

2) ラットにおける催奇形性試験

(資料 No. 19)

試験機関：

報告書作成年：1993年

検体の純度： % (その他成分：水 %)

供試動物：Wistar系妊娠ラット (Alpk:APfSD)、1群24匹、妊娠1日時10~12週齢、
体重167~320g

投与期間：妊娠7日から妊娠16日までの10日間 (1993年4月~5月)

投与方法：検体を脱イオン水で希釈し、0、5、20、60 mg/kg/日の投与レベルで妊娠7日目* から妊娠16日までの10日間、毎日1回強制経口投与した。なお、対照群には、脱イオン水のみを同様に投与した。 *): 膈垢中に精子を認めた日を妊娠1日として起算した。

用量設定根拠：本試験で選択した用量は妊娠ラットにおける用量設定試験に基づいている。

観察・検査項目：

母動物；一般状態および生死を毎日観察し、妊娠1、4、7~16、19および22日に体重を測定し、妊娠1~4、4~7、7~10、10~13、13~16、16~19および19~22日間の摂餌量を測定した。妊娠22日に屠殺して、肉眼的病理検査を行い、子宮および卵巣を摘出して、妊娠子宮重量、黄体数、着床位置と着床数、生存胎児数、子宮内死亡数を検査した。

生存胎児；個体別体重を測定し、外表異常および口蓋裂について観察した。全胎児について内臓異常を検査し、性別判定後、メタノールで固定した。脳の肉眼的異常の有無を検査した後、骨格標本を作製し、骨格異常の有無および骨化進行度を検査した。

結果：結果の概要を次表に示した。

母動物；20および60 mg/kg/日群では、母動物毒性として用量相関性のある体重増加抑制および摂餌量の減少が投与期間中に認められた。また、これらの用量では、検体投与に起因すると考えられる症状所見として立毛、流涎および尿失禁がみられた。5 mg/kg/日群でも、投与期間中の体重増加量および摂餌量が対照群よりもわずかに低値であったが、投与に関連した異常症状はみられず、毒性的に意義がないと考えられた。肉眼的病理所見および子宮重量には検体投与の影響は認められなかった。対照群に比べて全ての投与群で着床前損失率が用量依存的に低下し、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバックマン・ラボラトリーズ(株)にある。

これにより着床数および生存胎児数がやや増加した。しかし、対照群の値は同研究所の背景対照データ範囲の上限であり、着床は投与開始前に起こっていることから、検体投与に関連しないと考えられた。着床後損失率および子宮内死亡率に変化は認められなかった。

胎児動物；20 および 60 mg/kg/日群では、胎児毒性として胎児体重の低値が認められた。さらに、60 mg/kg/日群では前後肢指骨の骨化遅延、20 および 60 mg/kg/日群では骨格の軽度異常および変異の発現頻度増加が認められた。骨格の軽度異常所見としては、60 mg/kg/日群で第4、第5および第6頸椎体未骨化または第5胸骨分節未骨化を有する胎児数の統計学的に有意な増加がみられた。また、骨格変異としては、20 および 60 mg/kg/日群で歯状突起未骨化および頸椎腹側結節未骨化を有する胎児数の統計学的に有意な増加ならびに第7頸椎横突起不完全骨化を有する胎児数の統計学的に有意な減少がみられ、60 mg/kg/日群でのみ第3頸椎体未骨化および第5胸骨分節不完全骨化を有する胎児数の統計学的に有意な増加が認められた。第2頸椎体未骨化および踵骨未骨化については、全ての投与群で統計学的に有意な増加がみられ、その増加は用量相関性があったが、5 および 20 mg/kg/日群での胎児の発現頻度は背景対照データの範囲（第2頸椎体未骨化：17.1～46.1%、踵骨未骨化：39.4～82.6%）内であった。これらの骨格の軽度異常および変異はいずれも骨化遅延に関連していた。

60 mg/kg/日群の胎児5例には頭部の重度異常が認められ、催奇形性作用であると考えられた。

20 mg/kg/日群の1例および5 mg/kg/日群の2例でも頭部の重度異常がみられたが、発現頻度は低く、統計学的有意差および用量相関性がないことから、検体投与に関連しないと考えられた。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに投与したときの母動物および胎児動物における無毒性量は5 mg/kg/日であった。最高投与量の60 mg/kgでは頭部の重度異常が認められたが、20 mg/kgでは催奇形性は認められなかった。

申請者注：

<再試験実施の理由>

資料 No18 の試験においては、母動物・胎児動物の無毒性量は10mg/kg/日、胎児動物での催奇形性の無毒性量は40mg/kg/日と報告されているが、EPAが再評価したところ、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

- ① 10mg 群の妊娠動物あたり生存胎児率、着床後胚死亡率が対照群と有意差有り。
40mg 群では対照群と差がなかったが、120mg 群では同様な傾向にあり、用量相関性が無いとして無毒性量を 10mg としていること。
- ② 10mg 群の胎児の骨格検査で異常・変異及び発育遅延の割合が増える傾向にあったこと。
以上の理由により、母動物の無毒性量は 10mg/kg/日、胎児動物及び催奇形性の無毒性量は 10mg/kg/日以下である可能性について再度本試験を実施した。

本試験においては、20 及び 60mg/kg/日群で母動物・胎児動物の体重増加抑制/低値が見られたため、無毒性量は 5mg/kg/日、胎児動物での催奇形性作用(頭部での重度異常)が 60mg 群で認められたが、20mg 群では認められなかったため、無毒性量は 20mg/kg/日と報告されている。

以上より、これら 2 試験より総合的に判断すると、

- ① 本剤の母動物・胎児動物への無毒性量は 5mg/kg/日。(資料 No18 では 10mg)
- ② 胎児動物の催奇形性作用は、60mg/kg/日で催奇性あり(資料 No18 では 120mg)、無毒性量は 20mg/kg/日(資料 No18 では 40mg)。

であると判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照	5	20	60
1 群当りの動物数		24	24	24	24
妊娠動物数		24	24	23	22
死亡数		0	0	0	0
一般状態 ^{a)}	立毛	0	0	0	10
	流涎	0	0	10	24
	尿失禁	0	0	1	10
平均体重	妊娠 8 日	295.5	↓290.1	↓290.3	↓278.0
	妊娠 9 日	300.7	↓293.1	↓292.3	↓275.9
	妊娠 10 日	305.2	↓298.4	↓295.9	↓277.3
	妊娠 11 日	311.5	↑304.0	↑300.6	↑282.1
	妊娠 12 日	317.4	↑309.6	↑304.4	↑286.8
	妊娠 13 日	323.8	↑315.4	↑308.3	↑291.6
	妊娠 14 日	330.1	↑320.5	↑314.1	↑296.6
	妊娠 15 日	337.1	↑327.5	↑320.7	↑301.7
	妊娠 16 日	342.9	↓333.8	↓326.7	↓307.3
	妊娠 19 日	377.2	370.5	↓362.9	↑340.9
摂餌量 (g/日)	妊娠 7~10 日	29.1	↓27.0	↓25.2	↓19.2
	妊娠 10~13 日	31.3	↓29.8	↓26.2	↓24.0
	妊娠 13~16 日	33.5	↓31.4	↓29.0	↓25.8
	妊娠 16~19 日	35.0	34.5	33.5	↓29.5
	妊娠 19~22 日	34.9	34.2	↓32.9	↑31.0
肉眼的病理所見		検体投与に起因する異常なし			
妊娠子宮重量 (g)		78.1	80.6	82.0	78.6
着床所見	検査母動物数	24	24	23	21 ^{b)}
	平均黄体数	14.4	14.6	14.7	15.0
	平均着床数	11.6	12.2	12.7	↑13.5
	平均生存胎児数	10.9	11.4	12.0	12.4

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

a) 表中の数値は所見がみられた動物数を示す。

b) 屠殺時に全胚吸収であった 1 例を除く。

対照群との有意差の検定 (↑↓: p < 0.05, ↑↑↓↓: p < 0.01)

Student の t 検定: 体重、摂餌量、着床数、生存胎児数、妊娠子宮重量

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要 (つづき)

		投与量 (mg/kg/日)	対照	5	20	60	
母動物	着床所見	着床前損失率 (%)	20.4	16.8	13.9	↓10.4	
		着床後損失率 (%)	6.8	7.6	5.9	8.7	
		子宮内死亡率 (%)	早期	5.4	6.0	5.2	6.9
			後期	1.3	1.6	0.7	1.8
胎児動物	同腹児重量 (g)		54.8	56.6	57.1	53.8	
	胎児体重 (g)		5.07	5.03	↓4.80	↓4.33	
	性比 (%)		58.8	52.1	50.3	52.1	
	外表・内臓検査胎児 (腹) 数		261 (24)	273 (24)	276 (23)	261 (21)	
	重度異常を有する胎児 (腹) 数		1 (1)	0 (0)	1 (1)	4 (4)	
	外脳症		0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	髄膜瘤		0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	小上顎		0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	小下顎		0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	口唇裂		0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	無眼球症		0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	小眼球症		1 (1)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	
	内水頭症		0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3)	
	臍帯ヘルニア		0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	軽度異常を有する胎児 (腹) 数		4 (2)	5 (4)	1 (1)	3 (3)	
	肝臓-嚢胞付着		0 (0)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	
	肝臓-変色域		0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	尿管軽度拡張		4 (2)	3 (2)	0 (0)	1 (1)	
	変異を有する胎児 (腹) 数		13 (7)	6 (4)	15 (8)	6 (3)	
	蛇行尿管		13 (7)	6 (4)	15 (8)	6 (3)	

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

着床前損失率 (%) = ((黄体数 - 着床数) / 黄体数) × 100

着床後損失率 (%) = ((着床数 - 生存胎児数) / 着床数) × 100

対照群との有意差の検定 (↑↓: p < 0.05, ↑↓: p < 0.01)

Student の t 検定: 同腹児重量、胎児体重

Fisher 直接確率検定: 着床前損失率、着床後損失率、子宮内死亡率、性比、異常/変異を有する胎児および腹の割合

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		対照	5	20	60
胎 児 動 物	骨格検査胎児 (腹) 数	261 (24)	273 (24)	276 (23)	261 (21)
	重度異常を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	2 (2)	1 (1)	3 (3)
	頬骨弓異常	0 (0)	2 (2)	0 (0)	1 (1)
	頭蓋肉眼的異常	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
	第2頸椎弓未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第3頸椎弓未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第4頸椎弓未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	軽度異常を有する胎児 (腹) 数	30 (16)	45 (18)	47 (21)	1188 (19)
	頭頂間骨不完全骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	後頭骨分割	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	後頭骨不完全骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	頭頂骨不完全骨化	4 (4)	1 (1)	1 (1)	2 (2)
	頭頂間骨-頭頂骨間縫合骨	1 (1)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
	大泉門軽度拡張	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	小泉門軽度拡張	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	舌骨未骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	第1頸椎弓不完全骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第2頸椎弓不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第3頸椎弓不完全骨化	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
	第4頸椎弓不完全骨化	0 (0)	2 (2)	2 (2)	3 (2)
	第5頸椎弓不完全骨化	1 (1)	2 (2)	3 (2)	7 (6)
	第6頸椎弓不完全骨化	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
	第5頸椎弓縮小	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第4頸椎体未骨化	4 (3)	5 (3)	8 (7)	1127 (113)
	第5頸椎体未骨化	2 (2)	3 (2)	3 (2)	1114 (118)
	第6頸椎体未骨化	1 (1)	0 (0)	2 (2)	119 (5)
	第7頸椎体未骨化	0 (0)	0 (0)	2 (2)	1 (1)
	第7頸椎横突起完全骨化	1 (1)	2 (2)	3 (2)	0 (0)
	頸肋	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第3胸椎体分割	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
第5胸椎体分割	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3)	
第8胸椎体分割	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)

Fisher 直接確率検定: 異常/変異を有する胎児および腹の割合

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハックマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		対照	5	20	60
胎 児 動 物	第 10 胸椎体分割	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第 11 胸椎体分割	0 (0)	0 (0)	3 (2)	2 (2)
	第 12 胸椎体分割	0 (0)	1 (1)	0 (0)	4 (3)
	第 13 胸椎体分割	1 (1)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
	第 5 胸椎体不完全骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第 10 胸椎体不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
	第 11 胸椎体不完全骨化	1 (1)	0 (0)	4 (4)	3 (3)
	第 12 胸椎体不完全骨化	0 (0)	3 (2)	0 (0)	5 (↑5)
	第 13 胸椎体不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
	第 13 胸椎半椎体未骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	第 3 胸椎半椎体不完全骨化	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	第 5 胸椎半椎体不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第 11 胸椎半椎体不完全骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第 12 胸椎半椎体不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第 13 胸椎半椎体不完全骨化	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第 3 腰椎弓不完全骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第 4 腰椎横突起完全骨化	3 (3)	11 (8)	7 (4)	0 (0)
	第 5 腰椎横突起不完全骨化	1 (1)	2 (2)	2 (2)	4 (3)
	第 6 腰椎横突起不完全骨化	2 (2)	2 (2)	2 (2)	5 (4)
	第 1 仙椎非対称	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
	第 1 仙椎弓不完全骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第 2 仙椎弓不完全骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	仙椎前椎骨数 27	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
	第 1 胸骨分節分割	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
	第 2 胸骨分節分割	0 (0)	1 (1)	2 (1)	2 (2)
	第 3 胸骨分節分割	0 (0)	1 (1)	2 (1)	0 (0)
	第 4 胸骨分節分割	0 (0)	1 (1)	2 (2)	0 (0)
	第 6 胸骨分節分割	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
	第 4 胸骨分節極度異常配列	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
	第 5 胸骨分節極度異常配列	1 (1)	3 (2)	1 (1)	6 (5)
第 2 胸骨分節未骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
第 5 胸骨分節未骨化	2 (2)	2 (2)	8 (5)	↑10 (↑9)	

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: $p < 0.05$, ↑↑: $p < 0.01$)

Fisher 直接確率検定: 異常/変異を有する胎児および腹の割合

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハックマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		対照	5	20	60	
胎 児 動 物	第1胸骨分節不完全骨化	0 (0)	1 (1)	2 (2)	0 (0)	
	第2胸骨分節不完全骨化	0 (0)	2 (2)	0 (0)	2 (2)	
	第4胸骨分節不完全骨化	0 (0)	0 (0)	2 (2)	1 (1)	
	第6胸骨分節不完全骨化	1 (1)	2 (2)	4 (4)	2 (2)	
	第2胸骨分節軽度異常配列	3 (2)	2 (2)	2 (2)	4 (4)	
	第3胸骨分節軽度異常配列	5 (3)	1 (1)	2 (2)	4 (4)	
	第4胸骨分節軽度異常配列	6 (5)	6 (5)	6 (5)	11 (6)	
	第5胸骨分節軽度異常配列	7 (6)	4 (4)	7 (7)	13 (10)	
	第1肋骨短小	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	
	第13肋骨短小	0 (0)	2 (2)	0 (0)	1 (1)	
	第5肋骨中央肥厚	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	第8肋骨中央肥厚	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	第9肋骨中央肥厚	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	
	第10肋骨中央肥厚	1 (1)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	
	第11肋骨中央肥厚	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	過剰第14肋骨短小	3 (2)	4 (3)	5 (5)	6 (5)	
	変異を有する胎児 (腹) 数		182 (24)	205 (24)	↑235 (23)	↑257 (21)
	歯状突起未骨化		24 (13)	35 (14)	↑56 (18)	↑118 (↑21)
	第2頸椎体未骨化		44 (17)	↑68 (19)	↑109 (20)	↑185 (↑21)
	第3頸椎体未骨化		10 (6)	12 (6)	18 (13)	↑60 (↑18)
	第7頸椎横突起不完全骨化		30 (15)	31 (15)	↓17 (9)	↓15 (7)
	頸椎腹側結節未骨化		10 (6)	12 (9)	↑26 (9)	↑22 (↑13)
	第5胸骨分節不完全骨化		76 (20)	70 (21)	80 (22)	↑107 (20)
	第5胸骨分節分割		58 (20)	57 (22)	52 (19)	48 (19)
	踵骨未骨化		113 (22)	↑155 (21)	↑186 (22)	↑245 (21)
	骨化スコア ^{c)}	前肢指骨	4.21	4.16	4.24	↑4.54
		後肢指骨	4.87	4.86	4.91	↑5.00

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

c) スコア1が完全骨化、スコア6は最も骨化が遅延していることを示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)

Student の t 検定: 骨化スコア

Fisher 直接確率検定: 異常/変異を有する胎児および腹の割合

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はパッカマン・ラボラトリーズ(株)にある。

3) ウサギにおける催奇形性試験

(資料 No.20)

試験機関:

報告書作成年: 1987年

検体の純度: % (その他成分: 水 %)

供試動物: ヒマラヤ種妊娠ウサギ (Chbb:HM)、1群 15匹、妊娠0日時 23~33週齢、
平均体重約 2190g

投与期間: 妊娠6日から妊娠18日目までの13日間

(1986年3月31日投与開始~1986年5月7日最終屠殺)

投与方法: 検体を蒸留水で希釈し、0、10、30、100 mg/kg/日の投与レベルで妊娠6日目* から妊娠18日目までの13日間、毎日1回強制経口投与した。なお、対照群には、蒸留水のみを同様に投与した。
*): 人工授精日を妊娠0日として起算した。

用量設定根拠: 同研究所で、ヒマラヤ種妊娠ウサギ (各群15匹) を用いて、0、50、100、200 mg/kg/日の投与レベルで妊娠6日目から妊娠18日目まで強制経口投与した予備試験の結果、200 mg/kg/日群では、体重が妊娠11日から試験終了時まで対照群に比べて統計学的に有意に低下し、100 mg/kg/日群では妊娠29日に体重の低値が認められた。妊娠6~9日間には全ての検体投与群で用量依存的な体重減少がみられ、100および200 mg/kg/日群ではその後も体重増加抑制または体重減少が認められた。また、100および200 mg/kg/日群では摂餌量が投与開始時に減少し、子宮重量が対照群に比べて有意に低値であった。吸収胚・死亡胎児数は用量依存的に増加し、生存胎児数が用量依存的に減少したが、統計学的有意差がみられたのは100および200 mg/kg/日群のみであった。200 mg/kg/日群における生存胎児は3腹4例のみであった。したがって、本試験の投与量を0、10、30および100 mg/kg/日とした。

観察・検査項目:

母動物: 一般状態および生死を毎日観察し、摂餌量を毎日測定した。体重は妊娠-7、-5、-3、0、2、4、6、7、9、11、14、16、18、21、23、25、28および29日に測定した。妊娠29日に屠殺して、肉眼的病理検査を行い、子宮および卵巣を摘出して、妊娠子宮重量、黄体数、着床位置と着床数、生存胎児数、吸収胚数および死亡胎児数を検査した。

生存胎児: 体重測定、胎盤重量測定、性別判定および外表異常の観察を行った。全生存胎児について、屠殺後、内臓異常を検査した。X線照射後、頭部をブアン液で

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

固定して検査し、胴体はアルコール固定後、骨格標本を作製した。骨格異常はX線照射検査に基づいて評価し、不鮮明な場合は骨格標本を立体顕微鏡で検査した。

結 果：概要を次表に示した。

母動物；検体投与に関連する死亡および一般状態の異常は認められなかった。

100 mg/kg 群では、投与期間中および投与後期間とも体重増加量が他の群に比べてやや低値であり、検体投与に起因していると考えられた。摂餌量は100 mg/kg 群の全例で、投与期間中に他の群に比べて軽度（約8%）減少し、検体投与に関連していると考えられた。

子宮重量については、対照群に比べて統計学的に有意な減少が100 mg/kg 群で認められた。

30 および100 mg/kg 群では、特に早期吸収胚数の増加による吸収胚・死亡胎児数の増加がみられ、着床後損失率の増加により生存胎児数が減少した。30 mg/kg 群におけるこれらの値は背景対照データの範囲内であったが、用量相関性があることから検体投与の影響と考えられた。

胎児動物；各検体投与群の平均胎児体重は対照群と差がなかったが、生存胎児数の減少により100 mg/kg 群では平均胎盤重量が有意に増加した。

外表・内臓検査および骨格検査とも、異常、変異および発育遅延について投与群と対照群間で統計学的有意差は認められなかったが、100 mg/kg 群の

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母動物における無毒性量は30 mg/kg/日、胎児動物における無毒性量は10 mg/kg/日であった。また、最高投与量の100 mg/kg では2腹2例の胎児に髄膜瘤または二分脊椎がみられたが、30 mg/kg/日では胎児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照	10	30	100	
1群当りの動物数		15	15	15	15	
妊娠動物数		15	15	14	15	
死亡・切迫屠殺数		1 ^{a)}	2 ^{b)}	0	0	
流早産		1	0	0	1	
一般状態		検体投与に起因する異常なし				
平均体重		—	有意差なし	有意差なし	有意差なし	
親動物	体重増加量 (g)	妊娠 0~2 日	-5.87	32.15	12.43	↑33.00
		妊娠 6~7 日	21.47	16.54	21.64	8.33
		妊娠 7~9 日	2.27	14.69	-0.21	1.53
		妊娠 9~11 日	10.07	14.69	12.64	3.67
		妊娠 11~14 日	20.33	23.15	27.29	11.53
		妊娠 14~16 日	24.67	39.92	28.29	11.80
		妊娠 16~18 日	14.27	11.31	18.07	27.20
		妊娠 18~21 日	21.40	25.85	16.93	↓7.33
		妊娠 25~28 日	64.29	65.15	57.07	↓36.60
親動物	摂餌量 (g/日)	妊娠 7~9 日	118.5	117.6	116.7	106.6
		妊娠 10~11 日	108.1	115.1	111.0	98.9
		妊娠 12~14 日	105.9	110.3	106.3	97.4
		妊娠 15~16 日	97.5	103.0	100.2	97.1
		妊娠 17~18 日	101.4	104.2	102.0	97.4
		妊娠 7~18 日	107.3	110.7	108.0	99.9
肉眼的病理所見		検体投与に起因する異常なし				
妊娠子宮重量 (g)		301.21	337.23	280.93	↓187.33	
補正体重増加量		-8.50	30.77	19.21	12.53	
着床所見	検査母動物数	14	13	14	15 ^{c)}	
	平均黄体数	7.36	7.77	7.93	7.80	
	平均着床数	6.07	7.08	6.00	7.13	
	平均生存胎児数	5.79	6.54	5.21	3.20	

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

— : 対照群

a) 妊娠 28 日の早産後に屠殺した。

b) 投与中の腰部脊椎の骨折により切迫屠殺した。

c) 流産した 1 例 (7 胎児) のデータを含む。

対照群との有意差の検定 (↑↓ : p < 0.05、↑↓ : p < 0.01)

Williams 検定 : 体重、子宮重量

Krauth 検定 : 黄体数、着床数

Fisher 検定 : 死亡率

(つづく)

結果の概要 (つづき)

		投与量 (mg/kg/日)	対照	10	30	100	
親動物	着床所見	着床前損失率 (%)		17.59	8.74	23.79	8.84
		着床後損失率 (%)		3.65	8.06	12.36	↑54.93
		吸収胚数 (総数)	早期	1	6	7	40
			中期	2	1	3	10
後期	1		0	1	2		
胎児動物	性比 (雄%) ^d		53.1	42.4	53.4	45.8	
	胎児体重 (g)	雄	38.54	38.25	38.51	41.35	
		雌	38.04	37.81	38.24	39.17	
		全体	38.70	37.93	38.86	39.89	
	胎盤重量 (g)	雄	4.56	4.57	4.99	↑5.06	
		雌	4.52	4.61	4.54	↑5.26	
		全体	4.59	4.56	4.83	↑5.22	
	外表検査胎児 (腹) 数		81 (14)	85 (13)	73 (14)	48 (14)	
	外表異常を有する胎児 (腹) 数		0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	
	髄膜瘤		0	0	0	1	
	二分脊椎		0	0	0	1	
	外表変異を有する胎児 (腹) 数		0 (0)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	
	後肢位置異常		0	1	0	0	
	両側偽関節強直		0	1	0	1	
	片側偽関節強直		0	1	1	0	
	内臓検査胎児 (腹) 数		81 (14)	85 (13)	73 (14)	48 (14)	
	内臓異常を有する胎児 (腹) 数		0 (0)	0 (0)	1 (1)	2 (2)	
	総動脈幹		0	0	0	1	
	胆嚢無発生		0	0	1	1	
	内臓変異を有する胎児 (腹) 数		40 (11)	37 (7)	39 (8)	28 (8)	
頸動脈起始分離		40	37	39	28		

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

d) 申請者が算出した。性比 = 雄胎児数 / 胎児総数 × 100

着床前損失率 (%) = ((黄体数 - 着床数) / 黄体数) × 100

着床後損失率 (%) = ((着床数 - 生存胎児数) / 着床数) × 100

対照群との有意差の検定 (↑↓: p < 0.05, ↑↓: p < 0.01)

Williams 検定: 体重、胎盤重量

Krauth 検定: 着床前損失率、着床後損失率、各腹の異常、変異または遅延を有する胎児の割合

Fisher 検定: 各群の異常、変異または遅延胎児を有する腹の割合

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要 (つづき)

投与量 (mg/kg/日)		対照	10	30	100
胎 児 動 物	骨格検査胎児 (腹) 数	81 (14)	85 (13)	73 (14)	48 (14)
	骨格異常を有する胎児 (腹) 数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	骨格変異を有する胎児 (腹) 数	8 (5)	4 (2)	8 (4)	8 (6)
	複数胸椎体垂鈴型	0	0	0	1
	腰椎体垂鈴型	0	0	0	1
	過剰胸骨分節	0	0	0	1
	胸骨分節癒合	2	2	3	1
	胸骨分節非対称	1	2	7	6
	両側痕跡状過剰肋骨	0	0	0	1
	片側過剰肋骨	1	0	0	0
	片側第 12 肋骨欠損	0	1	0	0
	両側鎖骨変形	1	0	0	0
	片側鎖骨変形	4	1	1	0
	骨化遅延を有する胎児 (腹) 数	52 (14)	58 (13)	47 (12)	15 (7)
	胸骨分節 1 箇所欠損	28	24	24	4
	胸骨分節 1 箇所不完全骨化	22	32	23	9
	各胸骨分節不完全骨化	0	1	2	1
	頸椎体不完全骨化	1	0	0	0
	両側痕跡状肋骨	0	0	1	0
	片側痕跡状肋骨	2	1	1	2

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: $p < 0.05$, ↑↑: $p < 0.01$)

Krauth 検定: 各腹の異常、変異または遅延を有する胎児の割合

Fisher 検定: 各群の異常、変異または遅延胎児を有する腹の割合

4) カーバムナトリウム水溶液のウサギにおける催奇形性試験

(資料 No.21)

試験機関：

報告書作成年：1993年

検体の純度： % (その他成分：水 %)

供試動物：New Zealand White 種妊娠ウサギ、1群 20匹、妊娠4日体重 3743~3809g

投与期間：妊娠8日から妊娠20日目までの13日間 (1993年3月~4月)

投与方法：検体を脱イオン水で希釈し、0、5、20、60 mg/kg/日の投与レベルで妊娠8日目^{*}から妊娠20日目までの13日間、毎日1回強制経口投与した。なお、対照群には、脱イオン水のみを同様に投与した。 *): 交配日を妊娠1日として起算した。

用量設定根拠；本試験で選択した用量は妊娠ウサギにおける用量設定試験に基づいている。

観察・検査項目：

母動物；行動および一般状態の変化について毎日観察し、入荷時、妊娠4、8~20、23、26および30日に体重を測定した。摂餌量は妊娠4~8、8~11、11~14、14~17、17~20、20~23、23~26および26~30日間の摂取量を測定した。妊娠30日に屠殺して、肉眼的病理検査を行い、子宮および卵巣を摘出して、妊娠子宮重量、黄体数、着床位置と着床数、生存胎児数および子宮内死亡数を検査した。

生存胎児；体重測定後、全胎児について外表異常および口蓋裂を観察した。全生存胎児について内臓異常を検査し、性別判定後、メタノールに固定して脳の肉眼的異常について検査した。次に、骨格標本作製して骨格異常の有無および骨化進行度を検査した。

結果：概要を次表に示した。

母動物；60 mg/kg/日では、著しい体重減少および摂餌量の低下がみられ、最大耐量を超えていると考えられた。20 mg/kg/日では軽度な体重減少が認められた。一般状態の異常として、60 mg/kg/日では、排糞減少およびケージ受け皿上の赤/橙色汚れの発現頻度増加がみられた。着床所見として、60 mg/kg/日では全胚吸収および早期子宮内死亡の増加による着床後損失率の増加がみられ、これにより同腹胎児数の減少ならびに妊娠子宮重量の低下がみられた。また、60 mg/kg/日では雄胎児の割合が低下したことから、胎児死亡率は雌よりも雄で高いと考えられた。

20および5 mg/kg/日では、着床数、着床前および着床後損失率、生存胎児数、子宮内死亡数、妊娠子宮重量に投与に関係する影響はなかった。20 mg/kg/日群

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

では雄胎児%の統計学的に有意な増加がみられたが、対照群が低値であったためであり、検体投与に関連しないと考えられた。

胎児動物；60 mg/kg/日では着床後損失率が増加し、生存胎児が少なかったため重度異常を有する胎児の割合が増加したが、絶対数の増加はみられなかった。60 mg/kg/日では2例に口蓋裂がみられたが、1例の口蓋裂は他の重度異常を伴っており、単独で認められたのは1例のみであることから、検体は催奇形性作用を及ぼさないと結論した。

軽微な毒性として、60 mg/kg/日群の生存胎児では平均胎児体重の軽度な低下、ならびに遅延および軽度変異といった骨格変化が認められ、20 mg/kg/日群では仙椎前椎骨数27の発現増加がみられた。

20 mg/kg/日群で第7頸椎横突起不完全骨化の有意な増加がみられたが、用量相関性がな
いことから、検体投与に関連しないと考えられた。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与したときの母動物および胎児動物における無毒性量は5 mg/kg/日であった。また、最高投与量の60 mg/kgでも胎児動物に対して催奇形性を及ぼさないと判断される。

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照	5	20	60	
1群当りの動物数		20	20	20	20	
親動物	妊娠動物数	20	17	18	19	
	死亡・切迫屠殺数	0	1 ^{a)}	1 ^{b)}	1 ^{c)}	
	流産	0	0	0	1	
	一般状態 ^{d)} : 排糞減少	2	0	0	10	
	ケージ受皿上赤/橙色汚れ	1	0	0	7	
	平均体重 (g)	妊娠 9 日	3866	3881	↓3810	↓3748
		妊娠 10 日	3880	3891	↓3827	↓3662
		妊娠 11 日	3907	3917	↓3837	↓3657
		妊娠 12 日	3937	3944	↓3858	↓3685
		妊娠 13 日	3953	3954	↓3886	↓3746
		妊娠 14 日	3971	3996	3914	↓3769
		妊娠 15 日	4011	4039	3962	↓3820
		妊娠 16 日	4063	4092	4017	↓3840
		妊娠 17 日	4099	4134	4050	↓3868
		妊娠 18 日	4110	4141	4060	↓3883
		妊娠 19 日	4136	4151	4064	↓3875
		妊娠 20 日	4154	4172	↓4060	↓3896
妊娠 23 日		4243	4259	↓4138	↓3983	
妊娠 26 日	4336	4341	↓4235	↓4081		
妊娠 30 日	4444	4424	4333	↓4210		
摂餌量 (g/日)	妊娠 8~11 日	189	189	↓154	↓48	
	妊娠 11~14 日	178	178	170	↓128	
	妊娠 14~17 日	180	174	173	↓150	
	妊娠 17~20 日	205	198	↓170	↓162	
	妊娠 26~30 日	156	↓131	136	↑197	
肉眼的病理所見		検体投与に起因する異常なし				
妊娠子宮重量 (g)		536	565	538	↓371	

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

- a) 妊娠 26 日に死亡しているのが発見された。臨床所見なし。全胚吸収。
- b) 人為的な理由により妊娠 24 日に屠殺した。
- c) 流産したため妊娠 24 日に屠殺した。
- d) 表中の数値は所見がみられた動物数を示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓ : p < 0.05, ↑↑↓↓ : p < 0.01)

Student の t 検定 : 体重、摂餌量、妊娠子宮重量

(つづく)

結果の概要

		投与量 (mg/kg/日)	対照	5	20	60
親動物	着床所見	検査母動物数	20	16	17	↓9 ^{e)}
		平均黄体数	11.9	11.6	10.8	11.0
		平均着床数	9.45	10.31	9.35	9.67
		平均生存胎児数	8.40	9.25	8.71	5.78
		着床前損失率 (%)	21.6	↓11.2	13.6	12.3
		着床後損失率 (%)	10.4	12.6	6.8	↑41.3
		子宮内死亡率 (%)	早期	8.7	8.9	5.2
	後期	1.7	3.7	1.6	3.1	
胎児動物	同腹児重量 (g)	364	379	366	↓232	
	胎児体重 (g)	44.8	42.7	42.8	↓40.1	
	性比 (雄%)	44.0	50.2	↑59.1	↓29.7	
	外表・内臓検査胎児 (腹) 数	168 (20)	148 (16)	148 (17)	52 (9)	
	重度異常を有する胎児 (腹) 数	5 (4)	4 (3)	0 (0)	3 (3)	
	二分脊椎髄膜瘤	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	二分脊椎脊椎裂	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	体壁閉鎖不完全	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	外脳症	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	髄膜瘤	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	口蓋裂	0 (0)	1 (1)	0 (0)	2 (2)	
	内水頭症	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	大動脈拡張	2 (2)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	大動脈弓離断	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	肺動脈縮小	2 (2)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	鎖骨下動脈欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	肺葉欠損	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
	横隔膜ヘルニア	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	鎖肛	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
	腹壁破裂	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
臍帯ヘルニア	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

e) 屠殺時に全胚吸収であった9例を除く。

着床前損失率 (%) = ((黄体数 - 着床数) / 黄体数) × 100

着床後損失率 (%) = ((着床数 - 生存胎児数) / 着床数) × 100

対照群との有意差の検定 (↑↓: p < 0.05, ↑↑: p < 0.01)

Student の t 検定: 同腹児重量、胎児体重、

Fisher 直接確率検定: 着床前損失率、着床後損失率、子宮内死亡率、性比、異常/変異を有する胎児および腹の割合

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照	5	20	60
胎 児 動 物	肝臓一肥厚/葉癒合	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	胆嚢欠損	2 (2)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	水尿管	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	内生殖器欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	後足過屈曲	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	後肢異常回転	2 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
	無尾	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	軽度異常を有する胎児 (腹) 数	9 (7)	9 (6)	5 (3)	2 (2)
	頭部皮膚半透明	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	頸部皮下浮腫	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	心室壁肥厚	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	左鎖骨下動脈/遠位心臓に隣接する過剰血管	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	肺副葉欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	肝臓嚢胞付着	7 (5)	9 (6)	5 (3)	3 (3)
	肝臓変形	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	胆嚢二葉	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	胆嚢痕跡状	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	副脾	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	腎臓位置異常	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	中等度腎盂拡張	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	軽度腎盂拡張	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	蛇行尿管	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	前足軽度屈曲	0 (0)	2 (2)	0 (0)	1 (1)
	軽度曲尾	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	痕跡状尾	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	骨格検査胎児 (腹) 数	168 (20)	148 (16)	148 (17)	52 (9)
	重度異常を有する胎児 (腹) 数	3 (2)	1 (1)	2 (2)	3 (3)
	頬骨弓異常	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	頭蓋無発生	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	頭頂骨穿孔	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
前頭骨/頭頂骨の奇形	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
頭蓋肉眼的奇形	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)

Fisher 直接確率検定: 異常/変異を有する胎児および腹の割合

(つづく)

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照	5	20	60
胎 児 動 物	第1腰椎弓未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	仙/尾椎弓拡張	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	仙椎奇形	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	尾椎欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	尾椎数減少	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	脊柱重度欠陥	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	脊柱側弯	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	腰/仙/尾椎弓拡張	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	第11肋骨欠損	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第5/第6肋骨過度癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	腸骨背側移動	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	後肢奇形	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	後足指骨数減少	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	軽度異常を有する胎児(腹)数	87 (20)	74 (15)	65 (16)	19 (8)
	頭頂間骨と後頭骨の統合	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	頭頂間骨分割	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	頭頂間骨不完全骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	後頭骨変形	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	頭頂骨陥凹	1 (1)	0 (0)	1 (1)	2 (2)
	前頭骨間縫合骨	1 (1)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
	前頭骨-鼻骨間縫合骨	1 (1)	5 (4)	1 (1)	0 (0)
	鼻骨間縫合骨	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	頭頂骨間縫合骨	1 (1)	1 (1)	4 (3)	0 (0)
	大泉門軽度拡張	1 (1)	1 (1)	0 (0)	3 (3)
	小泉門軽度拡張	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	頭頂骨癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	舌骨変形	3 (3)	3 (3)	5 (5)	1 (1)
	舌骨不完全骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	歯状突起未骨化	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
	歯状突起/中央結節癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	第1頸椎弓不完全骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第2頸椎弓不完全骨化	3 (2)	1 (1)	0 (0)	0 (0)

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: $p < 0.05$, ↑↑↓: $p < 0.01$)

Fisher 直接確率検定: 異常/変異を有する胎児および腹の割合

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)	対照	5	20	60
第3頸椎体分割	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
第3頸椎半椎体未骨化	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
第7頸椎横突起不完全骨化	0 (0)	3 (1)	↑6 (3)	1 (1)
歯状突起/第2頸椎体間骨化部	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
頸筋	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
第7胸椎弓不完全骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
第9胸椎弓縮小	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
第6胸椎体分割	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
第7胸椎体分割	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
第12胸椎体位置異常	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
第9胸椎体未骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
第7胸椎半椎体/第6胸椎体癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
第5胸椎半椎体未骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
第11胸椎半椎体未骨化	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
第6胸椎半椎体不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
第3腰椎体分割	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
第1腰椎半椎体未骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
第3腰椎半椎体不完全骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
第3腰椎横突起完全骨化	10 (7)	8 (5)	5 (4)	0 (0)
第4腰椎横突起未骨化	1 (1)	3 (3)	0 (0)	0 (0)
第5腰椎横突起未骨化	1 (1)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
第6腰椎横突起未骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
第7腰椎横突起未骨化	2 (2)	2 (2)	2 (2)	0 (0)
尾椎軽度癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
第10胸椎-第1腰椎間椎弓配列異常	1 (1)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
仙椎前椎骨数 28	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
第1胸骨分節分割	1 (1)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
第2胸骨分節分割	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
第3胸骨分節分割	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
第4胸骨分節分割	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)

Fisher 直接確率検定: 異常/変異を有する胎児および腹の割合

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照	5	20	60
胎 児 動 物	第5胸骨分節分割	4 (4)	2 (2)	1 (1)	0 (0)
	第6胸骨分節分割	0 (0)	2 (2)	3 (3)	1 (1)
	第1胸骨分節過度異常配列	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	第5胸骨分節過度異常配列	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	第5胸骨分節未骨化	22 (9)	17 (6)	15 (8)	↓0 (↓0)
	第6胸骨分節未骨化	11 (6)	5 (4)	9 (4)	1 (1)
	第2胸骨分節不完全骨化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
	第4胸骨分節不完全骨化	1 (1)	2 (1)	0 (0)	0 (0)
	第6胸骨分節不完全骨化	22 (11)	16 (9)	11 (7)	10 (4)
	第2胸骨分節軽度異常配列	2 (1)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
	第3胸骨分節軽度異常配列	1 (1)	0 (0)	0 (0)	3 (3)
	第4胸骨分節軽度異常配列	1 (1)	0 (0)	2 (1)	1 (1)
	第5胸骨分節軽度異常配列	3 (2)	3 (2)	4 (4)	1 (1)
	第1胸骨分節前過剰骨化部分割	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	第1胸骨分節前過剰骨化核	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	第7胸骨分節存在	0 (0)	0 (0)	1 (1)	↑7 (2)
	第1胸骨分節/過剰骨化核癒合	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	第2-第3胸骨分節癒合	3 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	第3-第4胸骨分節癒合	2 (2)	0 (0)	2 (2)	2 (2)
	第4-第5胸骨分節癒合	2 (2)	0 (0)	1 (1)	2 (2)
	第9肋骨分岐	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	第11肋骨分岐	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第10肋骨短小	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	過剰第13肋骨-正常長・浮遊	3 (3)	1 (1)	2 (2)	2 (2)
	過剰第13肋骨-短小・浮遊	15 (9)	23 (9)	13 (8)	↓0 (↓0)
	過剰第13肋骨-不完全・分割	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	過剰第14肋骨-短小・浮遊	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	第6-第7肋骨軽度癒合	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	第10-第11肋骨軽度癒合	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	分岐第9肋骨/第10肋骨軽度癒合	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: p < 0.05、↑↓: p < 0.01)

Fisher 直接確率検定: 異常/変異を有する胎児および腹の割合

(つづく)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハッカマン・ラボラトリーズ(株)にある。

結果の概要

投与量 (mg/kg/日)		対照	5	20	60
胎 児 動 物	骨盤骨非対称配列	5 (3)	2 (1)	2 (2)	2 (2)
	恥骨未骨化	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	距骨未骨化	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
	変異を有する胎児 (腹) 数	141 (20)	131 (16)	↑137 (17)	↑51 (9)
	歯状突起不完全骨化	75 (16)	83 (15)	75 (15)	↑42 (9)
	第1仙椎骨非対称	34 (16)	28 (11)	31 (14)	11 (6)
	第2仙椎骨非対称	31 (14)	32 (12)	36 (14)	10 (6)
	仙椎前椎骨数 27	34 (13)	26 (9)	↑50 (13)	↑37 (9)
	第5胸骨分節不完全骨化	64 (18)	54 (14)	55 (15)	↓7 (5)
	過剰第13肋骨—正常長	60 (16)	49 (11)	68 (17)	↑45 (9)
	過剰第13肋骨—短小	21 (12)	15 (8)	12 (9)	2 (2)
	骨化スコア ^d				
		前肢指骨	2.78	2.91	2.87
	後肢指骨	1.03	1.06	1.06	1.04

太枠は検体の投与による影響であることを示す。

c) スコア1が完全骨化、スコア6は最も骨化が遅延していることを示す。

対照群との有意差の検定 (↑↓: $p < 0.05$, ↑↓: $p < 0.01$)

Student の t 検定: 骨化スコア

Fisher 直接確率検定: 異常/変異を有する胎児および腹の割合

8. 変異原性

(1) 遺伝子突然変異原性

① 細菌を用いた復帰変異性試験

(資料22)

試験機関 (財)

報告書作成年 1986年

検体の純度: %

方 法: サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium*, ヒスチジン要求性 TA100, TA98, TA1535, TA1537 株及び大腸菌 *Escherichia coli* トリプトファン要求性 WP2uvr 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9)の存在下及び非存在下で Amesらの方法で変異原性を検定した。検体を滅菌蒸留水で希釈し、純度を換算して試験に供した。試験濃度は予備試験の結果から 2, 840 μ g/プレート(有効成分 1, 200 μ g/プレート)を最高投与量とした。試験は3反復で1回行った。

結 果: 次頁の表のとおり

検体は直接法においては 355~1, 420 μ g/プレート(有効成分濃度 150~600 μ g/プレート)の試験濃度においてすべての試験菌株に対し生育阻害を示し、また代謝活性化法では TA100株を除く4菌株に対し 710~2, 840 μ g/プレート(有効成分濃度 300~1, 200 μ g/プレート)で生育阻害を示した。しかし、88.7~2, 840 μ g/プレート(有効成分濃度 37.5~1, 200 μ g/プレート)のいずれの濃度においても溶媒対照に比べて復帰突然変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。一方、直接法、代謝活性化法の陽性対照はすべての検定菌株に顕著な復帰突然変異を誘発した。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

(細菌を用いた復帰変異性試験結果)

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$) ()内有効成分濃度	S-9 Mixの 有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2hcr	TA1353	TA100	TA1537	TA98	
対照 (滅菌蒸留水)	—	—	23 \pm 6	29 \pm 4	138 \pm 14	7 \pm 2	22 \pm 1	
	—	—	22 \pm 7	26 \pm 8	150 \pm 15	3 \pm 2	21 \pm 4	
検体	88.7(37.5)	—	16 \pm 4	16 \pm 3	131 \pm 8	2 \pm 0	19 \pm 7	
	177(75)	—	20 \pm 12	13 \pm 1	106 \pm 4	3 \pm 3	16 \pm 3	
	355(150)	—	20 \pm 10	7 \pm 2	89 \pm 19	5 \pm 2*	13 \pm 8	
	710(300)	—	13 \pm 4	6 \pm 2	69 \pm 4	2 \pm 1*	12 \pm 2	
	1420(600)	—	10 \pm 6*	0 \pm 1*	7 \pm 5*	0 \pm 0*	2 \pm 1*	
	2840(1200)	—	3 \pm 4*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	
対照 (滅菌蒸留水)	—	+	27 \pm 1	21 \pm 5	151 \pm 16	6 \pm 1	39 \pm 3	
	—	+	19 \pm 5	19 \pm 6	147 \pm 8	5 \pm 2	34 \pm 6	
検体	88.7(37.5)	+	18 \pm 9	15 \pm 2	140 \pm 12	5 \pm 2	33 \pm 2	
	177(75)	+	22 \pm 5	10 \pm 2	127 \pm 3	4 \pm 1	32 \pm 6	
	355(150)	+	22 \pm 4	10 \pm 2	122 \pm 17	4 \pm 1	23 \pm 1	
	710(300)	+	15 \pm 6	4 \pm 1	105 \pm 6	3 \pm 3*	19 \pm 4	
	1420(600)	+	18 \pm 8	0 \pm 0	10 \pm 8	1 \pm 1*	7 \pm 1*	
	2840(1200)	+	4 \pm 5*	0 \pm 0*	0 \pm 0	0 \pm 0*	0 \pm 0*	
陽性 対照	AF-2	0.01	—	170 \pm 57	—	580 \pm 38	—	—
		0.1	—	—	—	—	—	563 \pm 37
	ENNG	5	—	—	98 \pm 3	—	—	—
	ACR	80	—	—	—	—	107 \pm 33	—
	2-AA	0.5	+	—	—	500 \pm 16	—	204 \pm 17
		2	+	—	141 \pm 10	—	126 \pm 27	—
	40	+	463 \pm 54	—	—	—	—	

注)* 生育阻害が認められた。

観察はいずれも3プレートで実施した。

陽性対照の略称

AF-2 ; 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

ENNG ; 1-エチル-2-ニトロ-3-ニトロソグアニジン

ACR ; 9-アミノアクリジン

2-NF ; 2-ニトロフルオレン

2-AA ; 2-アミノアントラセン

②チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験

(資料23)

試験機関

報告書作成年 1987年

検体の純度: %

方 法: チャイニーズ・ハムスターの継代培養した卵巣細胞を用いてHGPRT遺伝子座に対する突然変異誘発性を検査した。試験前に濃度設定のため実施した細胞毒性試験(細胞付着テスト)から、本試験の濃度は非活性化法、活性化法とも0.0464、0.1、0.215、0.464、1、2.15、4.64及び10 μ g/mlとした。これは有効成分換算濃度では0.0196、0.0422、0.0907、0.196、0.422、0.907、1.958及び4.220 μ g/mlである。

陽性対照として、非活性化法ではエチルメタンスルホネート(EMS)0.3mg/ml、活性化法では3-メチルコランスレン(MCA)0.01mg/mlを用いた。

試験は3回実施した。1回目の試験は、非活性化法においてコロニー形成率が低いため、また2回目の試験では陽性対照群のMCAによる突然変異の誘発が背景データよりも低かったため2回反復した。

結 果: 次頁以下の表のとおり。

3回目の試験において0.1及び1 μ g/mlの濃度では細胞毒性がみられ遺伝子変異原性もみられたが、用量反応関係が認められず判定基準に照らすとその基準には達しなかった。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下で遺伝子突然変異誘発性は陰性であると判断される。

(CHO細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験結果)

試験1

S-9 Mix	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	突然変異性 (フラスコ当りのコロニー数)					突然変異率*(%)		コロニー形成率** (%)	
							補正なし	補正後	投与24hr後	最終継代時
-	0	0	0	0	0	0	0	0	37.50	51.50
	0.0464	0	0	0	0	0	0	0	31.25	49.50
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	26.75	42.25
	0.215	0	0	0	0	0	0	0	38.50	56.00
	0.464	2	1	3	0	2	5.33	11.29	23.25	47.25
	1	0	0	0	0	0	0	0	24.50	57.00
	2.15	0	0	0	0	0	0	0	35.50	55.25
	4.64	0	0	0	0	0	0	0	20.25	55.00
	10	0	0	0	0	-	0	-	4.25	47.50
	陽性対照 (EMS)300		63	59	69	71	69	220.67	817.28	23.50
+	0	0	0	0	0	0	0	0	51.00	43.75
	0.0464	0	0	0	0	0	0	0	58.75	48.25
	0.1	2	0	3	3	2	6.67	13.68	47.25	48.75
	0.215	0	0	0	0	0	0	0	46.25	39.00
	0.464	0	0	0	0	0	0	0	44.25	37.75
	1	1	4	2	3	4	9.33	25.75	43.50	36.25
	2.15	0	0	0	0	0	0	0	45.50	54.75
	4.64	0	3	3	0	2	5.33	12.85	52.25	41.50
	10	4	2	6	4	-	13.33	26.80	42.75	49.75
	陽性対照 (MCA)100		15	18	22	21	-	50.67	108.38	41.25

* 細胞 10^6 個当りの突然変異細胞数, 選択培地への継代時のコロニー形成率で補正

** 各フラスコ当りのコロニー数平均値の播種細胞数(約200個)に対する割合

陽性対照の略称;

MCA; 3-Methylcholanthrene

EMS; Ethylmethanesulfonate

試験2

S-9 Mix	濃度 (μ g/ml)	突然変異性 (フラスコ当りのコロニー数)					突然変異率*(%)		コロニー形成率** (%)	
							補正なし	補正後	投与24hr後	最終継代時
-	0	0	0	-			0	0	59.50	56.25
	0.0464	0	0	0			0	0	56.00	64.25
	0.1	0	0	0			0	0	61.00	65.25
	0.215	0	0	0			0	0	40.25	54.00
	0.464	3	3	4			11.11	16.04	46.25	69.25
	1	0	0	0			0	0	37.25	60.50
	2.15	0	0	0			0	0	39.00	60.75
	4.64	0	0	0			0	0	32.50	66.25
	10	0	-	-			0	0	14.00	56.00
	陽性対照 (EMS)300	68	46	-			190.00	633.33	38.00	30.00
+	0	0	0	0	0	0	0	0	80.00	55.00
	0.0464	0	0	0	0	0	0	0	51.00	54.00
	0.1	0	1	1	1	0	2.00	3.77	59.25	53.00
	0.215	1	0	1	0	0	1.33	2.82	46.50	47.25
	0.464	0	0	0	0	-	0	0	57.50	60.50
	1	0	0	0	0	0	0	0	51.25	58.25
	2.15	0	0	0	0	-	0	0	42.00	73.75
	4.64	0	0	0	0	-	0	0	54.50	72.25
	10	0	0	0	0	0	4.00	6.56	39.50	61.00
	陽性対照 (MCA)100	9	14	12	10	-	37.50	78.95	48.25	47.50

* 細胞 10^6 個当りの突然変異細胞数, 選択培地への継代時のコロニー形成率で補正

** 各フラスコ当りのコロニー数平均値の播種細胞数(約200個)に対する割合

陽性対照の略称;

MCA; 3-Methylcholanthrene

EMS; Ethylmethanesulfonate

試験3

S-9 Mix	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	突然変異性 (フラスコ当りのコロニー数)					突然変異率*(%)		コロニー形成率** (%)	
							補正なし	補正後	投与24hr後	最終継代時
-	0	0	0	0	0	0	0	0	48.50	93.25
	0.0464	0	0	0	0	0	0	0	33.00	76.75
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	51.25	75.75
	0.215	0	0	0	0	0	0	0	44.25	64.50
	0.464	0	0	0	0	0	0	0	62.75	80.50
	1	0	0	0	0	0	0	0	49.25	72.25
	2.15	0	1	0	0	0	0.67	0.92	41.25	73.00
	4.64	0	0	0	0	0	0	0	44.75	68.00
	10	1	2	3	2	0	5.33	8.53	20.50	62.50
	陽性対照 (EMS)300	57	44	64	47	49	174.00	250.36	21.00	69.50
+	0	0	0	0	0	0	0	0	67.75	97.25
	0.0464	0	0	0	0	0	0	0	60.25	80.50
	0.1	0	0	0	0	1	0.67	0.68	50.00	99.00
	0.215	2	2	3	1	2	6.67	8.55	47.75	78.00
	0.464	0	0	0	0	0	0	0	44.75	78.25
	1	9	11	8	10	7	30.00	34.58	44.50	86.75
	2.15	0	0	0	0	0	0	0	70.50	76.25
	4.64	0	0	0	0	0	0	0	50.75	91.75
	10	3	3	3	6	3	12.00	13.95	7.00	86.00
	陽性対照 (MCA)100	167	169	163	197	164	573.33	725.73	34.25	79.00

* 細胞 10^6 個当りの突然変異細胞数, 選択培地への継代時のコロニー形成率で補正

** 各フラスコ当りのコロニー数平均値の播種細胞数(約200個)に対する割合

陽性対照の略称;

MCA ; 3-Methylcholanthrene

EMS ; Ethylmethanesulfonate

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバックマン・ラボラトリーズ(株)にある。

(2) 染色体異常試験

ヒトのリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料24)

試験機関

報告書作成年 1987年

検体の純度： %

試験方法：ヒトの静脈血から採血したリンパ球を用いた。

薬量；広範囲薬量での予備試験を実施し中期分裂像の形態から判断した最高濃度を基にして本試験濃度は非代謝活性条件 (S-9 mix 存在しない) では 20,10,5,1 μ g/mL (有効成分換算濃度;8.44,4.22,2.11,0.422 μ g/mL) を、代謝活性条件 (S-9 mix 存在下) では 40,20,10 μ g/mL (有効成分濃度;16.88,8.44,4.22 μ g/mL) の濃度を設定した。代謝活性条件に使用した S-9mix は SD 系ラットより Ames らの方法に従い調整した。培養・観察；ヒトの静脈血から採血した全血液を PHA 含有染色体用培地で 37°C で 48 時間養した。被験物質溶液、マイトマイシン C (S-9mix を添加した場合は サイクロフォスファミドを) または溶媒を添加し更に 24 時間培養した。コルセミドを添加し 2-3 時間後に標本作成した。

観察は各濃度で 100 個/プレートの分裂中期像を観察した。試験は 2 反復で 1 回行った。

染色体の異常をギャップ (gap), 交換 (exchange), マルチプル及び細粉化に分類し、計測した。また、1500 個の細胞を観察して分裂頻度を計測し、観察細胞中の中期分裂像数の実測値及び溶媒対照を 100% とした場合の相対値で示した。

結果：次頁の表のとおり。

検体投与群は代謝活性の存在下及び非存在下において構造的染色体異常が有意に増加し、その増加性には用量依存性が認められた。

以上の結果から、本検体におけるヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験での変異原性は陽性であると判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバックマン・ラボラトリーズ(株)にある。

(ヒトのリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験結果)

S9 mix	薬物	濃度 (μ g/mL)	処理 時間	標本 作成 時間	観察 細胞 数	異常を有する細胞数					倍数性 (%)	異数性 (%)	分裂頻度 (相対値)	評価
						ギャップを 含む異常細 胞数(%)	ギャップを 除く異常細 胞数(%)	交換 (%)	マルチ プル	細粉 化				
-	溶媒対照 (蒸留水)	-	72hr	2 ~ 3hr	200	10(5.0)	1(0.5)	0(0)	0	0	0	0	6.7(100)	-
	検体	1			200	17(8.5)	3(1.5)	0(0)	0	0	1(0.5)	0	7.1(105)	±
		5			200	17(8.5)	2(1.0)	0(0)	0	0	1(0.5)	0	9.7(144)	±
		10			200	25(12.5)	7(3.5)	0(0)	0	0	0	0	10.9(161)	+
		20			200	24(24.0)**	10(10.0)**	2(2.0)	0	0	0	0	9.7(143)	+
	陽性 対照*	0.3			100	53(53.0)**	51(51.0)**	24(24.0)	9	0	0(0)	0	1.9(28)	+
	無処理	-			200	10(5.0)	2(1.0)	0(0)	0	0	1(0.5)	0	7.7(100)	-
	+	溶媒対照 (蒸留水)			-	72hr	2 ~ 3hr	200	10(5.0)	1(0.5)	0(0)	0	0	1(0.5)
検体		10	200	14(1.4)	3(0.3)			0(0)	0	0	3(0.3)		7.3(100)	+
		20	200	28(14.0)	10(5.0)**			2(1.0)	0	0	0	0	8.5(118)	+
		40	200	40(20.0)**	17(8.5)**			2(1.0)	1	0	0	0	11.4(157)	+
陽性 対照*		6	100	23(23.0)**	15(15.0)**			4(4.0)*	0	0	0	0		+
無処理		-	200	11(5.5)	2(1.0)			1(0.5)	0	0	0	0	0.7(100)	-

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (Fisherの検定)

検体濃度40, 20, 10, 5, 1 μ g/mLは有効成分換算では 16.88, 8.44, 4.22, 2.11, 0.422 μ g/mL である。陽性対照: a:7イトマイシンC, b:シクロホスファミド

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバックマン・ラボラトリーズ(株)にある。

①チャイニーズ・ハムスター骨髄細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験

(資料25)

試験機関

報告書作成年 1987年

検体の純度: %

方法: 予備試験の結果から、蒸留水に溶解した検体を体重あたり150, 300及び600mg/kg (有効成分換算; 63.3, 126.6, 253.2mg/kg) で1群雌雄各5匹に単回経口投与した。陰性対照として蒸留水及び陽性対照としてシクロfosファミド(CPP)を投与した。各濃度で100個(各群で計1000個)の分裂中期像を観察した。染色体の異常をギャップ(gap), 切断(break), 交換(exchange), マルチプル及び細粉化に分類し計測した。

結果: 次頁の表のとおり。

検体投与群は染色体異常の発現頻度において濃度及び異なる処理時間群との間に有意な差は認められなかった。一方、陽性対照として用いたシクロfosファミドは顕著な染色体異常の増加がみられた。

以上の結果から、本検体におけるチャイニーズハムスター骨髄細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験では陰性であると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はハクマン・ラボラトリーズ(株)にある。

(チャイニーズ・ハムスター骨髄細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験結果)

処 理 時	薬物	濃度 (mg/kg)	染色体異常 を有する細 胞の発現し	異常を有する細胞数					倍数性 (%)	異数性 (%)	評価
				ギャップを 含む異常細	ギャップを 除く異常細	交換 (%)	マルチプル	細粉化			
24 時 間	溶媒対照 (蒸留水)	—	9	26 (2.6)	1 (0.1)	0 (0)	0	0	1 (0.1)	3 (0.3)	—
	検体	150	9	12 (1.2)	2 (0.2)	0 (0)	0	0	0 (0)	7 (0.7)	—
		300	8	18 (1.8)	1 (0.1)	0 (0)	0	0	0 (0)	23 (2.3)	—
		600	6	24 (2.4)	9 (0.9)	0 (0)	0	0	0 (0)	18 (1.8)	—
	陽性対照 (CPP)	40	10	322** (32.2)	261** (26.1)	70** (7.0)	114	23	0 (0)	11 (1.1)	+
6 時 間	溶媒対照 (蒸留水)	—	10	26 (2.6)	1 (0.1)	0 (0)	0	0	1 (0.1)	3 (0.3)	—
	検体	600	7	14 (1.4)	3 (0.3)	0 (0)	0	0	3 (0.3)	17 (1.7)	—
48 時 間	溶媒対照 (蒸留水)	—	9	26 (2.6)	1 (0.1)	0 (0)	0	0	1 (0.1)	3 (0.3)	—
	検体	600	5	7** (0.7)	1 (0.1)	0 (0)	0	0	3 (0.3)	8 (0.8)	—

* ; p<0.05, ** ; p<0.01 (Fisherの検定)

陽性対照の略称 : CPP:サイクロフォスファミド

表中検体濃度 150, 300 及び600 mg/kg は有効成分換算濃度では63.3, 126.6 及び 253.2mg/kgである。

(3) DNA損傷誘発性

細菌を用いたDNA修復試験

(資料26)

試験機関

報告書作成年 1986年

検体の純度: %

方法: 枯草菌(*Bacillus subtilis*)のH17(Rec⁺)及びM45(Rec⁻)株を用い、代謝活性化及び非活性化法によってDNA損傷の誘発性を検定した。

検体を滅菌蒸留水で希釈し、純度を換算して試験に供した。試験濃度は予備試験の結果から、非活性化法では379 μ g/ディスク(有効成分濃度160 μ g/ディスク)、代謝活性化法では757 μ g/ディスク(有効成分濃度320 μ g/ディスク)を最高投与量とした。

結果: 次頁の表のとおり

非活性化法24~379 μ g/ディスク(有効成分濃度10~160 μ g/ディスク)、代謝活性化法24~757 μ g/ディスク(有効成分濃度10~320 μ g/ディスク)の各試験濃度において両試験菌株に対する生育阻害が認められた。しかし各試験濃度における生育阻止帯差はいずれとも2mm未満であった。

一方、陽性対照のマイトマイシンC及びTrp-P-1においては生育阻止帯差が4mm以上となりDNA損傷性が認められた。

また陰性対照薬剤カナマイシン(0.3 μ g/ディスク)はタンパク質合成阻害作用を有するため、両菌株の生育阻止帯径は同程度であった。

以上の結果より、本検体は代謝活性化を含む本試験条件下においてDNA損傷の誘発性がないものと判断される。

(細菌を用いたDNA修復試験結果)

代謝活性化 の有無	薬 物	濃度 $\mu\text{g}/\text{disk}$ (有効成分濃度)	阻止域 (mm)		差 (mm) (M45-H17)	判定
			M45 (Rec ⁻)	H17 (Rec ⁺)		
非活性化	対 照	—	0.0	0.0	0.0	—
	(滅菌蒸留水)	—	0.0	0.0	0.0	—
	検 体	12 (5)	0.0	0.8	<0.0	—
		24 (10)	3.0	3.8	<0.0	—
		47 (20)	11.8	12.4	<0.0	—
		95 (40)	21.9	23.4	<0.0	—
		189 (80)	35.4	34.9	0.5	—
		379 (160)	46.6	46.6	0.0	—
	陰性対照 (カナマイシン)	0.3	8.3	7.9	0.4	—
	陽性対照 (マイトマイシンC)	0.02	9.4	0.1	9.3	+
活性化	対照	—	0.0	0.0	0.0	—
	(滅菌蒸留水)	—	0.0	0.0	0.0	—
	検 体	24 (10)	0.5	0.1	0.4	—
		47 (20)	4.1	4.9	<0.0	—
		95 (40)	9.1	9.9	<0.0	—
		189 (80)	16.4	17.0	<0.0	—
		379 (160)	23.0	22.3	0.7	—
		757 (320)	27.8	26.6	1.2	—
陽性対照 (Trp-P-1)	20	7.4	0.6	6.8	+	

陽性対照の略称。 Trp-P-1 ; トリプトファン P 1

陽性対照 : a:マイトマイシンC, b:シクロフォスファミド

9. 生体の機能に及ぼす影響

カーバムナトリウム塩における薬理試験

(資料27)

試験機関

報告書作成年 1991年

検体の純度: %

①中枢神経系に対する作用

i) マウスの一般症状

供試動物: ICR系マウス, 体重22~26g(経口投与)または23~28g(静脈内投与), 1群雄3匹

方法: 検体を蒸留水で希釈し, 純度を換算して(以下同じ)30, 100, 300及び1,000mg/kgを経投与し, また, 生理食塩水で希釈して30, 100及び300mg/kgを静脈内投与した。Irwinの多次元観察法に準じて一般症状を観察した。

結果: 経口投与では100mg/kg以上でグルーミングの低下, 自発運動の軽度な低下; 300mg/kg以上で瞳孔径の軽度な増大, 軽度の流涙, 体温の軽度な低下及び1,000mg/kgでは上記の他立毛が観察された。自発運動は逆に軽度の亢進を示した。これ等の症状は投与6時間以内に消失した。静脈内投与では100mg/kg以上でグルーミング, 自発運動及び体温の軽度な低下, 軽度の流涙, 300mg/kgで四肢筋緊張度, 躯体緊張度の軽度な低下, 瞳孔径の軽度な増大, 握力の低下が観察された。これ等の症状は投与2時間以内に消失した。

ii) マウスにおける睡眠延長作用

供試動物: ICR系マウス, 体重26~30g, 1群雄8匹

方法: 検体を蒸留水で希釈して30, 100及び300mg/kgを経口投与して1時間後にヘキソバルビタール(80mg/kg)を腹腔内投与し, 正向反射消失から正向反射回復までの時間を睡眠時間として測定した。陽性対照群にはクロルプロマジン10mg/kgを経口投与した。

結果: 300mg/kg経口投与で対照群に対し1.9倍と睡眠時間を有意に延長した(Dunnett検定, $P < 0.05$)。

iii) ラットの正常体温に対する作用

供試動物: Sprague-Dawley系ラット, 体重140~180g, 体温37.5~38.9°C, 1群雄8匹

方法: 検体を蒸留水に溶解して30, 100及び300mg/kgを経口投与し, 投与0.5, 1, 2及び4時間後に直腸温を測定した。陽性対照群にはクロルプロマジン20mg/kgを経口投与した。

結果: 100mg/kg以上の投与群で投与2時間後においてのみ有意に低下した(Dunnett検定, $P < 0.05$)。

iv) マウスの痙攣に対する作用

イ) 電撃痙攣に対する作用(痙攣誘発作用)

供試動物：ICR系マウス，体重21～26g，1群雄8匹

方 法：検体を蒸留水で希釈して30，100及び300mg/kgを経口投与し，投与1時間後に電気刺激装置により両角膜を痙攣誘発閾値よりやや低い電撃条件(10mA，5msec，0.6sec)で刺激し，誘発される痙攣(強直性屈曲：TF，強直性伸展：TE，間代性痙攣：CL，昏睡：CO)の有無を観察した。陽性対照群にペンチレンテトラゾール40mg/kgを皮下投与し，その15分後に電気刺激を行った。

結 果：100mg/kg投与群でTF，TE，CL及びCOが1/8例に発現したが，対照群，30mg/kg及び300mg/kg投与群では1例も発現しておらず，用量依存性は認められなかったことからこれは偶発的なものであると考え，痙攣誘発作用は認められないと結論した。

ロ) 抗痙攣作用

供試動物：ICR系マウス，体重26～32g，1群雄8匹

方 法：検体を蒸留水で希釈して30，100及び300mg/kgを経口投与してから1時間後にペンチレンテトラゾール150mg/kgを皮下投与して発現する間代性痙攣(CL)，強直性伸展痙攣(TE)及び死亡の有無を30分間観察した。陽性対照群にシアゼパム3mg/kgを経口投与した。

結 果：検体投与群においては対照群と同じく，全例にCL，TE及び死亡がみられ，抗痙攣作用は認められなかった。

v) 協調運動に対する作用(回転棒)

供試動物：ICR系マウス，体重16～20g，1群雄8匹(予め6rpmで回転する回転棒上に乗せ，3分以上とどまるマウスを使用)

方 法：検体を蒸留水に溶解して30，100及び300mg/kgを経口投与し，投与1，2及び4時間後に回転棒にマウスを乗せ，1分以内に落下する場合は陽性とみなした。

結 果：検体投与による有意な作用は認められなかった。

②呼吸，循環器系に対する作用(呼吸・血圧・心拍数及び心電図)

供試動物：日本白色種ウサギ，体重2.7～3.0kg，1群雄4匹

方 法：ウレタンで麻酔した後，気管に気管カニューレを挿入し，大腿動脈及び静脈にそれぞれカテーテルを挿入した。呼吸運動は気管カニューレより呼吸流量計を用いて，血圧は大腿動脈カテーテルより圧トランスジューサに導くことにより，心拍数は血圧脈波より心拍計を駆動させることによりポリグラフ上に記録した。心電図は第二誘導により心電計に記録した。

検体は生理食塩水で希釈して、10、30及び100mg/kgを大腿静脈に挿入したカテーテルを介して投与した。

結果：100mg/kg投与で血圧、呼吸流量ならびに呼吸数が上昇し、心拍数が低下したが、いずれの作用も一過性で5分後にほぼ元に回復した。心電図波形には明らかな変化が認められなかった。

③自律神経系に対する作用

i) 摘出輸精管に対する作用

供試動物：Sprague-Dawley系ラット，体重310～360g，雄4匹

方法：ラットを放血致死させた後輸精管を摘出した。混合ガス(95%O₂+5%CO₂)を通気し32°CのKrebs-Henseleit液20mlを含むマグヌス装置に輸精管を懸垂した。収縮張力はFDピックアップを用いて0.5gの静止張力をかけ記録した。収縮はノルエピネフリン(10⁻⁷～10⁻³M)または白金双極電極を介する経壁刺激により惹起させた。検体の前処置時間はノルエピネフリン収縮に対しては5分とした。電気刺激試験においては検体を累積的に加えることにより行なった。検体は10⁻⁶、10⁻⁵及び10⁻⁴g/mlを適用した。

結果：摘出輸精管のノルエピネフリン収縮及び電気刺激収縮に対しては10⁻⁴g/mlで明らかに抑制した(Dunnett検定、P<0.05)。

ii) 摘出回腸に対する作用

供試動物：Hartley系モルモット，体重560～590g，雄4匹

方法：モルモットを放血致死させた後回腸を摘出した。混合ガス(95%O₂+5%CO₂)を通気した32°CのKrebs-Henseleit液20mlを含むマグヌス装置に回腸標本を懸垂した。収縮張力は等張性トランスジューサを用いて0.5gの静止張力をかけ記録した。収縮薬としてアセチルコリン(ACh)、ヒスタミン(Hist)及び塩化バリウム(BaCl₂)を用いた。ACh及びHistの場合には累積的投与による用量反応曲線を得た後、検体を収縮薬適用5分前に処置した。BaCl₂の場合には単独濃度(10⁻³M)適用による収縮反応を記録した後、検体を処置し、その5分後にBaCl₂を適用した。検体は10⁻⁶、10⁻⁵及び10⁻⁴g/mlを適用した。

結果：摘出回腸におけるACh、Hist及びBaCl₂収縮に対して明らかな影響を示さなかった。

④ 消化器系に及ぼす作用(腸管輸送能に対する作用)

供試動物：ICR系マウス，体重22～26g，1群雄8匹

方法：検体を蒸留水で希釈して30、100及び300mg/kgを経口投与し、投与1時間後に5%アラビア

ゴム液に懸濁させた5%炭末液(0.2ml/マウス)を経口投与した。30分後に頸椎脱臼により致死させた後、胃腸管を摘出し、幽門部より回盲部までの長さに対する炭末到達部までの長さから炭末の移動率を求めた。陽性対照群にはアトロピン80mg/kgを経口投与した。

結 果：腸管輸送能に対し全投与群で影響を及ぼさなかった。

⑤骨格筋に対する作用(横隔膜神経筋標本に対する作用)

供試動物：Sprague-Dawley系ラット，体重250～300g，雄4匹

方 法：ラットを放血致死させた後Buelbringの方法に従って横隔膜を横隔膜神経と共に摘出して扇状の横隔膜標本を作成し、混合ガス(95%O₂+5%CO₂)を通気した37℃のKrebs-Henseleit液20mlを含むマグヌス装置に懸垂した。収縮張力の記録はFDピックアップを用いて1gの静止張力をかけ行なった。収縮は電気刺激装置を用いて神経(0.1Hz, 0.1msec, 5～10V)及び筋肉(0.1Hz, 2msec, 20～50V)を交互に電気刺激することにより惹起させた。検体は10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴g/mlを累積的に適用した。陽性対照にd-ツボクラリン(3×10⁻⁵M)を処置した。

結 果：ラット横隔膜神経筋標本の神経及び筋直接刺激による収縮に対して、検体投与による影響は認められなかった。

⑥血液系に対する作用

i) 溶血に対する作用

供試動物：Sprague-Dawley系ラット，体重170～210g，1群雄6匹

方 法：検体を蒸留水で希釈して30, 100及び300mg/kgを経口投与した。投与1時間後にベントバルビタール(50 mg/kg腹腔内投与)麻酔下に開腹して腹部大静脈から採血し、ヘパリンを加え、3000rpmで10分間遠心して血漿を得た。この血漿をトリス緩衝生食液(pH7.4)で希釈して吸光度(OD540nm)を測定した。この吸光度から溶血の判定を行なった。

結 果：検体投与による影響は認められなかった。

ii) 血液凝固に対する作用

供試動物：Sprague-Dawley系ラット，体重175～215g，1群雄6匹

方 法：検体を蒸留水で希釈して30, 100及び300mg/kgを経口投与した。投与1時間後にベントバルビタール(50mg/kg腹腔内投与)麻酔下に腹部大静脈から採血し、血液0.9容に対して3.8%クエン酸ナトリウム0.1容を加え、12,000rpmで3分間遠心分離して血漿を得た。このクエン酸血漿にトロンボプラスチンCを添加してプロトロンビン時間(PT)をパトロンチン及び塩化カルシウムを添加して活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を血液凝固測定装置にて測定した。

結果：PTに対しては300mg/kgで対照群よりわずかな延長(4.9%)を認めたが、下記の様にわずかな変動であり、生物学的に意味のある差とは考えられない。なお、APTTに対し検体投与による影響は認められなかった。

	P T	平均値
対照群	13.7~15.0	14.3±0.2
カーバム群 (300mg/kg)	14.6~15.5	15.0±0.1

(n=6)

⑦ コリンエステラーゼに対する作用

供試動物：Sprague-Dawley系ラット，体重170~210g，1群雄6匹

方法：検体を蒸留水に溶解して30，100及び300mg/kgを経口投与した。投与1時間後にペントバルビタール(50mg/kg腹腔内投与)麻酔下に腹部大静脈から採血し，ヘパリンを加え，3000rpmで10分間遠心分離して血漿を得た。この血漿を用いてチオコリンエステルを基質としてDTNB法に従って生化学自動分析装置によりコリンエステラーゼ活性を測定した。

結果：血漿中コリンエステラーゼ活性に対して，検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果から，in vivo 試験において 30mg/kg 以下では薬理活性は示さなかったが，100mg/kg以上で薬理作用を発現した。in vitro 試験における明らかな作用発現は 摘出輸精管 でのみ認められその濃度は 10^{-4} g/mlであった。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /1群	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要
①中枢神経系に対する作用						
i) 一般症状・Irwin法 (マウス)	経口投与 (蒸留水)	30, 100, 300, 1000	♂3	30	100	下記表に記載*
	静脈内投与 (生理食塩水)	30, 100, 300	♂3	30	100	
ii) 睡眠延長作用(マウス)	経口投与 (蒸留水)	30, 100, 300	♂8	100	300	300mg/kgで対照群に対し 睡眠時間を1.9倍延長
iii) 正常体温に対する作用 (ラット)	経口投与 (蒸留水)	30, 100, 300	♂8	30	100	100mg/kg以上で投与2時間後 に有意に低下
iv) 痙攣に対する作用 (イ) 痙攣誘発作用(マウス)	経口投与 (蒸留水)	30, 100, 300	♂8	30	100	痙攣誘発作用なし (100mg/kg投与群の1例で 強直性屈曲などが発現)
(ロ) 抗痙攣作用(マウス)	経口投与 (蒸留水)	30, 100, 300	♂8	300	—	抗痙攣作用なし
v) 協調運動に対する作用 (マウス、回転棒)	経口投与 (蒸留水)	30, 100, 300	♂8	300	—	検体投与影響なし

* : 中枢神経系に対する一般症状

投与	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
経口	無	グルーミング、自発運動の軽度低下を認めたが1hr後に消失	グルーミング、自発運動の軽度低下、瞳孔の拡大、流涙などを認めたが4hr後に消失	同左の症状の他に顕著な立毛及び体温低下を示したが6hr後に消失。翌日1例死亡
静脈内	無	グルーミング、自発運動の軽度低下、軽度なる流涙を認めたが1hr以内に消失	グルーミング、自発運動の軽度低下、四肢緊張度の軽度低下、体温低下、瞳孔の増大、流涙などを認めたが2hr以内に消失	

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /1群	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要
②呼吸, 循環器系に対する作用 (ウサギ) ・呼吸・血圧・心拍数 ・心電図	静脈内投与 (生理食塩水)	10, 30, 100	♂4	30	100	血圧・呼吸流量・呼吸数に有意な上昇が、心拍数に有意な低下が見られた。
			♂4	100	—	心電図波形に影響なし
③自律神経系に対する作用 i) 摘出輸精管に対する作用 (ラット)	in vitro (溶媒A*)	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁴	♂4	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	ノルエピネフリン収縮および電気刺激収縮を抑制
ii) 摘出回腸に対する作用 (モルモット)	in vitro (溶媒A*)	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁴	♂4	10 ⁻⁴	—	アセチルコリン, ヒスタミン, 塩化バリウムによる収縮に対し影響なし
④消化器系に及ぼす作用 (マウス腸管輸送能に対する作用) 陽性対照: アトロピン30mg/kg(po)	経口投与 (蒸留水)	30, 100, 300	♂8	300	—	影響なし
⑤骨格筋に対する作用 (横隔膜神経筋標本に対する作用) (ラット)	in vitro (溶媒A*)	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁴	♂4	10 ⁻⁴	—	影響なし
⑥血液系に対する作用 (ラット) i) 溶血に対する作用	経口投与 (蒸留水)	30, 100, 300	♂6	300	—	影響なし
ii) 血液凝固に対する作用	経口投与 (蒸留水)	30, 100, 300	♂6	300	—	影響なし
⑦コリンエステラーゼに対する作用(ラット)	経口投与 (蒸留水)	30, 100, 300	♂6	300	—	影響なし

*溶媒A: Krebs-Henleit液

IX 製剤毒性

1. 急性経口/経皮毒性

(1) カーバムナトリウム塩液剤のラットにおける急性経口毒性試験

(資料28)

試験機関

報告書作成年 1991年

検体の純度: %液剤 (有効成分 %、水: %)

試験動物: Sprague-Dawley系(Crj: CD(SD))ラット(雌雄共5週齢, 平均体重 雄129g, 雌108g)1群雌雄各5匹

試験期間: 14日間観察

方法: 検体を注射用蒸留水で希釈して体重100g当り1ml投与した。投与前5時間、投与後3時間絶食させた。

試験項目: 中毒症状及び生死を14日観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について適用部位を含む組織の肉眼的病理検査を行った。

結果:

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	雌雄共に 1050, 1365, 1775, 2308, 3000
LD50(mg/kg) (95%信頼限界)	雄: 1838 (1504~2249) 雌: 2024 (1692~2421)
死亡開始時間及び終了時間	開始: 投与5時間後 終了: 投与1日後
症状発現及び消失時期	投与15分後から3日後まで
毒性徴候の認められなかった最高投与量(mg/kg)	最低投与群 (1050)、でも自発運動減少、流涎、流涙及び眼瞼下垂が観察された。
死亡例が認められなかった最高投与量(mg/kg)	雄: 1365 雌: 1365

一般状態では、流涎、流涙、眼瞼下垂、自発運動量減少が投与後15分ないし1時間より、間代性痙攣が投与後3時間より認められたが、雄では投与後2日、雌では投与後3日には全例が消失した。

体重では、雌雄とも投与後3日まで減少または増加抑制が認められたが、それ以降は順調な回復傾向を示した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三菱商事(株)にある。

剖検では、死亡例に胃の前腎部にうっ血または腺胃部に出血が認められ、生存例では、胃の前胃部粘膜に灰白色斑状の肥厚が認められた。

(2) カーバムナトリウム塩液剤のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料29)

試験機関

報告書作成年 1991年

検体の純度：30%液剤（有効成分： %、水： %）

試験動物：ICR系(Crj：CD-1)マウス(雌雄共5週齢，平均体重 雄30.0g，雌23.3g)1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：検体を注射用蒸留水で希釈して体重100g当り1ml投与した。投与前5時間、投与後3時間絶食させた。

試験項目：中毒症状及び生死を14日観察した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について適用部位を含む組織の肉眼的病理検査を行った。

結果：

投与方法	経口
投与量(mg/kg)	雌雄共に 723, 868, 1042, 1250, 1500, 1800
LD50(mg/kg) (95%信頼限界)	雄：1023(978~1070) 雌：951(951)
死亡開始時間及び終了時間	開始：投与6時間後 終了：投与3日後
症状発現及び消失時期	投与15分後から3日後まで
毒性徴候の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	最低投与群(723)でも自発運動減少、流涎、 流涙、間代性麻痺及び眼瞼下垂が観察された。
死亡例が認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雄：868 雌：868

一般状態では、流涎、流涙、眼瞼下垂、自発運動量減少が投与後15分ないし1時間より、間代性痙攣が投与後3時間より認められたが、投与後3日には消失した。

体重では、雌雄ともに投与後3日まで減少あるいは増加抑制がみられたが、それ以降は雌雄とも順調な増加が認められた。

剖検では、死亡例に胃の前胃部にうっ血または腺胃部に出血が認められ、生存例では胃の前胃部の粘膜に灰白色斑状の肥厚が認められた。

(3) カーバムナトリウム塩液剤のラットにおける急性経皮毒性試験

(資料30)

試験機関

報告書作成年 1991年

検体の純度：30%液剤（有効成分： %、水：67.2%）

試験動物：Sprague-Dawley系(Crj：CD(SD))ラット(雄6週齢，雌7週齢，平均体重雄246g，雌222g)1
群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察

方法：検体を刈毛した背部皮膚に塗布した。

試験項目：中毒症状及び生死を14日観察した。投与直前，投与3，7及び14日後に体重測定を行った。

観察終了時にすべての動物について剖検を行った。

結果：

投与方法	経皮
投与量(mg/kg)	2000
LD50(mg/kg)	雌雄共 2000以上
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時期	一般症状：投与30分～1時間後から2日後まで 投与部位：投与1日後から12日後まで
毒性徴候の認められなかった 最高投与量(mg/kg)	投与群(2000)で、自発運動減少、流涎、 流涙、眼瞼下垂、紅斑、痂皮形成が観察された。
死亡例が認められなかった 最高投与量(mg/kg)	雄：2000 雌：2000

雌雄共一般症状として、自発運動量減少、流涎、流涙あるいは眼瞼下垂、さらに雌に赤色流涙がみられ、投与部位では紅斑及び痂皮形成が認められた。

体重は投与後3日後に増加抑制あるいは減少が認められた動物もあったが、それ以降は順調な増加が認められた。

剖検では雌雄共異常は認められなかった。

2. 眼及び皮膚に対する刺激性

(1) 眼刺激性

ウサギを用いた眼一次刺激性試験

(資料31)

試験機関

報告書作成年 1991年

検体の純度：30%液剤(有効成分： %、水： %)

試験動物：日本白色種雌ウサギ(10週齢，体重2.0～2.4kg)1群9匹

試験期間：72時間観察

方法：検体0.1mlを右眼に単回投与し，6匹については洗眼せず，他の3匹については3分後に60秒間の洗眼を行った。

観察項目：投与1，24，48及び72時間後に角膜，虹彩，結膜の刺激性変化を観察した。

結果：観察した刺激性変化のDraize方法による採点は次ページの表のとおりである。

非洗眼群では投与1時間後に結膜の発赤及び浮腫，分泌物が全例にみられたが，投与48時間後までに消失した。洗眼群では投与1時間後に結膜の発赤及び浮腫が全例に，分泌物が1例にみられたが，投与後48時間までには消失した。洗眼群では非洗眼群に比較して，症状の程度に明確な軽減が認められなかったことから，洗眼操作の効果は少ないものと考えられる。

一般状態では投与直後に全例が苦痛を示し，奇声を発する例も認められた。その他に異常は認められなかった。

体重では検体の影響は認められなかった。

以上の結果より，本剤はウサギの眼粘膜に対して可逆性のごく軽度の刺激性があるものと思われる。

非洗眼群6匹の個別評価結果も次ページに取りまとめた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三菱商事(株)にある。

	動物 番号	項目	最高 評点	投与後時間				EEC 基準	
				1h	24h	48h	72h		
鼻 洗 眼	1	角膜	程度	4	0	0	0	0	0
		混濁	範囲	4	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
			発赤	3	1	0	0	0	0
		結膜	浮腫	4	1	0	0	0	0
			分泌物	3	2	0	0	0	0
		評点合計		110	8	0	0	0	0
	2	角膜	程度	4	0	0	0	0	0
		混濁	範囲	4	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
			発赤	3	1	0	0	0	0
		結膜	浮腫	4	1	0	0	0	0
			分泌物	3	2	0	0	0	0
		評点合計		110	8	0	0	0	0
	3	角膜	程度	4	0	0	0	0	0
混濁		範囲	4	0	0	0	0	0	
虹彩			2	0	0	0	0	0	
		発赤	3	1	1	0	0	0.3	
結膜		浮腫	4	1	0	0	0	0	
		分泌物	3	2	0	0	0	0	
	評点合計		110	8	2	0	0	0.3	
4	角膜	程度	4	0	0	0	0	0	
	混濁	範囲	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	
		発赤	3	1	0	0	0	0	
	結膜	浮腫	4	1	0	0	0	0	
		分泌物	3	2	1	0	0	0	
	評点合計		110	8	2	0	0	0	
5	角膜	程度	4	0	0	0	0	0	
	混濁	範囲	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	
		発赤	3	1	2	0	0	0.7	
	結膜	浮腫	4	1	0	0	0	0	
		分泌物	3	2	0	0	0	0	
	評点合計		110	8	2	0	0	0.7	
6	角膜	程度	4	0	0	0	0	0	
	混濁	範囲	4	0	0	0	0	0	
	虹彩		2	0	0	0	0	0	
		発赤	3	1	0	0	0	0	
	結膜	浮腫	4	1	0	0	0	0	
		分泌物	3	2	0	0	0	0	
	評点合計		110	8	0	0	0	0	
	6匹の合計の平均		110	8.0	1.0	0	0	0.17	
洗 眼 群	3 匹 合 計	角膜		4	0	0	0	0	0
		虹彩		2	0	0	0	0	0
			発赤	3	1.0	0.7	0	0	0.2
	結膜	浮腫	4	1.0	0	0	0	0	
		分泌物	3	0.7	0.3	0	0	0.1	
	3匹の合計の平均		—	5.3	2.0	0	0	—	

1) 評点合計=角膜評点+虹彩評点+結膜評点

角膜評点:(混濁)×(混濁領域)×5、虹彩評点:虹彩×5、結膜評点:((発赤)+(浮腫)+(分泌物))×2

2) EEC評価=24,48及び72時間後の評点の平均

3) 本表は、試験成績の個体別表を元に申請者が作成した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三菱商事(株)にある。

洗 眼 群	7	角膜	程度	4	0	0	0	0	0	
		混濁	範囲	4	0	0	0	0	0	
		虹彩		2	0	0	0	0	0	
			発赤	3	1	0	0	0	0	
		結膜	浮腫	4	1	0	0	0	0	
			分泌物	3	0	0	0	0	—	
		評点合計		110	4	0	0	0		
		角膜	程度	4	0	0	0	0	0	
		混濁	範囲	4	0	0	0	0	0	
		8	虹彩		2	0	0	0	0	
	発赤	3	1	1	0	0	0.3			
結膜	浮腫	4	1	0	0	0	0			
	分泌物	3	0	1	0	0	—			
評点合計		110	4	4	0	0				
9	9	角膜	程度	4	0	0	0	0	0	
		混濁	範囲	4	0	0	0	0	0	
		虹彩		2	0	0	0	0	0	
			発赤	3	1	1	0	0	0.3	
		結膜	浮腫	4	1	0	0	0	0	
			分泌物	3	2	0	0	0	—	
		評点合計		110	8	2	0	0		
		3匹の合計の平均			110	5.3	2.0	0	0	

(2) 皮膚刺激性

ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

(資料32)

試験機関

報告書作成年 1991年

検体の純度：30%液剤(有効成分： %、水： %)

試験動物：日本白色種雌ウサギ(10週齢，体重2.1~2.4kg)1群6匹

試験期間：10日間観察

方法：刈毛した皮膚に検体0.5mlを滴下した後，ガーゼパッチ(約2.5cm平方)を貼布した。

暴露時間は4時間とし，パッチを除去後，皮膚に残った検体は水を浸した脱脂綿を用いて拭き取った。

観察項目：パッチ除去1，24，48，72時間，7日及び10日後に投与部位の刺激性変化(紅斑，痂皮，浮腫)の有無を観察した。

結果：観察した刺激性変化の採点は，以下の表のとおりである。

観察期間	最高値	時間				日	
		1	24	48	72	7	10
紅斑・痂皮	2	0	1.2	1.0	0.5	0.3	0
浮腫	2	0.3	0.2	0	0	0	0
平均評点*	2	0.3	1.3	1.0	0.5	0.3	0
P. C. I. **		0.9					

* 紅斑，浮腫の評価点を加算した平均点を表す

** Primary Cutaneous Irritation Indexパッチ除去1，24及び48時間後の平均評点の平均

パッチ除去1時間後に浮腫(1例)24時間後に紅斑(全例)及び浮腫(1例)がみられ，48時間後には紅斑(全例)が認められた。これらの症状はパッチ除去10日後までに全例で消失した。その他の所見では，パッチ除去7日後に鱗屑(3例)が認められた。

一般状態及び体重では，検体の影響は認められなかった。

これらの結果より，本剤はウサギの皮膚に対して可逆性の軽度な刺激性があるものと思われる。投与6匹の個体別評価結果は次ページに取りまとめた。皮膚刺激性指数算出には，パッチ除去後1，24，48時間後の評価結果を元に算出した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は三菱商事(株)にある。

動物 番号	観察所見	最高評点	投与後時間、日数						PCI刺激性評点	
			1h	24h	48h	72h	7日	10日	計	平均
1	紅斑・痂皮	4	0	1	1	1	0	0	2	0.7
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0		
	他所見 一般状態		所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	鱗屑 異常なし	所見なし 異常なし		
2	紅斑・痂皮	4	0	1	1	1	1	0	2	0.7
	浮腫	4	0	0	0	0	0	0		
	他所見 一般状態		所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	鱗屑 異常なし	所見なし 異常なし		
3	紅斑・痂皮	4	0	2	1	1	0	0	5	1.7
	浮腫	4	2	0	0	0	0	0		
	他所見 一般状態		所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	鱗屑 異常なし	所見なし 異常なし		
4	紅斑・痂皮	4	0	1	1	0			2	0.7
	浮腫	4	0	0	0	0				
	他所見 一般状態		所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし				
5	紅斑・痂皮	4	0	1	1	0			2	0.7
	浮腫	4	0	0	0	0				
	他所見 一般状態		所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし				
6	紅斑・痂皮	4	0	1	1	0			2	0.7
	浮腫	4	0	0	0	0				
	他所見 一般状態		所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし	所見なし 異常なし				
合計	紅斑・痂皮	4	0	7	6	3	1	0		
	浮腫	4	2	0	0	0	0	0		
平均	紅斑・痂皮	4	0	1.3	1	0.5	0.3	0		
	浮腫	4	0.3	0	0	0	0	0		
								合計	5.2	
Primary Cutaneous Irritation Index / バッチ除去後1,24,48時間後平均							皮膚刺激性指数 (PCI)		0.9	
本表は、試験成績の個体別表を元に申請者が作成した。										

3. 皮膚感作性

(1) モルモットを用いた皮膚感作性試験-1

(資料33)

試験機関

報告書作成年 1992年

検体の純度：30%液剤(有効成分： %、水： %)

試験動物：ハートレー系雌モルモット(6週齢，感作開始日体重278~366g)検体投与群，陽性対照群，陰性対照群の3群，1群各20匹

試験期間：48時間観察

方法：[ビューラー法]

感作：左側腹部を刈毛・剃毛し，0.6%検体水溶液(予備試験の結果，皮膚一次刺激性のみられなかった最高濃度である0.625%に近い0.6%に設定)を0.2mlずつ，6時間閉鎖塗布投与した。陰性対照群には感作処置をせず，刈毛・剃毛のみとし，陽性対照群には0.1%ジニトロクロロベンゼン(DNCB)軟膏0.2gを6時間閉鎖投与した。この処置を週1回，計3回行った。

誘発：最終感作の14日後に動物の右側腹部を刈毛・剃毛して誘発部位とした後，検体投与群には0.6%検体水溶液を，陽性対照群には1%DNCB軟膏を，それぞれ6時間閉鎖塗布投与した。陰性対照群には0.6%検体水溶液及びDNCB軟膏をそれぞれ0.2mlまたは0.2g6時間閉鎖塗布投与した。

観察項目及び評価：誘発24及び48時間後に誘発部位を肉眼的に観察し，紅斑と浮腫の形成について佐藤らの基準(1980)に従って判定した。さらにその判定結果から各群の平均評点及び陽性率を算出し，Magnussonらの基準(1969)に従い皮膚感作性の強度を分類した。

結果：検体投与群では24及び48時間日の各判定時に一部の動物にごく軽度(評点1)の紅斑がみられたのみで，浮腫は認めらず，陽性率は15%で皮膚感作性の強度は軽度と分類された。

陽性対照群では明瞭な紅斑と痂皮及び浮腫がみられ陽性率は95%で，極度の皮膚感作性が認められた。陰性対照群では皮膚反応は認められなかった。

(皮膚感作性試験結果)

群	動物数	感 作	誘 発	時間 (hr)	紅斑スコア					浮腫スコア				陽性率	平均 評点	
					0	1	2	3	4	0	1	2	3			
陰性対照	10	無処理	0.6%被験物質	24	10						10				0	0
				48	10						10				0	0
	10	無処理	0.1%DNCB	24	10						10				0	0
				48	10						10				0	0
陽性対照	20	1%DNCB	0.1%DNCB	24	1	3	4	8	4	16	4			95	2.75	
				48	1	3	4	7	5	9	9	2			3.95	
被験物質	20	0.6%被験物質	0.6%被験物質	24	18	2				20				15	0.10	
				48	17	3				20					0.15	

以上の結果から、本剤は軽度の皮膚感作性を有すると思われるが、その皮膚反応は非常に軽度であると判断される。

(2) モルモットを用いた皮膚感作性試験-2

(資料34)

試験機関:

報告書作成年: 1993年

検体の純度: 30%液剤(有効成分: %、水: %)

試験動物: ハートレー系雄モルモット(6週令, 感作開始日体重264~348g)

検体投与群, 陽性対照群, 陰性対照群の3群, 一群20匹

試験期間: 誘発物質除去後24および48時間

方法: [マキシミゼーション法]

予備試験; 皮内感作・塗布感作および誘発時の検体濃度を設定するため, 背部を剪毛した3匹の動物を用いて予備試験を実施した。検体原液(100%), 33.3, 11.1, 3.7, 1.2および0.4%水溶液を0.1mlずつ背部6カ所に皮内投与し, また別の3匹の動物に皮内投与と同濃度の検体溶液を各0.2mlずつパッチテスト用絆創膏に塗布して24時間閉塞塗布した。予備試験の結果, 皮内感作および塗布感作時の被験物質濃度には, 皮膚反応が認められた最低濃度に近い1%を, 誘発時には皮膚反応が認められなかった0.4%を用いることとした。

皮内感作; あらかじめ頸背部を剪毛した全動物のうち, 陰性対照群以外の各動物について2×4cmの感作部位に, 左右対称になるように次の①, ②, ③の皮内感作物質を1カ所あたりそれぞれ0.05mlずつ計6カ所に皮内投与した。

①: 注射用蒸留水とFCA(Freund's Complete Adjuvant)の乳化物

②: 1%検体水溶液または0.1%DNCBエタノール溶液

③: 2%検体水溶液とFCAの等量混合した乳化物または0.2%ジニトロクロロベンゼン(DNCB)エタノール溶液とFCAの等量混合した乳化物。

起炎剤塗布; 皮内感作の7日後に同部位を再度除毛し, 陽性対照群を除く各群に10%ラウリル硫酸ナトリウムワセリン軟膏0.5gを開放塗布した。

塗布感作; 起炎剤塗布24時間後に微温湯を用いて同剤を除去し, 検体投与群には1%検体水溶液を, 陽性対照群には0.1%DNCBワセリン軟膏をそれぞれ0.2mlまたは0.2gずつ, 2×4cmの広さに48時間閉塞塗布した。

誘発; 塗布感作終了14日後に, 各群全例の右側腹部を除毛し, 検体投与群には, 0.4%検体水溶液を, 陽性対照群には, 0.1%DNCBワセリン軟膏, 陰性対照群には0.4%検体水溶液または0.1%DNCBワセリン軟膏をそれぞれ0.1mlまたは0.1gずつ2×2cmの広さに24時間閉塞塗布した。

観察項目および評価; 誘発物質除去後24及び48時間に誘発部位を肉眼的に観察し, 皮膚反応(紅斑・浮腫)を次の判定基準(参考文献: 佐藤ら(1980), 谷垣ら(1990))に従って判定した。

さらに、その判定結果から各群の平均評価点及び感作率を算出し、Magnusson and Kligmanの分類(1969)に従い、皮膚感作性の強度を分類した。この他、全例について体重は皮内感作日および誘発48時間後の最終判定日に、一般状態は毎日観察した。

結果: 検体投与群では24時間および48時間で5/20例にごく軽度の紅斑が認められ、感作率は25%、感作性強度は軽度と分類された。

一方、陽性対照群では24時間に評点2または3の明かな紅斑から中～強度の紅斑が全例に、評点1のごく軽度の浮腫が9/20例に認められ、48時間には評点2～4の明かな紅斑から強い紅斑～痂皮の形成が全例に、評点1のごく軽度の浮腫が11/20例に観察され、感作率は100%、感作性強度は極度と分類された。陰性対照群は全例に皮膚反応は認められなかった。

(皮膚感作性試験結果)

群	動物数	皮内 感作 塗布	誘 発	時間 (hr)	紅斑スコア					浮腫スコア				陽性率	平均 評点	
					0	1	2	3	4	0	1	2	3			
陰性対照群	10	無処置	0.4%検体 水溶液	24	10						10				0	0
				28	10						10				0	0
	10	無処置	0.1%DNCB ワセリン軟膏	24	10						10				0	0
				48	10						10				0	0
陽性対照群	20	0.1% DNCB(エタノール) 1%DNCB(ワセリン)	0.1%DNCB ワセリン軟膏	24		8	12				11	9			100	3.05
				48		6	8	6			9	11			100	3.55
検体投与群	20	1%水溶液 1%水溶液	0.4%水溶液	24	15	5					20				25	0.25
				48	15	5					20				25	0.25

以上の結果から、本剤は軽度の皮膚感作性を有すると思われるが、その皮膚反応は非常に軽度であると判断される。