

⑤ピリダリルのラット初代培養肝細胞を用いた *in vivo/in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

(資料 7-5)

試験施設: Covance Laboratories Inc.

報告書作成年: 2000 年 [GLP 対応]

検 体: ピリダリル原体

検体純度:

供試動物: CD(SD)IGS BR 系雄ラット (体重 206~307g)

用量設定試験: 1 群 3 匹, UDS 試験: 1 群 4 匹

試験方法: 検体をコーンオイルに溶解し 500, 1000 及び 2000mg/kg を経口投与した。投与後 2-4 または 15-16 時間に肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流した後に摘出して肝細胞を分離し、10%牛胎児血清を含むウィリアムズ E 培地 (WME) 中で培養した。細胞を ³H-チミジンを含む WME 中で 4 時間培養後、非標識チミジンを含む WME 中で 16-20 時間培養した。細胞を酢酸:エタノール (1:3) で固定後、写真用乳剤に浸して乳剤皮膜を形成させ、暗箱内(2-8℃)で 7-10 日間露出させた後、現像した。各群当り 3 匹の動物の標本を観察した。核内銀粒子を計数し、細胞質銀粒子数 (核に隣接した核と同じ面積の細胞質 3 ヲ所の平均銀粒子数) を差し引いて正味の核内銀粒子数を求めた。正味の核内銀粒子数の平均が対照群の平均値より核当たり 3 個以上増加した場合、及び 5 個以上の正味の核内銀粒子を有する細胞の割合が対照群の群平均値より 10%以上増加した場合を UDS 陽性とした。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を表に示す。

2-4 時間処理ではいずれの投与群においても不定期 DNA 合成を誘発しなかった。15-16 時間処理では 1000 mg/kg 投与群において 5 個以上の正味の核内銀粒子を有する細胞の割合が 14.67%で対照群の群平均値より 10%以上増加していた。しかし、増加の程度は小さく用量相関性はなかった。一方、ジメチルニトロソアミン (DMN) 投与群では UDS 陽性の両基準を超える UDS の誘発が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において、ラット初代培養肝細胞を用いた *in vivo/in vitro* 不定期 DNA 合成試験の結果は陰性でありピリダリルは DNA 損傷性を示さないと結論した。

肝細胞 採取時間 (hr)	化合物	投与量 (mg/kg)	正味の核内 銀粒子数の 平均 ^a	5個以上の正 味の核内銀粒 子数を有する 細胞の割合 ^a	細胞質 銀粒子数 の平均 ^a
2・4	対照	5ml/kg	-0.71	4.59	7.22
	DMN	10.0	12.20	65.86	6.00
	ピリダリル	500	-0.64	6.89	8.13
		1000	-0.67	3.33	6.89
		2000	-0.94	2.67	5.62
15・16	対照	5ml/kg	-0.38	4.22	6.14
	DMN	15.0	10.11	65.78	6.07
	ピリダリル	500	0.42	5.99	4.61
		1000	1.17	14.67	6.44
		2000	0.51	10.89	7.42

a) 群平均値は3例の各平均から求め、動物の平均は各標本の平均から求めた。

対照：コーンオイル

DMN：ジメチルニトロソアミン

(8) 生体機能影響

① ピリダリルにおける一般薬理試験

(資料 8-1)

試験機関：パナファーム・ラボラトリーズ

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検 体：ピリダリル原体

純 度：

試験方法：

1) ラットの一般症状及び行動に及ぼす影響

供試動物：SD 系ラット，8 週齢，体重雄 277.1~286.9g，雌 190.9~204.3g，

1 群雌雄各 3 匹

方法：検体を希釈せずに 600 及び 2000mg/kg を経口投与した。投与前，投与後 0.5，1，2，3，4，6 及び 24 時間に Irwin の方法に準じて一般症状及び行動を観察した。

対照群には 2000mg/kg と同容量の注射用水を投与した。

結果：一般症状及び行動に対し，600 及び 2000mg/kg 経口投与で検体による影響は認められなかった。

2) 麻酔イヌの呼吸数・血圧・心拍数及び心電図に及ぼす影響

供試動物：ビーグル，8 ヶ月齢，雄，体重 9.5~10.7kg，1 群 4 匹

方法：検体を希釈せずに 80，400 及び 2000mg/kg をペントバルビタール麻酔イヌに十二指腸内投与した。投与前，投与後 0.5，1，2，3，4，5 及び 6 時間において呼吸数・血圧・心拍数・心電図を測定した。対照群には 2000mg/kg と同容量の注射用水を投与した。

結果：400 及び 2000mg/kg 投与で呼吸数の増加傾向が認められた。2000mg/kg 投与で血圧の低下傾向が認められた。心電図では 80mg/kg 投与後 2 時間において QTc の有意な短縮が一過性に認められたが，投与量との関連性はなく検体に起因する変化ではなかった。心拍数は検体による影響は認められなかった。

以上により，ピリダリルは 400mg/kg 以上の十二指腸内投与で呼吸数及び血圧に影響を及ぼす可能性が示された。

「生体機能への影響に関する試験」総括表

試験項目	動物種 (例数/群)	投与経路	投与量 (mg/kg)	試験成績
一般症状及び行動 (Irwin)	ラット (♂3♀3)	経口	600,2000	影響は認められなかった
呼吸数・血圧・心拍 数・心電図	イヌ(♂4)	十二指腸 内	80,400, 2000	400及び2000mg/kgで呼吸数の増加 傾向 2000mg/kg投与で血圧の低下傾向 心電図及び心拍数には影響は認めら れなかった

(9) その他

①ピリダリルのER α 、ARおよびTR α を用いたレポータージーンアッセイ試験*

(資料 9-i)

試験機関 住友化学工業株式会社
[非GLP対応]

報告書作成年 2002年

試験目的：ピリダリルに各種ホルモンレセプター（エストロゲン、アンドロゲンおよび甲状腺ホルモンレセプター）に対する直接作用があるかどうかを調べる目的で、本試験を実施した。

(1) ER α を用いたレポーター遺伝子アッセイ試験

本試験において典型ホルモンE2および典型アンタゴニスト、4ヒドロキシタモキシフェン (HTM) の作用が確認できたことから試験系は保証された(図1a)。しかしピリダリルは10nMから1 μ Mの濃度でER α に対する転写活性への影響は認めなかった(図1b)。従って、ER α に対するアゴニストおよびアンタゴニスト作用は陰性と判定した。

(2) ARを用いたレポーター遺伝子アッセイ試験

本試験において典型ホルモンDHTおよび典型アンタゴニスト、ヒドロキシフルタミド (HFT) の作用が確認できたことから試験系は保証された(図2a)。しかしピリダリルは10nMから1 μ Mの濃度でARに対する転写活性への影響は認めなかった(図2b)。従って、ARに対するアゴニストおよびアンタゴニスト作用は陰性と判定した。

(3) TR α を用いたレポーター遺伝子アッセイ試験

本試験において典型ホルモンT₃の作用が確認できたことから試験系は保証された(図3a)。しかしピリダリルは100 nMおよび1 μ Mの濃度でTR α に対する転写活性への影響は認めなかった(図3b)。従って、TR α に対するアゴニストおよびアンタゴニスト作用は陰性と判定した。

②ピリダリルのラット性ホルモン生合成系に対する影響検討試験

(資料 9-2)

試験機関 住友化学工業株式会社

[非 GLP 対応]

報告書作成年 2002 年

検 体：ピリダリル

純 度：

試験目的：ピリダリルの2世代繁殖性試験(資料6-1)で膈開口日の高値、卵巣における重量増加および間質腺細胞の空胞化が、統計学的な有意差を伴って認められた。しかしながら、その変化の程度は軽度であり、雌雄の繁殖能にも影響は認められなかった。また、ラットにおける90日間反復投与毒性試験(資料4-1)において副腎における細胞質空胞化が認められた。さらに、本剤の開発初期に実施した高純度品を用いたラットにおける90日間反復投与毒性試験(資料4-2)において、最高用量群(3500ppm)のみで実施した血中濃度測定において、テストステロンならびにエストラジオールの血中レベルの低下が認められ、本剤のステロイド合成系への影響が示唆された。ピリダリルの内分泌系への影響を *in vitro* でより詳細に検討する目的で本試験を実施した。

結果：

培地中ホルモン濃度（精巢）：

初代培養精巢細胞を M199 培地（0.1%BSA 添加）中、37℃で5時間培養したところ、対照群の培地中の 17α -OH-プロゲステロン、アンドロステンジオンおよびテストステロン濃度はそれぞれ 0.14 ± 0.062 、 4.5 ± 0.08 および 4.7 ± 0.17 ng/ml となった。プロゲステロンおよびエストラジオール濃度は検出限界（それぞれ 0.02 ng/ml および 0.008 ng/ml）未満であった。1～30 μ M のピリダリルを添加すると、 17α -OH-プロゲステロンおよびテストステロン濃度は対照群と比較して有意な差が認められなかったが、10 μ M 以上ではピリダリル添加濃度の増加に伴ってアンドロステンジオン濃度の増加が認められ、30 μ M においては溶媒対照群の約2倍の 7.4 ± 1.21 ng/ml に増加した。

ホルモン生成量（精巢）：

培養開始後24時間までアンドロステンジオンおよびテストステロンの生成が認められ、48時間まで 17α -OH-プロゲステロンの生成が認められた。Ketoconazole を添加して培養すると、想定どおりアンドロステンジオンおよびテストステロンの生成量が低下し、hCG を添加すると 17α -OH-プロゲステロン、アンドロステンジオンおよびテストステロンの生成量が増加したことから、精巢のステロイドホルモン合成阻害剤の評価系として本実験系が妥当であり、細胞の脳下垂体ホルモンに対する応答機能が維持されていることが示された。ピリダリル（10 μ M）を添加して培養すると、全ての時点においてアンドロステンジオン生成量の増加が認められた。

17 β -HSD 活性に対する影響：

初代培養精巣細胞の[¹⁴C]アンドロステンジオン代謝活性を調べた。3 μ M以上のピリダリルの添加により、アンドロステンジオン分解量が有意に低下し(10 μ M群を除く)、17 β -HSD活性の阻害が示唆された。しかしながら、阻害の程度は非常に弱く、30 μ Mにおいても溶媒対照と比較して6%の活性が阻害されるに過ぎなかった。

ホルモン濃度(卵巣)：

初代培養卵巣細胞をM199培地(0.1%BSA添加)中、37 $^{\circ}$ Cで5時間培養したところ、対照群の培地中のプロゲステロン、17 α -OH-プロゲステロンおよびエストラジオール濃度はそれぞれ18.1 \pm 1.89、0.68 \pm 0.021、0.40 \pm 0.361および0.14 \pm 0.020 ng/mlとなった。テストステロンは検出限界(0.04 ng/ml)未満であった。KetoconazoleおよびLHによる変動は文献の報告どおりであり、卵巣のステロイドホルモン合成阻害剤の評価系として本実験系が妥当であり、細胞の脳下垂体ホルモンに対する応答機能が維持されていることが示された。1~30 μ Mのピリダリルを添加して培養したが、いずれのホルモン濃度にも対照群と比較して顕著な差が認められなかった。

17 β -HSD 活性に対する影響(卵巣)：

初代培養卵巣細胞の[¹⁴C]アンドロステンジオン代謝活性を調べた。1~30 μ Mのピリダリルを添加すると、極めて弱い作用ではあるが、アンドロステンジオンの代謝に対する阻害傾向が認められ、30 μ Mにおいて溶媒対照の11%の代謝活性が阻害された。

アロマターゼ活性に対する影響(卵巣)：

初代培養卵巣細胞の[¹⁴C]テストステロンを基質にしたエストラジオールへの代謝活性を調べた。1~30 μ Mのピリダリルを添加してもエストラジオール生成量には有意な変化は認められず、ピリダリルはアロマターゼを阻害しないことが明らかとなった。

まとめ：

ピリダリルは3 μ M以上で精巣の性ホルモン合成の過程に影響を与え、その作用は非常に弱い17 β -HSD活性阻害を介したテストステロン合成阻害であることが明らかとなった。

③ピリダリル原体のラットを用いた4週間投与によるホルモン検討試験 (資料9-3)

試験機関：住友化学工業株式会社

[GLP 非対応]

報告書作成年：2002年

検 体：ピリダリル原体

純 度：

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡；生死を含む一般状態を毎日観察した。有意差検定は Fisher の直接確率法を用いて実施した。

死亡および被験物質投与に起因すると考えられる症状は雌雄いずれの投与量においても認められなかった。

体重変化；投与期間中全動物の体重を毎週測定し、解剖前には全解剖動物の体重を測定した。

また、全測定週について、体重増加量を算出した。有意差検定は、Dunnett の多重比較検定あるいは Steel の多重比較検定により行った。

平均体重の変化を次図に示す。

雄の 500ppm 以上の群および雌の 1000ppm 以上の群で投与 8 日目の体重増加量および総体重増加量の低値が認められた。体重においては、1000ppm 以上の群の雌雄で低値が認められた。2000ppm 群における体重増加抑制の程度は雄で 8%、雌で 6%であり、顕著な体重増加抑制が認められず、一般症状にも何等影響がなかったことから、内分泌系への影響を評価できないほどの過度な一般毒性は認められなかったと判断した。

摂餌量及び食餌効率；全動物の摂餌量を週 1 回測定し、食餌効率も算出した。

統計学的有意差が認められた時点の結果を下表に示す。

有意差の検定は、Dunnettの多重比較検定あるいはSteelの多重比較検定により行った。(↓, $p \leq 0.05$; ↓↓, $p \leq 0.01$)。

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示した。

500ppm以上の群の雄および1000ppm以上の群の雌で摂餌量の低値あるいは低値傾向が認められた。摂餌効率については、2000ppm群の雌雄において、投与8日目の摂餌効率の低値が認められた。

検体採取量；投与期間中の平均検体採取量は以下の通りであった。

ホルモン測定；断頭によって採取した血液から血清を分取して以下の項目を測定した。

雄：コルチコステロン、テストステロン

雌：エストラジオール、プロゲステロン（各群の動物番号の前半 8 例、性周期を観察し、発情前期に解剖した。）

コルチコステロン（各群の動物番号の後半 8 例、性周期を考慮せず解剖した。）

有意差検定は、Dunnett の多重比較検定あるいは Steel の多重比較検定、定量限界未満の数値を含む群については、Mann-Whitney の U 検定を行った。

雌雄いずれの群、いずれのホルモンにおいても、対照群に比べ有意な変化は認められなかった。

性周期観察；雌の動物番号の前半 8 例／群については、投与 3 週目から連日、1 日 1 回の頻度で午前中に膣垢を採取し、標本を作製して観察した。投与 5 週目以降の膣垢観察において、発情前期を示す動物を当日の解剖対象動物とした。

いずれの動物においても、本化合物に起因する性周期の異常を認めなかった。

臓器重量；投与終了時の全生存動物を対象として以下の臓器重量を測定し、相対重量も算出した。

肝臓、腎臓、副腎、卵巣、子宮、精巣、前立腺腹葉、前立腺背側葉、精嚢、精巣上体
統計学的有意差の認められた項目を次表に示す。

有意差の検定は、Dunnett の多重比較検定あるいは Steel の多重比較検定を行った。（ $\uparrow\downarrow$, $p \leq 0.05$ ； $\uparrow\downarrow$, $p \leq 0.01$ ）。また、前立腺(背側葉) および精嚢については、最終体重の低値との相関を検討するため、共分散分析 (EPA において、体重

との相関を検討する統計処理法として推奨)を行った。*:共分散分析によっても有意な変化であった。

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を示した。

雄において、1000 ppm以上の群の精囊で絶対重量の、2000ppm群の前立腺(背側葉)で絶対重量の低値が認められた。相対重量においては、これらの器官には有意な変化は認められなかった。さらに、最終体重の低値との相関性を検討する目的で、これらの器官について、最終体重を加味した共分散分析を実施したところ、前立腺(背側葉)については、体重の低値を考慮してもなお、有意な低値であった。一方、精囊については共分散分析を行った結果、有意でなかった。*

その他、2000ppm群の雄および雌(動物番号の前半8例)で肝臓の、雄で精巢の相対重量の高値が認められた。精巢の相対重量の高値については、相対重量のみの変化であること、同群で最終体重の低値が認められていることから、被験物質投与の影響とは考えなかった。

雌においては、100ppm群の卵巣の絶対重量の低値が認められたが、投与量に対応した変化でないことから、被験物質投与の影響とは考えなかった。その他の群および器官においては、対照群に比して有意な変化は認められなかった。

肉眼的病理検査;全ての動物について剖検を行った。

観察された主要な肉眼病理検査所見を下表に示す。

* 申請者註: 上記のように、2000ppm群(94.9mg/kg)で雄の前立腺(背側葉)の絶対重量の低値が認められた。本化合物を用いた *in vitro* での試験(ピリダリルのラット性ホルモン生成系に対する影響検討試験。資料9-2)において、本化合物は軽微ながら、ステロイドホルモン生成の阻害作用を有することが示されており、本所見は、本化合物のステロイドホルモン合成系への影響と関連する変化と考えられた。

しかしながら、高用量(2000ppm群、雄で94.9mg/kg/day、雌で102.2mg/kg/day)においても、テストステロンおよびエストラジオールの血中濃度には何等影響が無く、1000ppm群(雄で49.9mg/kg/day、雌で54.9mg/kg/day)では器官重量を含めて、内分泌系へは何等影響が認められなかった。また、前立腺(背側葉)重量は、内分泌系の検査項目の中でも比較的鋭敏な項目であることが知られている。

これらのことから、本化合物の内分泌系への影響は、高用量においてのみ鋭敏な項目に変動が認められる程度の軽微な影響であり、重篤なものではないと考えられた。

有意差の検定は、Fisherの直接確率計算法を用いて行った
(↑↓, $p \leq 0.05$; ↑↑↓, $p \leq 0.01$)。

性周期を観察し、発情前期にあわせて解剖を行った雌（各群動物番号の前半 8 例）においては、対照群 1 例（動物番号：108）、100ppm 群 2 例（動物番号：119、124）、1000ppm 群 1 例（動物番号：151）を除いて、子宮の液貯留（両側）が認められた。

雄および性周期のステージに関係なく解剖を行った雌においては、雄で膀胱内白色物質、雌で子宮の液貯留（両側）が対照群も含めて全ての群に、雄で腎臓の陥凹巣が1000ppm群の1例に、肝臓の奇形様突起が2000ppm群の1例に、雌で卵巣（右側）の大型化が100ppm群の1例に、肝臓の白色巣が1000 ppm群の1例に認められたものの、いずれも、ラットで通常認められる所見であるか、その発生頻度において対照群に比して有意差がなく、低頻度であることから、被験物質投与に起因する変化とは考えなかった。

病理組織学的検査；卵巣の病理組織学的検査を行った。

観察された検査所見を下表に示す。

2000ppm 群の卵巣において、間質腺細胞の空胞化が認められた。本所見は本化合物を用いた 90 日間反復投与毒性試験において認められている所見であり、本化合物投与による影響と考えられた。

以上のように、ピリダリルを雌雄の SD ラットに 100、500、1000 および 2000ppm の投与量で 4 週間反復投与し、内分泌系への影響を検討したところ、軽度な影響が前立腺（背側葉）および卵巣に認められたものの、血中ホルモンやその他の関連器官には影響が認められず、本化合物が内分泌系へ重篤な影響を及ぼさないことが示された。

尚、本試験における無毒性量は、雄の 500ppm 以上の群および雌の 1000ppm 以上の群で摂餌量の低値を伴う体重増加抑制が認められたことから、雄で 100ppm (5.5mg/kg)、雌で 500ppm (29.5mg/kg) であった。

④ピリダリルのラット脂肪酸代謝に対する影響検討試験

(資料 9-4)

試験機関 住友化学工業株式会社

[非 GLP 対応]

報告書作成年 2003 年

試験目的:ピリダリルの90日間反復投与毒性試験(資料4-2)で副腎および卵巣の空胞化ならびに肺における泡沫細胞/好酸性細胞の集簇が認められ、脂質の代謝阻害が疑われた。ピリダリルの脂肪酸代謝への影響を *in vitro* で詳細に検討する目的で本試験を実施した。

検体純度:

結果:

ラット副腎、腎臓、肝臓、肺および卵巣ホモジネートにおける $[1-^{14}C]$ パルミチン酸の β 酸化生成物量を経時的に調べた。それぞれの組織における反応開始後60分における β 酸化生成物量は、それぞれ、6.3、2.6、6.2、0.6および2.6 $\mu\text{mol/g}$ 組織/hrであり、組織の種類によって顕著に異なった。各組織における反応継続時間は60分以上であり、卵巣においては180分以上継続した。以上の結果から、以降の各被験物質の脂肪酸代謝への影響を調べる実験では、反応時間を60分とした。

ラット副腎、腎臓、肝臓、肺および卵巣ホモジネートにおける $[1-^{14}C]$ パルミチン酸の β 酸化に対するピリダリル、antimycin A および rotenone の添加効果を調べた。antimycin A および rotenone は、電子伝達系の阻害剤として β 酸化を阻害することが知られているが、本実験系においても、60 μM のantimycin Aは肺以外の組織において β 酸化を阻害した。10 μM のrotenoneは、副腎と腎臓の β 酸化を阻害した。

副腎ホモジネートにおいて10 μM のピリダリルを添加すると β 酸化が阻害され、 β 酸化生成物量が対照群の77%に低下したが、その他の組織においては顕著な影響は認められなかった。ラットにおけるピリダリルの亜急性経口毒性試験において、副腎の空胞化が認められており、 β 酸化の阻害による脂肪の蓄積との関連性が示唆された。肺においては β 酸化の阻害活性が認められず、肺における泡沫細胞/好酸性細胞の集簇との関連性は不明であった。

まとめ:

ピリダリルは10 μM で副腎ホモジネートの脂肪酸(パルミチン酸)代謝を阻害したが、腎臓、肝臓、肺および卵巣のホモジネートにおいてはそれぞれ10 μM 、30 μM および10 μM の濃度でパルミチン酸の代謝に影響を及ぼさなかった。

2. 原体混在物及び代謝物

2-1 原体混在物

(1) 急性毒性

①ピリダリル原体混在物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 混1-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：2002年 [GLP 非対応]

検体：ピリダリル原体混在物

純度：

試験動物：Crj:CD (SD) 系のラット (8週齢、体重 雄 270~289g、雌 192~202g)

1群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察

投与方法：0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁した検体を投与前約20時間絶食したラットに2000mg/kg体重(10ml/kg体重)の割合で単回投与した。

試験項目：一般状態および生死を14日間観察し、体重は投与前(0日目)、投与後7日目、および解剖直前の生存時(14日目)に測定した。試験期間終了時に、全動物を安楽死させ、肉眼的剖検を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂, ♀ ; 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	♂♀共 >2000
死亡開始および終了時間	死亡例なし
症状発現および終了時間	症状発現なし
最大無作用量 (mg/kg)	♂♀共 2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀共 2000

中毒症状および死亡は認められなかった。体重については、全動物は試験期間中順調な増加を示した。剖検では、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

②ピリダリル原体混在物のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 混1-2)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：2002年 [GLP 非対応]

検体：ピリダリル原体混在物

純度：

試験動物：Crj:CD (SD) 系のラット (8週齢、体重雄 265~279g、雌 186~195g)

1群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察

投与方法：被験物質は希釈することなく、投与前約20時間絶食したラットに2000mg/kg-体重の割合で単回投与した。

試験項目：一般状態および生死を14日間観察し、体重は投与直前(0日目)、投与後7日目、および解剖直前の生存時(14日目)に測定した。試験期間終了時に、全動物を安楽死させ、肉眼的剖検を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂, ♀ ; 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	♂♀共 >2000
死亡開始および終了時間	死亡例なし
症状発現および終了時間	症状発現なし
最大無作用量 (mg/kg)	♂♀共 2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀共 2000

中毒症状および死亡は認められなかった。体重については、全動物は試験期間中順調な増加を示した。剖検では、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

③ピリダリル原体混在物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 混1-3)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：2002年【GLP 非対応】

検体：ピリダリル原体混在物

純度：

試験動物：Crj:CD (SD) ラット (8週齢、体重雄 255~281g、雌 190~200g)

1群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察

投与方法：0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁した検体を、投与前約20時間絶食したラットに2000mg/kg・体重の割合で単回投与した。

試験項目：一般状態および生死を14日間観察し、体重は投与直前(0日目)、投与後7日目、および解剖直前の生存時(14日目)に測定した。試験期間終了時に、全動物を安楽死させ、肉眼的剖検を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂, ♀ ; 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	♂♀共 >2000
死亡開始および終了時間	死亡例なし
症状発現および終了時間	症状発現なし
最大無作用量 (mg/kg)	♂♀共 2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀共 2000

中毒症状および死亡は認められなかった。体重については、全動物は試験期間中順調な増加を示した。剖検では、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

(2) 変異原性

①ピリダリル原体混在物の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 混2-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：2002年[GLP 非対

応]

検体：ピリダリル原体混在物

純度：

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) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *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 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、S-9 Mix 存在下、非存在下とも 156~5000 µg/プレート の範囲の 6 濃度で本試験を実施した。試験は 2 連制とし 2 回行なった。

用量設定根拠：

試験結果：結果を表に示した。

S-9 Mix 存在下 TA1535 株で検体処理群の復帰変異コロニー数が対照群の 2 倍以上にかつ用量依存的に増加し、増加には再現性が認められた。その他の菌株についてはいずれの条件下においても復帰変異コロニー数が対照群の 2 倍以上にかつ用量依存的に増加することはなかった。

一方、陽性対照化合物である 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-アミノアクリジン及び 2-アミノアントラセンではすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、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を有するものと判断される。

用量設定試験結果

本試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix の 有無	復帰変異コロニー数 a) /プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
対照(DMSO)	0	-	106	8	37	25	17
ピリダリル 原体混在物	156	-	95	6	19	35	13
	313	-	105	9	28	35	17
	625*	-	84	10	31	30	19
	1250*	-	90	10	29	33	15
	2500*	-	96	8	24	28	16
	5000*	-	117	11	25	29	17
陽性対照	b)	-	481	317	92	366	799
対照(DMSO)	0	+	81	7	37	29	14
ピリダリル 原体混在物	156	+	146	12	46	34	12
	313	+	128	17	42	34	14
	625	+	131	14	45	41	11
	1250	+	133	15	46	34	15
	2500*	+	151	12	44	33	16
	5000*	+	157	12	50	37	12
陽性対照	b)	+	770	263	680	272	174

a) 2枚のプレートの平均値

b) 陽性対照化合物($\mu\text{g}/$ プレート):

S-9 Mix 非存在下

TA100 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)
 TA1535 アジ化ナトリウム (0.5)
 WP2 $uvrA$ 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)
 TA98 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.1)
 TA1537 9-アミナクリジン (80)

S-9 Mix 存在下

2-アミナントラセン (1)
 2-アミナントラセン (2)
 2-アミナントラセン (10)
 2-アミナントラセン (0.5)
 2-アミナントラセン (2)

* : 被験物質の折出が認められた。

②ピリダリル原体混在物 のマウスを用いた小核試験

(資料 混2-2)

試験施設：食品農医薬品安全性評価センター

報告書作成年：2002年 [GLP 非対応]

検 体：ピリダリル原体混在物

純 度：

供試動物：CD-1(ICR)系マウス (8週齢, 雄, 体重 32.8~38.8g)

1群6匹 (評価は1群5匹)

試験方法：検体をコーンオイルに溶解し, 500, 1000及び2000mg/kgの用量で単回経口投与した。投与24時間後(500, 1000及び2000mg/kg)及び48時間後(2000mg/kg)に各動物から大腿骨を採取して骨髓塗抹標本を作製した。陽性対照群にはマイトマイシンCを2 mg/kgで腹腔内投与し, 24時間後に標本を作製した。標本は, メタノールで固定後, 5%ギムザ液で染色した。

各動物当たり1000個の多染性赤血球を観察し, 小核を有する細胞の出現頻度を求め, 500個の赤血球(多染性赤血球及び正染性赤血球)中の多染性赤血球の出現頻度も求めた。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示す。いずれの投与群においても死亡は認められず, 一般症状の変化も見られなかった。いずれの投与群においても, 溶媒対照群と比較して全赤血球に対する多染性赤血球の割合に有意な減少は認められず, 小核を有する多染性赤血球の出現頻度の有意な増加も認められなかった。陽性対照であるマイトマイシンCでは, 小核を有する多染性赤血球の出現頻度が溶媒対照群と比較して統計学的に有意に増加した。

以上の結果から, 本試験条件下において, ピリダリル原体混在物 はマウス骨髓細胞に対して小核を誘発せず, 染色体異常性誘発性は陰性と結論した。

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE ^{a)} (%, 平均±SD)	PCE/(PCE+NCE) ^{b)} (%, 平均±SD)
24	陰性対照 (コ-オイル)	c)	5	0.22±0.19	54.8±3.8
	ビリダリル 原体混在物	500	5	0.28±0.18	58.4±6.5
		1000	5	0.22±0.18	58.7±3.1
		2000	5	0.20±0.16	64.0±8.5
	陽性対照 (マイトマイシンC)	2	5	8.92±1.59**	45.7±8.9
48	陰性対照 (コ-オイル)	-	5	0.22±0.16	53.8±8.5
	ビリダリル 原体混在物	2000	5	0.20±0.14	58.5±7.4

PCE : 多染性赤血球 NCE : 正染性赤血球

MNPCE : 小核を有する多染性赤血球

a) 1個体につき 1000 個の多染性赤血球を観察した

b) 1個体につき 500 個の赤血球を観察した

c) 10mL/kg

統計学的解析 : 小核を有する多染性赤血球の出現頻度は Kastenbaum and Bowman の方法で行い, 全赤血球に対する多染性赤血球の割合については Dunnett の t 検定を行った。

**p<0.05

③ピリダリル原体混在物 のチャイニーズハムスターの肺由来 V79 細胞を用いた
遺伝子突然変異試験

(資料 混 2-3)

試験施設：食品薬品安全センター

報告書作成年：2002 年 [GLP 非対応]

検 体：ピリダリル原体混在物

純 度：

試験方法：チャイニーズハムスターの継代培養した肺由来 V79 細胞を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) 存在下及び非存在下で、6-チオグアニン存在下でのコロニー増殖を指標とする HGPRT 遺伝子座の遺伝子突然変異誘発性を検定した。検体は DMSO に溶解して用い、S-9 Mix 非存在下では 0.01、0.02、0.04、0.06、0.1mg/mL、S-9 Mix 存在下では 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1mg/mL で試験を実施した。試験は 1 連制で 1 回行なった。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

S-9 Mix 存在下では 0.08mg/mL 以上の濃度で強い細胞増殖阻害作用が認められたため、これらの処理群では突然変異細胞の検出を行わなかった。突然変異細胞の検出を行なった処理群の突然変異率は、いずれの条件においても対照群の 3 倍未満であった。一方、陽性対照として用いたエチルメタンサルホン酸及び N-ニトロソジメチルアミンは、突然変異率を有意に増加させた。

以上の結果より、検体は代謝活性化存在下及び非存在下で遺伝子突然変異誘発性を有しないものと判断される。

薬物	濃度 (mg/mL)	S-9 Mix の有無	相対細胞増殖率 (%) ^{a)}	相対コロニー 形成率 (%) ^{b)}	突然変異率 ($\times 10^{-6}$) ^{c)}
対照 (DMSO)	0	-	100.0	100.0	11.4
ピリダリル 原体混在物	0.01	-	101.3	114.3	11.1
	0.02	-	100.3	119.4	10.6
	0.04	-	97.7	87.7	7.2
	0.06	-	100.0	104.7	8.5
	0.1†	-	99.0	101.3	5.0
陽性対照 (NDMA)	2	-	99.3	98.4	6.4
陽性対照 (EMS)	1	-	97.0	77.6	1228.4 ^{d)}
対照 (DMSO)	0	+	100.0	100.0	11.4
ピリダリル 原体混在物	0.01	+	104.7	94.9	2.7
	0.02	+	103.0	108.9	9.3
	0.04	+	102.4	93.6	1.4
	0.06	+	85.0	94.4	14.8
	0.08	+	2.7	NT	NT
	0.1†	+	0.7	NT	NT
陽性対照 (NDMA)	2	+	101.4	83.9	565.2 ^{d)}

a) 対照群と比較した相対吸光度から求めた。

b) 薬物処理 6 日後に 100 個播種した細胞のコロニー数から求めた。

c)

$$\text{突然変異率} = \frac{\text{突然変異コロニー数の平均値} \times 10}{10^6} \times \frac{100}{\text{コロニー形成率の平均値}}$$

d) 対照群の 3 倍以上の値を示した。

NDMA: N-ニトロソジメチルアミン EMS: エチルメタンサルホン酸

†: 検体の析出が認められた。

NT: 強い細胞増殖阻害作用のため突然変異細胞の検出を行わなかった。

④ピリダリル原体混在物の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 混2-4)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：2002年 [GLP 非対応]

検体：ピリダリル原体混在物

純度：

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) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *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 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、試験は 1 用量当たり 1 枚のプレートを用い、一回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

試験菌株に対して 5000 μ g/プレートまで生育阻害が認められなかった。検体の析出が S-9 Mix 存在下の 625 μ g/プレート以上、S-9 Mix 非存在下の 156 μ g/プレート以上の用量において認められた。検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、菌株の生育阻害を起こさない最高用量 (5000 μ g/プレート) においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた 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-アミノアクリジン及び 2-アミノアントラセンではすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、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。

試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照(DMSO)	0	-	78	8	16	16	6
ピリダリル 原体混在物	156*	-	90	8	20	13	5
	313*	-	92	10	11	19	1
	625*	-	87	11	14	20	7
	1250*	-	102	13	23	9	5
	2500*	-	100	13	11	18	6
	5000*	-	117	10	13	24	6
陽性対照	a)	-	466	323	148	471	910
対照(DMSO)	0	+	90	7	20	26	14
ピリダリル 原体混在物	156	+	102	11	13	21	9
	313	+	103	4	26	31	11
	625*	+	101	9	22	23	17
	1250*	+	81	10	23	28	6
	2500*	+	105	4	19	23	9
	5000*	+	78	8	34	24	6
陽性対照	a)	+	641	164	754	378	124

a) 陽性対照物質($\mu\text{g}/$ プレート):

S-9 Mix 非存在下

TA100 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)
 TA1535 アジ化ナトリウム (0.5)
 WP2uvrA 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)
 TA98 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.1)
 TA1537 9-アミリアクリジン (80)

S-9 Mix 存在下

2-アミノアントレン (1)
 2-アミノアントレン (2)
 2-アミノアントレン (10)
 2-アミノアントレン (0.5)
 2-アミノアントレン (2)

b) *: 検体の析出が認められた。

⑤ピリダリル原体混在物 の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 混2-5)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：2002年 [GLP 非対応]

検体：ピリダリル原体混在物

純度：

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) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *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 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で、Amesらの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、各用量につき、本試験は1枚、追加試験 (S-9 Mix 非存在下 TA1535 株のみ) は2枚のプレートを用い、各試験を一回ずつ行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

試験菌株に対して 5000 μ g/プレートまで生育阻害が認められなかった。検体の析出が S-9 Mix 存在下の 500 μ g/プレート以上、S-9 Mix 非存在下の 150 μ g/プレート以上の用量において認められた。S-9 Mix 非存在下 TA1535 株の一部に復帰変異コロニー数のわずかな増加が散見されたため、156~5000 μ g/プレートの範囲の6濃度で追加試験を実施した。その結果追加試験において、対照群の2倍を超えかつ用量依存性のある復帰変異コロニー数の増加は認められず、本試験の増加の再現性は認められなかった。その他の菌株についてもいずれの条件下においても復帰変異コロニー数が対照群の2倍以上にかつ用量依存的に増加することはなかった。

一方、陽性対照として用いた 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-アミノアクリジン及び2-アミノアントラセンではすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、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。

本試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	0	-	97	7	14	25	7
ピリダリル 原体混在物	15	-	109	13	16	26	9
	50	-	89	8	17	15	7
	150*	-	98	24	19	17	9
	500*	-	105	12	21	19	5
	1500*	-	110	9	25	21	6
	5000*	-	98	15	13	20	3
陽性対照	a)	-	428	332	164	332	689
対照 (DMSO)	0	+	99	15	27	45	19
ピリダリル 原体混在物	15	+	105	5	26	43	8
	50	+	121	5	27	38	12
	150	+	90	6	21	18	8
	500*	+	84	9	14	33	10
	1500*	+	118	10	23	23	11
	5000*	+	72	17	19	22	9
陽性対照	a)	+	564	190	513	311	142

a) 陽性対照物質($\mu\text{g}/$ プレート):

S-9 Mix 非存在下
 TA100 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)
 TA1535 アジ化ナトリウム (0.5)
 WP2uvrA 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)
 TA98 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.1)
 TA1537 9-アミノアクリジン (80)

S-9 Mix 存在下
 2-アミノアントラセン (1)
 2-アミノアントラセン (2)
 2-アミノアントラセン (10)
 2-アミノアントラセン (0.5)
 2-アミノアントラセン (2)

* : 検体の析出が認められた。

追加試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニ-数 ^{a)} /プレート
			塩基置換型
			TA1535
対照(DMSO)	0	—	9
ピリダリル 原体混在物	15	—	6
	50	—	5
	150*	—	10
	500*	—	8
	1500*	—	6
	5000*	—	11
陽性対照	b)	—	305

a) 2枚のプレートの平均値

b) 陽性対照物質($\mu\text{g}/\text{プレート}$): S-9 Mix 非存在下 TA1535 7ジ化ナトリウム (0.5)

c) *: 検体の析出が認められた。

2-2 代謝物

(1) 変異原性 (ピリダリル代謝物 S-1812-DP)

①ピリダリル代謝分解物 S-1812-DP の細菌を用いる復帰突然変異試験

(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：2002年

検 体：ピリダリル代謝分解物(S-1812-DP)

純 度：

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)及びトリプトファン要求性大腸菌 *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 (S-9 Mix) の存在下及び非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、S-9 Mix 存在下、非存在下で 0.05~5000 μ g/プレートの用量範囲で試験を実施した。各用量につき、用量設定試験は 1 枚、本試験は 2 枚のプレートを用い、各試験を 1 回ずつ実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を表に示した。

検体は S-9 Mix の有無にかかわらず、各菌株が抗菌性を示す最高用量においても、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照化合物として用いた 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-アミノアクリジン及び 2-アミノアントラセンではすべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、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。

用量設定試験結果



本試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/$ プレート)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数 $\mu\text{g}/$ プレート				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照(DMSO)	0	-	115	7	23	36	19
ヒリガリル 代謝分解物 (S-1812-DP)	0.05	-	101	8	NT	32	24
	0.15	-	93	4	NT	44	14
	0.5	-	100	7	NT	26	19
	1.5	-	92	13	21	37	16
	5	-	99	8	24	37	16
	15	-	63*	5*	24	18*	2*
	50	-	NT	NT	18	NT	NT
	500	-	NT	NT	8*	NT	NT
陽性対照	b)	-	626	321	120	357	884
対照(DMSO)	0	+	83	8	32	30	23
ヒリガリル 代謝分解物 (S-1812-DP)	0.5	+	88	5	NT	NT	19
	1.5	+	103	7	NT	32	12
	5	+	109	9	NT	30	16
	15	+	100	8	38	36	14
	50	+	69*	4	39	27	14*
	150	+	61*	5*	31	16	14*
	500	+	NT	NT	19	14*	NT
	5000†	+	NT	NT	7*	NT	NT
陽性対照	b)	+	753	299	745	249	150

a) 2枚のプレートの平均値

b) 陽性対照化合物($\mu\text{g}/$ プレート):

	S-9 Mix 非存在下	S-9 Mix 存在下
TA100	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)	2-アミノアントレン (1)
TA1535	アジ化ナトリウム (0.5)	2-アミノアントレン (2)
WP2uvrA	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)	2-アミノアントレン (10)
TA98	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.1)	2-アミノアントレン (0.5)
TA1537	9-アミノアクリジン (80)	2-アミノアントレン (2)

†: 検体の析出が認められた。

*: 検体による菌の生育阻害が認められた。

NT: 試験せず。

(2) 変異原性 (ピリダリル代謝物 HTFP)

①ピリダリル代謝物 HTFP の細菌を用いた復帰突然変異試験

(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：2002 年

検 体：ピリダリル代謝物；HTFP

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、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 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、TA98、TA100 および TA1537 株に対しては 15.0~5000 μg /プレートの範囲の 6 濃度、TA1535 および WP2uvrA 株に対しては 156~5000 μg /プレートの範囲の 6 濃度で本試験を実施した。また、S9 mix 存在下の TA100 株に対し、156~5000 μg /プレートの範囲の 6 濃度で確認試験を実施した。試験はブレインキューベーション法により行い、本試験は 1 連制、確認試験は 2 連制で各 1 回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

検体は S9 mix 存在下、非存在下の TA1535 および WP2uvrA 株において、復帰変異コロニー数を溶媒対照群の 2 倍以上にかつ用量依存的に増加させた。TA1535 および WP2uvrA 株以外の菌株では、5000 μg /プレートの濃度まで、復帰変異コロニー数を溶媒対照群の 2 倍以上に増加させることはなかった。

なお、陽性対照として用いた 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各菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、HTFP は本試験条件下で、TA1535 および WP2uvrA 株に対して薬物代謝酵素系の存在の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有すると判断された。

本試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート		
			塩基対置換型		フレームシフト型
			TA100	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	—	81	19	10
HTFP	15.0	—	77	19	5
	50.0	—	69	23	6
	150	—	100	25	7
	500	—	87	22	4
	1500	—	75	16	6
	5000	—	101	21	6
陽性対照		—	478	264	740
溶媒対照 (DMSO)	0	+	90	22	12
HTFP	15.0	+	67	30	6
	50.0	+	72	24	11
	150	+	77	27	14
	500	+	103	25	12
	1500	+	85	28	6
	5000	+	140	33	11
陽性対照		+	586	251	133

陽性対照化合物 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)

	S9 mix非存在下	S9 mix存在下
TA100	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド* (0.01)	2-アミノアントラセン (1)
TA98	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド* (0.1)	2-アミノアントラセン (0.5)
TA1537	9-アミノアクリジン (80)	2-アミノアントラセン (2)

本試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート	
			塩基対置換型	
			TA1535	WP2uvrA
溶媒対照 (DMSO)	0	-	6	12
HTFP	156	-	10	22
	313	-	11	39
	625	-	12	35
	1250	-	11	65
	2500	-	19	107
	5000	-	36	230
陽性対照		-	307	206
溶媒対照 (DMSO)	0	+	9	24
HTFP	156	+	15	21
	313	+	9	41
	625	+	12	44
	1250	+	14	80
	2500	+	33	157
	5000	+	42	229
陽性対照		+	154	549

陽性対照化合物 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)

	S9 mix非存在下	S9 mix存在下
TA1535	アジ化ナトリウム (0.5)	2-アミノアントラセン (2)
WP2uvrA	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド* (0.01)	2-アミノアントラセン (10)

確認試験結果

表中の数値は2連の平均値

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート
			塩基対置換型 TA100
溶媒対照 (DMSO)	0	+	98
HTFP	156	+	82
	313	+	93
	625	+	86
	1250	+	101
	2500	+	113
	5000	+	125
陽性対照		+	599

陽性対照化合物 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{プレート}$)

S9 mix存在下

TA100 2-アミノアントラセン (1)

②ピリダリル代謝物 HTFP のチャイニーズハムスター細胞 (V79) を用いた
遺伝子突然変異試験

(資料 代 2-2)

試験機関：(財) 食品薬品安全センター

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検 体：ピリダリル代謝物；HTFP

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター細胞 (V79) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、6-チオグアニン存在下でのコロニー増殖を指標とするヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 遺伝子座の突然変異誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、S9 mix 存在下および非存在下ともに、検体で 4 時間処理した。試験は 2 連制とし、2 回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

1 回目試験の S9 mix 非存在下での 0.40 および 1.6 mg/mL の濃度における突然変異率(それぞれ 4.9×10^{-6} および 9.8×10^{-6}) および S9 mix 存在下での 1.6 mg/mL の濃度における突然変異率 (7.6×10^{-6}) は、溶媒対照群 (S9 mix 非存在下； 1.3×10^{-6} 、S9 mix 存在下； 2.5×10^{-6}) の 3 倍以上であった。しかし、いずれの濃度においても溶媒対照群の背景値の範囲 (S9 mix 非存在下； $0 \sim 13.8 \times 10^{-6}$ 、S9 mix 存在下； $0 \sim 18.0 \times 10^{-6}$) を超えなかった。再現性確認のために実施した 2 回目の試験では、突然変異率は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの濃度においても溶媒対照群の背景値の範囲を超えず、溶媒対照群と比較して 3 倍以上の増加も認められなかった。

一方、陽性対照物質であるエチルメタンサルホン酸 (EMS、S9 mix 非存在下) および N-ニトロソジメチルアミン (NDMA、S9 mix 存在下) は突然変異率の顕著な増加を誘発した。

以上の結果から、ピリダリル代謝物 HTFP は代謝活性化を含む本試験条件下において、突然変異誘発性を有しないものと判断された。

1回目試験

(表中の値は2反復の平均値)

薬物	濃度 (mg/mL)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	相対コロニー 形成率 ^{b)} (%)	突然変異頻度 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
溶媒対照 (DMSO)	0 ^{d)}	—	100.0	100.0	1.3
HTFP	0.10	—	104.7	103.3	2.9
	0.20	—	104.9	104.7	1.2
	0.40	—	107.3	100.4	4.9 ^{e)}
	0.80	—	101.1	97.8	3.2
	1.6	—	100.2	101.5	9.8 ^{e)}
陽性 対照	NDMA	—	104.0	102.5	10.6 ^{e)}
	EMS	—	88.6	74.1	910.4 ^{e),f)}
溶媒対照 (DMSO)	0 ^{d)}	+	100.0	100.0	2.5
HTFP	0.10	+	97.9	96.0	1.9
	0.20	+	100.4	102.9	3.1
	0.40	+	102.4	104.6	2.0
	0.80	+	99.7	101.5	2.0
	1.6	+	99.4	103.9	7.6 ^{e)}
陽性対照 (NDMA)	2	+	95.0	78.5	279.5 ^{e),f)}

a): 相対細胞生存率 = (コロニー数 / 溶媒対照群のコロニー数) $\times 100$ 、各3ウェルの平均値

b): コロニー形成率 = (コロニー数 / 接種細胞数) $\times 100$ 、各3ウェルの平均値

c): 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 $\times 10$) / $10^6 \times 100$ / (コロニー形成率)、各10プレートの平均値

d): 1 vol%

e): 溶媒対照群の3倍以上に増加

f): 溶媒対照の背景値 (平均 $\pm 2SD$: 5.4 \pm 8.4 (S9 mix 非存在下)、7.6 \pm 10.4 (S9 mix 存在下) より高値)

NDMA: N-ニトロソジメチルアミン

EMS: エチルメタンサルホン酸

2回目試験

(表中の値は2反復の平均値)

薬物	濃度 (mg/mL)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	相対コロニー 形成率 ^{b)} (%)	突然変異率 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
溶媒対照 (DMSO)	0 ^{d)}	-	100.0	100.0	11.4
HTFP	0.10	-	95.4	93.9	2.1
	0.20	-	93.9	103.5	1.9
	0.40	-	96.5	106.7	2.9
	0.80	-	93.0	100.2	7.6
	1.6	-	87.4	99.9	7.6
陽性 対照	NDMA	-	93.5	102.9	7.1
	EMS	-	79.5	76.5	703.7 ^{e),f)}
溶媒対照 (DMSO)	0 ^{d)}	+	100.0	100.0	4.0
HTFP	0.10	+	98.1	94.5	6.1
	0.20	+	96.1	103.8	2.3
	0.40	+	96.1	94.0	6.9
	0.80	+	97.5	94.4	4.5
	1.6	+	90.3	93.4	5.1
陽性対照 (NDMA)	2	+	88.4	80.7	307.7 ^{e),f)}

a): 相対細胞生存率 = (コロニー数 / 溶媒対照群のコロニー数) $\times 100$ 、各3ウェルの平均値

b): コロニー形成率 = (コロニー数 / 接種細胞数) $\times 100$ 、各3ウェルの平均値

c): 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 $\times 10$) / $10^6 \times 100$ / (コロニー形成率)、各10プレートの平均値

d): 1 vol%

e): 溶媒対照群の3倍以上に増加

f): 溶媒対照の背景値 (平均 $\pm 2SD$: 6.2 \pm 8.4 (S9 mix 非存在下)、6.9 \pm 9.2 (S9 mix 存在下) より高値)

NDMA: N-ニトロソジメチルアミン

EMS: エチルメタンサルホン酸

③ピリダリル代謝物 HTFP のチャイニーズハムスター肺由来培養細胞 (CHL/IU) を用いた
in vitro 染色体異常試験

(資料 代 2-3)

試験機関：(財) 食品薬品安全センター

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検 体：ピリダリル代謝物；HTFP

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの肺由来培養細胞 (CHL/IU) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で検体の染色体異常誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。観察は 1 濃度あたり 200 個の分裂中期像について行い、試験は 2 回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

検体は S9 mix 存在下の 6 時間処理において、いずれの濃度においても染色体構造異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。1 回目試験の 1.6 mg/mL の濃度の倍数体細胞の出現頻度において、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められ、濃度依存性を調べる傾向検定において有意差が認められた。しかしながら、しかしその出現頻度は 1.9% と低頻度であったこと、2 回目試験において濃度依存性が認められたものの、最高濃度の 1.6 mg/mL まで倍数体細胞の出現頻度の有意な増加は再現されなかったことから、1 回目試験の増加の生物学的意義はないと判断された。

S9 mix 非存在下の 6 時間処理では、倍数体細胞の出現頻度において濃度依存性に有意差が認められたものの、いずれの濃度においても、染色体構造異常細胞および倍数体細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

24時間連続処理 (S9 mix 非存在下) では、いずれの濃度においても染色体構造異常細胞および倍数体細胞の出現頻度の有意な増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシンCおよびシクロホスファミドは染色体構造異常を示す分裂中期細胞数の明らかな増加を示した。

以上の結果より、ピリダリル代謝物 HTFP は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性を有しないものと判断された。

1 回目試験

薬物	濃度 (mg/mL)	処理 時間 (h)	標 本 作 製 時 間 (h)	観 察 細 胞 数	S9 mix の 有 無	構造異常							傾向 検定 ^{c)}	増 殖 率 (%)				
						異常数					異常細胞数				倍数体 細胞数 (%) ^{b)}	-G	+ 倍数 体 細胞	
						ギャ ップ	染色分体型		染色体型		多重 異常 ^{a)}	+G (%)						-G (%)
							切 断	交 換	切 断	交 換								
溶媒対照 (DMSO)	1 %	6	24	200	-	0	2	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	5 (0.6)	-	+	100.0	
HTFP	0.40	6	24	200	-	0	2	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	3 (0.4)			98.5	
	0.80			200	-	1	3	1	1	0	0	6 (3.0)	5 (2.5)	7 (0.9)			92.0	
	1.6			200	-	0	4	0	0	0	0	3 (1.5)	3 (1.5)	15 (1.9)			86.0	
陽性対照 (MMC)	0.1 μg/mL			6	24	200	-	6	101	101	3	1	0	127 (63.5)			125** (62.5)	1 (0.1)
溶媒対照 (DMSO)	1 %	6	24	200	+	1	6	0	0	0	0	6 (3.0)	6 (3.0)	0 (0.0)	-	+	100.0	
HTFP	0.40	6	24	200	+	0	0	0	1	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)			97.0	
	0.80			200	+	0	4	0	0	0	0	4 (2.0)	4 (2.0)	2 (0.3)			98.5	
	1.6			200	+	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	15** (1.9)			93.0	
陽性対照 (CP)	5 μg/mL			6	24	200	+	1	40	56	5	0	0	71 (35.5)			71** (35.5)	0 (0.0)

DMSO : ジメチルスルフォキシド、MMC : マイトマイシン C、CP : シクロホスファミド、+G : ギャップを含む異常、-G : ギャップを除く異常

a) : 10 個以上の異常を持つ細胞

b) : 各群 800 個の細胞を観察した

c) : Cochran-Armitage の傾向検定 ($p < 0.01$ 、片側)

** : $p < 0.01$ (構造異常細胞数および倍数体細胞数 : Fisher の正確確率検定 (片側))

2回目試験

薬物	濃度 (mg/mL)	処理 時間 (h)	標 本作 製時 間 (h)	観 察 細 胞 数	S9 mix の 有 無	構造異常							傾向 検定 ^{c)}	増 殖 率 (%)				
						異常数					異常細胞数				倍数体 細胞数 (%) ^{b)}	-G		
						ギ ャ ッ プ	染色分体型		染色体型		多 重 異 常 ^{a)}	+G (%)						-G (%)
							切 断	交 換	切 断	交 換								
溶媒対照 (DMSO)	1 %	24	24	200	-	0	3	0	1	0	0	4 (2.0)	4 (2.0)	1 (0.1)	-	-	100.0	
HTFP	0.40	24	24	200	-	2	3	0	0	0	0	5 (2.5)	3 (1.5)	1 (0.1)			88.0	
	0.80			200	-	0	4	0	1	0	0	5 (2.5)	5 (2.5)	1 (0.1)			74.0	
	1.6			200	-	3	4	0	4	0	0	10 (5.0)	7 (3.5)	0 (0.0)			55.5	
陽性対照 (MMC)	0.05 μg/mL	24	24	200	-	2	103	126	6	1	0	128 (64.0)	128** (64.0)	1 (0.1)				
溶媒対照 (DMSO)	1 %	6	24	200	+	3	4	0	2	0	20	11 (5.5)	8 (4.0)	4 (0.5)	-	+	100.0	
HTFP	0.40	6	24	200	+	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.1)			100.5	
	0.80			200	+	0	2	3	1	0	0	4 (2.0)	4 (2.0)	1 (0.1)			95.0	
	1.6			200	+	1	6	1	0	1	0	8 (4.0)	7 (3.5)	12 (1.5)			91.5	
陽性対照 (CP)	5 μg/mL	6	24	200	+	1	60	65	1	0	0	81 (40.5)	81** (40.5)	1 (0.1)				

DMSO : ジメチルスルフォキシド、MMC : マイトマイシンC、CP : シクロホスファミド、+G : ギャップを含む異常、-G : ギャップを除く異常

a) : 10 個以上の異常を持つ細胞

b) : 各群 800 個の細胞を観察した

c) : Cochran-Armitage の傾向検定 ($p < 0.01$ 、片側)

** : $p < 0.01$ (構造異常細胞数および倍数体細胞数 : Fisher の正確確率検定 (片側))

④ピリダリル代謝物 HTFP のラット肝細胞を用いた *in vivo*/*in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験

(資料代 2-4)

試験機関: (財) 食品農医薬品安全性評価センター

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

検 体: ピリダリル代謝物; HTFP

検体純度:

供試動物: Crj:CD (SD) IGS 系雄ラット (投与時 8 週齢、体重 301~323 g)、1 群 3 匹

試験方法: 検体を 0.5 w/v% メチルセルロース (MC) 水溶液に懸濁し、1000 および 2000 mg/kg の投与量で、強制的に単回経口投与した。なお、陰性対照群には 0.5% MC 水溶液のみを同様に投与した。投与 2 および 16 時間後に肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流した後に摘出して肝細胞を分離した。10% 牛胎児血清を含むウイリアムズ E 培地 (WEM) 中で培養した肝細胞を、³H-チミジンを含む WEM 培地中で約 4 時間培養し、さらに非標識チミジンを含む WEM 培地中で一晩培養した。その後、細胞をメタノール: 酢酸 = 3:1 で固定し、オートラジオグラム用標本を作製した。

各群 3 匹の動物について、それぞれ 150 個 (各群 450 個) の肝細胞を観察した。核内総粒子数を計数し、核と同じ面積の細胞質粒子数を差し引いて、正味の核内粒子数を求めた。また、正味の核内粒子数が 5 個以上の細胞 (修復細胞) 数を記録した。検体投与群の正味の核内粒子数の平均値が 5 個以上かつ修復細胞の割合が 20% 以上増加した場合に陽性とした。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次表に示した。

投与 2 時間後および 16 時間後のいずれの検体投与群においても、正味の核内粒子数および修復細胞の出現頻度は、溶媒対照群と比較して差は認められなかった。

一方、陽性対照であるジメチルニトロソアミン (DMN) 投与群および 2-アセチルアミノフルオレン (2AAF) 投与群では、陽性の基準を超える肝細胞における正味の核内粒子数および修復細胞の出現頻度の増加が認められた。

以上の結果から、本試験条件下において、ピリダリル代謝物 HTPP はラット肝細胞に不定期 DNA 合成を誘発せず、DNA 損傷性を示さないと判断された。

試験結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察動物数	核内総粒子数 (平均値±SD)	細胞質粒子数 (平均値±SD)	正味の核内粒子数 ^{a)}	修復細胞の割合 ^{b)} (% , 平均値±SD)	判定
2	陰性対照 (0.5 w/v%MC)	0 ^{c)}	3	9.1±0.4	11.0±0.4	-1.9	0.7±0.0	-
	HTFP	1000	3	9.1±0.5	11.6±1.0	-2.5	1.6±0.4	-
		2000	3	10.1±1.0	12.5±1.1	-2.4	0.9±1.0	-
	陽性対照 (DMN)	5	3	37.2±1.0	7.7±0.7	29.5	100.0±0.0	+
16	陰性対照 (0.5 w/v%MC)	0 ^{c)}	3	10.0±1.6	12.7±1.4	-2.7	0.2±0.4	-
	HTFP	1000	3	10.8±0.1	13.4±0.7	-2.6	0.7±0.7	-
		2000	3	11.3±1.1	14.7±2.0	-3.4	0.9±0.4	-
	陽性対照 (2AAF)	100	3	38.8±1.0	8.9±0.9	29.9	100.0±0.0	+

DMN : ジメチルニトロソアミン、2AAF : 2-アセチルアミノフルオレン、0.5 w/v%MC : 0.5 w/v%メチルセルロース水溶液

a) : 正味の核内粒子数 = 核内総粒子数 (平均値) - 細胞質粒子数 (平均値)

b) : 正味の核内粒子数を 5 個以上有する細胞の割合

c) : 10 mL/kg

(3) 変異原性 (ピリダリル代謝物 HPDO)

①ピリダリル代謝物 HPDO の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代3-1)

試験機関：住友化学工業株式会社

報告書作成年：2002年

検体：ピリダリル代謝物；HPDO

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、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 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、156~5000 µg/プレートの範囲の6濃度で実施した。試験は1連制とし、プレインキュベーション法で本試験を1回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

検体は S9 mix 存在下、非存在下の TA1535 および WP2uvrA 株、S9 mix 非存在下の TA100 株において、復帰変異コロニー数を溶媒対照群の2倍以上にかつ用量依存的に増加させた。S9 mix 存在下 TA98、TA100、TA1537 株および S9 mix 非存在下 TA98、TA1537 株では、5000 µg/プレートの濃度まで、復帰変異コロニー数を溶媒対照群の2倍以上に増加させることはなかった。

なお、陽性対照として用いた 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各菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、HPDO は S9 mix 存在下、非存在下の TA1535 および WP2uvrA 株、S9 mix 非存在下の TA100 株において復帰変異誘発性を有すると判断された。

本試験結果

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照 (DMSO)	0	-	71	5	32	30	16
HPDO	156	-	91	15	82	27	16
	313	-	98	21	131	35	22
	625	-	143	22	216	31	14
	1250	-	14*	0*	333	15	2*
	2500	-	0*	0*	549	5*	0*
	5000	-	0*	0*	405*	0*	0*
陽性対照		-	468	301	139	286	911
溶媒対照 (DMSO)	0	+	105	12	24	30	16
HPDO	156	+	115	16	118	42	10
	313	+	126	23	174	41	10
	625	+	141	24	289	33	10
	1250	+	14*	8*	420	13*	0*
	2500	+	0*	0*	708	2*	0*
	5000	+	0*	0*	389	0*	0*
陽性対照		+	780	189	965	301	125

* : 検体による菌の生育阻害が認められた。

陽性対照化合物 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)

	S9 mix非存在下	S9 mix存在下
TA100	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)	2-アミノアントラセン (1)
TA1535	アゾ化ナトリウム (0.5)	2-アミノアントラセン (2)
WP2uvrA	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.01)	2-アミノアントラセン (10)
TA98	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (0.1)	2-アミノアントラセン (0.5)
TA1537	9-アミノアクリジン (80)	2-アミノアントラセン (2)

②ピリダリル代謝物 HPDO のチャイニーズハムスター細胞 (V79) を用いた
遺伝子突然変異試験

(資料 代 3-2)

試験機関：(財) 食品薬品安全センター

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検 体：ピリダリル代謝物；HPDO

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター細胞 (V79) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、6-チオグアニン存在下でのコロニー増殖を指標とするヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 遺伝子座の突然変異誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、S9 mix 存在下および非存在下ともに、検体で 4 時間処理した。試験は 2 連制とし、2 回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

1 回目試験の S9 mix 存在下、1.8 mg/mL の濃度において、突然変異率 (18.9×10^{-6}) は、溶媒対照群の背景値の範囲 ($0 \sim 17.4 \times 10^{-6}$) を超えたが、溶媒対照群と比較して 3 倍以上の増加は認められなかった。再現性確認のために実施した 2 回目の試験では、突然変異率は、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの濃度においても溶媒対照群の背景値の範囲を超えず、溶媒対照群の 3 倍以上の増加も認められなかった。

一方、陽性対照物質であるエチルメタンサルホン酸 (EMS, S9 mix 非存在下) および N-ニトロソジメチルアミン (NDMA, S9 mix 存在下) は突然変異率の顕著な増加を誘発した。

以上の結果から、ピリダリル代謝物 HPDO は代謝活性化を含む本試験条件下において、突然変異誘発性を有しないものと判断された。

1回目試験

(表中の値は2反復の平均値)

薬物	濃度 (mg/mL)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	相対コロニー 形成率 ^{b)} (%)	突然変異率 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
溶媒対照 (DMSO)	0 ^{d)}	-	100.0	100.0	10.9
HPDO	0.11	-	102.8	108.7	7.7
	0.23	-	103.7	100.7	6.4
	0.45	-	103.0	101.5	8.3
	0.90 P	-	94.1	106.6	9.1
	1.8 P	-	94.1	103.1	6.2
陽性 対照	NDMA	-	100.6	99.9	14.7 ^{e)}
	EMS	-	94.0	82.1	851.5 ^{e),f)}
溶媒対照 (DMSO)	0 ^{d)}	+	100.0	100.0	8.8
HPDO	0.11	+	99.5	94.7	9.4
	0.23	+	102.2	96.3	10.5
	0.45	+	97.7	108.5	14.1
	0.90 P	+	95.3	99.6	10.3
	1.8 P	+	93.9	98.5	18.9 ^{e)}
陽性対照 (NDMA)	2	+	93.8	93.6	393.1 ^{e),f)}

P: 析出が認められた。

a): 相対細胞生存率 = (コロニー数 / 溶媒対照群のコロニー数) $\times 100$ 、各3ウェルの平均値

b): コロニー形成率 = (コロニー数 / 接種細胞数) $\times 100$ 、各3ウェルの平均値

c): 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 $\times 10$) / 10^6 $\times 100$ / (コロニー形成率)、各10プレートの平均値

d): 1 vol%

e): 溶媒対照の背景値 (平均 $\pm 2SD$: 5.9 \pm 8.6 (S9 mix 非存在下)、7.8 \pm 9.6 (S9 mix 存在下) より高値

f): 溶媒対照群の3倍以上に増加

NDMA: N-ニトロソジメチルアミン

EMS: エチルメタンサルホン酸

2回目試験

(表中の値は2反復の平均値)

薬物	濃度 (mg/mL)	S9 mix の有無	相対細胞 生存率 ^{a)} (%)	相対コロニー 形成率 ^{b)} (%)	突然変異率 ^{c)} ($\times 10^{-6}$)
溶媒対照 (DMSO)	0 ^{d)}	-	100.0	100.0	2.8
HPDO	0.11	-	100.9	105.4	0.7
	0.23	-	99.7	111.6	1.2
	0.45	-	100.0	111.2	5.6
	0.90 P	-	99.5	100.7	3.3
	1.8 P	-	99.7	101.1	6.0
陽性 対照	NDMA	-	104.0	93.8	10.4 ^{e)}
	EMS	-	92.6	76.2	1162.0 ^{e),f)}
溶媒対照 (DMSO)	0 ^{d)}	+	100.0	100.0	2.7
HPDO	0.11	+	101.0	100.9	2.0
	0.23	+	100.7	100.9	2.0
	0.45	+	101.0	95.3	2.1
	0.90 P	+	101.4	99.4	2.7
	1.8 P	+	100.0	106.4	3.1
陽性対照 (NDMA)	2	+	99.3	88.3	653.5 ^{e),f)}

P: 析出が認められた。

a): 相対細胞生存率 = (コロニー数 / 溶媒対照群のコロニー数) $\times 100$ 、各3ウェルの平均値

b): コロニー形成率 = (コロニー数 / 接種細胞数) $\times 100$ 、各3ウェルの平均値

c): 突然変異率 = (6-チオグアニン耐性コロニー数 $\times 10$) / $10^6 \times 100$ / (コロニー形成率)、各10プレートの平均値

d): 1 vol%

e): 溶媒対照の背景値 (平均 $\pm 2SD$: 6.0 ± 8.6 (S9 mix 非存在下)、 6.5 ± 9.2 (S9 mix 存在下) より高値)

f): 溶媒対照群の3倍以上に増加

NDMA: N-ニトロソジメチルアミン

EMS: エチルメタンサルホン酸

③ピリダリル代謝物 HPDO のチャイニーズハムスター肺由来培養細胞 (CHL/IU) を用いた
in vitro 染色体異常試験

(資料 代3-3)

試験機関：(財) 食品薬品安全センター

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検 体：ピリダリル代謝物；HPDO

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスターの肺由来培養細胞 (CHL/IU) を用い、薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で検体の染色体異常誘発性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して用いた。観察は1濃度あたり 200 個の分裂中期像について行い、試験は2回行った。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次表に示した。

検体は S9 mix 存在下の 6 時間処理において、いずれの濃度においても染色体構造異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。1 回目試験の 0.45 および 0.90 mg/mL の濃度の倍数体細胞の出現頻度において、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。しかしその出現頻度はいずれも低頻度 (0.9 および 1.6%) で濃度依存性も認められないこと、2 回目試験ではいずれの濃度においても倍数体細胞の出現頻度の有意な増加は再現されなかったことから、1 回目試験の増加の生物学的意義はないと判断された。

S9 mix 非存在下の 6 時間処理では、いずれの濃度においても、染色体構造異常

細胞および倍数体細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

一方、24時間連続処理（S9 mix 非存在下）において、染色体構造異常を示す分裂中期細胞数の増加が認められた（0.23 mg/mL:12.5%、0.45 mg/mL:14.0%）。

いずれの濃度においても倍数体細胞の有意な増加は認められなかった。

なお、陽性対照として用いたマイトマイシンCおよびシクロホスファミドは染色体構造異常を示す分裂中期細胞数の明らかな増加を示した。

以上の結果より、ピリダリル代謝物 HPDO は本試験条件下において染色体異常誘発性を有するものと判断された。

1 回目試験

薬物	濃度 (mg/mL)	処理 時間 (h)	標本 作製 時間 (h)	観 察 細 胞 数	S9 mix の 有 無	構造異常								倍数体 細胞数 (%)	傾向 検定 ^{c)}		増 殖 率 (%)
						異常数					異常細胞数				-G	倍数 体細胞	
						ギャ ップ	染色分体型		染色体型		多重 異常 ^{a)}	+G (%)	-G (%)				
							切 断	交 換	切 断	交 換							
溶媒対照 (DMSO)	1 %	6	24	200	-	0	2	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	5 (0.6)	-	-	100.0
HPDO	0.45	6	24	200	-	4	5	0	0	0	0	6 (3.0)	5 (2.5)	2 (0.3)			81.0
	0.90			200	-	0	7	2	0	1	0	7 (3.5)	7 (3.5)	7 (0.9)			75.5
	1.8			200	-	1	4	0	3	0	0	6 (3.0)	5 (2.5)	11 (1.4)			66.5
陽性対照 (MMC)	0.1 μg/mL	6	24	200	-	6	101	101	3	1	0	127 (63.5)	125** (62.5)	1 (0.1)			
溶媒対照 (DMSO)	1 %	6	24	200	+	1	6	0	0	0	0	6 (3.0)	6 (3.0)	0 (0.0)	-	-	100.0
HPDO	0.45	6	24	200	+	0	8	0	2	0	0	7 (3.5)	7 (3.5)	7** (0.9)			85.0
	0.90			200	+	0	5	4	1	0	10	6 (3.0)	6 (3.0)	13** (1.6)			86.5
	1.8			200	+	0	2	2	2	0	0	4 (2.0)	4 (2.0)	5 (0.6)			82.0
陽性対照 (CP)	5 μg/mL	6	24	200	+	1	40	56	5	0	0	71 (35.5)	71** (35.5)	0 (0.0)			

DMSO : ジメチルスルフォキシド、MMC : マイトマイシン C、CP : シクロホスファミド、+G : ギャップを含む異常、-G : ギャップを除く異常

a) : 10 個以上の異常を持つ細胞

b) : 各群 800 個の細胞を観察した

c) : Cochran-Armitage の傾向検定 ($p < 0.01$ 、片側)

** : $p < 0.01$ (構造異常細胞数および倍数体細胞数 : Fisher の正確確率検定 (片側))

2 回目試験

薬物	濃度 (mg/mL)	処理 時間 (h)	標本 作製 時間 (h)	観 察 細 胞 数	S9 mix の 有 無	構造異常							倍数体 細胞数 (%)	傾向 検定 ^{c)}		増 殖 率 (%)	
						異常数					異常細胞数			-G	倍数 体 細 胞		
						ギ ャ ッ プ	染色分体型		染色体型		多重 異常 ^{a)}	+G (%)					-G (%)
							切 断	交 換	切 断	交 換							
溶媒対照 (DMSO)	1 %	24	24	200	-	0	3	0	1	0	0	4 (2.0)	4 (2.0)	1 (0.1)	+	-	100.0
HPDO	0.11	24	24	200	-	0	13	0	0	0	0	11 (5.5)	11 (5.5)	1 (0.1)			81.0
	0.23			200	-	2	25	0	2	0	0	27 (13.5)	25** (12.5)	2 (0.3)			75.0
	0.45			200	-	2	27	3	0	0	0	28 (14.0)	28** (14.0)	1 (0.1) ^{d)}			69.5
陽性対照 (MMC)	0.05 μg/mL	24	24	200	-	2	103	126	6	1	0	128 (64.0)	128** (64.0)	1 (0.1)			
溶媒対照 (DMSO)	1 %	6	24	200	+	3	4	0	2	0	20	11 (5.5)	8 (4.0)	4 (0.5)	-	-	100.0
HPDO	0.45	6	24	200	+	1	1	0	0	1	0	3 (1.5)	2 (1.0)	4 (0.5)			87.0
	0.90			200	+	0	9	14	0	0	10	13 (6.5)	13 (6.5)	5 (0.6)			93.5
	1.8			200	+	0	7	8	0	1	10	12 (6.0)	12 (6.0)	5 (0.6)			72.0
陽性対照 (CP)	5 μg/mL	6	24	200	+	1	60	65	1	0	0	81 (40.5)	81** (40.5)	1 (0.1)			

DMSO : ジメチルスルフォキシド、MMC : マイトマイシン C、CP : シクロホスファミド、+G : ギャップを含む異常、-G : ギャップを除く異常

a) : 10 個以上の異常を持つ細胞

b) : 各群 800 個の細胞を観察した

c) : Cochran-Armitage の傾向検定 (p < 0.01、片側検定)

d) : 720 個の細胞を観察した

** : p < 0.01 (構造異常細胞数および倍数体細胞数 : Fisher の正確確率検定 (片側))

④ピリダリル代謝物 HPDO のマウスを用いた小核試験

(資料 代3-4)

試験機関：(財) 残留農薬研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検 体：ピリダリル代謝物；HPDO

検体純度：

供試動物：ICR 系雄マウス (Crj:CD-1) (投与時 7 週齢、体重 28.1~37.4 g)、1 群 5 匹

試験方法：検体を 0.5%メチルセルロース (MC) 水溶液に懸濁し、500、1000 および 2000 mg/kg の投与量で、強制的に単回経口投与した。なお、陰性対照群には 0.5%MC 水溶液のみ、陽性対照群にはマイトマイシン C 10 mg/kg (溶媒；純水) を同様に投与した。投与 24 時間後 (500, 1000, 2000 mg/kg) および 48 時間後 (2000 mg/kg) に各動物から大腿骨の骨髓を採取して、スライドガラス上にメタノール固定後、3%ギムザ溶液で染色し骨髓標本作製した。

各個体あたり 1000 個の赤血球 (多染性赤血球および正染性赤血球) を観察し、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出した。また、各個体あたり 2000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計数した。

用量設定根拠：

試験結果：骨髓標本の観察結果を次表に示した。

試験期間中、いずれの投与群においても死亡は認められず、また、一般状態に異常も認められなかった。いずれの標本採取時間においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。また、全赤血球中の多染性赤血球の割合にも有意な変化は見られず、検体は骨髓細胞に毒性を示さないと考えられた。一方、陽性対照であるマイトマイシン C では、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

観察結果

採取時間 (hr)	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE ^{a)} % (平均値±SD)	PCE/(PCE+NCE) ^{b)} % (平均値±SD)
24	陰性対照 (0.5%MC)	- ^{c)}	5	0.10±0.08	56.5±3.6
	HPDO	500	5	0.16±0.11	56.1±5.1
		1000	5	0.18±0.09	56.8±3.8
		2000	5	0.15±0.07	61.8±9.4
	陽性対照 (マイトマイシン C)	10	5	5.96±1.52***	43.4±4.9*
48	陰性対照 (0.5%MC)	- ^{c)}	5	0.20±0.06	59.1±7.4
	HPDO	2000	5	0.19±0.09	55.2±3.9

統計学的解析：小核を有する多染性赤血球の出現頻度について、検体投与群については Kastenbaum と Bowman の方法、陽性対照群についてはカイ二乗検定を行った。多染性赤血球の割合について、Wilcoxon の順位和検定を行った。

*** : $P \leq 0.001$, * : $P \leq 0.05$

PCE : 多染性赤血球、NCE : 正染性赤血球、MNPCE : 小核を有する多染性赤血球

0.5%MC : 0.5%メチルセルロース水溶液

a) : 1 個体につき 2000 個の多染性赤血球を観察した。

b) : 1 個体につき 1000 個の赤血球を観察した。

c) : 10mL/kg

以上の結果から本試験条件下において、ピリダリル代謝物 HPDO は骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断された。

3. 製剤

(1) 急性毒性

①プレオフロアブルのラットを用いた急性経口毒性試験

(資料 製1-1)

試験機関：(株) ポリサーチセンター

報告書作成年：2002年 [GLP 対応]

検体： プレオフロアブル

組成： ビリダリル原体 10%

水、界面活性剤等 残量

試験動物：SD系ラット、(7週齢、体重：雄 213~228g、雌 148~162g)

1群雌雄各5匹

観察期間：14日間観察(投与日2001年11月12日、観察終了剖検日2001年11月26日)

投与方法：投与前(約16時間)絶食させたラットに、金属製胃ゾンデを用いて所定量(比重換算で2mL/kg体重)の被験物質を2000mg/kgの割合で1回経口投与した。対照群の動物には蒸留水のみを同様に投与した(0mg/kg)。投与後6時間に給餌を再開した。

試験項目：一般状態および生死を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日目に体重測定した。全動物は14日間の観察期間終了後にエーテル麻酔下で放血致死させ、体表外ならびに頭部、胸部および腹部の器官・組織を肉眼的に観察した。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂, ♀ ; 0, 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	♂♀共 >2000
死亡開始および終了時間	死亡例なし
症状発現および終了時間	症状の発現なし
最大無作用量 (mg/kg)	♂♀共 2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀共 2000

一般状態では、雌雄ともに異常はなく、被験物質投与の影響は認められなかった。体重では、雄で体重増加量に有意差が認められたが、通常見られる程度の一時的な変化であり、被験物質投与の影響はないものと考えられた。剖検では、雌雄ともに異常はなく、被験物質投与の影響は認められなかった。

②プレオフロアブルのラットを用いた急性経皮毒性試験

(資料 製1-2)

試験機関：(株)ポリサーチセンター

報告書作成年：2002年 [GLP 対応]

検体： プレオフロアブル

組成： ビリダリル原体 10%

水、界面活性剤等 残量

試験動物：SD系ラット、(7週齢、体重：雄 246~259g、雌 167~180g)

1群雌雄各5匹

試験期間：14日間観察(投与日2001年11月12日、観察終了剖検日2001年11月26日)

投与方法：投与前日に電器バリカン(松下電工株式会社)を用いて背部皮膚を刈毛(約30cm²：5×6cm)した。投与は、所定量(2000mg/kg、比重換算で2mL/kg体重)の被験物質をリント布(約20cm²：4×5cm)にのせ、刈毛した背部皮膚に貼付した。更に粘着性伸縮テープ(キネシオテックス：株式会社キネシオ)を用いて固定した。塗布後24時間にリント布および粘着性伸縮テープを除去し、温水およびガーゼを用いて塗布部位を消拭した。対照群の動物には被験物質の塗布を除き、リント布および粘着性伸縮テープを同様に処置した。

試験項目：一般状態および生死を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日目に体重測定した。全動物は14日間の観察期間終了後にエーテル麻酔下で放血致死させ、塗布部位を含む体表外ならびに頭部、胸部および腹部の器官・組織を肉眼的に観察した。

試験結果：

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	♂, ♀ ; 0, 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	♂♀共 >2000
死亡開始および終了時間	死亡例なし
症状発現および終了時間	症状の発現なし
最大無作用量 (mg/kg)	♂♀共 2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀共 2000

中毒症状および死亡は認められなかった。体重では、対照群を含め雌雄で投与翌日に減少あるいは増加抑制が認められたが、対照群と被験物質投与群における体重の変化は同様であり、粘着性伸縮テープ固定に伴うストレス性の変化と判断されたことから、被験物質投与の影響はないものと考えられた。剖検では、投与部位の皮膚を含めて、雌雄ともに異常はなく、被験物質投与の影響は認められなかった。

(2) 皮膚及び眼に対する刺激性

① プレオフロアブルのウサギを用いた皮膚刺激性試験

(資料 製2-1)

試験機関：株式会社ボゾリサーチセンター
報告書作成年：2002年 [GLP対応]

検 体： プレオフロアブル

組 成： ピリダリル原体 10%
水、界面活性剤等 残量

試験動物： 日本白色種ウサギ、雌 (18週令、体重2.95~3.22kg)

試験期間： 14日間観察

試験方法： 検体の0.5mLを塗布したリント布を3匹の動物の剃毛した左側背部に貼付した。貼付後その上から自着性弾力包帯を胴体に巻き付け、さらにポリエチレンフィルムのテープで固定し、4時間閉塞した。4時間後、リント布を取り除き、投与部位を消拭した。その後経時的に観察した。右側背部は無処置対照群とした。

観 察： 検体除去後、1、24、48、72時間後、その後は14日後まで1日1回、紅斑および痂皮と浮腫を観察し、Draizeらの判定基準に従って、皮膚の局所反応を点数化して記録した。

試験結果： Draizeらの判定基準による局所反応の平均値は以下の通りであった。

反応の種類	刺激反応 の 最高評点	適用後の経過時間			
		1時間	24時間	48時間	72時間
紅斑・痂皮	4	1.7	1.7	1.3	1.3
浮腫	4	1.0	0.0	0.0	0.0
合計	8	2.7	1.7	1.3	1.3

表の点数は3匹の平均値

反応の種類	刺激反応 の 最高評点	適用後の経過時間			
		4日	5日	6日	7日
紅斑・痂皮	4	1.3	1.3	1.3	0.7
浮腫	4	0.0	0.0	0.0	0.0
合計	8	1.3	1.3	1.3	0.7

表の点数は3匹の平均値

反応の種類	刺激反応 の 最高評点	適用後の経過時間			
		8日	9日	10日	11日
紅斑・痂皮	4	0.7	0.7	0.7	0.7
浮腫	4	0.0	0.0	0.0	0.0
合計	8	0.7	0.7	0.7	0.7

表の点数は3匹の平均値

反応の種類	刺激反応 の 最高評点	適用後の経過時間		
		12日	13日	14日
紅斑・痂皮	4	0.3	0.0	0.0
浮腫	4	0.0	0.0	0.0
合計	8	0.3	0.0	0.0

表の点数は3匹の平均値

検体投与部位において、検体除去1～72時間後に紅斑、浮腫が認められた。刺激反応は7～13日後に消失した。また、7～13日後には刺激性の二次的変化と考えられる鱗屑が2/3例に認められた。

以上の結果から、皮膚一次刺激性指数は1.8となり、「軽度の刺激性あり」と判断された。

②プレオフロアブルのウサギを用いる眼一次刺激性試験

(資料 製2-2)

試験機関：株式会社ボゾリサーチセンター

報告書作成年：2002年[GLP対応]

検 体： プレオフロアブル

組 成： ピリダリル原体 10%
水、界面活性剤等 残量

試験動物： 日本白色種ウサギ、雌（非洗眼群；14週令、体重2.50～2.58kg、洗眼群；
15週令、体重2.25～2.80kg）

試験期間： 3日間観察

試験方法： 非洗眼群では、検体の0.1mLを3匹の動物の左眼結膜嚢内に適用し、1秒間
眼瞼を閉じた後、経時的に観察した。右眼は無処置対照とした。

洗眼群では、検体の0.1mLを3匹の動物の左眼結膜嚢内に適用し、適用30
秒後に注射用水で30秒間洗眼した。右眼は30秒間の洗眼のみの対照眼とし
た。

観 察： 検体適用後、1、24、48、72時間後に、角膜、虹彩、結膜を観察し、Draize
らの判定基準に従って、眼の局所反応を点数化して記録した。

試験結果： Draizeらの判定基準による局所反応の平均値は以下の通りであった。

	反応の種類	刺激反応 の 最高評点	適用後の経過時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
非洗淨眼	角膜	80	0.0	0.0	0.0	0.0
	虹彩	10	0.0	0.0	0.0	0.0
	結膜	20	4.0	0.0	0.0	0.0
	(発赤)	(6)	2.0	0.0	0.0	0.0
	(浮腫)	(8)	0.0	0.0	0.0	0.0
	(眼脂分泌)	(6)	2.0	0.0	0.0	0.0
	合計	110	4.0	0.0	0.0	0.0

表の点数は3匹の平均

	反応の種類	刺激反応 の 最高評点	適用後の経過時間			
			1時間	24時間	48時間	72時間
洗浄眼	角膜	80	0.0	0.0	0.0	0.0
	虹彩	10	0.0	0.0	0.0	0.0
	結膜	20	0.0	0.0	0.0	0.0
	(発赤)	(6)	0.0	0.0	0.0	0.0
	(浮腫)	(8)	0.0	0.0	0.0	0.0
	(眼脂分泌)	(6)	0.0	0.0	0.0	0.0
	合計	110	0.0	0.0	0.0	0.0

表の点数は3匹の平均

非洗浄眼において投与1時間後に結膜発赤および眼脂分泌が観察されたが、投与24時間以降では刺激反応は認められなかった。洗浄眼においては観察期間を通じて角膜、虹彩、結膜等に眼刺激性は認められなかった。

以上の結果から、眼刺激性評点は4.0であり、「ごく軽度の刺激性あり」と判断された。また、洗浄効果が認められた。

(3) 皮膚感作性

① プレオフロアブルのモルモットを用いた皮膚感作性試験 (Buehler Test法)

(資料 製3-1)

試験機関：株式会社ポソリサーチセンター

報告書作成年： 2002年 [GLP対応]

検 体： プレオフロアブル

組 成： ピリダリル原体 10%
水、界面活性剤等 残量

試験動物： ハートレー系白色モルモット、雌 (7週令、体重353~432g)

試験期間： 30日間観察

方 法： Buehler法

投与量設定

根拠：

感 作： 検体0.2mLを直径2.5cmのバッチに塗布して、剃毛した動物の左側胸部に貼付した。6時間後に除去し貼付部位を清拭した。同様の操作を感作開始日、7日後、14日後の3回行った。陽性対照群として1%DNCB溶液、非感作群は溶媒である注射用水またはエタノールを貼付した。

惹 起： 感作27日後に、検体の0.2mLを直径2.5cmのバッチに塗布して、剃毛した動物の右側胸部に貼付した。6時間後に除去し貼付部位を清拭した。陽性対照として0.25%DNCB溶液を貼付した。

観 察： 各感作の貼付除去24および48時間後ならびに惹起貼付除去24および48時間後に、適用部位の紅斑および浮腫の有無等をMagnusson & Kligmanの基準により肉眼的に観察した。

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下表に示す

群		供試動物数	検体濃度	感作反応動物数								平均評点 24時間	平均評点 48時間	陽性動物数	陽性感作率 (%)	
				皮膚反応	24時間				48時間							
					皮膚反応評点											
					0	1	2	3	0	1	2					3
検体	感作群	20	25%	紅斑	9	11	0	0	11	9	0	0	0.6	0.5	13	65
				浮腫	20	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
	対照群	10	25%	紅斑	10	0	0	0	8	2	0	0	0	0.2	2	20
				浮腫	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0

群		供試動物数	検体濃度	感作反応動物数								平均評点 24時間	平均評点 48時間	陽性動物数	陽性感作率 (%)	
				皮膚反応	24時間				48時間							
					皮膚反応評点											
					0	1	2	3	0	1	2					3
DNCB	感作群	10	0.25%	紅斑	0	0	5	5	0	4	4	2	2.5	1.8	10	100
				浮腫	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
	対照群	10	0.25%	紅斑	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
				浮腫	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0

検体感作群では、惹起貼付除去後紅斑が認められ、陽性率は65%であった。検体非感作群でも、紅斑が認められ、陽性率は20%であった。検体感作群に認められた反応は非感作群に比べてわずかではあるが陽性率を上回るものであった。以上の結果より、皮膚感作性を有すると判断された。

IX. 動植物および土壌等における代謝分解

<代謝・分解試験一覧表>

資料No.	試験の種類	供試動物植物等	投与方法	投与量・処理量	結果概要	試験機関 (報告年)	頁
I-1 (GLP)	代謝・分解 (動物) [吸収・排泄]	ラット	経口投与	フェニル標識体: 1回投与 低用量 5mg/kg 高用量 500mg/kg プロベニル標識体: 1回投与 低用量 5mg/kg 高用量 500mg/kg ピリジル標識体: 1回投与 低用量 5mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> 投与した¹⁴C-ピリジルは速やかに糞尿および呼気中に排泄された。フェニル基およびピリジル基標識体では主として糞中に排泄され(糞83.8~96.7%、尿1.6~2.1%)、プロベニル基標識体では糞尿および呼気中に排泄された(糞54.9~58.8%、尿9.7~17.7%、呼気10.8~11.6%)。 投与7日目における組織残留量はフェニル基およびピリジル基標識体で投与量の1.1%~5.2%であり、プロベニル基標識体で5.4~10.0%であった。比較的高値を示したのは、脂肪(フェニル基標識体0.72~0.87ppm、プロベニル基標識体1.66~1.68ppm)、副腎(同0.27~0.33ppm、0.88~1.25ppm)、卵巣(同0.22~0.29ppm、0.57ppm)であった(低用量群)。 主要代謝物はS-1812-DP(低用量群41.9%~49.9%、高用量群24.6%~28.7%)であった。¹⁴CO₂は、低用量で10.8%~11.6%、高用量で10.8%~11.0%であった。他の代謝物はいずれも7.1%以下であった。性差はなかった。 主要代謝反応は、ジクロロプロベニル基の酸化および脱離であった。ピリジル基3位の水酸化、エーテル結合の開裂、ならびにピリジル基N-メチル化物が検出された。 	PTRL West (2001)	223
I-2 (GLP)	代謝・分解 (動物) [薬物動態]	ラット	経口投与	フェニル基標識体: 1回投与 低用量 50mg/kg 高用量 500mg/kg プロベニル基標識体: 1回投与 低用量 50mg/kg 高用量 500mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> 血漿の薬物動態学的パラメータ フェニル基標識体 <ul style="list-style-type: none"> <低用量> ♂ Tmax: 6-8時間 Cmax: 0.255ppm T_{1/2}: 18時間 ♀ Tmax: 6-8時間 Cmax: 0.212ppm T_{1/2}: 18時間 <高用量> ♂ Tmax: 8時間 Cmax: 21.04ppm T_{1/2}: 35時間 ♀ Tmax: 8時間 Cmax: 21.15ppm T_{1/2}: 35時間 プロベニル基標識体 <ul style="list-style-type: none"> <低用量> ♂ Tmax: 6-12時間 Cmax: 0.412ppm T_{1/2}: 60時間 ♀ Tmax: 6-12時間 Cmax: 0.324ppm T_{1/2}: 52時間 <高用量> ♂ Tmax: 12-24時間 Cmax: 34.753ppm T_{1/2}: 80時間 ♀ Tmax: 12-24時間 Cmax: 32.351ppm T_{1/2}: 91時間 フェニル基標識体に比べプロベニル基標識体では、Cmaxが若干高く、Tmaxが若干遅かった。T_{1/2}はフェニル基標識体に比べプロベニル基標識体では2倍以上長かった。 	PTRL East (2002)	231

資料 No.	試験の種類	供試動物 植物等	投与方法	投与量・処理量	結果概要	試験機関 (報告年)	頁
I-3 (GLP)	代謝・分解 (動物) [組織内分布]	ラット	経口投与	フェニル基標識体： 1回投与 低用量 50mg/kg 高用量 500mg/kg プロベニル基標識体： 1回投与 低用量 50mg/kg 高用量 500mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> 投与後初期の¹⁴C濃度は、肝臓に最も高く (Cmax : 3.55~7.22ppm、Tmax : 4~8時間)、副腎 (Cmax : 3.55~7.22ppm、Tmax : 4~8時間)、脂肪 (Cmax : 2.60~4.01ppm、Tmax : 24~120時間) がこれに次いで高かった (低用量群)。脂肪以外の組織における¹⁴Cは速やかに消失した。用量、性差、標識位置による差は認められなかった。 主要組織中の代謝物(肝臓、腎臓、肺、血液および脂肪)： ピリダリル、PhCH₂COOH、S-1812-DP および HPHM。 	PTRL West (2002)	235
I-4 (GLP)	代謝・分解 (動物) [胆汁排泄]	ラット	経口投与	フェニル基標識体： 1回投与 5mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> 投与後2日以内に投与¹⁴C量の72.3%~78.7%が糞および消化管中に、1.7%~1.8%が尿中に、7.9%~8.2%が胆汁中に排泄された。体内には5.7%~10.8%が残った。糞中の¹⁴Cの90%以上が未変化体であり、胆汁中の主要代謝物はS-1812-DPであった。 経口吸収率：性差なし ♂ 65.1%、♀ 66.5% 	PTRL West (2002)	264
I-5 (GLP)	代謝・分解 (動物) [反復投与]	ラット	経口投与	フェニル基標識体： 1日1回14日間 連続投与 5mg/kg/day	<ul style="list-style-type: none"> 投与終了後14日目までに、投与した¹⁴C量の95.9%~96.5%が排泄され(糞91.5%~94.5%、尿2.0%~4.4%)、体内に残留する¹⁴Cは2.6%~3.2%であった。 白色脂肪中の¹⁴C濃度は14日間の投与では定常状態には達しなかったが、投与終了後は半減期11日で低下した。褐色脂肪を含む各種臓器組織中の¹⁴C濃度は、投与開始後6~10日でほぼ一定となった。14日間投与終了後1日目の¹⁴C濃度が比較的高値であったのは、白色脂肪(32.4~43.1ppm)、褐色脂肪(33.7~57.5ppm)、肝臓(3.7~5.6ppm)、副腎(1.6~2.0ppm)、卵巣(1.4ppm)であった。 脂肪および肺においてはピリダリルの濃度が最も高かった(90%以上)。肝臓、腎臓、血液ではS-1812-PhCH₂COOHの濃度が最も高かった。他にS-1812-DP、S-1812-Py-OH、HPHMが検出された。 	住友化学 (2001)	269

本資料に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。

資料 No.	試験の種類	供試動物 植物等	投与方法	投与量・処理量	結果概要	試験機関 (報告年)	頁
I-6 (GLP)	代謝・分解 (動物) [代謝]	泌乳期ヤギ	経口投与	フェニル標識体: 9回投与(1日2回) 飼料中 10ppm プロベニル標識体: 9回投与(1日2回) 飼料中 10ppm ピリジル標識体: 9回投与(1日2回) 飼料中 10ppm	<ul style="list-style-type: none"> 投与した¹⁴C-<i>p</i> は速やかに糞および尿中に排泄された。投与終了6時間後における乳汁および組織残留量はフェニル基およびピリジル基標識体で投与量の2%未満であり、プロベニル基標識体で約10%であった。乳汁中の放射能濃度は投与3日目に定常状態に達した。 糞、脂肪および乳汁中の主要代謝物は<i>p</i> であり、筋肉、肝臓および腎臓でも検出された。また、フェニル基標識体の糞、尿、組織および乳汁中の主要代謝物として遊離代謝物または硫酸およびグルクロン酸抱合された S-1812-DP が検出された。乳汁、肝臓および腎臓中の少量代謝物として DGM、S-1812-Ph-CH₂COOH、H TFP および分子量が 575 の未知代謝物が検出された。プロベニル基標識体の組織および乳汁においてはラクトース、蛋白質中のアミノ酸、グルコース、脂質の脂肪酸または組織マトリックス成分に取り込まれた¹⁴Cであった。 主要代謝反応は、ジクロロプロベニル基の脱離およびグルクロン酸や硫酸抱合化であった。ジクロロプロベニル基の酸化、プロベニル基の代謝による低分子化合物の生成および組織生体高分子への取り込み、エーテル結合の開裂およびピリジル基の酸化が認められた。 	Ricerca (2002)	276

本資料に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。

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	投与方法	投与量・処理量	結果概要	試験機関(報告年)	頁
II-1 (GLP)	代謝・分解 (植物)	はくさい	植物全面 スプレー 処理	フェニル標識体 プロベニル標識体 0.2 lb/acre (224 g/ha 相当) 計4回処理	<ul style="list-style-type: none"> はくさい結球部には1.116-3.163ppm、はくさい外葉部には4.711-5.007ppmの¹⁴Cが残留していた。 はくさい結球部並びに外葉部中の¹⁴Cの>74%は親化合物であった。代謝物としてS-1812-DP、S-1812-Ph-CH₂COOHが検出されたが、いずれも10%TRR未満であった。 はくさいでの主たる代謝経路はプロベニル基の二重結合の開裂およびその脱離によるS-1812-Ph-CH₂COOH およびS-1812-DPの生成であった。 	Ricerca (2000)	291
II-2 (GLP)	代謝・分解 (植物)	トマト	植物全面 スプレー 処理	フェニル標識体 プロベニル標識体 0.2 lb/acre (224 g/ha 相当) 計4回処理	<ul style="list-style-type: none"> トマト果実には0.062-0.135ppmの¹⁴Cが残留していた。 トマト果実中の¹⁴Cの>70%は親化合物であり、主要代謝物としてS-1812-DP (4.5-5.5%TRR) が検出された。 トマトでの主たる代謝経路はプロベニル基の脱離によるS-1812-DPの生成であった。プロベニル基については更に低分子化合物にまで分解され、生体成分(グルコース等)を含む極性代謝物に変換された。 	Ricerca (2000)	296
II-3	代謝・分解 (植物)	イチゴ	葉面処理 果実処理 土壌処理	フェニル標識体 プロベニル標識体 葉面: 0.17mg/葉 果実: 4.8-8.4μg/果実 土壌: 4mg/ポット 葉面・果実処理では 200g/ha 相当の4回処理、 土壌処理では800g/haの1回処理	<ul style="list-style-type: none"> 葉面処理: 処理した¹⁴C量の92-96%が処理葉中に残存しており、果実への移行は0.02%未満(<0.01ppm)であった。 果実処理: 処理した¹⁴C量の92-93%が処理果実に残存しており、他の植物部位への移行は0.15%未満(<0.01ppm)であった。 土壌処理: 処理した¹⁴Cの果実への移行はほとんどなかった。 果実中の¹⁴Cのほとんどは親化合物(>97%TRR)であり、代謝物としてS-1812-DP (<1.3%TRR) が検出された。 イチゴでの主たる代謝経路はプロベニル基の脱離によるS-1812-DPの生成であった。 	住友化学 (2000)	300
III-1	代謝・分解 (土壌)	畑地土壌 (牛久)	土壌混和	フェニル標識体 プロベニル標識体 ピリジル標識体 乾土あたり0.2ppm (最大慣行施用量200g/ha、1回処理相当)	<ul style="list-style-type: none"> 消失半減期: 93-174日 土壌抽出物(処理180日目): 添加¹⁴C量の25-46%は親化合物で、¹⁴CO₂は14-26%であった。 主たる分解物: S-1812-DP、S-1812-DP-Me、HTFP (いずれも添加¹⁴C<8.1%) 	住友化学 (2001)	309

資料 No.	試験の種類	供試動物 植物等	投与方法	投与量・処理量	結果概要	試験機関 (報告年)	頁	
IV-1 (GLP)	水中運命 (加水分解)	緩衝液 (pH5, 7, 9)	水に添加	ピリジル標識体 添加濃度: 4 ppb	・加水分解は認められなかった。	Valent (2002)	313	
IV-2 (GLP)	水中運命 (水中光分解)	緩衝液 (pH7)、 フミン酸添加 水溶液	水に添加	フェニル標識体 ピリジル標識体 添加濃度: 4 ppb	<ul style="list-style-type: none"> ・緩衝液: 暗条件下、消失半減期は408日であった。東京6月の太陽光換算の光条件下、半減期8.6-9.1日でS-1812は速やかに分解した。 ・フミン酸添加水溶液: 暗条件下、消失半減期は95日であった。東京6月の太陽光換算の光条件下、半減期3.5-3.8日でS-1812は速やかに分解した。 ・主要分解物(試験期間中、添加¹⁴C>10%): S-1812-PYP、S-1812-DP、HTFP、S-1812-Ph-CH₂COOH ・揮散性¹⁴CのほとんどがCO₂であり、照射30日目には、フェニル標識体では22.6%(緩衝液)-26.4%(フミン酸添加)であり、ピリジル標識体では6.6%(緩衝液)-8.2%(フミン酸添加)であった。 	PTRL-West (2002)	317	
IV-3 (GLP)	分解要因 (水中光分解)	緩衝液 (pH7)、 フミン酸添加 水溶液	水に添加	プロペニル標識体 添加濃度: 4 ppb	<ul style="list-style-type: none"> ・緩衝液: 東京春の太陽光換算の光条件下、半減期5.8日でS-1812は速やかに分解した。 ・フミン酸添加水溶液: 東京春の太陽光換算の光条件下、半減期4.0日でS-1812は速やかに分解した。 ・添加¹⁴C>10%の分解物は検出されなかった。 ・揮散性¹⁴CのほとんどがCO₂であり、緩衝液中で14日目に10.6%、フミン酸添加溶液中で7日目に4.6% CO₂が生成した。 	PTRL-West (2002)	325	
V	土壌吸着性	試験実施省略						330
VI-1 (GLP)	生物濃縮性	ブルーギル	水に添加 連続流水式	フェニル基標識体 低濃度区: 0.05 μg/L 高濃度区: 0.15 μg/L	<ul style="list-style-type: none"> ・低濃度区の平均濃縮係数(BCFss): 18500倍 ・高濃度区の平均濃縮係数(BCFss): 14853倍 ・魚体中からの排泄半減期: 30-31日 	Ricerca (2002)	332	
VI-2 (GLP)	生物濃縮性 (マイクロソーム)	ブルーギル	ドリフト処理: 水面に散布 ラジオ処理: 散布された 土壌(スチール) を水面に投入	フェニル基標識体 <設定濃度> ドリフト処理: 1.46 μg/L ラジオ処理: 20.3mg/㎡ ラジオ(投入土壌量: 2 4.5kg)	<ul style="list-style-type: none"> ・野外試験であり、ドリフト処理は水中から速やかに消失するため、濃縮平衡は起こらず濃縮係数BCFは評価できないが、初期の水中濃度および魚体中の最高濃度に基づく濃縮率BAFおよび魚体中からの排泄半減期は以下の通り。 - ドリフト処理の濃縮率: 230倍 - ラジオ処理の濃縮率: 330倍 - ドリフト処理の魚体中からの排泄半減期: 21.7日 - ラジオ処理の魚体中からの排泄半減期: 約1ヶ月 	Springborn (Europe) (2003)	335-1	

代分解試験に使用した検体の標識位置選定理由：

<代謝物一覧表>

由来	名称 (略称)	化学名	構造式
親化合物	ピリダリル S-1812		
動物	S-1812-Py-OH		
動物 植物 土壌 水中光分解	S-1812-DP		
土壌	S-1812-DP-Me		
動物 植物 水中光分解	S-1812-Pb- CH ₂ COOH		
動物	HPHM		
動物	DCHM		

由来	名称 (略称)	化学名	構造式
水中光分解 動物	S-1812-PYP		
動物	TPPA		
動物 土壌	HTFP		
水中光分解 動物	HPDO		
動物	N-methyl-HTFP		
動物	N-methyl-HPDO		
水中光分解	S-1812-DHQ		
水中光分解	3, 3-dichloro-2- propenol		
水中光分解	3, 3-dichloro-2- propenoic acid		
水中光分解	malonic acid		

IX. 動植物及び土壌等における代謝分解

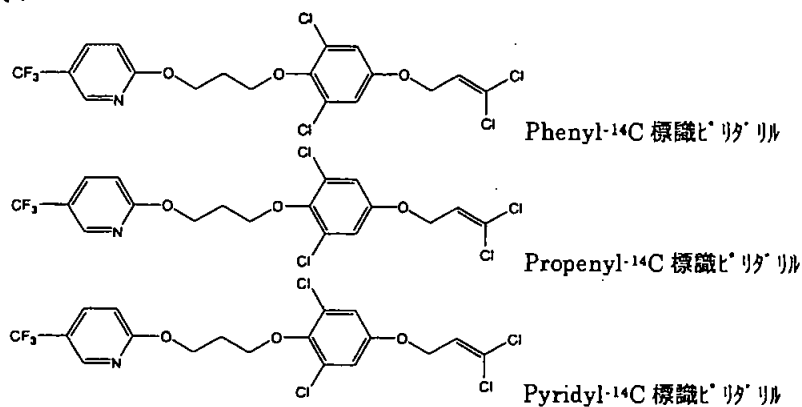
1. 動物体内運命に関する試験

(1) ピリダリルのラットに対する高用量および低用量の単回経口投与における体内分布と代謝試験

(資料 I-1)

試験機関 PTRL West, Inc.
PTRL East, Inc.
報告書作成年 2002年 (GLP 対応)

供試標識化合物：
構造式：



化学名： 2-(3-(2,6-dichloro-4-(3,3-dichloroprop-2-enyloxy)phenoxy)propoxy)-5-(trifluoromethyl)pyridine

比放射能および放射化学純度

標識体	同位元素希釈後の 比放射能	投与時の純度
[Phenyl- ¹⁴ C]ピリダリル 低用量		
[Phenyl- ¹⁴ C]ピリダリル 高用量		
[Propenyl- ¹⁴ C]ピリダリル 低用量		
[Propenyl- ¹⁴ C]ピリダリル 高用量		
[Pyridyl- ¹⁴ C]ピリダリル 低用量		

標識位置の設定理由：

供試動物： CrI:CD®(SD)BR ラット 7 週齢

試験方法：

投与： 被験物質をコーンオイルに溶解し、投与液を調製した。各標識体につき、ラット雄 4 匹および雌 4 匹に高用量 (pyridyl-¹⁴C 標識体を除く) および低用量でそれぞれ 500 mg および 5 mg [¹⁴C]ピリダリル/kg 体重、約 40-80 μCi/匹で強制経口投与した。ピリ

ジル基標識体は、低用量（5 mg/kg）のみを投与した*1。

投与量設定根拠*2：

採取試料：

尿およびケージ洗液：投与後 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 および 168 時間目に採取し、LSC で放射能を測定した。計算上、ケージ洗液試料中の放射能は、尿排泄の一部に含めた。

糞：投与後 24, 48, 72, 96, 120, 144 および 168 時間目に採取し、オキシダイザーで燃焼させた後、LSC で放射能を測定した。

呼気：投与後 6, 12, 24 時間目およびその後 1 日 1～2 回を投与後 7 日目までに、呼気中の二酸化炭素をトラップし、LSC で放射能を測定した。（ピリジル基標識体については測定しなかった。）

組織：投与後 7 日目に屠殺して組織を採取し、オキシダイザーで燃焼させた後、LSC で放射能を測定した。

代謝物の分析：

尿（直接分析または、酵素加水分解、酸加水分解後に分析）および糞抽出物（アセトンおよびメタノール/水（9:1,v:v）で抽出後に分析）について高速液体クロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィー分析を行った。投与量の 5% を超える代謝物は全て、同定と定量を行った。また、同定にはマススペクトロメトリーも用いた。呼気中の代謝物はトラップ液を BaCl₂ 分析して CO₂ と同定した。

結果：

排泄バランス：

[phenyl-¹⁴C]ピリダリルまたは[pyridyl-¹⁴C]ピリダリル投与ラットからの放射能の総回収率は、90% 以上であったが、[propenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群では、やや低かった*3。標識部位、投与量または雌雄に関わらず、投与量の大部分は 72 時間以内に糞中に排泄されたが、[propenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群では、糞中放射能はやや低く、尿中に他の 2 標識体からよりも多く排泄された。また、呼気中には、[propenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群からのみ、放射能が検出された。

*1 申請者註：ピリジル基特有の代謝の比率は極めて低かったため、低用量のみ実施した。

*2 申請者註：ラットにおける 90 日間亜急性経口毒性試験の結果、無毒性量は雌雄とも 100 ppm（雄 5.56 mg/kg/day, 雌 6.45 mg/kg/day）であり、1000 ppm（雄 56 mg/kg/day, 雌 64 mg/kg/day）以上の投与群において雌雄の体重及び体重増加量の減少、摂餌量の減少、雌の肝臓の相対重量の増加、肝臓、肺（雌雄）及び卵巣（雌のみ）の病理組織学的変化が認められた。

*3 申請者註：[propenyl-¹⁴C]ピリダリルの高用量投与群で放射能の総回収率が 90% を下回った要因としては、¹⁴CO₂ の排泄が多く、一部が捕集できなかった可能性がある。

表 尿、糞、呼気中放射能排泄 ([phenyl-¹⁴C]ピリダリル)

性	排泄率 [投与量に対する割合(%)]							
	雄				雌			
	5		500		5		500	
用量(mg/kg bw)								
時間(hr)/試料	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞
0-6	0.3	64.6	0.1	51.2	0.1	52.6	0.0	29.2
6-12	0.7		0.4		0.5		0.3	
12-24	0.6		0.7		0.6		0.7	
24-48	0.3	23.9	0.4	27.7	0.6	40.1	0.4	44.6
48-72	0.1	2.3	0.1	5.0	0.1	2.1	0.1	6.5
72-96	0.0	0.6	0.1	1.4	0.0	0.6	0.0	1.7
96-120	0.0	0.3	0.0	0.9	0.0	0.3	0.0	0.8
120-144	0.0	0.3	0.0	0.6	0.0	0.2	0.0	0.5
144-168	0.0	0.2	0.1	0.5	0.0	0.2	0.1	0.5
0-168	2.0	92.0	1.9	87.3	0.1	96.1	1.6	83.8
呼気(0-24)	0.0		0.0		0.0		0.0	
体組織	2.4		4.8		2.0		5.2	
総排泄率	96.4		94.0		100.1		90.6	

表 尿、糞、呼気中放射能排泄 ([propenyl-¹⁴C]ピリダリル)

性	排泄率 [投与量に対する割合(%)]							
	雄				雌			
	5		500		5		500	
用量(mg/kg bw)								
時間(hr)/試料	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞
0-6	1.3	43.4	0.3	36.0	2.0	32.6	0.5	30.3
6-12	7.8		1.5		5.4		1.0	
12-24	4.4		4.5		5.1		3.6	
24-48	1.8	9.7	3.4	15.7	3.6	22.1	3.2	24.5
48-72	0.5	0.8	0.7	1.6	0.6	1.3	0.6	1.5
72-96	0.4	0.4	0.4	0.6	0.4	0.5	0.3	0.7
96-120	0.3	0.3	0.3	0.6	0.3	0.3	0.3	0.4
120-144	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	0.3
144-168	0.2	0.1	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	1.1
0-168	16.9	54.9	11.5	55.2	17.7	57.2	9.7	58.8
呼気(0-168)	11.6		11.0		10.8		10.8	
体組織	7.0		10.0		5.4		7.8	
総排泄率	90.4		87.7		91.1		87.1	

表 尿、糞、呼気中放射能排泄 ([pyridyl-¹⁴C]ピリダリル)

用量(mg/kg bw)	5 mg/kg			
	雄		雌	
時間(hr)/試料	尿	糞	尿	糞
0-6	0.2		0.0	
6-12	1.0		0.6	
12-24	0.8	78.1	0.8	63.2
24-48	0.2	16.0	0.7	26.8
48-72	0.0	1.4	0.1	1.8
72-96	0.0	0.4	0.0	0.4
96-120	0.0	0.3	0.0	0.2
120-144	0.0	0.2	0.0	0.2
144-168	0.0	0.3	0.0	0.1
0-168	2.0	96.7	2.1	92.7
呼気				
体組織	1.9		1.1	
総排泄率	100.6		95.9	

∴ 測定せず

組織中放射能： [phenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群の組織中放射能濃度は、低用量投与では、脂肪、副腎、膵臓、被毛/皮膚、雌では加えて卵巣で高く、高用量では、副腎、膵臓、唾液腺、甲状腺、脂肪および被毛/皮膚、雌では加えて卵巣で高かった。[propenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群では、低用量および高用量ともに[phenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群より概して高く、低用量の雄では副腎、脂肪、膵臓、甲状腺および被毛/皮膚で、低用量の雌では副腎、脂肪、膵臓および卵巣で、高用量では、脂肪、膵臓、副腎、下垂体、唾液腺、肝臓および腎臓で高かった。[pyridyl-¹⁴C]ピリダリル投与群では、[phenyl-¹⁴C]ピリダリル低用量投与群と同様に、脂肪で高かった*。

* 申請者註：脂肪、副腎、膵臓、卵巣、唾液腺、甲状腺、被毛/皮膚、下垂体、肝臓および腎臓中放射能濃度は他に比べて高かったが、毒性試験の結果、脂肪、膵臓、唾液腺および被毛/皮膚には被験化合物投与による変化を認めていない。

糞からの放射能の抽出および回収：

[phenyl-¹⁴C]ピリダリルまたは [pyridyl-¹⁴C]ピリダリル投与ラットの糞中から回収された放射能の大部分は、アセトンで抽出され、残った放射能の殆どはメタノール/水で抽出された。[propenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群では、アセトン抽出された放射能は、回収放射能の50~70%で、メタノール/水で約20%が抽出され、さらに他の溶媒系（酸性および塩基性メタノール、リン酸緩衝液およびプロテアーゼ加水分解）によっても、抽出された。抽出後に残存した放射能は、[propenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群で、他の標識体投与群よりも多かった。

糞抽出物中代謝物の分析：

いずれの投与群においても、糞中から抽出された放射能の主な成分は、ピリダリルであり、主要代謝物として、S-1812-DP が検出され ([propenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群以外)、S-1812-Py-OH、HPHM(申請者註)およびDCHMも少量認められた。

尿中代謝物の分析：

[phenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群では、尿中に排泄された放射能は、投与量の2%以下で、投与量の1%を超える成分はなかった。[propenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群では、投与量の約10~18%の放射能が尿中に排泄され、分析の結果、11個以上の高極性代謝物が認められたが、いずれも少量であった。[pyridyl-¹⁴C]ピリダリル投与群からは、投与量の約2%が尿中に排泄され、HTFP およびHPDOの硫酸およびグルクロン酸抱合体が認められた。

呼気中代謝物の分析：

呼気中からは、[propenyl-¹⁴C]ピリダリル投与群でのみ、¹⁴CO₂が検出された。

申請者註：ピリダリルの開発初期段階でラット代謝の予備検討を行った結果、ラット糞中代謝物としてHPHMが存在することをNMR、MSを用いた機器分析により確認している。

排泄物中の代謝物の割合：

投与群	投与量に対する割合 (%) で表した同定された代謝物 ¹⁾								総計
	S-1812 ピリダリル	S-1812 Py-OH	S-1812 DP	HPHM	DCHM	HTFP	HPDO ²⁾	CO ₂	
①	31.7	1.6	49.9	3.4 ³⁾		-	-	0.0	86.6
②	31.0	2.2	47.3	7.0 ³⁾		-	-	0.0	87.5
③	51.5	0.9	24.6	0.9	3.3	-	-	0.0	81.2
④	49.8	1.1	28.7	1.2	2.4	-	-	0.0	83.2
⑤	32.2	3.4	-	2.5	3.4	-	-	11.6	53.1
⑥	28.1	4.1	-	3.9	3.4	-	-	10.8	50.3
⑦	39.4	1.1	-	0.3	0.2	-	-	11.0	52.0
⑧	41.8	1.7	-	0.5	0.0	-	-	10.8	54.8
⑨	32.5	1.3	50.5	-	-	1.3	0.7	nd ⁴⁾	86.3
⑩	39.2	1.3	41.9	-	-	1.1	0.9	nd ⁴⁾	84.4

投与群： ① [phenyl-¹⁴C]ピリダリル 低用量雄 ② [phenyl-¹⁴C]ピリダリル 低用量雌
 ③ [phenyl-¹⁴C]ピリダリル 高用量雄 ④ [phenyl-¹⁴C]ピリダリル 高用量雌
 ⑤ [propenyl-¹⁴C]ピリダリル 低用量雄 ⑥ [propenyl-¹⁴C]ピリダリル 低用量雌
 ⑦ [propenyl-¹⁴C]ピリダリル 高用量雄 ⑧ [propenyl-¹⁴C]ピリダリル 高用量雌
 ⑨ [pyridyl-¹⁴C]ピリダリル 低用量雄 ⑩ [pyridyl-¹⁴C]ピリダリル 低用量雌

- 糞中代謝物 (HTFP、HPDO および CO₂ を除く)。尿には HTFP および HPDO 以外にも多数の高極性代謝物が含まれたが、いずれも個々に投与量の 3% を超えなかった。呼気には CO₂ のみが検出された。
- 尿中に硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体として検出された。
- [phenyl-¹⁴C]ピリダリルの低用量群の HPLC 分析において、HPHM および DCHM が十分に分離されなかったため、HPHM および DCHM の合計値を示した。その他の群の分析においては、HPHM と DCHM は十分に分離されたため、HPHM と DCHM を分離定量した。
- 測定せず。

代謝経路：

ピリダリルの主要代謝経路は、[phenyl-¹⁴C]および[pyridyl-¹⁴C]標識体から S-1812-DP を生成し、[propenyl-¹⁴C]標識体から CO₂ および少量の高極性代謝物を生成する、ジクロロプロベニル基の開裂であった。[phenyl-¹⁴C]および[propenyl-¹⁴C]標識体から DCHM および HPHM が生成するピリジン環とジクロロフェニル環間のメチレン基の酸化的開裂は、主要ではない経路と考えられた。また、全ての標識体から、ピリダリルが水酸化を受けた S-1812-Py-OH が少量生成され、[pyridyl-¹⁴C]標識体からは、HTFP ならびに HPDO、N-methyl-HTFP および N-methyl-HPDO の硫酸およびグルクロン酸抱合体が生成された。
 推定代謝経路を図 1 に示す。



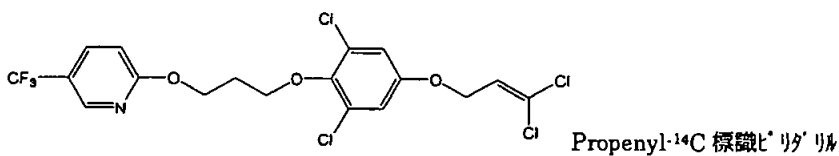
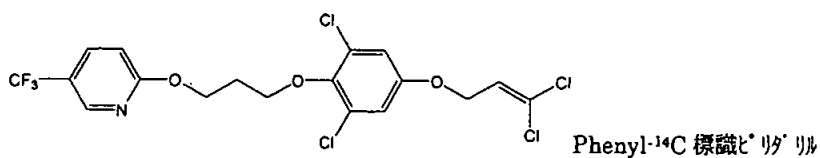
図1 ピリダリルのラットにおける推定代謝経路

(2) ピリダリルのラットにおける薬物動態

(資料 I-2)

試験機関 PTRL East, Inc.
報告書作成年 2002年 (GLP 対応)

供試標識化合物：



化学名： 2-(3-(2,6-dichloro-4-(3,3-dichloroprop-2-enyloxy)phenoxy)propoxy)-5-(trifluoromethyl)pyridine

比放射能および放射化学純度：

[Phenyl-¹⁴C]ピラリル

[Propenyl-¹⁴C]ピラリル

標識位置の設定理由：

供試動物： CrI:CD[®](SD)BR ラット 6~7 週齢

試験方法：

投与： [Phenyl-¹⁴C]ピラリルおよび[Propenyl-¹⁴C]ピラリルについて同位体希釈を行い、各動物に対する設定放射能を 25 μCi/匹とした。これらの被験物質をコーンオイルに溶解し、投与液を調製した。各標識体について、低用量 (5 mg/kg 体重) および高用量 (500 mg/kg 体重) を、ラット 30 匹/性/群に、強制経口投与した。

投与量設定根拠*1:

血液の採取および処理:

投与後、0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 および 120 時間に血液を採取した。各血液試料から、血漿および赤血球を分離した。全血、血漿および赤血球をサンプルオキシダイザーで燃焼させた後、LSCで放射能を測定した。

薬動学的パラメーターの測定:

各標識体の 2 用量群の雌雄ラットについて、血液、血漿および赤血球中の平均総放射能量を ppm 比当量で表し、採取時間に対してグラフに表し、薬物動態パラメーター、 C_{max} 、 T_{max} 、生物学的半減期 ($T_{1/2}$) および曲線下面積 (AUC) を求めた。さらに、 $1/2C_{max}(AB)$ 、 $1/2C_{max}(EL)$ 、 $1/10C_{max}(EL)$ 、 $T_{1/2}C_{max}(AB)$ 、 $T_{1/2}C_{max}(EL)$ および $T_{1/10}C_{max}(EL)$ を求めた。

結果:

血漿中濃度*2:

phenyl 標識体 5 mg/kg 投与群では、血漿 C_{max} は、雄で投与後 6 時間目に 0.586 ppm、雌で投与後 8 時間目に 0.308 ppm であった。同標識体の 500 mg/kg 投与群では、血漿 C_{max} は、雄で投与後 12 時間目に 21.65ppm、雌で投与後 12 時間目に 25.94ppm であった。消失半減期は phenyl 標識体では一相性の一次減衰を示した。

propenyl 標識体 5 mg/kg 投与群では、血漿 C_{max} は、雄で投与後 6 時間目に 0.961 ppm、雌で投与後 12 時間目に 0.423 ppm であった。同標識体の 500 mg/kg 投与群では、血漿 C_{max} は、雄で投与後 12 時間目に 45.73ppm、雌で投与後 24 時間目に 44.26ppm であった。propenyl 標識体においては二相性の一次減衰を示した。このように、propenyl 標識体では、phenyl 標識体より血漿中からの排泄が遅く、propenyl 基からの天然成分 (アミノ酸、トリグリセリド、グルコースなど) の生成によるものと考えられた*。

*1 申請者註: ラットにおける 90 日間亜急性経口毒性試験の結果、無毒性量は雌雄とも 100 ppm (雄 5.56 mg/kg/day, 雌 6.45 mg/kg/day) であり、1000 ppm (雄 56 mg/kg/day, 雌 64 mg/kg/day) 以上の投与群において雌雄の体重及び体重増加量の減少、摂餌量の減少、雌の肝臓の相対重量の増加、肝臓、肺 (雌雄) 及び卵巣 (雌のみ) の病理組織学的変化が認められた。

*2 申請者註: 申請者が血漿中濃度を用いて薬物動態パラメーターを再計算した (報告書は血中濃度で計算)。以降は血漿中濃度を用いて議論した。

* 申請者註: ヤギの代謝試験 (資料 I-6) において、propenyl 基からの天然成分 (アミノ酸、トリグリセリド等) の生成が示された。本試験のサンプルについても同様の検

