48.0	+	0.0	-				

S9 Mix	時間 ^{a)} (h)	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	増殖率 (%)	分裂 指数 (%)	構造異常 ^{b)}							異常細胞 ^{c)} (%)		判 定 ^{b)}	数的 異常 倍数 体 (%)	判 定 ^{b)}	
					N	gap	ctb	cte	csb	cse	oth	+g	-g				
-	48-0	無処理	102.1	3.2	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	0.5	-	
		溶媒対照 ^{d)}	100	2.8	200	0	3	1	0	0	0	2.0	2.0	-	0.0	-	
		25	43.7	2.4	200	1	2	5	0	0	0	3.5	3.0	-	0.5	-	
		37.5	34.1	1.9	200	0	4	11	0	0	0	6.5	6.5	±	0.0	-	
		50	28.7	2.4	200	2	12	13	0	2	0	12.5	11.5	+	0.5	-	
		75	21.8	1.3	150 ^{e)}	0	15	16	0	1	0	16.7	16.7	+	0.0	-	
		100	17.0	1.2	100 ^{f)}	1	11	8	0	0	0	15.0	14.0	+	0.0	-	
		150	14.2	0.8	- ^{g)}												
		200	13.7	0.6	- ^{g)}												
		300 ^{e)}	11.3	0.2	- ^{g)}												
		400 ^{e)}	7.2	- ^{h)}	- ^{h)}												
		陽性対照 ^{d)}	-	3.3	100 ^{h)}	1	55	104	0	0	3	68.0	67.0	+	0.0	-	
-	48-0	無処理	102.4	4.7	200	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	0.5	-		
		溶媒対照 ^{d)}	100	3.3	200	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	0.5	-		
		18.8	49.1	2.0	200	1	3	0	0	0	0	1.5	1.0	-	0.5	-	
		37.5	26.7	1.5	200	2	4	4	0	0	0	5.0	4.0	-	0.0	-	
		75	16.6	1.4	200	1	15	10	0	0	0	12.5	12.0	+	0.0	-	
				陽性対照 ^{d)}	-	2.9	100 ^{h)}	0	7	35	0	1	1	32.0	32.0	+	0.0

a) 処理時間一回復時間

b) N: 観察細胞数 gap: 染色分体キ・ャップ^{o)} および染色体キ・ャップ^{o)} ctb: 染色分体切断
cte: 染色分体交換 csb: 染色体切断 cse: 染色体交換 (二動原体、環状染色体等)
oth: 断片化および10個以上の異常を持つ細胞

c) +g: キ・ャップを含む異常 -g: キ・ャップを除く異常

d) ジメチルスルホキシド (0.5% w/v)

e) 培地が白濁し培地中に検体の析出が認められた

f) シクロホスファミド (10 $\mu\text{g/mL}$)

g) マイトマイシンC (0.03 $\mu\text{g/mL}$)

h) 判定: -; 陰性 (5%未満)、±; 疑陽性 (5%以上10%未満)、+; 陽性 (10%以上)

#1: 標本を作製しなかった

#2: 標本を観察しなかった

#3: 明らかに陽性と判断されたため、標本あたり 50 細胞で観察を打ち切った

#4: 一方の標本では明らかに陽性と判断されたため、50 細胞で観察を打ち切った

#5: 検体の毒性のため分裂中期像が少なく、標本あたり 50 細胞しか観察することができなかった

#6: 一方の標本では、検体の毒性のため分裂中期像が少なく、標本あたり 50 細胞しか観察することができなかった

#7: 一方の標本では、検体の毒性のため分裂中期像が少なく、観察することができなかった

#8: 検体の毒性のため分裂中期像が少なく、観察することができなかった

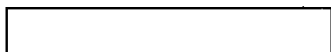
(3) フラメトピル原体のマウスを用いた小核試験

(資料9-3)

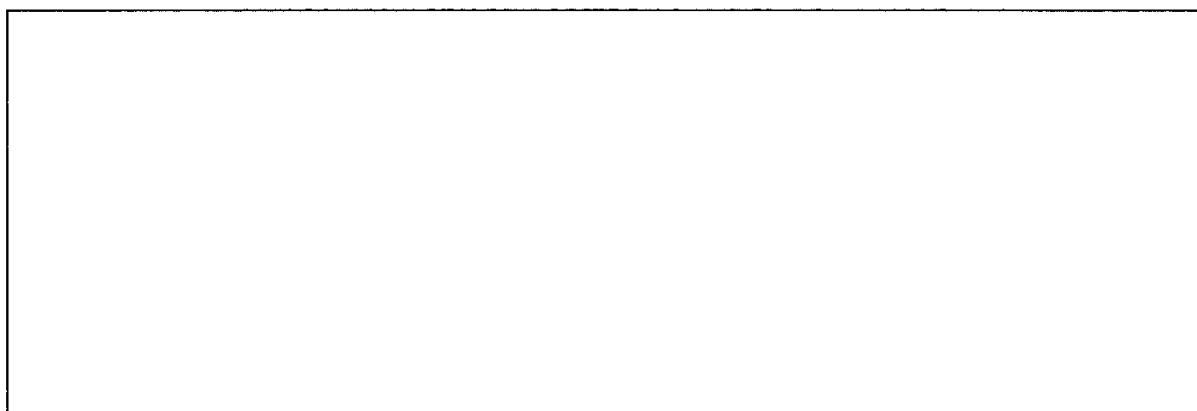
試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1992年[GLP対応]

検体：フラメトピル原体



試験方法：8週齢のICR系雌雄マウス（体重：雄34.7～43.4g、雌：27.3～36.2g）を1群5匹用い、コーンオイルに懸濁させた検体を0、150、300および600mg/kgの用量で単回経口投与して、24、48および72時間後に屠殺した。屠殺後大腿骨を摘出し、常法に従い骨髓細胞の塗抹標本を作製し、顕微鏡下で観察した。



試験結果：試験結果を次頁に示す。

雄では、600mg/kg投与の48時間処理群と72時間処理群で溶媒対照群と比較して小核を有する多染性赤血球の出現頻度に統計学的に有意な高値が認められ、その値は本試験系における小核出現頻度のバックグラウンドデータ（平均：0.14%、標準偏差：0.04%、最小-最大：0.10-0.24%、群数：14）の範囲をわずかに越えていた。しかし、その小核には、紡錘糸形成阻害剤の作用によってみられるものと同様の、赤血球の1/4以上の直径を有する大きな小核が高頻度で認められた。その他の処理群および雌では有意な小核の増加はみられなかった。

一方、陽性対照であるシクロホスファミド投与群では顕著な小核の増加が認められた。

尚、小核頻度の上昇が見られた600mg/kgの雄マウスでは死亡例（4/20）が認められた。

以上の結果から、フラメトピル原体は雄マウスにおいて最高用量の 600mg/kg 投与でわずかに小核出現頻度を増加させるが、大きな小核が高頻度で出現したことから、通常の染色体切断物質の作用とは異なる作用を有することが示唆された。雌マウスでは小核を誘発しないと結論した。なお、小核誘発性については、*in vivo* 染色体異常試験との比較（資料 11-3）、CREST 抗体によるセントロメア含有小核の検出（資料 11-4）検討からも、*in vivo* では染色体切断作用はないことが示され、「大きな小核」は紡錘糸形成阻害などの細胞分裂過程への作用によって誘発されたことが示唆された。

性別	薬物	投与量 (mg/kg)	処理 時間 (hr)	PCE ^{a)}	MNPCE ^{b)}
				(PCE+NCE) (%±SD)	PCE (%±SD) [最小-最大値]
雄	コーンオイル ^{c)}	—	24	57.7± 10.14	0.16±0.089 [1-3/1000]
	フラメトピル 原 体	150	24	50.3± 5.36	0.10±0.071 [0-2/1000]
		300	24	53.5± 7.19	0.08±0.084 [0-2/1000]
		600	24	61.4± 5.36	0.12±0.083 [0-2/1000]
	陽性対照 (CP) ^{d)}	80	24	37.8± 5.63**	6.60±2.546** [31-96/1000]
	コーンオイル ^{c)}	—	48	49.5± 1.88	0.14±0.134 [0-3/1000]
	フラメトピル 原 体	150	48	46.5± 5.89	0.10±0.071 [0-2/1000]
		300	48	48.2± 5.50	0.16±0.251 [0-6/1000]
		600	48	34.6± 6.41**	0.50±0.245** [2-8/1000]
	コーンオイル ^{c)}	—	72	45.0± 5.25	0.10±0.071 [0-2/1000]
	フラメトピル 原 体	150	72	51.0± 4.80	0.12±0.045 [1-2/1000]
		300	72	51.4± 9.91	0.10±0.100 [0-2/1000]
		600	72	45.2± 9.04	0.32±0.249* [1-7/1000]

- a) PCE: 多染性赤血球 NCE: 正染性赤血球
1 個体につき 1000 個の赤血球を観察した
- b) MNPCE: 小核を有する多染性赤血球
1 個体につき 1000 個の多染性赤血球を観察した
- c) 10mL/kg の割合で投与した
- d) CP: シクロホスファミド

* : p<0.05、 ** : p<0.01

溶媒対照群 (コーンオイル、各々24、48、72 時間処理) と比較して統計処理を実施した。小核を有する多染性赤血球の出現頻度については Kastenbaum と Bowman らの方法に従い、多染性赤血球の割合については t 検定を行った。

性別	薬物	投与量 (mg/kg)	処理 時間 (hr)	PCE ^{a)}	MNPCE ^{b)}
				(PCE+NCE) (%±SD)	PCE (%±SD) [最小-最大値]
雌	コーンオイル ^{c)}	—	24	62.4± 6.43	0.10±0.100 [0-2/1000]
	フラメトピル 原 体	150	24	64.9± 2.59	0.08±0.110 [0-2/1000]
		300	24	64.4± 3.93	0.14±0.089 [1-3/1000]
		600	24	56.5± 8.36	0.12±0.084 [0-2/1000]
	陽性対照 (CP) ^{d)}	80	24	49.8± 11.60	4.78±1.307** [34-67/1000]
	コーンオイル ^{c)}	—	48	56.1± 4.59	0.18±0.192 [0-5/1000]
	フラメトピル 原 体	150	48	60.6± 5.09	0.06±0.055 [0-1/1000]
		300	48	54.3± 5.35	0.06±0.055 [0-1/1000]
		600	48	48.8± 3.33*	0.14±0.114 [0-3/1000]
	コーンオイル ^{c)}	—	72	46.3± 6.13	0.06±0.089 [0-2/1000]
	フラメトピル 原 体	150	72	53.2± 5.13	0.06±0.055 [0-1/1000]
		300	72	51.5± 3.82	0.02±0.045 [0-1/1000]
		600	72	33.4± 9.61*	0.14±0.089 [0-2/1000]

a) PCE:多染性赤血球 NCE:正染性赤血球

1個体につき1000個の赤血球を観察した

b) MNPCE:小核を有する多染性赤血球

1個体につき1000個の多染性赤血球を観察した

c) 10mL/kgの割合で投与した

d) CP:シクロホスファミド

*: p<0.05, ** : p<0.01

溶媒対照群(コーンオイル、各々24、48、72時間処理)と比較して統計処理を実施した。小核を有する多染性赤血球の出現頻度についてはKastenbaumとBowmanらの方法に従い、多染性赤血球の割合についてはt検定を行った。

性別	薬物	投与量 (mg/kg)	処理 時間 (hr)	小核を有する多染性赤血球の総数		
				合計	<1/4 ^{a)}	≥1/4 ^{b)}
雄	コーンオイル	—	24	8	8	0
	フラメトピル 原 体	150	24	5	5	0
		300	24	4	4	0
		600	24	6	6	0
	コーンオイル	—	48	7	7	0
	フラメトピル 原 体	150	48	5	4	1
		300	48	8	6	2
		600	48	25**	12	13**
	コーンオイル	—	72	5	5	0
	フラメトピル 原 体	150	72	6	6	0
		300	72	5	5	0
		600	72	16	11	5*
	陽性対照 (CP) ^{c)}	80	24	330**	322**	8**

a) 小核の大きさが赤血球の直径の 1/4 未満のものを示した

b) 小核の大きさが赤血球の直径の 1/4 以上のものを示した

c) CP : シクロホスファミド

* : p<0.05、 ** : p<0.01

溶媒対照群 (コーンオイル、各々24、48、72時間処理) と比較し、Kastenbaum と Bowman らの方法に従って統計処理を実施した。

(4) フラメトピル原体の細菌を用いたDNA修復試験

(資料9-4)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1992年 [GLP対応]

検体：フラメトピル原体

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) M45株 (DNA組換修復欠損株) およびH17株 (野性株) を用いて、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9) 存在下および非存在下で、胞子法によりDNA損傷誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。

試験結果：試験結果を次頁に示す。

S9存在下および非存在下共にM45株およびH17株のいずれにおいても検体処理による生育阻止円は認められなかった。一方、S9非存在下および存在下の陽性対照化合物であるマイトマイシンCおよびステリグマトシスチン処理群では、M45株とH17株との間に明瞭な生育阻止円径の差が認められた。また、陰性対照化合物であるカナマイシン処理群では両菌株に同程度の生育阻止作用が認められた。

以上の結果から、フラメトピル原体は本試験条件下でDNA損傷誘発性はないと結論した。

薬物	処理濃度 ($\mu\text{g}/\text{ディスク}$)	S9非存在下			S9存在下			
		生育阻止円径 (mm)		差 ^{a)} (mm)	生育阻止円径 (mm)		差 ^{a)} (mm)	
		M45株	H17株		M45株	H17株		
溶媒対照 (DMSO)	0	<8	<8	0	<8	<8	0	
		<8	<8	0	<8	<8	0	
フラマトビル 原体	200	<8	<8	0	<8	<8	0	
		<8	<8	0	<8	<8	0	
	400	<8	<8	0	<8	<8	0	
		<8	<8	0	<8	<8	0	
	800	<8	<8	0	<8	<8	0	
		<8	<8	0	<8	<8	0	
	1600	<8	<8	0	<8	<8	0	
		<8	<8	0	<8	<8	0	
	3200	<8	<8	0	<8	<8	0	
		<8	<8	0	<8	<8	0	
	6400	<8	<8	0	<8	<8	0	
		<8	<8	0	<8	<8	0	
	カマイシン	3	15.2	16.5	-1.3	14.1	15.4	-1.3
			18.7	18.0	0.7	17.8	15.1	2.7
マイトマイシンC	0.3	37.5	23.9	13.6	— ^{b)}	—	—	
		45.9	24.1	21.8	—	—	—	
ステリク [®] マトシチン	3	—	—	—	16.3	<8	>8.3	
		—	—	—	18.2	<8	>10.2	

a) : (M45株における阻止円径) - (H17株における阻止円径)

b) : — ; 試験を実施しなかった。

表中の数字はそれぞれ2枚のディスクの平均値を示す。

(5) フラメトピル原体のラット肝細胞を用いた *in vivo/in vitro* 不定期DNA合成
(UDS) 試験

(資料9-5)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1991年[GLP対応]

検 体：フラメトピル原体



試験方法：検体を投与した6~7週齢雄ラット(体重：192.7~295.5g)の肝細胞を用いてUDS誘発を調べることにより、DNA損傷性を検定した。検体はコーンオイルに溶解して用いた。

肝細胞の調製：検体を投与したSD系ラット(6または7週齢、体重192.7~295.5g)の肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流した後摘出した。肝細胞を分離し、氷冷したウィリアムスE培地(WME、10%牛胎児血清を含む)中に懸濁した。

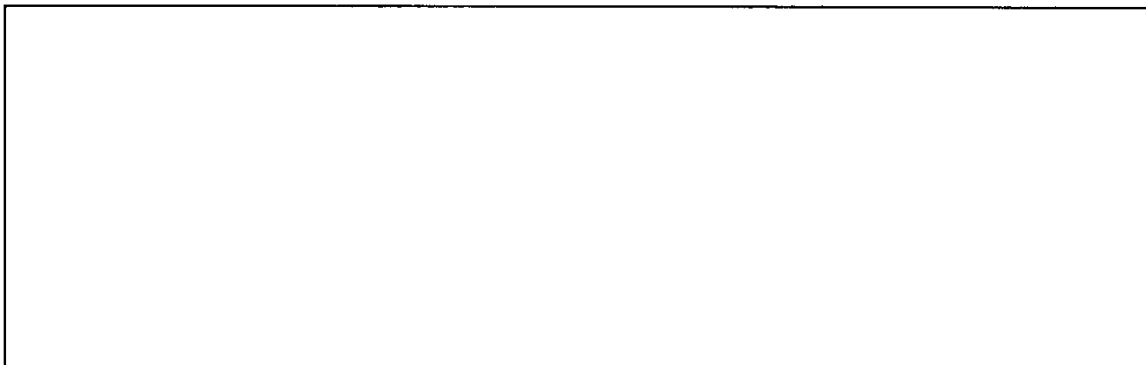
肝細胞生存率測定および培養：個体あたり400個以上の細胞を計数し、肝細胞生存率を比較した。細胞濃度を 2.5×10^5 個/mLに調製した後、サーモノックスカバーグラスを1枚ずつ含む6穴マルチプレートの各穴に細胞浮遊液を2mLずつ播種して培養し、細胞をカバーグラス上に付着させた。

UDS試験：1.5時間培養した肝細胞をWMEで洗浄した後、 ^3H -チミジンを370kBq/mLの濃度で含むWME中で4時間培養した。 ^3H -チミジン処理後、細胞を非標識チミジンを0.25mM含むWMEで2回洗浄し、さらにこの培地中で16~17時間培養した。培養後、細胞は洗浄(ハンクス液)、低張処理(1%クエン酸ナトリウム溶液)し氷冷固定液(エタノール：酢酸=3:1)で固定した。

得られた細胞標本を写真用乳剤に浸して乳剤被膜を形成させ、暗箱中で1週間露出(4℃)した後現像した。 ^3H -チミジン取り込み部位を銀粒子として検出し、さらに細胞をヘマトキシリンおよびエオジンYで染色し、UDSの測定を行った。UDSの測定は標本あたり細胞を50個ずつ、動物あたり2枚の標本を観察した。観察は顕微鏡下で行い、銀粒子の測定にはコロニーアナライザーを用いた。

各々の細胞について核銀粒子面積と細胞質銀粒子面積(核に隣接した核と同じ面積分の細胞質上に現れた銀粒子面積)を測定し、銀粒子面積と銀粒子数との相関式を用いて、核銀粒子数と細胞質銀粒子数を求めた。核内銀粒子数(NG)は核銀粒

子数から細胞質銀粒子数を引いて求め、NG が 5 以上の細胞はUDS 陽性細胞とみなし、その細胞数を計数して割合 (%R) を求めた。



試験結果：試験結果を次頁に示す。

経時変化試験：検体は 3 時間処理群において、肝細胞生存率を有意に低下させた
が、いずれの処理時間においても検体投与群の NG 値および %R 値にも増加は認め
られなかった。

用量反応性試験：上記の結果から、本試験の処理時間は 3 時間とし、UDS を測
定した。

いずれの検体投与群の NG 値および %R 値にも増加は認められなかった。

一方、陽性対照の 2-アセチルアミノフルオレンは NG 値および %R 値の両方を顕著
に増加させた。

以上の結果から、フラメトピル原体は、*in vivo* において、ラット肝細胞に対して不定
期 DNA 合成を誘発せず、DNA 損傷性を示さないと結論した。

経時変化試験：

薬物	投与量 (mg/kg)	処理 時間 (hr)	細胞生存率 (%)	核内銀粒子数 ^{a)}	UDS 陽性細胞	
					計数值 ^{b)}	%R ^{c)}
コーンオイル	- ^{d)}	12	60.0	-6.2	2/300	0.7
フラメトピル 原体	450	3	29.4**	-8.7	3/300	1.0
		12	47.9	-8.2	1/300	0.3
		24	62.8	-7.9	1/300	0.3
2-AAF ^{e)}	50	12	41.9	28.0	254/257	99.0

a) : 動物あたり 2 枚の標本から 50 細胞ずつ、計 100 細胞を観察した。

b) : 核内銀粒子数を 5 個以上もつ細胞数/観察した細胞数

c) : 核内銀粒子数を 5 個以上もつ細胞数の割合

d) : 10mL/kg

e) : 2-アセチルアミノフルオレン

** : $p < 0.01$ (Student's t 検定)

用量反応性試験

薬物	投与量 (mg/kg)	処理 時間 (hr)	細胞生存率 (%)	核内銀粒子数 ^{a)}	UDS 陽性細胞	
					計数值 ^{b)}	%R ^{c)}
コーンオイル	- ^{d)}	3	61.7	-7.9	3/300	1.0
フラメトピル 原体	113	3	56.6	-8.2	3/300	1.0
	225	3	60.5	-7.8	2/300	0.7
	450	3	58.2	-7.7	3/300	1.0
2-AAF ^{e)}	50	12	40.9	22.9	285/300	95.0

a) : 動物あたり 2 枚の標本から 50 細胞ずつ、計 100 細胞を観察した。

b) : 核内銀粒子数を 5 個以上もつ細胞数/観察した細胞数

c) : 核内銀粒子数を 5 個以上もつ細胞数の割合

d) : 10mL/kg

e) : 2-アセチルアミノフルオレン

10. 生体の機能に及ぼす影響

フラメトピルの一般薬理試験

(資料10)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1992年

検 体：フラメトピル原体

試験方法：経口投与による試験では0.5%メチルセルロースに懸濁して用いた。

静脈内投与および点眼についての試験ではグリセロールフォルマルに溶解して用いた。摘出臓器についての試験ではジメチルスルホキシドに溶解して用いた。被験液（投与液・添加液）は用時調製した。対照群にはそれぞれの溶媒を処置した。なお、摘出臓器の試験における検体の添加量は、反応液中の最終濃度で示した。

試験項目および試験結果：

1. 一般症状および行動に及ぼす影響

試験動物；ICR系雌雄マウス（開始時6週齢、体重 20.0～30.5 g）

方法；1群雌雄各3匹のマウスに検体を30、100、300および1000 mg/10mL/kg 経口投与し、投与前 および投与後15分、30分、1、2、4および24時間に行動観察を行った。

結果；300 mg/kg以上の投与群で自発運動減少、警戒性・位置視覚・痛覚反応・握力・腹筋緊張度・耳介反射の低下、鎮静、失調性歩行、呼吸数減少、受動性、四肢姿勢の異常、尿失禁を認めた。更に、1000 mg/kg群では円背位、触覚反応・四肢筋緊張度の低下、チアノーゼも認め、投与後24時間以内に雄2例が死亡した。

100 mg/kg以下の投与群では異常を認めなかった。

2. 中枢神経系に及ぼす影響

(1) 自発運動量

試験動物；ICR系雄マウス（開始時6週齢、体重 25.0～31.7 g）

方法；1群3匹の雄マウスに検体を30、100および300 mg/10mL/kg 経口投与し、投与直後より10分ごとに4時間までの運動量を自発運動量測定装置を用いて測定した。

試験は別の動物を用いて1群計4回行った。

結果；100 mg/kg投与群の投与後40～50分および60～70分、300 mg/kg投与群の投与後20～50分および60～70分に溶媒対照群と比較して有意な低値を認めた。その他の測定時点および30 mg/kg投与群では有意な変化を認めなかった。

(2) 睡眠

試験動物；ICR系雄マウス（開始時6週齢、体重 25.6～30.8 g）

方法；1群10匹の雄マウスに検体を10、30および100 mg/10mL/kg 経口投与し、その60分後にペントバルビタールナトリウム45 mg/kgを腹腔内投与し、正向反射の消失を指標として睡眠時間を測定した。

結果；30および100 mg/kg投与群では溶媒対照群と比較して睡眠時間の有意な延長作用を認め、用量依存性の麻酔増強作用を認めた。10 mg/kg投与群では影響は認められなかった。

(3) 抗痙攣

試験動物；ICR系雄マウス（開始時6週齢、体重 27.4～31.2 g）

方法；1群10匹の雄マウスに検体を30、100および300 mg/10mL/kg 経口投与し、その60分後にベンチレンテトラゾール100 mg/kgを腹腔内投与し、間代性痙攣および死亡発現の有無を30分間観察した。

結果；300 mg/kg投与群では10例中2例で間代性痙攣の発現を認めず、全例で死亡を認めなかった。死亡発現は溶媒対照群と比較して有意な差を認めた。100 mg/kg以下の投与群では影響を認めなかった。

(4) 鎮痛

試験動物；ICR系雄マウス（開始時6週齢、体重 25.0～32.9 g）

方法；1群10匹の雄マウスに検体を30、100および300 mg/10mL/kg 経口投与し、その60分後に0.7%酢酸10 mL/kgを腹腔内投与し、酢酸投与5分後から10分間に発現するwrithing（苦悶反応）の回数を測定した。

結果；100および300 mg/kg投与群で、酢酸投与によるwrithingの発現に対して溶媒対照群と比較して有意な抑制作用を認めた。30 mg/kg投与群では影響を認めなかった。

(5) 体温

試験動物 ; New Zealand White雄ウサギ (開始時12~15週齢、体重 2.3~2.6 kg)

方法 ; 1群3匹の雄ウサギに検体を200、600および2000 mg/10mL/kg 経口投与し、投与2時間前より1時間間隔で3回、投与後1、2、3、4時間にサーミスタ温度集録装置を用いて直腸体温を測定した。

結果 ; 600 mg/kg投与群では投与1時間後に、2000 mg/kg投与群では投与1時間以降に溶媒対照群と比較して有意な低値を認めた。200 mg/kg投与群では影響を認めなかった。

(6) 脳波

試験動物 ; New Zealand White雄ウサギ (開始時12~15週齢、体重 2.4~2.7 kg)

方法 ; 1群3匹の雄ウサギを用い、ガラミン不動化、人工呼吸下で大脳皮質運動領および海馬より単極誘導にてアンプを介して記録した。検体の0.3、1、3および10 mg/kgを0.1もしくは0.33 mL/kgの割合で静脈内投与し、投与前、投与直後、投与後5分、15分および30分の脳波を測定した。

結果 ; 3 mg/kg以上の投与群において、一過性の高振幅の徐波を認めた。1 mg/kg以下の投与群では影響を認めなかった。

3. 自律神経系および平滑筋に及ぼす影響

(1) ウサギ摘出回腸

試験動物 ; New Zealand White雄ウサギ (開始時12~15週齢、体重 2.2~2.6 kg)

方法 ; 雄ウサギから回腸を摘出し、回腸標本を作製した。標本を混合ガス(95% O₂、5% CO₂)を通気したタイロード液(37℃)中に約1gの負荷を加えて懸垂し、収縮をアイソトニックトランスデューサーを介して記録した。検体を最終濃度が10⁻⁸~10⁻⁶ g/mLになるように添加し、自動収縮に対する作用を添加後5分間調べた。

結果 ; 検体の10⁻⁶ g/mLでは自動収縮の振幅の軽度から中等度な抑制を認めた。10⁻⁶ g/mL以下の濃度では影響を認めなかった。

(2) モルモット摘出回腸

試験動物 ; Hartley系雄モルモット (開始時5~16週齢、体重 464~933 g)

方法 ; 雄モルモットから回腸を摘出し、回腸標本を作製した。標本を混合ガス(95% O₂、5% CO₂)を通気したタイロード液(30℃)中に約0.5gの負荷を加えて懸垂し、

収縮をアイソトニックトランスデューサーを介して記録した。検体を最終濃度が 10^{-8} ~ 10^{-5} g/mLになるように添加し、直接作用を添加後5分間調べた。また、検体添加の3分後にアセチルコリン 10^{-8} 、 10^{-7} g/mL、ヒスタミン 10^{-8} 、 10^{-7} g/mL、セロトニン 10^{-7} 、 10^{-6} g/mL、塩化バリウム 10^{-4} ~ 3×10^{-3} g/mLを添加し、アゴニスト収縮反応に対する検体の影響も検討した。

結果；検体の 10^{-8} ~ 10^{-5} g/mLではモルモット回腸の筋緊張度に対し影響を認めなかった。アセチルコリンおよびバリウムによる収縮反応に対し、検体の 10^{-8} ~ 10^{-6} g/mLでは影響を認めなかった。ヒスタミンおよびセロトニンによる収縮反応に対し、検体の 10^{-5} g/mLで軽度の抑制を認めたが、 10^{-8} g/mL以下の濃度では影響を認めなかった。

4. 呼吸・循環器系に及ぼす影響

(1) 呼吸・血圧・心拍数・心電図・血流量

試験動物；beagle雄イヌ（開始時6~19ヶ月齢、体重 9.1~10.7 kg）

方法；雄イヌ3頭をペントバルビタールで麻酔して用いた。呼吸は気管チューブを装着したピックアップよりアンプを介して、血圧は圧トランスデューサーおよび圧力アンプを介して、心電図は第II誘導によりアンプを介して、心拍数は心電図より瞬時心拍数ユニットを介して、血流量は大腿動脈に接続した血流プローブより血流計を介して、それぞれ記録した。検体の0.3、1、3および10 mg/0.1mL/kgを静脈内に漸増投与し、30分または60分間にわたり測定した。

結果；3 mg/kgの投与により、血圧低下、心拍数増加および血流量増加を認めた。10 mg/kgの投与ではそれらに加えて呼吸数増加を認めたが、血圧低下および呼吸数増加作用は一過性で投与5分以内に消失し、心拍数および血流量の増加は投与30分後には消失した。心電図に対しては10 mg/kg投与においても変化を認めなかった。1 mg/kg以下の投与では検体の影響を認めなかった。

(2) 摘出心房

試験動物；Hartley系雄モルモット（開始時5~16週齢、体重 356~821 g）

方法；雄モルモットから心房を摘出し、心房標本を作製した。標本を混合ガス(95% O_2 , 5% CO_2)を通気したロックーリンガー液(32°C)中に約1gの負荷を加えて懸垂し、収縮力はFDピックアップを介して、拍動数は瞬時心拍計ユニットを介してそれぞれ

れ記録した。検体を最終濃度が 10^{-8} ~ 10^{-5} g/mLになるように添加し、直接作用を添加後5分間調べた。

結果；検体の 10^{-5} g/mLで軽度な心房の振幅減少および拍動数の低下を認めた。検体の 10^{-6} g/mL以下では影響を認めなかった。

5. 消化器系に及ぼす影響

試験動物；ICR系雄マウス（開始時6週齢、体重 25.5~33.1 g）

方法；1群9~10匹の雄マウスに検体を30、100および300 mg/10mL/kg 経口投与し、その60分後に10%骨炭末懸濁液（20%アラビアゴム添加）10 mL/kgを経口投与した。その25分後に全腸管を摘出し、骨炭末移動距離から輸送率を求めることにより腸管輸送能を調べた。

結果；300 mg/kg投与群で溶媒対照と比較して有意な抑制作用を認めしたが、100 mg/kg以下の投与群では影響を認めなかった。

6. 体性神経系に及ぼす影響

(1) 摘出横隔膜神経筋

試験動物；SD系雄ラット（開始時7週齢、体重 246~290 g）

方法；雄ラットから横隔膜を摘出し、横隔膜神経筋標本を作製した。標本を混合ガス（95% O_2 、5% CO_2 ）を通気したクレプスーヘンゼライト液（37℃）中に懸垂した。神経および筋に10秒毎交互に電気刺激を加え、筋収縮をFDピックアップを介して記録した。検体を最終濃度が 10^{-8} ~ 10^{-5} g/mLになるように添加し、神経および筋の電気刺激による筋収縮反応に対する作用を添加後10分間調べた。

結果；検体の 10^{-5} g/mLでは間接（神経）刺激による収縮反応を軽度に抑制した。

検体の 10^{-6} g/mL以下では収縮反応に対し影響を認めなかった。

(2) 局所麻酔作用

試験動物；New Zealand White雄ウサギ（開始時12~15週齢、体重 2.4~2.8 kg）

方法；1群3匹の雄ウサギに検体（1、10%）および陽性対照物質（0.4%塩酸オキシプロカイン）を0.1 mL 点眼し、10、30、60、120分後に角膜刺激を5回行い、瞬目反応の回数を測定した。

結果；塩酸オキシプロカインが角膜反射を消失させたのに対し、検体の1、10%の各濃度ともに影響を認めなかった。

7. 水および電解質に及ぼす影響

試験動物；SD系雄ラット（開始時7週齢、体重 185～211 g）

方法；1群10匹の雄ラットに検体を30、100および300 mg/10mL/kg 経口投与し、その30分後に生理食塩液30 mL/kgを経口投与した。その後、ラットを1匹ずつ採尿ケージに入れ、生理食塩液投与後5時間までの尿を採取し、尿量および尿中電解質（ Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- ）の測定を行った。

結果；100 mg/kg投与群では Cl^- の有意な低下を認めたが、他の項目については変化を認めなかった。300 mg/kg投与群では有意な尿量の減少および Na^+ の上昇を認めた。30 mg/kg投与群では、 K^+ の有意な低下を認めたが、用量依存性のない変化であり、その他の項目については影響を認めなかった。

8. 血液に及ぼす影響

(1) 血液凝固

試験動物；SD系雄ラット（開始時7週齢、体重 187～203 g）

方法；1群5匹の雄ラットに検体を300 mg/10mL/kg 経口投与し、その4時間後に採血し、3.8%クエン酸ナトリウムを加えて血漿を採取し、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間およびフィブリノーゲン量の測定を行った。

結果；プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間およびフィブリノーゲン量のいずれにおいても検体投与の影響を認めなかった。

(2) 溶血

試験動物；SD系雄ラット（開始時7週齢、体重 187～203 g）

方法；1群5匹の雄ラットに検体を300 mg/10mL/kg 経口投与し、その4時間後に採血し、ヘパリンを加えて血漿を採取し、シアンメトヘモグロビン法により血漿中のヘモグロビン濃度を求めた。

結果；検体投与による溶血作用を認めなかった。

以上の結果より、フラメトピルは哺乳動物に対して、自発運動の抑制、麻酔増強作用、抗痙攣作用、鎮痛作用、体温降下作用、腸管輸送能抑制作用および脳波において徐波の発現等を示し、中枢神経抑制作用を有することが示唆された。また、水および電解質代謝については軽度な作用を認めたが、その他の作用については、ないもしくは中枢神経抑制作用に比較して弱いものと考えられた。

フラメトピル原体の「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	動物種	投与経路 (溶媒)	適用量 (mg/kg)	動物数	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢機能	一般症状及び行動	マウス	経口 (0.5%メチルセルロース) 30、100、300、1000	雌雄 3	300	100	300mg/kg以上で自発運動減少、警戒性・位置視覚・痛覚反応・握力・腹筋緊張度・耳介反射の低下、鎮静、失調性歩行、呼吸数減少、受動性、四肢姿勢の異常、尿失禁 1000mg/kgで円背位、触覚反応・四肢筋緊張度の低下、チアノーゼも認め、雄2例死亡
	自発運動量	マウス	経口 (0.5%メチルセルロース) 30、100、300	雄4	100	30	100、300mg/kg投与後に有意な低値
	睡眠	マウス	経口 (0.5%メチルセルロース) 10、30、100	雄10	30	10	30、100mg/kgで睡眠時間の有意な延長
	抗痙攣	マウス	経口 (0.5%メチルセルロース) 30、100、300	雄10	300	100	300mg/kgの2例で間代性痙攣を認めず、全例で死亡を認めなかった
	鎮痛	マウス	経口 (0.5%メチルセルロース) 30、100、300	雄10	100	30	100mg/kg以上で苦悶反応の有意な抑制
	体温	ウサギ	経口 (0.5%メチルセルロース) 200、600、2000	雄3	600	200	600mg/kg以上で有意な低値
	脳波	ウサギ	静注 (グリセロールフォルマル) 0.3、1、3、10	3	3	1	3mg/kg以上で一過性の高振幅の徐波
自律神経系	摘出回腸	ウサギ	in vitro (ジメチルスルホキシド) 10 ⁻⁴ ~10 ⁻⁵ (g/mL)	3	10 ⁻⁵ (g/mL)	10 ⁻⁶ (g/mL)	10 ⁻⁵ g/mLで自動収縮の振幅を抑制
	摘出回腸	モルモット	in vitro (ジメチルスルホキシド) 10 ⁻⁴ ~10 ⁻⁵ (g/mL)	3	10 ⁻⁵ (g/mL)	10 ⁻⁶ (g/mL)	10 ⁻⁶ g/mLでHis、5-HT収縮を抑制 影響なし(直接作用、Ach、Ba ²⁺ との相互作用)
呼吸循環器及び	呼吸・血圧・心拍数・心電図・血流量	イヌ	静注 (グリセロールフォルマル) 0.3、1、3、10	3	3	1	3mg/kg以上で血圧低下 心拍数増加、血流量増加、呼吸数増加
	摘出心房	モルモット	in vitro (ジメチルスルホキシド) 10 ⁻⁴ ~10 ⁻⁵ (g/mL)	3	10 ⁻⁵ (g/mL)	10 ⁻⁶ (g/mL)	10 ⁻⁶ g/mLで振幅減少および拍動数低下
器系消化	腸管輸送能	マウス	経口 (0.5%メチルセルロース) 30、100、300	雄9~10	300	100	300mg/kgで有意な抑制
体性神経系	神経筋接合部	ラット	in vitro (ジメチルスルホキシド) 10 ⁻⁴ ~10 ⁻⁵ (g/mL)	3	10 ⁻⁵ (g/mL)	10 ⁻⁶ (g/mL)	10 ⁻⁵ g/mLで間接刺激による収縮を抑制
	局所麻酔作用	ウサギ	点眼 (グリセロールフォルマル) 1、10 (%)	雄3	-	10 (%)	影響なし
尿検査	水および電解質	ラット	経口 (0.5%メチルセルロース) 30、100、300	雄10	100	30	100mg/kgでCL ⁻ の有意な低下 300mg/kgで有意な尿量の減少およびNa ⁺ の上昇
血液学的検討	血液凝固	ラット	経口 (0.5%メチルセルロース) 300	雄5	-	300	影響なし
	溶血	ラット	経口 (0.5%メチルセルロース) 300	雄5	-	300	影響なし

His:ヒスタミン
5-HT:セロトニン

11. 補足試験

(1) フラメトピルのマウス肝薬物代謝酵素系に対する影響検討試験

— 毒性発現機構検討試験 —

(資料 11-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1994年 (GLP 非対応)

検 体：フラメトピル原体

試験動物：ICRマウス 1群雌雄各18匹

(開始時6週齢、体重；雄28.3~33.3g、雌；21.3~25.4g)

投与開始後2、4および13週時に各群雌雄6匹ずつ屠殺した。

試験期間：13週間 (投与開始；1994年1月24日および2月21日、

最終屠殺；1994年4月27日および5月24日)

実施目的：フラメトピルのマウスにおける発癌性試験 (資料7-3) において、雌3000ppm投与群の肝臓の腫瘍の発生率の増加および変異肝細胞巢の増加が認められた。

一方、腫瘍の発生頻度 (肝細胞腺腫、肝細胞癌および合計値) には有意な増加は認められず、発癌性はないと考えられたが、腫瘍の発生数は雌の1500ppm以上の投与群でやや高かった。これらの肝臓の変化は、肝臓の薬物代謝酵素系の誘導と関連したものであると考えられた。

そこで、フラメトピルの薬物代謝酵素系に対する影響を明らかにするために本試験を実施した。

投与方法：検体を0、100、1500および3000ppmの濃度で基礎飼料に混入し、動物に自由に摂取させた。また、薬物代謝酵素誘導の陽性対照としフェノバルビタール(PB)を500ppmの濃度で同様に投与した。なお、飼料は4週間に1回調製した。

試験項目および試験結果：

死亡率；生死を毎日観察した。

死亡例はなかった。

体重変化；全動物について週に1回体重を測定した。

対照群と比較して差はみられなかった。

摂餌量；全動物について週に1回摂餌量を測定した。

対照群と比較して差はみられなかった。

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は以下の通りであった。

投与量 (ppm)		100	1500	3000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	12.4	183.1	371.3
	雌	15.0	239.5	466.4

肝臓重量；投与 2、4 および 13 週時に各群雌雄 6 匹の肝臓重量を測定し、体重比も算出した。
 対照群と比較して統計学的に有意差の認められた項目を以下の表に示す。

	検査 期間 (週)	項目	投与量 (ppm)							
			雄				雌			
			100	1500	3000	PB	100	1500	3000	PB
肝臓 重量	2	絶対			▲121	▲123		△116	▲129	▲123
		相対			▲117	▲114		▲113	▲126	▲120
	4	絶対		△112	▲127	▲122		▲126	▲144	▲126
		相対		▲114	▲125	▲116		▲121	▲136	▲124
	13	絶対			▲125	▲130		▲127	▲131	
		相対		▲111	▲125	▲121		△118	▲126	△117

検定方法：ANOVA/LSD、△：p<0.05、▲：p<0.01
 表中の数値は対照群(100)に対する割合

2 週時の雄の 1500ppm 群を除いて、いずれの検査時期でも雌雄の 1500ppm 以上の群で肝臓の絶対重量および相対重量が増加し、検体投与の影響と考えられた。なお、PB 群でも同様の変化が認められた。

肉眼的病理検査；各検査時期に全動物の剖検を行った。

発現した変化を以下の表に示す。

項目	検査 時期 (週)	投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	100	1500	3000	PB	0	100	1500	3000	PB
色調の暗化	2	0	0	3	4	3	0	0	0	4	▲6
	4	0	0	2	3	▲6	0	0	4	3	4
	13	0	0	△5	2	4	0	0	1	4	4
大型化	2	0	0	0	3	▲6	0	0	3	▲6	△5
	4	0	0	2	▲6	4	0	0	▲6	▲6	▲6
	13	0	0	3	▲6	▲6	1	2	4	△6	3

各群 6 例中の発生数

申請者注：剖検所見について統計検定を行った。

有意差検定は Fisher の直接確率検定を用いた(△：p<0.05、▲：p<0.01)。

いずれの検査時期でも雌雄の 1500ppm 以上の群で肝臓の色調の暗化および大型化が認められ、検体投与の影響と考えられた。なお、PB群でも同様の変化が認められた。

病理組織学的検査；各検査時期に全動物の肝臓の組織について病理標本を作製し、光学顕微鏡的検査を実施した。あわせて対照群と 3000ppm 群およびPB群について電子顕微鏡的検査を実施した。

主な病理変化を以下の表に示す。

項目	検査時期 (週)	投与量 (ppm)									
		雄					雌				
		0	100	1500	3000	PB	0	100	1500	3000	PB
肝細胞肥大 ^a	2	0	0	▲5	▲6	▲6	0	0	△4	▲6	▲6
	4	0	0	▲6	▲6	▲6	0	0	3	▲6	▲6
	13	0	0	▲5	▲6	▲6	0	0	2	▲5	▲6
滑面小胞体の増生 ^b	2	0	—	—	1	2	0	—	—	2	2
	4	0	—	—	2	2	0	—	—	1	2
	13	0	—	—	2	2	0	—	—	1	2

a：各群 6 例中の発生数、b：各群 2 例中の発生数

申請者注：病理組織学的検査について、統計検定を行った。

有意差は、Mann-Whitney 検定を用いて行った(△：p<0.05、▲：p<0.01)。

光学顕微鏡検査ではいずれの検査時期でも雌雄の 1500ppm 以上の群で肝細胞の肥大が認められた。電子顕微鏡検査では全検査時期で 3000ppm 群に滑面小胞体の増生が認められ、いずれも検体投与によると考えられた。PB群でも同様の変化が認められた。

肝臓のタンパク量：各検査時期に肝臓のホモジネート液の 600×g 上清 (S0.6)、105,000×g 上清 (S105) および 105,000×g 沈渣 (Ms) のタンパク量を測定した。

結果を以下の表に示す。

	検査時期 (週)	項目	投与量 (ppm)							
			雄				雌			
			100	1500	3000	PB	100	1500	3000	PB
タンパク量	2	S0.6		▲117	▲131	△110			▲113	
		S105		▲109	▲111	△107			△112	
		Ms			▲140	△119		▲127	▲141	▲125
	4	S0.6		△109	▲111					
		S105								
		Ms		▲142	▲151	△135			▲125	▲128
	13	S0.6			▲129	▲136				△114
		S105					△115			
		Ms			▲126	▲138		▲121	▲131	▲140

検定方法：ANOVA/LSD、△：p<0.05、▲：p<0.01

表中の数値は対照群(100)に対する割合

S0.6 タンパクは雌雄ともに 1500ppm 以上の群で増加が認められた。S105 タンパクは 2 週時に雄の 1500ppm 以上および雌の 3000ppm 群で、13 週時に雌の 100ppm 群で増加が認められた。Ms タンパクは雌雄ともに 1500ppm 以上の群で増加が認められた。13 週時の雌 100ppm 群の増加は用量相関性がなく、軽度な変化であるため、偶発的なものと考えられた。その他の変化はいずれも検体投与の影響と考えられた。PB 群でも同様の変化が認められた。

肝臓のチトクローム P-450 含量：5%肝ミクロソーム液 (0.05g 湿肝臓/mL 相当 Ms 懸濁液) を用いて肝臓中の P-450 含量を測定した。

結果を以下の表に示す。

	検査 時期 (週)	項目	投与量 (ppm)							
			雄				雌			
			100	1500	3000	PB	100	1500	3000	PB
チトクローム P-450 含量	2	a		△141	△145	▲168			▲143	▲226
		b		▲179	▲210	▲202		▲151	▲209	▲285
	4	a				▲168		▲150	▲170	▲215
		b		▲172	▲173	▲236		▲163	▲213	▲277
	13	a		▲132	▲148	▲151		▲137	▲176	▲223
		b		▲150	▲186	▲207		▲165	▲230	▲313

a : nmol/mg protein b : nmol/mg liver
 検定方法：ANOVA/LSD、△：p<0.05、▲：p<0.01
 表中の数値は対照群(100)に対する割合

2 週時の雌の 1500ppm 群および 4 週時の雄をのぞき、全検査時期の 1500ppm 以上の群で肝臓チトクローム P-450 含量が増加し、検体投与の影響と考えられた。PB 群でも同様の変化が認められた。

肝ミクロソーム分画の薬物代謝酵素活性;肝ミクロソーム液を用いてベンゾ[*a*]ピリリン-*o*-脱ベンゾ[*a*]化活性 (CYP2B)、カリン-7-水酸化活性 (CYP2A) およびイトキシリン-*o*-脱ベンゾ[*a*]化活性 (CYP1A) を測定した。

結果を以下の表に示す。

	検査 時期 (週)	項目	投与量 (ppm)							
			雄				雌			
			100	1500	3000	PB	100	1500	3000	PB
薬物代謝 酵素活性	2	CYP2B		▲709	▲1050	▲3770		▲1250	▲2310	▲4960
		CYP2A			▲261	▲243		△163	▲204	▲369
		CYP1A		▲266	▲309	▲230		▲251	▲348	▲308
	4	CYP2B		▲3190	▲5690	▲11100		▲990	▲1450	▲2520
		CYP2A			▲207	△392		▲196	▲278	▲238
		CYP1A		▲222	▲339	▲341		▲258	▲387	▲249
	13	CYP2B		▲597	▲1010	▲2270		▲903	▲1390	▲2850
		CYP2A		△200	△216	▲293		▲169	▲233	▲249
		CYP1A		▲239	▲282	▲239		▲309	▲344	▲354

検定方法：ANOVA/LSD、△：p<0.05、▲：p<0.01
 表中の数値は対照群(100)に対する割合

全検査時期の 1500ppm 以上の群でベンゾピレン-1-オキシド-3-ヒドロキシ化活性 (CYP2B)、クマリン-7-水酸化活性 (CYP2A) およびエトキシベンゾピレン-1-オキシド-3-ヒドロキシ化活性 (CYP1A) が上昇し、特に著しい活性の増加がベンゾピレン-1-オキシド-3-ヒドロキシ化活性 (CYP2B) に認められ、検体投与の影響と考えられた。また、PB 群でも同様の変化が認められた。

以上のように、本試験の 1500ppm 以上の群で雌雄ともに肝臓において重量の増加、色調の暗化、小葉中心性の肝肥大の増加、滑面小胞体の増加、タンパク量の増加、チトクローム P-450 量の増加ならびにベンゾピレン-1-オキシド-3-ヒドロキシ化活性 (CYP2B)、クマリン-7-水酸化活性 (CYP2A) およびエトキシベンゾピレン-1-オキシド-3-ヒドロキシ化活性 (CYP1A) の上昇が認められた。これらは PB 群と同程度あるいはそれ以下の変化であったが、ほぼ同じプロフィールを示した。また、本試験における最大無作用量は 100ppm (雄: 12.4mg/kg/day、雌: 15.0mg/kg/day) であると判断された。

申請者注:

報告書中には無毒性量について記載していないが、1500ppm 投与群で認められた所見については、いずれも毒性変化と考えられることから、無毒性量は 100ppm (雄: 12.4mg/kg/day、雌: 15.0mg/kg/day) と判断した。

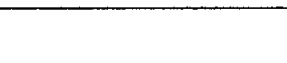
(2) フラメトピル原体のマウスを用いた小核試験 (13 週間摂食投与)

(資料 11-2)

試験機関：住友化学工業株式会社

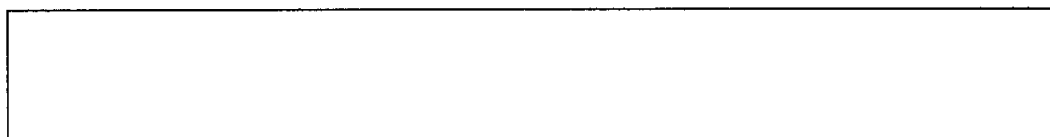
報告書作成年：1994 年

検 体：フラメトピル原体



試験目的：先に実施した単回投与の小核試験 (資料 9-3) において、雄マウスの最高投与量群でわずかな小核頻度の増加が認められた。本試験では、「マウスにおける発癌性試験」と同じ投与条件で 13 週間連続投与した場合の小核誘発性の有無について確認した。

試験方法：6 週齢の ICR 系雌雄マウス (体重：雄 28.3~33.3g、雌 21.3~25.4g) を 1 群各 6 匹用い、飼料に混入させた検体を 100、1500 および 3000ppm の用量で摂食投与して、2、4 および 13 週間後に屠殺した。屠殺後大腿骨を摘出し、常法に従い骨髓細胞の塗抹標本を作製し、顕微鏡下で観察した。



試験結果：試験結果を次頁に示す。

いずれの性、用量、処理時間においても対照群と比較して小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加はみられなかった。

一方、陽性対照であるシクロホスファミド投与群では顕著な小核の増加が認められた。

以上の結果から、フラメトピル原体はマウス骨髓細胞に対して小核を誘発しないと結論した。

薬物	投与量	投与経路	処理時間	動物数	PCE ^{a)}	MNPCE ^{b)}
					$\frac{\text{PCE+NCE}}{\text{PCE+NCE}}$ (%±SD)	$\frac{\text{MNPCE}}{\text{PCE}}$ (%±SD) [最小-最大値]
-雄-						
無処理	-	-	-	6	53.8 ± 4.74	0.25 ± 0.122 [1-4/1000]
フラムビ [®] ル原体	100ppm	fe ^{c)}	2W	6	58.5 ± 7.04	0.17 ± 0.186 [0-4/1000]
フラムビ [®] ル原体	1500ppm	fe ^{c)}	2W	6	57.6 ± 6.33	0.33 ± 0.197 [1-6/1000]
フラムビ [®] ル原体	3000ppm	fe ^{c)}	2W	6	53.8 ± 7.69	0.27 ± 0.082 [2-4/1000]
陽性対照 CP ^{d)}	80mg/kg	po ^{e)}	24hr	6	42.8 ± 5.04**	3.32 ± 0.659** [23-42/1000]
-雌-						
無処理	-	-	-	6	55.1 ± 6.08	0.18 ± 0.117 [1-4/1000]
フラムビ [®] ル原体	100ppm	fe ^{c)}	2W	6	61.5 ± 3.83	0.18 ± 0.194 [0-5/1000]
フラムビ [®] ル原体	1500ppm	fe ^{c)}	2W	6	65.5 ± 6.39*	0.10 ± 0.063 [0-2/1000]
フラムビ [®] ル原体	3000ppm	fe ^{c)}	2W	6	66.3 ± 4.58**	0.05 ± 0.055* [0-1/1000]
陽性対照 CP ^{d)}	80mg/kg	po ^{e)}	24hr	6	46.6 ± 4.37*	3.23 ± 0.493** [26-39/1000]

a) PCE: 多染性赤血球 NCE: 正染性赤血球

1個体につき1000個の赤血球を観察した

b) MNPCE: 小核を有する多染性赤血球

1個体につき1000個の多染性赤血球を観察した

c) 摂食投与

d) CP: シクロホスファミド

e) 経口投与(単回)

*: P<0.05, **: P<0.01

無処理群と比較し、KastenbaumとBowmanらの方法に従って統計処理を実施した。

薬物	投与量	投与経路	処理時間	動物数	PCE ^{a)}	MNPCE ^{b)}
					PCE+NCE (%±SD)	PCE (%±SD) [最小-最大値]
—雄—						
無処理	—	—	—	6	53.5 ± 4.86	0.12 ± 0.160 [0-4/1000]
フラトビ®ル原体	100ppm	fe ^{c)}	4W	6	61.7 ± 6.64*	0.20 ± 0.155 [0-4/1000]
フラトビ®ル原体	1500ppm	fe ^{c)}	4W	6	62.2 ± 2.29**	0.23 ± 0.186 [0-5/1000]
フラトビ®ル原体	3000ppm	fe ^{c)}	4W	6	53.8 ± 4.46	0.20 ± 0.126 [0-3/1000]
陽性対照 CP ^{d)}	80mg/kg	po ^{e)}	24hr	6	55.7 ± 9.71	4.15 ± 1.150** [27-60/1000]
—雌—						
無処理	—	—	—	6	65.6 ± 9.11	0.20 ± 0.210 [0-6/1000]
フラトビ®ル原体	100ppm	fe ^{c)}	4W	6	62.0 ± 7.30	0.12 ± 0.117 [0-3/1000]
フラトビ®ル原体	1500ppm	fe ^{c)}	4W	6	61.2 ± 9.07	0.12 ± 0.117 [0-3/1000]
フラトビ®ル原体	3000ppm	fe ^{c)}	4W	6	60.5 ± 6.91	0.15 ± 0.122 [0-3/1000]
陽性対照 CP ^{d)}	80mg/kg	po ^{e)}	24hr	6	58.5 ± 9.03	3.92 ± 1.230** [24-58/1000]

a) PCE: 多染性赤血球 NCE: 正染性赤血球

1個体につき1000個の赤血球を観察した

b) MNPCE: 小核を有する多染性赤血球

1個体につき1000個の多染性赤血球を観察した

c) 摂食投与

d) CP: シクロホスファミド

e) 経口投与(単回)

*: P<0.05, **: P<0.01

無処理群と比較し、KastenbaumとBowmanらの方法に従って統計処理を実施した。

薬物	投与量	投与経路	処理時間	動物数	$\frac{\text{PCE}^a}{\text{PCE}+\text{NCE}}$	$\frac{\text{MNPCE}^b}{\text{PCE}}$
					(% ± SD)	(% ± SD) [最小-最大値]
—雄—						
無処理	—	—	—	6	54.9 ± 8.31	0.12 ± 0.147 [0-3/1000]
フラムビ [®] ル原体	100ppm	fe ^c	13W	6	52.4 ± 7.04	0.15 ± 0.138 [0-4/1000]
フラムビ [®] ル原体	1500ppm	fe ^c	13W	6	54.2 ± 4.33	0.12 ± 0.010 [0-2/1000]
フラムビ [®] ル原体	3000ppm	fe ^c	13W	6	50.7 ± 2.82	0.22 ± 0.133 [1-4/1000]
陽性対照 CP ^d	80mg/kg	po ^e	24hr	6	39.8 ± 6.69**	3.50 ± 0.897** [22-47/1000]
—雌—						
無処理	—	—	—	6	50.6 ± 7.22	0.10 ± 0.126 [0-3/1000]
フラムビ [®] ル原体	100ppm	fe ^c	13W	6	59.4 ± 4.97*	0.13 ± 0.137 [0-3/1000]
フラムビ [®] ル原体	1500ppm	fe ^c	13W	6	60.8 ± 8.52*	0.10 ± 0.126 [0-3/1000]
フラムビ [®] ル原体	3000ppm	fe ^c	13W	6	55.5 ± 9.72	0.10 ± 0.110 [0-2/1000]
陽性対照 CP ^d	80mg/kg	po ^e	24hr	6	44.2 ± 9.41	2.80 ± 1.241** [13-46/1000]

a) PCE: 多染性赤血球 NCE: 正染性赤血球

1 個体につき 1000 個の赤血球を観察した

b) MNPCE: 小核を有する多染性赤血球

1 個体につき 1000 個の多染性赤血球を観察した

c) 摂食投与

d) CP: シクロホスファミド

e) 経口投与 (単回)

*: P<0.05, **: P<0.01

無処理群と比較し、Kastenbaum と Bowman らの方法に従って統計処理を実施した。

(3) フラメトピル原体のマウスを用いた染色体異常試験

—小核試験、*in vivo*染色体異常試験の比較—

(小核誘発機構検討試験)

(資料11-3)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1994年

検 体：フラメトピル原体

試験目的：先に実施した小核試験（資料9-3）において、雄マウスに小核誘発性が認められたが、その小核はサイズが大きいものの割合が多く、染色体切断以外の作用で引き起こされたと推定した。本試験では、先の試験と同じ条件で小核試験及び*in vivo*染色体異常試験（染色体切断検出）を同時に実施し、染色体切断の可能性について確認した。

試験方法：7～8週齢のICR系雄マウス（体重：31.5～39.4g）を1群5匹用い、コーンオイルに懸濁させた検体を600mg/kgの用量で単回経口投与して、24、36、48、60および72時間後に屠殺した。屠殺後大腿骨を摘出して常法に従い骨髓細胞の染色体標本、塗抹標本作製し、顕微鏡下で観察した。

試験結果：試験結果を次頁に示す。

36、48および60時間処理群で溶媒対照群と比較し、有意な小核の出現頻度の増加がみられたが、いずれの処理群でも染色体異常の出現頻度の増加は認められなかった。その際、出現した小核はサイズの大きなものの割合が38～60%と高値を示した。

フラメトピル原体と同等に、紡錘糸形成阻害物質であるピンクリスチン投与群では、小核の出現頻度の増加がみられたが、染色体異常の出現頻度の増加はみられず、サイズの大きな小核も34～53%と高値を示した。

一方、染色体切断物質であるシクロホスファミド投与群では、小核出現頻度、染色体異常出現頻度が共に増加し、大きなサイズの小核はほとんど認められなかった(1%)。

以上の結果から、フラメトピル原体は小核を誘発するが、染色体異常を誘発せず、染色体切断作用はないと結論した。また、本物質は、紡錘糸形成阻害物質に類似した細胞分裂過程への作用により小核を誘発すると推察された。

本表は記載された情報に係る権利及び内容の責任は住友化学株式会社にある。

薬物	投与量 (mg/kg)	投与 経路	処理 時間 (hr)	動物 数	小核試験		染色体異常試験									
					MNPCE/PCE ^{a)} (%)	MNPCE数 合計 ≥1/4 ^{b)} (%)	異常細胞数(%)		異常出現頻度 ^{d)}							
							-GAP ^{c)}	+GAP ^{c)}	cig	ctb	cte	csg	csb	cse	MA	
<試験1>																
ユーンオイル	-e)	po	24	5	0.12	6	1(17)	0.0	0.4	2	0	0	0	0	0	0
フラトビ [®] ル原体	600	po	24	5	0.12	6	0(-)	0.2	0.2	0	1	0	0	0	0	0
	600	po	36	5	0.32*	16	6(38)	0.2	0.4	1	1	0	0	0	0	0
	600	po	48	5	0.50**	25	13(52)	0.2	0.2	0	1	0	0	0	0	0
<試験2>																
ユーンオイル	-e)	po	48	5	0.18	9	1(11)	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0
フラトビ [®] ル原体	600	po	48	5	0.50**	25	14(56)	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0
	600	po	60	5	0.40*	20	12(60)	0.0	0.2	1	0	0	0	0	0	0
	600	po	72	5	0.00**	0	0(-)	0.0	0.4	2	0	0	0	0	0	0
シクロホスファミド	80	po	24	5	3.06**	153	2(1)	11.8**	14.4**	36	101	16	2	4	0	3
生理食塩水	-e)	ip	24	5	0.08	4	1(25)	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0
ビソクリアチン	0.1	ip	24	5	7.98**	399	210(53)	0.0	0.4	2	0	0	0	0	0	0
	0.1	ip	36	5	7.26**	363	169(47)	0.0	0.4	1	0	0	1	0	0	0
	0.1	ip	48	5	1.24**	62	21(34)	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0

a) PCE : 多染性赤血球 MNPCE : 小核を有する多染性赤血球
1個体につき、1000個の多染性赤血球を観察した。
b) 小核の大きさが赤血球の直径の1/4以上のものを示した。
c) -GAP : ギヤップを異常に含めない場合 +GAP : ギヤップを異常に含める場合
d) cig : 染色体分体ギヤップ、ctb : 染色体分体切断、cte : 染色体分体交換、csg : 染色体ギヤップ、csb : 染色体切断、cse : 染色体交換、
MA : 10個以上の異常を持つ細胞
e) 10mL/kg

* : p<0.05, ** : p<0.01 ## : p<0.01 (但し、溶媒対照群と比較して有意な減少)
フラメトピル処理群は溶媒対照群(コーンオイル)と比較して統計処理を実施した。
ビソクリスチン処理群は溶媒対照群(生理食塩水)と比較して統計処理を実施した。
小核を有する多染性赤血球の出現頻度についてはKastenbaumとBowmanらの方法に従い、染色体異常を有する細胞の数については χ^2 検定を行った。

(4) フラメトビル原体のマウスを用いた小核試験

—CREST抗体によるセントロメア含有小核の検出—

(小核誘発機構検討試験)

(資料11-4)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1994年

検体：フラメトビル原体

試験目的：先に実施した小核試験（資料9-3）において、雄マウスに小核誘発性が認められたが、その小核はサイズが大きいものの割合が多く、紡錘糸形成阻害に代表される間接的作用によって引き起こされたと推定した。本試験では、先の試験と同じ条件で小核試験を実施し、生じた小核のセントロメア含有率を測定し、紡錘糸形成阻害と類似した作用を有するかどうかの可能性について確認した。

試験方法：8週齢のICR系雄マウス（体重：31.1～37.0g）を1群4-5匹用い、コーンオイルに懸濁させた検体を600mg/kgの用量で単回経口投与して、48時間後に屠殺した。屠殺後大腿骨を摘出し、骨髓細胞の塗抹標本を作製して、常法に従った小核の観察と、抗セントロメア抗体（CREST抗体）を用いたセントロメア含有小核の検出を、顕微鏡下で実施した。

試験結果：試験結果を次頁に示す。

フラメトビル原体の小核出現頻度は溶媒対照群と比較して統計的に有意な増加を示し、サイズの大きな小核の割合が59%、セントロメア含有小核の割合が29%を示した。染色体切断物質であるマイトマイシンC、紡錘糸形成阻害物質であるピンクリスチンを用いた試験では、前者はサイズの大きな小核の割合が0%、セントロメア含有小核の割合が5%であったのに対し、後者は各々61%、32%であった。フラメトビル原体の結果は、ほぼピンクリスチンのそれに一致した。

以上のように、小核のサイズ、セントロメア含有率において、フラメトビル原体は紡錘糸形成阻害物質のピンクリスチンと類似した。従って、フラメトビル原体は紡錘糸形成阻害など細胞分裂過程への作用によって小核を誘発したことが示唆された。

薬物	投与量 (mg/kg)	投与 経路	処理 時間 (hr)	動物 数	ギムザ染色		蛍光抗体染色	
					MNPCE/PCE ^{a)} (%)	MNPCE数 合計 $\geq 1/4^b$ (%)	観察した 小核の数	CREST 陽性 陽性率 (%)
コロンオイル	—	po	48	5	0.14 ± 0.09	7 0 (0)	30	6 20
フラムビドル原体	600	po	48	5	0.88 ± 0.68**	44 26 (59)	55	16 29
ヒンクリスチン	0.1	ip	24	5	5.08 ± 1.64**	254 156 (61)	60	19 32
アトマイシンC	2	ip	24	4	10.10 ± 1.48**	404 0 (0)	60	3 5

a) PCE : 多染性赤血球 MNPCE : 小核を有する多染性赤血球
1個体につき、1000個の多染性赤血球を観察した。

b) 小核の大きさが赤血球の直径の1/4以上のものを示した。

* : p<0.05, ** : p<0.01

ギムザ染色のデータに関しては、溶媒対照群 (コロンオイル) と比較してKastenbaumとBowmanらの方法に従い統計処理を実施した。

B. 代謝物を用いた毒性試験成績

(1) 急性毒性

①フラメトピルの植物中の代謝物658-HKの Mausにおける経口投与による

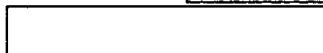
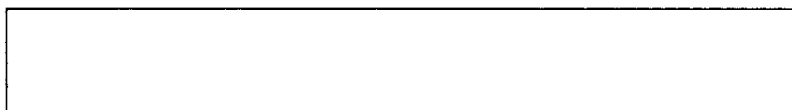
急性毒性試験

(資料代1-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1993年

検 体：658-HK (フラメトピルの植物中の代謝物)



供試動物：ICR系 Maus、6週齢、体重；雄24.5~29.9g、雌20.0~23.7g、1群雌雄各5匹

観察期間：7日間

試験方法：2段階の用量を設定した投与群を設けた。

投与方法：検体は0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、約20時間絶食した Mausに10mL/kgの割合で単回経口投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を7日間観察した。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量(mg/kg)	雌雄共；600、1200
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共；>1200
死亡開始時間および終了時間	雌雄共；死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共；投与後2時間から発現、投与翌日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌雄共；<600
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌雄共；1200

中毒症状としては、自発運動減少を認めたのみであった。

②フラメトピルの植物中の代謝物658-ALの Mausにおける経口投与による
急性毒性試験

(資料 代1-2)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1993年

検 体：658-AL (フラメトピルの植物中の代謝物)

供試動物：ICR系マウス、6週齢、体重；雄26.2~29.6g、雌20.2~24.3g、1群雌雄各5匹

観察期間：7日間

試験方法：2段階の用量を設定した投与群を設けた。

投与方法：検体は0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、約20時間絶食したマウスに10mL/kg
の割合で単回経口投与した。

観察・検査項目：中毒症状および生死を7日間観察した。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量(mg/kg)	雌雄共；600、1200
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共；>1200
死亡開始時間および終了時	雌雄共；死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共；投与後2時間から発現、 投与後4時間に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌雄共；<600
死亡例の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雌雄共；1200

中毒症状としては、自発運動減少を認めたのみであった。

(2) 変異原性

①フラメトピルの植物中の代謝物である658-HKの細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 代2-1)

試験機関 : 住友化学工業株式会社

報告書作成年 : 1993年

検 体 : 658-HK

試験方法 : ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA100、TA98、TA1535、TA1537株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2uvrA株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9Mix) の存在下および非存在下でAmesらの方法で変異原性を検討した。
溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

試験結果 : 試験結果を次頁にまとめた。

S9Mix存在下および非存在下ともに検体処理群の復帰変異コロニー数が溶媒対照値の2倍を越えて濃度依存的に増加することはなかった。

一方、S9Mix非存在下および存在下の各菌株に対する陽性対照である2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジンおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の明瞭な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下では、658-HKには変異原性はないと結論した。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9Mix	復帰変異コロニー数/プレート ^{a)}				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 ^{b)}		—	87	9	20	18	8
658-HK	156	—	85	9	17	24	7
	313	—	100	5	16	19	5
	625	—	101	8	15	14	8
	1250	—	93	9	15	21	5
	2500#	—	101	8	16	19	4
	5000#	—	77*	8*	13*	13*	6*
陽性対照		—	784 ^{c)}	271 ^{d)}	200 ^{e)}	250 ^{e)}	430 ^{f)}
溶媒対照 ^{b)}		+	83	10	29	32	11
658-HK	156	+	83	7	22	29	6
	313	+	84	8	21	26	10
	625	+	87	7	20	25	7
	1250	+	93	12	29	25	13
	2500#	+	90	8	20	25	8
	5000#	+	78*	7*	14*	29*	7*
陽性対照		+	583 ^{g)}	178 ^{h)}	636 ⁱ⁾	218 ^{j)}	119 ^{b)}

a) : 数値は2枚のプレートの平均値

b) : ジメチルスルホキシド

c) : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

d) : アジ化ナトリウム

0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

e) : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

f) : 9-アミノアクリジン

80 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

g) : 2-アミノアントラセン

1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

h) : 2-アミノアントラセン

2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

i) : 2-アミノアントラセン

10 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

j) : 2-アミノアントラセン

0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

: 検体の析出が認められた

* : 生育阻害作用が認められた

②フラメトピルの植物中の代謝物である658-ALの細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 代2-2)

試験機関 : 住友化学工業株式会社

報告書作成年 : 1993年

検 体 : 658-AL

試験方法 : ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium* TA100、TA98、TA1535、TA1537株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2uvrA株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9Mix) の存在下および非存在下でAmesらの方法で変異原性を検討した。
溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

試験結果 : 試験結果を次頁にまとめた。

S9Mix存在下および非存在下ともに検体処理群の復帰変異コロニー数が溶媒対照値の2倍を越えて濃度依存的に増加することはなかった。

一方、S9Mix非存在下および存在下の各菌株に対する陽性対照である2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジンおよび2-アミノアントラセンでは復帰変異コロニー数の明瞭な増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下では、658-ALには変異原性はないと結論した。

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9Mix	復帰変異コロニー数/プレート ^{a)}				
			塩基対置換型			7- μM 型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 ^{b)}		—	89	5	15	22	4
658-AL	156	—	97	5	15	20	6
	313#	—	110	6	12	23	4
	625#	—	94	7	19	23	2
	1250#	—	100	7	22	29	7
	2500#	—	111	6	19	19	5
	5000#	—	112	8	16	23	5
陽性対照		—	754 ^{c)}	291 ^{d)}	193 ^{c)}	259 ^{e)}	487 ^{f)}
溶媒対照 ^{b)}		+	80	10	23	28	12
658-AL	156	+	79	10	33	23	9
	313#	+	80	7	22	29	8
	625#	+	95	8	27	32	10
	1250#	+	99	11	30	23	12
	2500#	+	95	13	28	29	18
	5000#	+	100	8	25	22	11
陽性対照		+	535 ^{g)}	195 ^{h)}	573 ⁱ⁾	193 ^{j)}	98 ^{h)}

a): 数値は2枚のプレートの平均値

b): ジメチルスルホキシド

c): 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

d): アジ化ナトリウム

0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

e): 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

f): 9-アミノアクリジン

80 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

g): 2-アミノアントラセン

1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

h): 2-アミノアントラセン

2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

i): 2-アミノアントラセン

10 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

j): 2-アミノアントラセン

0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

#: 検体の析出が認められた

C. 製剤を用いた毒性試験成績

(1) フラメトピル1.5%粒剤 (リンバー粒剤)

①フラメトピル1.5%粒剤のラットを用いた経口投与による急性毒性試験

(資料 製1-1)

試験機関: (株) ボソリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 [GLP対応]

検 体: フラメトピル1.5%粒剤

組 成: フラメトピル原体

鉱物質微粉等



供試動物: SD系ラット、7週齢、体重; 雄230~248g、雌153~169g、1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

試験方法: 5000mg/kgの用量を設定した投与群および対照群を設けた。

投与方法: 検体は注射用蒸留水に懸濁し、約16時間絶食したラットに20mL/kgの割合で単回経口投与した。対照群には注射用蒸留水を20mL/kgの割合で同様に投与した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10、14日に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共; 0、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共; >5000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共; 死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共; 症状の発現なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 5000

中毒症状および死亡は認められず、体重および剖検においても検体投与に起因する変化は認められなかった。

②フラメトピル1.5%粒剤のマウスを用いた経口投与による急性毒性試験

(資料 製1-2)

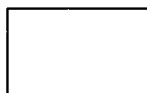
試験機関: (株)ボソリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 [GLP対応]

検 体: フラメトピル1.5%粒剤

組 成: フラメトピル原体

鉍物質微粉等



供試動物: ICR系マウス、7週齢、体重;雄27.7~30.8g、雌21.0~22.8g、1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

試験方法: 5000mg/kgの用量を設定した投与群および対照群を設けた。

投与方法: 検体は注射用蒸留水に懸濁し、約16時間絶食したマウスに20mL/kgの割合で単回経口投与した。対照群には注射用蒸留水を20mL/kgの割合で同様に投与した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共; 0、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共; >5000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共; 死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共; 症状の発現なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 5000

中毒症状および死亡は認められず、体重および剖検においても検体投与の影響は認められなかった。

③フラメトピル1.5%粒剤のラットを用いた経皮投与による急性毒性試験

(資料 製1-3)

試験機関: (株) ポソリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 [GLP対応]

検 体: フラメトピル1.5%粒剤

組 成: フラメトピル原体

鉍物質微粉等

供試動物: SD系ラット、7週齢、体重; 雄275~284g、雌176~190g、1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

投与方法: 検体は等量の注射用蒸留水と混合し、ラットの剪毛した背部皮膚(約20cm²)に4g/kgの割合で塗布し、サージカルテープで24時間閉塞した。24時間後、検体が残存しないように水に浸したガーゼで塗布面を拭き取った。対照群は注射用蒸留水のみを塗布したほかは上記と同様に処置した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共; 0、2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共; >2000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共; 死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共; 症状の発現なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 2000

中毒症状および死亡は認められず、体重および剖検においても検体投与の影響は認められなかった。また、投与部位への刺激性も認められなかった。

④フラメトピル1.5%粒剤のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 製1-4)

試験機関: (株) ポソリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 (GLP対応)

検 体: フラメトピル1.5%粒剤

組 成: フラメトピル原体
 鉍物質微粉等

試験動物: 日本白色種 雌性ウサギ、15週令、体重; 2.60~2.90kg、1群6匹

観察期間: 検体除去後72時間観察

試験方法: 剪毛したウサギの背部を正中線をはさんで2分し、その一方に検体を、片方を対照とした。検体は0.5gを同量の注射用水で湿らせリント布(2.5×2.5cm)に展延して貼付し、油紙で被覆した後、弾性包帯で4時間閉塞適用した。適用4時間後リント布を取り除き、皮膚に付着した検体を注射用水を含ませた脱脂綿で拭き取った。

観 察: 貼付除去の1、24、48及び72時間後に局所を観察し、局所反応はDraizeの判定基準に従って点数化し、一次刺激率を求めて評価した。

結 果: 観察した刺激性変化の評点は以下の通りである。

動物番号	項目	最高 評点*	暴露後時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
1101	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1102	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1103	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1104	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1105	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1106	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合 計	紅斑・痂皮形成	24	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0
平 均	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

*判定基準の最高評点

観察時期を通じて紅斑、浮腫等の刺激性反応は認めず、一次刺激率は0であった。

以上の結果から、フラメトピル1.5%粒剤はウサギの皮膚に対して刺激性なしと判定した。

⑤フラメトピル1.5%粒剤のウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料 製1-5)

試験機関：(株)ボゾリサーチセンター

報告書作成年：1994年 (GLP対応)

検 体：フラメトピル1.5%粒剤

組 成：フラメトピル原体
 鉍物質微粉等

試験動物：日本白色種 雌性ウサギ、15週令、体重；2.81~3.09kg、1群6匹

観察期間：適用後72時間観察

試験方法：検体0.1gをウサギの一方の眼（下眼瞼結膜囊）に適用し、適用後に洗浄処置を行わなかった。他眼は対照とした。

観 察：適用1、24、48及び72時間後に角膜、虹彩、結膜を検眼鏡を用いて観察し、Draizeの判定基準に従い、局所反応を点数化して記録した。刺激性の評価は、Kay and Calandraの方法に従って行った。

結 果：刺激性変化の評点は以下の通りであった。

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 淨 群	動物 番号 1101	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0
			面積	4	0	1	1	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	2	1	0
			浮腫	4	1	1	0	0
			眼脂分泌	3	2	1	0	0
	動物 番号 1102	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0
			面積	4	0	1	1	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
結 膜		潮紅	3	1	1	1	0	
		浮腫	4	1	1	0	0	
		眼脂分泌	3	2	1	0	0	
動物 番号 1103	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	
		面積	4	0	2	1	0	
	虹 彩		2	0	1	0	0	
	結 膜	潮紅	3	1	2	1	0	
		浮腫	4	1	1	0	0	
		眼脂分泌	3	2	1	0	0	

※判定基準の最高評点

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 淨 群	動物 番号 1104	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0
			面積	4	0	1	1	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1	0	0
			浮腫	4	1	1	0	0
			眼脂分泌	3	2	1	0	0
	動物 番号 1105	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0
			面積	4	0	1	1	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	2	1	0
			浮腫	4	1	1	0	0
			眼脂分泌	3	2	1	0	0
	動物 番号 1106	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1	1	0
			浮腫	4	1	1	0	0
			眼脂分泌	3	2	1	0	0
合 計*		660	48	77	35	0		
平 均		110	8.00	12.83	5.83	0		

※判定基準の最高評点 * Draize 法による評価点 (最高 110 点/匹)

適用後、強さ 1、広さ 1～2 の角膜混濁、強さ 1 の虹彩充血、強さ 1～2 の結膜潮紅、強さ 1 の結膜浮腫及び強さ 1～2 の眼脂分泌を認めた。これらの局所反応は徐々に軽減し、72時間後には全ての局所反応が消失した。眼のその他の変化としては、全例に閉眼を観察した。

以上の結果より、軽度の刺激性ありと判定された。

⑥フラメトピル 1.5%粒剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験 (Buehler 法)

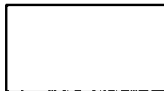
(資料 製 1-6)

試験機関：(株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年：1994 年 [GLP 対応]

検 体：フラメトピル 1.5%粒剤

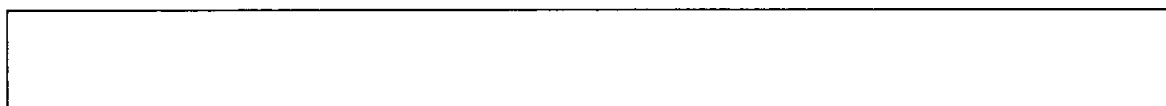
組 成：フラメトピル原体
 鉍物質微粉等



試験動物：ハートレー系雌性モルモット、6 週令、体重；317~372g、1 群 20 匹

観察期間：感作開始後 30 日間観察

試験方法：農林水産省の基準に従って Buehler 法 (貼付法) で実施した。



感作；1 群 20 匹のモルモットの腹部側を剪毛し、検体 0.5g を同量の注射用水にて湿らせたパッチ (直径 2.5cm) に塗布して 6 時間閉塞貼付した、感作は、3 回 (週 1 回、1 週間間隔) 行った。尚、1.0% DNCB のオリーブ油溶液 0.5mL を上記同様に適用した。パッチを取り除いた後、検体群は注射用水、陽性対照群はアセトンで適用部位を清拭した。

誘発；最終感作の 2 週間後に、検体感作群及び非感作群には検体を感作と同様の方法で適用した。DNCB 感作群及び非感作群には、0.25% DNCB オリーブ油溶液 0.5mL を適用した。

観察；それぞれの感作及び誘発適用の 24 時間後及び 48 時間後に局所反応の強さを紅斑と浮腫に分け、以下の基準で点数化して評価した。

0；変化なし、1；非常に軽度な反応、2；はっきりした紅斑、軽度浮腫

3；中等度ないし高度紅斑、中等度浮腫、4；高度紅斑からわずかな痂皮形成、高度浮腫

体重測定を感作開始日、最終感作日、誘発日及び誘発後 2 日に行った。

試験結果：観察した皮膚感作性反応は次頁の表のとおりである。

	群		供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)					
	感作	惹起		皮膚反応の種類	24時間後					48時間後					24時間	48時間			
					皮膚反応評点					皮膚反応評点									
					0	1	2	3	4	計	0	1	2	3			4	計	
検体	100% 検体	100% 検体	20	紅斑	20	0	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
				浮腫	20	0	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0		
	媒体	100% 検体	20	紅斑	20	0	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
				浮腫	20	0	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0		
陽性対照	1% DNCB	0.25% DNCB	10	紅斑	0	3	5	2	0	10/10	0	7	3	0	0	10/10	100	100	
				浮腫	4	6	0	0	0	6/10	7	3	0	0	0	3/10			
	媒体	0.25% DNCB	10	紅斑	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10	0	0	
				浮腫	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10			

* : 同時に実施したフラメトピル 15%水和剤の試験(資料 製3-5)の陽性対照群を採用

検体感作群では、誘発 24 及び 48 時間後の観察において、非感作群と同様に皮膚反応は認められなかった。

一方、陽性対照の DNCB 感作群では、誘発 24 時間後に全例に軽度、中等度、強度の紅斑、内 6 例に軽度の浮腫を、48 時間後には全例に軽度、中等度の紅斑、内 3 例に軽度の浮腫を認めたが、DNCB 非感作群ではいずれの観察時期においても局所反応は認められなかった。

各試験とも観察期間中、体重に異常を認めなかった。

以上の結果より、フラメトピル 1.5% 粒剤は Buehler 法 (貼付法) で皮膚感作性なしと判定した。

(2) フラメトピル4%粒剤 (リンバー箱粒剤)

① フラメトピル4%粒剤のラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 製2-1)

試験機関：(株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年：1998年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4%粒剤 (商品名：リンバー箱粒剤)

組 成：フラメトピル原体

鉱物質微粉等

供試動物：Crj：CD (SD) 系ラット、7週齢、体重；雄 199~216g、雌 141~156g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：5000mg/kgの用量を設定した投与群および対照群を設けた。

投与方法：検体を注射用水に懸濁し、約16時間絶食したラットに25mL/kgの割合で単回強制経口投与した。対照群には注射用水を25mL/kgの割合で同様に投与した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。

体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に測定し、観察期間終了時に生存していた全動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共；0、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共；>5000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共；死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雄；投与後5分から発現、投与翌日に消失 雌；投与後5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)	雌雄共；<5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共；5000

中毒症状としては、雌雄で腹臥、呼吸数の減少、体温低下が観察された。

体重は、雌雄で投与翌日に減少あるいは増加抑制が認められたものの、その後はほぼ順調に増加した。

剖検では、検体投与の影響は認められなかった。

②フラメトピル4%粒剤のマウスを用いた急性経口毒性試験

(資料 製2-2)

試験機関：(株) ポソリサーチセンター

報告書作成年：1998年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4%粒剤 (商品名：リンバー箱粒剤)

組 成：フラメトピル原体
 鉍物質微粉等



供試動物：Crj：CD-1(ICR)系マウス、7週齢、体重；雄28.0~32.4g、雌20.5~26.3g、
 1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：5000mg/kgの用量を設定した投与群および対照群を設けた。

投与方法：検体を注射用水に懸濁し、約16時間絶食したマウスに25mL/kgの割合で単回強制経口投与した。対照群には注射用水を25mL/kgの割合で同様に投与した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。

体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に測定し、観察期間終了時に生存していた全動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共；0、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共；>5000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共；死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共；投与後約1時間に発現、 投与後約4時間に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共；<5000
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共；5000

中毒症状としては、雌雄で自発運動の減少が観察された。

体重および剖検では、検体投与の影響は認められなかった。

③フラメトピル4%粒剤のラットを用いた急性経皮毒性試験

(資料 製2-3)

試験機関：(株) ポソリサーチセンター

報告書作成年：1998年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4%粒剤 (商品名：リンバー箱粒剤)

組 成：フラメトピル原体

鉍物質微粉等



試験動物：Crj：CD(SD)系ラット、7週齢、体重；雄254~284g、雌180~206g、

1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

投与方法：1匹あたり2000mg/kgの割合で秤量した検体をリント布(約20cm²)にのせ、0.5mLの蒸留水で湿らせた後、剪毛した背部皮膚に貼付した。サージカルテープで24時間閉塞した後、検体が残存しないように温水に浸したガーゼで貼付部位を拭き取った。

対照群には蒸留水のみを同様に塗布した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。

体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に測定し、観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共；0、2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共；>2000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共；死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共；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)	雌雄共；2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共；2000

中毒症状および死亡は認められず体重および適用部位の皮膚を含めた剖検においても検体投与の影響は認められなかった。

④フラメトピル4%粒剤のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 製2-4)

試験機関：(株) ポソリサーチセンター

報告書作成年：1998年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4%粒剤 (商品名：リンパー箱粒剤)

組 成：フラメトピル原体

鉍物質微粉等



試験動物：日本白色種雌性ウサギ、14週齢、体重 2.38~2.72kg、1群6匹

観察期間：検体除去後72時間観察

試験方法：剪毛したウサギの背部を正中線をはさんで2分し、その一方に検体を、片方を対照とした。検体は0.5gを同量の注射用水で湿らせリント布(2.5×2.5cm)に展延して貼付し、油紙で被覆した後、弾性包帯で4時間閉塞適用した。適用4時間後リント布を取り除き、皮膚に付着した検体を注射用水を含ませた脱脂綿で拭き取った。

観察項目：検体除去1、24、48及び72時間後に塗布部位の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)の有無等を観察し、Draize基準に従って採点した。

試験結果：観察した刺激性変化の評点は以下の通りであった。

動物番号	項目	最高 評点*	暴露後時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
1101	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1102	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1103	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1104	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1105	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1106	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合 計	紅斑・痂皮形成	24	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0
平 均	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

※判定基準の最高評点

検体投与部位に何ら刺激性変化はみられず、一般状態にも特記すべき変化はみられなかった。

以上の結果から、本剤はウサギの皮膚に対して、刺激性なしと判定した。

⑤フラメトピル4%粒剤のウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料 製2-5)

試験機関：(株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年：1998年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4%粒剤 (商品名：リンパー箱粒剤)

組 成：フラメトピル原体
 鉍物質微粉等

試験動物：日本白色種雌性ウサギ、14週齢、体重 2.68~2.92kg、1群6匹

観察期間：適用後72時間観察

試験方法：検体0.1gを左眼に投与した。

観察項目：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観察し、Draizeの基準に従って採点した。

試験結果：観察した刺激性変化の評点は以下の通りである。

項目			最高 評点*	適用後時間				
				1時間	24時間	48時間	72時間	
非 洗 淨 群	動物 番号 1101	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結 膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
			眼脂分泌	3	1	0	0	0
	動物 番号 1102	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結 膜	発赤	3	1	0	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
			眼脂分泌	3	2	0	0	0
	動物 番号 1103	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0
		結 膜	発赤	3	1	0	0	0
浮腫			4	1	0	0	0	
眼脂分泌			3	2	0	0	0	
動物 番号 1104	角膜混濁	程度	4	0	1	0	0	
		面積	4	0	1	0	0	
	虹 彩		2	0	0	0	0	
	結 膜	発赤	3	1	1	1	0	
		浮腫	4	1	0	0	0	
		眼脂分泌	3	2	0	0	0	

※判定基準の最高評点

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 淨 群	動物 番号 1105	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	
			面積	4	0	1	1	0	
		虹 彩			2	0	0	0	0
		結 膜	発赤	3	1	1	0	0	
			浮腫	4	1	0	0	0	
			眼脂分泌	3	2	0	0	0	
	動物 番号 1106	角膜混濁	程度	4	0	1	0	0	
			面積	4	0	1	0	0	
		虹 彩			2	0	0	0	0
		結 膜	発赤	3	1	1	0	0	
			浮腫	4	1	0	0	0	
			眼脂分泌	3	2	0	0	0	
	合 計*				660	46	21	7	0
	平 均				110	7.7	3.5	1.2	0

※判定基準の最高評点 *Draize法による評価点 (最高110点/匹)

角膜混濁、結膜発赤、浮腫及び眼脂分泌がみられ、72時間後には全て消失した。判定基準/評点の平均値の最大値は7.7であり、軽度の刺激性とみなされた。

以上の結果から、本剤はウサギの眼に対して、軽度の刺激性があると考えられた。

⑥フラメトピル4%粒剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験

(資料 製2-6)

試験機関：(株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年：1998年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4%粒剤 (商品名：リンパー箱粒剤)

組 成：フラメトピル原体

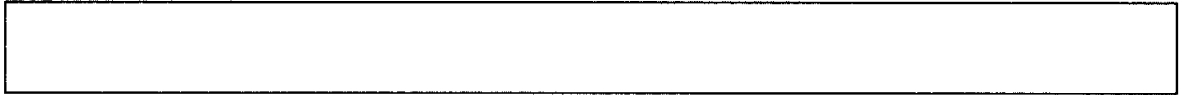
鉍物質微粉等



試験動物：ハートレー系雌性モルモット、7週齢、体重 317~408g、1群20匹

観察期間：感作開始後30日間観察

試験方法：Buehler法



感作；検体の原末0.2gを注射用水で湿らせた直径2.5cmのパッチを用いて剃毛した動物の左側胴部に貼付し、6時間後に除去した。同様の操作を7日毎に合計3回実施した。

誘発；最終感作の13日後に、検体の原末0.2gを注射用水で湿らせた直径2.5cmのパッチを用いて剃毛した動物の右側胴部に貼付し、6時間後に除去した。

陽性対照；試験実施機関で1年に1回実施しているDNCBを用いた背景データ収集試験の結果を引用した。

観察項目；誘発除去24及び48時間後に適用部位の紅斑及び浮腫の有無等を以下のDraizeの基準により肉眼的に観察した。

0；変化なし、1；非常に軽度な反応、2；はっきりした紅斑、軽度浮腫

3；中等度ないし高度紅斑、中等度浮腫、4；高度紅斑からわずかな痂皮形成、高度浮腫

試験結果；各観察時間における感作変化が認められた動物数を次頁の表に示す。

1. 試験結果

群	感作		惹起	供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)			
					皮膚反応の種類	24時間後					計	48時間後					24時間	48時間
						皮膚反応評点						皮膚反応評点						
						0	1	2	3	4		0	1	2	3	4		
検体	100% 検体	100% 検体	20	紅斑	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
				浮腫	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20		
	媒体	100% 検体	20	紅斑	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
				浮腫	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20		

2. 陽性対照 (DN CB) : 背景データ

群	感作		惹起	供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)			
					皮膚反応の種類	24時間後					計	48時間後					24時間	48時間
						皮膚反応評点						皮膚反応評点						
						0	1	2	3	4		0	1	2	3	4		
陽性対照	0.5% DN CB	0.25% DN CB	10	紅斑	0	3	5	2	0	10/10	0	3	5	2	0	10/10	100	100
				浮腫	3	7	0	0	0	7/10	6	4	0	0	0	4/10		
	媒体	0.25% DN CB	10	紅斑	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10	0	0
				浮腫	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10		

検体処理群において、感作群及び対照群とも皮膚反応は認められず、陽性率は0%であった。

以上の結果から、本剤は皮膚感作性はないものと思われる。

(3) フラメトピル4.5%粒剤 (リンバー1キロ粒剤)

①フラメトピル4.5%粒剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 製3-1)

試験実施機関：(株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年：1996年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4.5%粒剤 (商品名：リンバー1キロ粒剤)

組 成：フラメトピル原体

鉍物質微粉等



供試動物：Crj：CD(SD)系ラット、7週齢、体重；雄244~262g、雌151~168g、1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：5000mg/kgの用量を設定した投与群および対照群を設けた。

投与方法：検体は注射用水に懸濁し、約16時間絶食したラットに25mL/kgの割合で単回経口投与した。対照群には注射用水を25mL/kgの割合で同様に投与した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共；0, 5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共；>5000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共；死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共；投与後15分から発現、投与翌日に消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共；<5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共；5000

死亡は認められなかったが、中毒症状として雌雄ともに投与15分後から自発運動の減少、よろめき歩行、腹臥あるいは呼吸数の減少が認められた。それらの症状は投与翌日以降には回復した。体重では雌雄とも投与翌日に体重増加の抑制あるいは抑制傾向がみられたが、その後は対照群とほぼ同等の体重増加を示した。剖検では、検体投与による影響は認められなかった。

②フラメトピル4.5%粒剤の Maus における急性経口毒性試験

(資料 製3-2)

試験実施機関：(株) ポソリサーチセンター

報告書作成年：1996年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4.5%粒剤 (商品名：リンバー1キログラム)

組 成：フラメトピル原体

鋳物質微粉等



供試動物：Crj：CD-1 (ICR) 系 Maus、7 週齢、体重；雄30.2~33.0g、雌20.2~22.6g、

1 群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：5000mg/kgの用量を設定した投与群および対照群を設けた。

投与方法：検体は注射用水に懸濁し、約16時間絶食した Maus に25mL/kgの割合で単回経口投与した。対照群には注射用水を25mL/kg体重の割合で同様に投与した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10 および14日に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共；0, 5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共；>5000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共；死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雄；投与後30分から発現、投与翌日に消失 雌；投与後15分から発現、投与翌日に消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共；<5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共；5000

死亡は認められなかったが、中毒症状として雌雄ともに投与15分あるいは30分後から自発運動の減少、よろめき歩行が認められた。それらの症状は投与翌日以降には回復した。体重では雌雄とも投与翌日に体重増加の抑制あるいは抑制傾向がみられたが、その後は対照群とほぼ同等の体重増加を示した。剖検では、検体投与による影響は認められなかった。

③フラメトピル4.5%粒剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料 製3-3)

試験実施機関：(株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年：1996年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4.5%粒剤 (商品名：リンバー1キログラム)

組 成：フラメトピル原体

鉱物質微粉等



供試動物：Crj：CD(SD)系ラット、7週齢、体重；雄280~300g、雌194~202g、

1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

投与方法：1匹あたり2000mg/kgの割合で秤量した検体を注射用水(約1.0mL)で湿らせた後、ラットの剪毛した背部皮膚(約20cm²；4×5cm)に塗布した。塗布部位はガーゼで覆い、ポリエチレンフィルムおよびサージカルテープで24時間閉塞した。24時間の閉塞後、検体が残存しないように水に浸したガーゼで塗布面を拭き取った。対照群には約1mLの注射用水を投与群と同様に処理した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果：

投与方法	経 皮
投与量 (mg/kg)	雌雄共；0、2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共；>2000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共；死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共；投与翌日から発現、投与後7日に消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共；<2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共；2000

死亡は認められなかったが、一般症状として雌雄ともに投与翌日から塗布部位に紅斑、投与4あるいは5日後から痂皮形成が認められた。それらの症状は投与7日後には回復した。体重では、閉塞塗布により生じたストレスによる一過性の低値あるいは高値が認められたが、検体投与による影響は認められなかった。

剖検では、検体投与による影響は認められなかった。

④フラメトピル4.5%粒剤のウサギにおける皮膚及び眼に対する一次刺激性試験

(資料 製3-4)

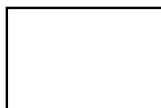
試験実施機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1996年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4.5%粒剤 (商品名：リンバー1キロ粒剤)

組 成：フラメトピル原体

鋳物質微粉等



[皮膚に対する刺激性試験]

試験動物：ニュージーランドホワイト種雌雄ウサギ、23週齢、体重 3.08~3.35kg、

1群雌雄各3匹

観察期間：検体除去後72時間観察

試験方法：粉碎した検体0.5gを生理食塩水で湿らせたリント布(2.5cm×2.5cm)に均等に展延し、そのリント布を剪毛したウサギの背部に貼付し、サージカルテープで固定し、さらに圧迫帯で4時間閉塞適用した。

適用後皮膚に付着した検体を水を含ませた脱脂綿で拭き取った後、経時的に観察した。

観 察：検体除去1、24、48及び72時間後に局所を観察した。皮膚の反応はDraizeらの方法に従って点数化し、一次刺激率を求め、皮膚に対する刺激性を評価した。

試験結果：観察した刺激反応の評点は以下の通りであった。

動物番号	項目	最高 評点*	暴露後時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
1	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮形成	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮形成	4	1	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮形成	4	1	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0
5	紅斑・痂皮形成	4	1	1	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0
6	紅斑・痂皮形成	4	1	1	1	0
	浮腫	4	1	0	0	0
合 計	紅斑・痂皮形成	24	4	2	1	0
	浮腫	24	3	0	0	0
平 均	紅斑・痂皮形成	4	0.7	0.3	0.2	0
	浮腫	4	0.5	0	0	0
一次刺激率=0.4						

※判定基準の最高評点

4時間の閉塞適用の1時間後に6例中4例に紅斑（強さ1），内3例に浮腫（強さ1）を認めた。24時間後には2例に紅斑（強さ1），48時間後には1例に紅斑（強さ1）を認めるのみになった。72時間後には全ての局所反応は消失した。

尚，一次刺激率は0.4であった。

以上の結果より、フラメトピル4.5%粒剤はウサギの皮膚に対して、ごく軽度の刺激性ありと判定した。

【眼に対する刺激性試験】

試験動物：ニュージーランドホワイト種雌雄ウサギ、2324週齢、体重 2.93~3.41kg、

非洗浄群：1群6匹、洗浄群：1群3匹

観察期間：適用後1週間観察

試験方法：検体0.1gを6匹（雄3匹，雌3匹）のウサギの片側眼（下眼瞼結膜嚢）に適用し、その後は洗浄処置を行わず経時的に観察した（非洗浄群）。また、3匹のウサギ（雄1匹，雌2匹）に検体0.1gを眼に同様に適用し、適用2分後に30秒間、水道水で洗浄した後、経時的に観察した（洗浄群）。

観察：非洗浄群及び洗浄群とも検体適用1、24、48、72、96時間後及び1週間後に角膜、虹彩及び結膜を観察し、Draizeらの方法に従って眼の局所反応を判定した。

試験結果：局所反応の評点は以下の通りであった。

項目		最高 評点※	適用後時間							
			1時間	24時間	48時間	72時間	96時間	1週間		
非 洗 浄 群	動物 番号 7	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	0	0
			面積	4	0	1	1	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1	1	1	1	0
			浮腫	4	1	1	1	0	0	0
			眼脂分泌	3	0	0	0	0	0	0
	動物 番号 8	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	0	0
			面積	4	0	1	1	0	0	0
		虹 彩		2	0	1	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1	1	1	0	0
			浮腫	4	1	1	1	0	0	0
			眼脂分泌	3	0	1	0	0	0	0
動物 番号 9	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	0	0	
		面積	4	0	1	1	0	0	0	
	虹 彩		2	0	0	0	0	0	0	
	結 膜	潮紅	3	1	1	1	1	1	0	
		浮腫	4	1	1	0	0	0	0	
		眼脂分泌	3	0	1	0	0	0	0	

※判定基準の最高評点

項目			最高 評点*	適用後時間							
				1時間	24時間	48時間	72時間	96時間	1週間		
非 洗 淨 群	動物 番号 10	角膜混濁	程度	4	0	1	1	1	0	0	
			面積	4	0	1	1	1	0	0	
		虹 彩			2	0	0	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1	1	0	0	0	
			浮腫	4	1	1	0	0	0	0	
			眼脂分泌	3	0	0	0	0	0	0	
	動物 番号 11	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	0	0	
			面積	4	0	1	1	0	0	0	
		虹 彩			2	0	0	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1	1	1	1	0	
			浮腫	4	1	1	0	0	0	0	
			眼脂分泌	3	0	1	0	0	0	0	
	動物 番号 12	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	0	0	
			面積	4	0	1	1	0	0	0	
		虹 彩			2	0	0	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1	1	1	0	0	
			浮腫	4	1	1	0	0	0	0	
			眼脂分泌	3	0	0	0	0	0	0	
合 計*			660	24	65	46	15	6	0		
平 均			110	4	10.8	7.7	2.5	1	0		
洗 淨 群	3匹 平均	角膜混濁	程度	3	0	0.7	0	0	0	0	
			面積	3	0	0.7	0	0	0	0	
		虹 彩			2	0	0.3	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1.3	1	0.3	0.3	0	
			浮腫	4	1	1.7	0	0	0	0	
			眼脂分泌	3	0	1.3	0	0	0	0	
		合 計*			110	4	13.7	2	0.7	0.7	0

※判定基準の最高評点 * Draize法による評価点 (最高110点/匹)

非洗淨群；適用1時間後に全例で結膜潮紅，浮腫（強さ1）を認めた。適用24時間後には全例で角膜混濁（強さ1，広さ1），結膜潮紅，浮腫（強さ1）を認め，その内3例で眼脂分泌（強さ1），1例で虹彩充血（強さ1）を認めた。これらの局所反応は，その後徐々に軽減し，96時間後には3例に結膜潮紅（強さ1）を認めるのみとなり，1週間後には全ての局所反応は消失した。

洗淨群；適用1時間後に全例で結膜潮紅，浮腫（強さ1）を認めた。適用24時間後には全例で結膜潮紅，浮腫（強さ1～2）及び眼脂分泌（強さ1～2）を認め，その内2例で角膜混濁（強さ1，広さ1），1例で虹彩充血

(強さ1)を認めた。適用48時間後には結膜潮紅(強さ1)のみを全例に認め、72時間後及び96時間後にはそれぞれ1例に認めるのみとなった。適用1週間後には全ての局所反応は消失した。

以上の結果より、フラメトピル4.5%粒剤はウサギの眼に対して、非洗浄群、洗浄群とも軽度の刺激性ありと判定された。尚、洗浄効果は認められなかった。

⑤フラメトピル4.5%粒剤のモルモットにおける皮膚感作性試験 (Buehler法)

(資料 製3-5)

試験実施機関：(株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年：1996年 [GLP対応]

検 体：フラメトピル4.5%粒剤 (商品名：リンバー1キロ粒剤)

組 成：フラメトピル原体

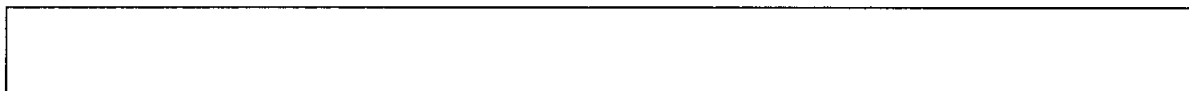
鉍物質微粉等



試験動物：ハートレー系雌性モルモット、6週齢、体重；323~412g、1群10~20匹

観察期間：感作開始後30日間観察

試験方法：農林水産省の基準に従ってBuehler法 (貼付法) で実施した。



感作；1群20匹のモルモットの左側胴部 (5×5cm) を剪毛し、感作の適用部位とした。

微粉化した検体0.2gを注射用水で湿らせたパッチ (直径2.5cm) に塗布し、適用部位に6時間閉塞貼付した。その後、パッチを取り除き、注射用水で適用部位を清拭した。この感作のための適用は7日毎に3回行った。

尚、1%DNCBオリーブ油溶液0.2mLを上記と同様に適用した。また、非感作群として、注射用水またはオリーブ油を上記と同様に適用した。

惹起；最終感作後14日にモルモットの右側胴部 (5×5cm) を剪毛し、惹起の適用部位とした。

惹起は、検体感作群及び非感作群には微粉化した検体0.2gを感作と同様の方法で1回適用した。DNCB感作群及び非感作群には、0.25%DNCBオリーブ油溶液0.2mLを1回適用した。

観察；皮膚反応の観察は、惹起後24及び48時間に適用部位における局所反応の強さを紅斑・痂皮形成と浮腫に分け、以下の基準で点数化して評価した。

0；変化なし、1；非常に軽度な反応、2；はっきりした紅斑、軽度浮腫、

3；中等度ないし高度紅斑、中等度浮腫、4；高度紅斑からわずかな痂皮形成、高度浮腫

一般状態については、感作開始日から惹起後の皮膚観察終了日まで、毎日観察した。

また、体重については、感作開始日 (0日)、最終感作日 (14日)、惹起日 (28日) 及び惹起後2日 (30日) に測定した。

試験結果；観察した皮膚感作性反応は次頁の表の通りであった。

	群		供試動物数	感作反応動物数											陽性率 (%)			
	感作	惹起		皮膚反応の種類 ^{a)}	24時間後					計	48時間後					24時間	48時間	
					皮膚反応評点						皮膚反応評点							
					0	1	2	3	4		0	1	2	3	4			
検体	100% 検体	100% 検体	20	ER	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
				ED	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20		
	媒体	100% 検体	20	ER	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
				ED	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20		
陽性 対照	1% DNCB	0.25% DNCB	10	ER	0	10	0	0	0	10/10	0	10	0	0	0	10/10	100	100
				ED	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10		
	媒体	0.25% DNCB	10	ER	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10	0	0
				ED	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10		

a) ER ; 紅斑・痂皮形成、ED ; 浮腫

検体感作群、非感作群とも惹起後24及び48時間の観察において何ら皮膚反応を認めなかった。一方、陽性対照のDNCB感作群では、惹起後24及び48時間の観察において、全例に非常に軽度の紅斑（評点1）を認めた（陽性率:100%）。DNCB非感作群では、惹起後の観察では何ら皮膚反応は見られなかった。尚、観察期間中の一般状態には異常は認められず、体重にも異常は見られなかった。

以上の結果より、フラメトピル4.5%粒剤は、本試験条件下(Buehler法)では皮膚感作性なしと判定した。

(4) フラメトピル0.5%粉剤 (リンバー粉剤)

①フラメトピル0.5%粉剤のラットを用いた経口投与による急性毒性試験

(資料 製4-1)

試験機関: (株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 [GLP対応]

検 体: フラメトピル0.5%粉剤

組 成: フラメトピル原体
 鉍物質微粉等

供試動物: Crj: CD(SD)系ラット、7週齢、体重; 雄240~245g、雌154~162g、

1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

試験方法: 5000mg/kgの用量を設定した投与群および対照群を設けた。

投与方法: 検体は0.5%メチルセルロース (0.5%MC) 水溶液に懸濁し、約16時間絶食したラットに20mL/kgの割合で単回経口投与した。対照群には0.5%MC水溶液を20mL/kgの割合で同様に投与した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共; 0、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共; >5000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共; 死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共; 症状の発現なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 5000

中毒症状および死亡は認められず、体重および剖検においても検体投与の影響は認められなかった。

②フラメトピル0.5%粉剤のマウスを用いた経口投与による急性毒性試験

(資料 製4-2)

試験機関: (株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 [GLP対応]

検 体: フラメトピル0.5%粉剤

組 成: フラメトピル原体
 鉍物質微粉等

供試動物: Crj: CD-1 (ICR) 系マウス、7週齢、体重; 雄27.5~29.4g、雌21.4~24.0g、

1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

試験方法: 5000mg/kgの用量を設定した投与群および対照群を設けた。

投与方法: 検体は0.5%メチルセルロース (0.5%MC) 水溶液に懸濁し、約16時間絶食したマウスに20mL/kgの割合で単回経口投与した。対照群には0.5%MC水溶液を20mL/kgの割合で同様に投与した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共; 0, 5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共; >5000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共; 死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共; 症状の発現なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 5000

中毒症状および死亡は認められず、体重および剖検においても検体投与の影響は認められなかった。

③フラメトピル0.5%粉剤のラットを用いた経皮投与による急性毒性試験

(資料 製4-3)

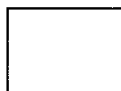
試験機関: (株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 [GLP対応]

検 体: フラメトピル0.5%粉剤

組 成: フラメトピル原体

鉍物質微粉等



供試動物: Crj: CD(SD)系ラット、7週齢、体重: 雄;268~288g、雌;174~185g、

1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

投与方法: 検体は0.5%メチルセルロース(0.5%MC)水溶液に懸濁し(500mg/mL)、ラットの剪毛した皮膚(約20cm²)に4mL/kgの割合で塗布し、リント布で覆った後、サージカルテープで24時間閉塞した。24時間後、検体が残存しないように水に浸したガーゼで塗布面を拭き取った。対照群は0.5%MC水溶液を上記と同様に処置した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日目に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的剖検を実施した。

試験結果:

投与方法	経 皮
投与量 (mg/kg)	雌雄共 ; 0、2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共 ; >2000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共 ; 死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共 ; 症状の発現なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 ; 2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 ; 2000

中毒症状および死亡は認められず、体重および剖検においても検体投与の影響は認められなかった。また、塗布部位への刺激性も認められなかった。

④フラメトピル0.5%粉剤のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 製4-4)

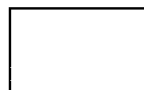
試験機関：(株)ボソリサーチセンター

報告書作成年：1994年 (GLP対応)

検 体：フラメトピル0.5%粉剤

組 成：フラメトピル原体

鉍物質微粉等



試験動物：日本白色種 雌性ウサギ、15週令、体重；2.50～2.89kg、1群6匹

観察期間：検体除去後72時間観察

試験方法：剪毛したウサギの背部を正中線をはさんで2分し、その一方に検体を、片方を対照とした。検体は0.5gを同量の注射用水で湿らせリント布(2.5×2.5cm)に展延して貼付し、油紙で被覆した後、弾性包帯で4時間閉塞適用した。適用4時間後リント布を取り除き、皮膚に付着した検体を注射用水を含ませた脱脂綿で拭き取った。

観 察：貼付除去の1、24、48及び72時間後に局所を観察し、局所反応はDraizeの判定基準に従って点数化し、一次刺激率を求めて評価した。

結 果：観察した刺激性変化の評点は以下の通りである。

動物番号	項目	最高 評点*	暴露後時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
1101	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1102	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1103	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1104	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1105	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1106	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合 計	紅斑・痂皮	24	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0
平 均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

※判定基準の最高評点

観察時期を通じて紅斑、浮腫等の刺激性反応は認めず、一次刺激率は0であった。

以上の結果から、フラメトピル0.5%粉剤はウサギの皮膚に対して刺激性なしと判定した。

④フラメトピル0.5%粉剤のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 製4-4)

試験機関：(株)ボゾリサーチセンター

報告書作成年：1994年 (GLP対応)

検 体：フラメトピル0.5%粉剤

組 成：フラメトピル原体
 鉍物質微粉等

試験動物：日本白色種 雌性ウサギ、15週令、体重；2.50~2.89kg、1群6匹

観察期間：検体除去後72時間観察

試験方法：剪毛したウサギの背部を正中線をはさんで2分し、その一方に検体を、片方を対照とした。検体は0.5gを同量の注射用水で湿らせリント布(2.5×2.5cm)に展延して貼付し、油紙で被覆した後、弾性包帯で4時間閉塞適用した。適用4時間後リント布を取り除き、皮膚に付着した検体を注射用水を含ませた脱脂綿で拭き取った。

観 察：貼付除去の1、24、48及び72時間後に局所を観察し、局所反応はDraizeの判定基準に従って点数化し、一次刺激率を求めて評価した。

結 果：観察した刺激性変化の評点は以下の通りである。

動物番号	項目	最高 評点*	暴露後時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
1101	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1102	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1103	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1104	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1105	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1106	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合 計	紅斑・痂皮	24	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0
平 均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

※判定基準の最高評点

観察時期を通じて紅斑、浮腫等の刺激性反応は認めず、一次刺激率は0であった。

以上の結果から、フラメトピル0.5%粉剤はウサギの皮膚に対して刺激性なしと判定した。

⑤フラメトピル0.5%粉剤のウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料 製4-5)

試験機関：(株)ポソリサーチセンター

報告書作成年：1994年 (GLP対応)

検 体：フラメトピル0.5%粉剤

組 成：フラメトピル原体
 鉍物質微粉等

試験動物：日本白色種 雌性ウサギ、15週令、体重；2.53~2.92kg、1群6匹

観察期間：適用後72時間観察

試験方法：検体0.1gをウサギの一方の眼（下眼瞼結膜囊）に適用し、適用後に洗浄処置を行わなかった。他眼は対照とした。

観 察：適用1、24、48及び72時間後に角膜、虹彩、結膜を検眼鏡を用いて観察し、局所反応をDraizeの判定基準に従って点数化して記録した。刺激性の評価は、Kay and Calandraの方法に従って行った。

結 果：刺激性変化の評点は以下の通りであった。

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 淨 群	動物 番号 1101	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩	2	0	0	0	0	
		結 膜	潮紅	3	1	1	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
			眼脂分泌	3	1	0	0	0
	動物 番号 1102	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0
		虹 彩	2	0	0	0	0	
		結 膜	潮紅	3	1	1	0	0
			浮腫	4	1	0	0	0
			眼脂分泌	3	1	0	0	0
動物 番号 1103	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
		面積	4	0	0	0	0	
	虹 彩	2	0	0	0	0		
	結 膜	潮紅	3	1	1	1	0	
		浮腫	4	1	0	0	0	
		眼脂分泌	3	2	0	0	0	

※判定基準の最高評点

				最高 評点*	適用後時間				
					1時間	24時間	48時間	72時間	
非 洗 淨 群	動物 番号 1104	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
			面積	4	0	0	0	0	
		虹 彩			2	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1	0	0	
			浮腫	4	1	0	0	0	
			眼脂分泌	3	1	0	0	0	
	動物 番号 1105	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
			面積	4	0	0	0	0	
		虹 彩			2	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1	0	0	
			浮腫	4	1	0	0	0	
			眼脂分泌	3	2	0	0	0	
	動物 番号 1106	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
			面積	4	0	0	0	0	
		虹 彩			2	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	1	0	0	
			浮腫	4	1	0	0	0	
			眼脂分泌	3	1	0	0	0	
	合 計 *			660	40	12	2	0	
	平 均			110	6.67	2	0.33	0	

※判定基準の最高評点 * Draize法による評価点 (最高110点/匹)

適用後、角膜混濁及び虹彩充血を認めなかった。強さ1の結膜潮紅、強さ1の結膜浮腫及び強さ1～2の眼脂分泌を認めた。これらの局所反応は、適用後24時間認められたが、徐々に軽減し、48時間後には1例を除いて全ての局所反応が消失した。適用72時間後には全ての局所反応が消失した。眼のその他の変化としては、全例に閉眼を観察した。

以上の結果より、軽度の刺激性ありと判定された。

⑥フラメトピル0.5%粉剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験 (Buehler 法)

(資料 製4-6)

試験機関：(株) ポソリサーチセンター

報告書作成年：1994年 [GLP 対応]

検 体：フラメトピル0.5%粉剤

組 成：フラメトピル原体
 鉍物質微粉等



試験動物：ハートレー系雌性モルモット、6週令、体重；307~355g、1群 20匹

観察期間：感作開始後30日間観察

試験方法：農林水産省の基準に従ってBuehler法(貼付法)で実施した。



感作；1群20匹のモルモットの腹部側を剪毛し、検体0.5gを同量の注射用水にて湿らせたパッチ(直径2.5cm)に塗布して6時間閉塞貼付した。感作は、3回(週1回、1週間間隔)行った。尚、1.0%DNCBのオリーブ油溶液0.5mLを上記同様に適用した。パッチを取り除いた後、検体群は注射用水、陽性対照群はアセトンで適用部位を清拭した。

誘発；最終感作の2週間後に、検体感作群及び非感作群には検体を感作と同様の方法で適用した。DNCB感作群及び非感作群には、0.25%DNCBオリーブ油溶液0.5mLを適用した。

観察；それぞれの感作及び誘発適用の24時間後及び48時間後に局所反応の強さを紅斑と浮腫に分け、以下の基準で点数化して評価した。

0；変化なし、1；非常に軽度な反応、2；はっきりした紅斑、軽度浮腫

3；中等度ないし高度紅斑、中等度浮腫、4；高度紅斑からわずかな痂皮形成、高度浮腫
体重測定を感作開始日、最終感作日、誘発日及び誘発後2日に行った。

試験結果：観察した皮膚感作性反応は次頁の表のとおりである。

	群		供試動物数	感作反応動物数										陽性率 (%)				
	感作	惹起		皮膚反応の種類	24時間後					48時間後					24時間	48時間		
					皮膚反応評点					皮膚反応評点								
					0	1	2	3	4	計	0	1	2	3			4	計
検体	100% 検体	100% 検体	20	紅斑	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
				浮腫	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20		
	媒体	100% 検体	20	紅斑	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
				浮腫	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20		
陽性対照	1% DNCB	0.25% DNCB	10	紅斑	0	3	5	2	0	10/10	0	7	3	0	0	10/10	100	100
				浮腫	4	6	0	0	0	6/10	7	3	0	0	0	3/10		
	媒体	0.25% DNCB	10	紅斑	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10	0	0
				浮腫	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10		

* : 同時に実施したフラメトピル 15%水和剤の試験(資料 製3-5)の陽性対照群を採用

検体感作群では、誘発 24 及び 48 時間後の観察において、非感作群と同様に皮膚反応は認められなかった。

一方、陽性対照の DNCB 感作群では、誘発 24 時間後に全例に軽度、中等度、強度の紅斑、内 6 例に軽度の浮腫を、48 時間後には全例に軽度、中等度の紅斑、内 3 例に軽度の浮腫を認めたが、DNCB 非感作群ではいずれの観察時期においても局所反応は認められなかった。

各試験とも観察期間中、体重に異常を認めなかった。

以上の結果より、フラメトピル 0.5%粉剤は Buehler 法(貼付法)で皮膚感作性なしと判定した。

(5) フラメトピル15%水和剤 (リンバー水和剤)

①フラメトピル15%水和剤のラットを用いた経口投与による急性毒性試験

(資料 製5-1)

試験機関: (株) ポゾリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 [GLP対応]

検 体: フラメトピル15%水和剤

組 成: フラメトピル原体

鋳物質微粉、界面活性剤等



供試動物: Crj: CD(SD)系ラット、7週齢、体重: 雄; 241~256g、雌; 168~182g、

1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

試験方法: 5000mg/kgの用量を設定した投与群および対照群を設けた。

投与方法: 検体は注射用蒸留水に懸濁し、約16時間絶食したラットに20mL/kgの割合で単回経口投与した。対照群には注射用蒸留水を20mL/kgの割合で同様に投与した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日目に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共; 0、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共; >5000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共; 死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共; 投与後5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)	雌雄共; <5000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 5000

死亡は認められなかったが、中毒症状としては、雌雄ともに自発運動の低下、よろめき歩行、腹臥、正向反射消失筋緊張の低下、流涙および体温の低下を認めた。体重では、雌雄とも投与翌日に一過性の減少を認めた。剖検では、検体投与の影響は認められなかった。

②フラメトピル15%水和剤のマウスを用いた経口投与による急性毒性試験

(資料 製5-2)

試験機関: (株) ポリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 [GLP対応]

検 体: フラメトピル15%水和剤

組 成: フラメトピル原体

鉱物質微粉、界面活性剤等



供試動物: Crj: CD-1 (ICR) 系マウス、7週齢、体重: 雄; 27.1~30.5g、雌; 20.4~24.2g、

1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

試験方法: 対照群を含む6段階の用量を設定した投与群を設け、それらの死亡状況からProbit法によりLD₅₀値を算出した。

投与方法: 検体は注射用蒸留水に懸濁し、約16時間絶食したマウスに20mL/kgの割合で単回経口投与した。対照群には注射用蒸留水を20mL/kgの割合で同様に投与した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10、14日目および死亡動物発見時に測定した。途中死亡動物および観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果:

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	雌雄共; 0、4200、5000、6000、7100、8400
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄; 5670 (5000~6390) 雌; 5490 (4690~6290)
死亡開始時間および終了時間	雄; 投与翌日から開始、投与後4日に終了 雌; 投与翌日から開始、投与後3日に終了
症状発現時間および消失時間	雌雄共; 投与後5分から発現、投与後4日に消失
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; <4200
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 4200

中毒症状としては、自発運動の低下、よろめき歩行、腹臥姿勢、正向反射消失、筋緊張の低下および体温の低下を認めた。体重では、雌雄の全投与群で一過性の減少および増加抑制を認めた。剖検では、途中死亡動物および生存動物ともに検体投与の影響は認められなかった。

③フラメトピル15%水和剤のラットを用いた経皮投与による急性毒性試験

(資料 製5-3)

試験機関: (株)ボゾリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 [GLP対応]

検 体: フラメトピル15%水和剤

組 成: フラメトピル原体

鋳物質微粉、界面活性剤等



試験動物: Crj: CD(SD)系ラット、7週齢、体重: 雄; 264~288g、雌; 179~194g、

1群雌雄各5匹

観察期間: 14日間

投与方法: 検体は注射用蒸留水に懸濁し(500mg/mL)、ラットの剪毛した背部皮膚(約20cm²)に4mL/kgの割合で塗布し、リント布で覆った後、サージカルテープで24時間閉塞した。24時間後、検体が残存しないように水に浸したガーゼで塗布面を拭き取った。対照群は注射用蒸留水を上記と同様に処置した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察し、体重は投与直前、投与後1、2、3、7、10および14日目に測定した。観察期間終了時に生存していた全ての動物について肉眼的病理検査を実施した。

試験結果:

投与方法	経 皮
投与量 (mg/kg)	雌雄共; 0、2000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雌雄共; >2000
死亡開始時間および終了時間	雌雄共; 死亡例なし
症状発現時間および消失時間	雌雄共; 症状の発現なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌雄共; 2000

中毒症状および死亡は認められず、体重および剖検においても検体投与の影響は認められなかった。また、投与部位の刺激性も認められなかった。

④フラメトピル15%水和剤のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料 製5-4)

試験機関：(株)ボソリサーチセンター

報告書作成年：1994年 (GLP対応)

検 体：フラメトピル15%水和剤

組 成：フラメトピル原体

鉍物質微粉、界面活性剤等



試験動物：日本白色種 雌性ウサギ、15週令、体重；2.65~3.09kg、1群6匹

観察期間：検体除去後72時間観察

試験方法：剪毛したウサギの背部を正中線をはさんで2分し、その一方に検体を、片方を対照とした。検体は0.5gを同量の注射用水で湿らせリント布(2.5×2.5cm)に展延して貼付し、油紙で被覆した後、弾性包帯で4時間閉塞適用した。適用4時間後リント布を取り除き、皮膚に付着した検体を注射用水を含ませた脱脂綿で拭き取った。

観 察：貼付除去の1、24、48及び72時間後に局所を観察し、局所反応はDraizeの判定基準に従って点数化し、一次刺激率を求めて評価した。

結 果：観察した刺激性変化の評点は以下の通りである。

動物番号	項目	最高 評点*	暴露後時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
1101	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1102	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1103	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1104	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1105	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1106	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合 計	紅斑・痂皮	24	0	0	0	0
	浮腫	24	0	0	0	0
平 均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

* 判定基準の最高評点

観察時期を通じて紅斑、浮腫等の刺激性反応は認めず、一次刺激率は0であった。

以上の結果から、フラメトピル15%水和剤はウサギの皮膚に対して刺激性なしと判定した。

⑤フラメトピル15%水和剤のウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料 製5-5)

試験機関：(株)ボゾリサーチセンター

報告書作成年：1994年 (GLP対応)

検 体：フラメトピル15%水和剤

組 成：フラメトピル原体

鉱物質微粉、界面活性剤等



試験動物：日本白色種 雌性ウサギ、15~16週令、体重；2.55~3.16kg、非洗浄群：1群6匹、
洗浄群：1群3匹

観察期間：非洗浄群；適用後120時間観察、洗浄群；適用後72時間観察

試験方法：検体を0.1gずつ6匹の片眼結膜嚢内に適用し、適用後に洗浄処置を行わず、経時的に観察した（非洗浄群）。非洗浄群において適用72時後においても刺激性が認められたので、適用2分後に1分間約200mLの微温湯にて洗浄する群を別途設けた。尚、他眼は対照とした。

観 察：非洗浄群では検体適用1、24、48、72、96及び120時間後、洗浄群では検体適用1、24、48及び72時間後に角膜、虹彩、結膜を観察し、Draizeの判定基準に従い、局所反応を点数化して記録した。刺激性の評価は、Kay and Calandraの方法に従って行った。

結 果：観察した刺激性変化の評点は以下の通りであった。

項目		最高 評点*	適用後時間							
			1時間	24時間	48時間	72時間	96時間	120時間		
非 洗 浄	動物 番号 1101	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	0	0
			面積	4	0	0	0	0	0	0
	虹 彩		2	0	0	0	0	0	0	
	結 膜	潮紅	3	1	1	1	0	0	0	
		浮腫	4	1	0	0	0	0	0	
		眼脂分泌	3	2	1	0	0	0	0	
洗 浄 群	動物 番号 1102	角膜混濁	程度	4	0	1	1	1	0	0
			面積	4	0	1	1	1	0	0
	虹 彩		2	0	1	0	0	0	0	
	結 膜	潮紅	3	1	2	2	0	0	0	
		浮腫	4	1	1	0	0	0	0	
		眼脂分泌	3	2	1	0	0	0	0	

※判定基準の最高評点

項目		最高 評点*	適用後時間							
			1時間	24時間	48時間	72時間	96時間	120時間		
非 洗 淨 群	動物 番号 1103	角膜混濁	程度	4	0	1	1	1	1	0
			面積	4	0	1	1	1	1	0
		虹 彩		2	0	1	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	2	2	1	0	0
			浮腫	4	1	1	0	0	0	0
			眼脂分泌	3	2	2	0	0	0	0
	動物 番号 1104	角膜混濁	程度	4	0	1	1	1	0	0
			面積	4	0	1	1	1	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	2	1	0	0	0
			浮腫	4	1	1	0	0	0	0
			眼脂分泌	3	2	1	0	0	0	0
	動物 番号 1105	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	0	0
			面積	4	0	1	1	0	0	0
		虹 彩		2	0	0	0	0	0	0
		結 膜	潮紅	3	1	2	1	0	0	0
			浮腫	4	2	1	0	0	0	0
			眼脂分泌	3	2	1	1	0	0	0
	動物 番号 1106	角膜混濁	程度	4	0	1	1	0	0	0
			面積	4	0	1	1	0	0	0
虹 彩		2	0	0	0	0	0	0		
結 膜		潮紅	3	1	2	2	0	0	0	
		浮腫	4	1	1	0	0	0	0	
		眼脂分泌	3	2	2	1	0	0	0	
合 計*		660	50	83	47	17	5	0		
平 均		110	8.33	13.83	7.83	2.83	0.83	0		
洗 淨 群	3 匹 平 均	角膜混濁	程度	4	0	1	0.3	0		
			面積	4	0	1	0.3	0		
	虹 彩		2	0	0	0	0			
	結 膜	潮紅	3	1	1	0	0			
		浮腫	4	1	0	0	0			
		眼脂分泌	3	1	0	0	0			
合 計*		110	6	7	1.67	0				

※判定基準の最高評点 *Draize 法による評価点 (最高110点/匹)

適用後、強さ1、広さ1の角膜混濁、強さ1の虹彩充血、強さ1～2の結膜潮紅、強さ1～2の結膜浮腫及び眼脂分泌を認めた。これらの局所反応は適用後96時間まで認められたが、120時間後にはすべての局所反応が消失した。他方、洗浄群では適用後強さ1、広さ1の角膜混濁、強さ1の結膜潮紅、強さ1の結膜浮腫及び眼脂分泌を認めた。これらの局所反応は、徐々に軽減し、72時間後には消失した。眼のその他の変化としては、全例に閉眼を観察した。

以上の結果より、非洗浄群では軽度の刺激性あり、洗浄群も軽度の刺激性ありと判定され、洗浄効果が認められた。

⑥ フラメトピル15%水和剤及び1500倍希釈液のモルモットを用いた累積皮膚刺激性試験

(資料 製5-6)

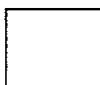
試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：1995年

検 体：フラメトピル15%水和剤及びその1500倍希釈液

組 成：フラメトピル原体

鉍物質微粉、界面活性剤等



試験動物：ハートレー系雄性モルモット (4週齢、体重；298~351g)、1群3匹

観察期間：初回適用後11日間及び18日間観察

目 的：フラメトピル15%水和剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験 (資料 製3-5) において、感作処理の適用部位に皮膚刺激性が認められた。特に適用2回目以降で明らかな刺激性反応が認められたことから、実使用濃度 (希釈液) ではどのような反応が認められるかを確認するため、本試験を実施した。

試験方法：剃毛したモルモットの背部皮膚4箇所、検体及びその1500倍希釈液、また、蒸留水ならびにリント布を各1箇所ずつ適用した。

検体の場合は0.2g、検体希釈液、蒸留水の場合は0.2mLを2×2cmのリント布に均一に展延し、貼付し、サージカルテープで6時間閉塞適用した。

尚、適用量は通常実施している皮膚感作性試験 (Buehler法) と単位面積当たりの処理量とほぼ同程度になるよう設定した。

6時間閉塞終了後、水で適用部位を清拭し、除去時及び適用24時間目の皮膚状態を観察した。その後は、1週間に4回 (4日間連続)、2週間あるいは3週間に渡って同様の適用操作及び皮膚状態の観察を行った (適用回数；計8回あるいは12回)。

剃毛については、適用1回間隔で実施した。

観察項目：検体除去時及び適用24時間目の局所の観察においては、Magnusson & Kligmanの判定基準にしたがって紅斑と浮腫に分けて評点をつけた。また、適用2週間及び3週間群の両方について観察終了後、貼付部皮膚を採取し、固定、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的検査を実施した。

試験結果：

1. 肉眼的観察

水和剤及び1500倍希釈液を適用した場合の、適用6時間後及び24時間後の皮膚反応評点を次頁の表に示した。

検体として水和剤を適用した場合、1回目の適用で軽度の紅斑が観察され、2回目適用時以降、痂皮形成を伴う明らかな皮膚刺激反応が認められた。

適用3～4回目時に刺激が最も強く発現したが、その後は刺激性の増強は認められなかった。

一方、1500倍希釈液を適用した場合は、紅斑、浮腫等の皮膚反応は何等認められなかった。尚、蒸留水、リント布を適用した場合も皮膚反応は観察されなかった。

2. 病理組織学的検査

適用2週間目、3週間目の病理組織学的検査の結果、水和剤を適用した場合は表皮の角質肥厚、表皮肥厚、海綿状変化、痂皮形成及び真皮の炎症性細胞浸潤及び皮下組織での単核細胞浸潤等が認められたが、1500倍希釈液では何等異常は認められなかった。尚、蒸留水及びリント布適用では、限局性の表皮の潰瘍、痂皮形成及び海綿状変化等が認められた。

以上の結果から、フラメトピル15%水和剤は、本試験条件下では累積皮膚刺激性を有すると考えられた。しかしながら、実使用濃度である1500倍希釈液では累積皮膚刺激性はないと考えられた。

表 累積皮膚刺激性

2週間(8回)適用群

動物 番号	項目	最高 評点*	暴露回数及び暴露後時間																												
			1		2		3		4		5		6		7		8														
			6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24											
1	水和剤	3	1	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2*	2*	1*	1*	2*	2*	1*	1*	2*	2*	1*	2*	2*	1*	2*	1*	1	1	1
	希釈液	3	0	0	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	水和剤	3	1	0	2	1	1	2	2	2	2	2*	2*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1	1	1
	希釈液	3	0	0	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	水和剤	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	希釈液	3	0	0	1	1	1	2	2	1	2	2*	2*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1	1	1
	水和剤	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	希釈液	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	水和剤	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	希釈液	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	水和剤	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	希釈液	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	水和剤	9	2	0	4	3	6	5	6	6*	6*	3*	3*	3*	3*	3*	4*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3	3	2
	希釈液	9	0	0	2	2	2	6	5	5	5	5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2
	水和剤	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	希釈液	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
平均	水和剤	3	0.7	0	1.3	1.0	2.0	1.7	2.0	2.0*	2.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.3*	1.0*	1.3*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0	1.0	1.0	
	希釈液	3	0	0	0.7	0.7	2.0	1.7	1.7	1.7	1.7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7	0.7	
	水和剤	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	希釈液	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

※判定基準の最高評点

水和剤：フラメトピル15%水和剤

希釈液：フラメトピル15%水和剤1500倍希釈液

*痂皮形成

水和剤：フラメトピル15%水和剤

希釈液：フラメトピル15%水和剤1500倍希釈液

※判定基準の最高評点

水和剤：フラメトピル15%水和剤

希釈液：フラメトピル15%水和剤1500倍希釈液

*痂皮形成

3週間(12回)適用群

動物 番号	項目	最高 評価*	暴露回数及び暴露後時間																																																
			1			2			3			4			5			6			7			8			9			10			11			12															
			6	24		6	24		6	24		6	24		6	24		6	24		6	24		6	24		6	24		6	24		6	24		6	24		6	24											
4	水和剤	3	1	0	1	1	1	1	1	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*												
	浮腫	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0										
	紅斑	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	希釈液	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
5	水和剤	3	1	0	1	1	1	1	1	2*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*									
	浮腫	3	0	0	1	1	1	1	2	1	2	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
	紅斑	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	希釈液	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
6	水和剤	3	0	0	1	1	2	2	2	1	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*				
	浮腫	3	0	0	1	1	0	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	紅斑	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	希釈液	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	水和剤	9	2	0	3	3	4	5	6	3	4*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*	3*			
	浮腫	9	0	0	2	1	5	6	3	6	3	6	3	2	3	3	1	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	紅斑	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	希釈液	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
平均	水和剤	3	0.7	0	1.0	1.0	1.3	1.7	1.7	1.0	1.3*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*	1.0*				
	浮腫	3	0	0	0.7	0.3	1.7	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	0.7	1.0	1.0	0.3	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0			
	紅斑	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	希釈液	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

※判定基準の最高評価点

水和剤：フラメトピル15%水和剤 希釈液：フラメトピル15%水和剤1500倍希釈液

蒸留水、リント布では皮膚反応は認められなかった

*痲皮形成 a：死亡

⑦フラメトピル 15%水和剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験 (Buehler 法)

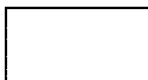
(資料 製5-7)

試験機関: (株) ポリサーチセンター

報告書作成年: 1994年 [GLP 対応]

検 体: フラメトピル 15%粉剤

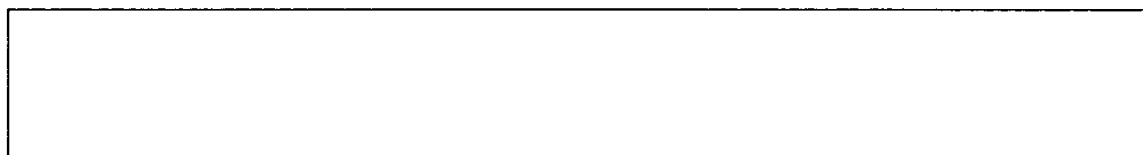
組 成: フラメトピル原体
 鉍物質微粉等



試験動物: ハートレー系雌性モルモット、6週令、体重: 312~368g、1群 10~20匹

観察期間: 感作開始後 30日間観察

試験方法: 農林水産省の基準に従って Buehler 法 (貼付法) で実施した。



感作; モルモットの腹部側を剪毛し、検体 0.5g を同量の注射水にて湿らせたパッチ (直径 2.5cm) に塗布して6時間閉塞貼付した。感作は、3回 (週1回、1週間間隔) 行った。尚、1.0% DNCB のオリーブ油溶液 0.5mL を上記同様に適用した。
パッチを取り除いた後、検体群は注射用水、陽性対照群はアセトンで適用部位を清拭した。

誘発; 最終感作の2週間後に、検体感作群及び非感作群にはの 25%被験液 0.5mL を適用した。
DNCB感作群及び非感作群には 0.25% DNCB オリーブ油溶液 0.5mL を適用した。

観察; それぞれの感作及び誘発適用の 24 時間後及び 48 時間後に局所反応の強さを紅斑と浮腫に分け、以下の基準で点数化して評価した。

0; 変化なし、1; 非常に軽度な反応、2; はっきりした紅斑、軽度浮腫

3; 中等度ないし高度紅斑、中等度浮腫、4; 高度紅斑からわずかな痂皮形成、高度浮腫
体重測定を感作開始日、最終感作日、誘発日及び誘発後2日に行った。

試験結果: 検体感作群において、1回目の感作後に評点1の紅斑 (6/20例) が、2回目の感作後には評点2~4の紅斑 (全例) 及び評点1~2の浮腫 (17/20例) が、3回目の感作後には評点2~4の紅斑 (全例) 及び評点1~2の浮腫 (全例) が認められた。

誘発後に観察した皮膚感作性反応は次頁の表のとおりである。

	群		供試動物数	感作反応動物数										陽性率(%)				
	感作	惹起		皮膚反応の種類	24時間後					48時間後					24時間	48時間		
					皮膚反応評点					皮膚反応評点								
					0	1	2	3	4	計	0	1	2	3			4	計
検体	100% 検体	25% 検体	20	紅斑	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
				浮腫	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20		
	媒体	25% 検体	20	紅斑	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20	0	0
				浮腫	20	0	0	0	0	0/20	20	0	0	0	0	0/20		
陽性 対照	1% DNCB	0.25% DNCB	10	紅斑	0	3	5	2	0	10/10	0	7	3	0	0	10/10	100	100
				浮腫	4	6	0	0	0	6/10	7	3	0	0	0	3/10		
	媒体	0.25% DNCB	10	紅斑	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10	0	0
				浮腫	10	0	0	0	0	0/10	10	0	0	0	0	0/10		

検体感作群では、誘発 24 及び 48 時間後の観察において、非感作群と同様に皮膚反応は認められなかった。

一方、陽性対照の DNCB 感作群では、誘発 24 時間後に全例に軽度、中等度、強度の紅斑、内 6 例に軽度の浮腫を、48 時間後には全例に軽度、中等度の紅斑、内 3 例に軽度の浮腫を認めたが、DNCB 非感作群ではいずれの観察時期においても局所反応は認められなかった。

各試験とも観察期間中、体重に異常を認めなかった。

以上の結果より、フラメトピル 15%水和剤は Buehler 法（貼付法）で皮膚感作性なしと判定した。