

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

VIII.1.9. 変異原性試験

1) 細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料 2-16-①)

試験機関：Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 5 株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537 および TA1538) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 株を用い、アロクロール 1254 で誘導した雄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 らの方法を用いてプレート法で変異原性を検索した。

検体は溶媒としてアセトンを用いて調製し、処理容量は 20 μ L/プレートとした。各用量 3 枚のプレートを用いた。陽性対照試験および溶媒対照試験も同時に実施した。37°C で 48 から 72 時間培養後、復帰変異コロニーを計数した。再現性のある正の用量反応関係が認められる場合あるいは溶媒対照に比し 2.5 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められる場合に変異原性を有すると判定した。

用量設定根拠：

結果：結果を次頁の表に示した。

分析の結果、アセトンに調製した検体溶液は少なくとも 1 日は安定であった。

2 回の独立した復帰突然変異試験の結果、検体処理群において、S9 Mix の有無にかかわらず、いずれの菌株、いずれの処理濃度においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では、明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下における本検体の細菌に対する突然変異誘発性は陰性であると結論された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-1 復帰突然変異試験成績 (1 回目の実験)

(表中の値は 3 枚のプレートの平均値)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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		
			WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA100	TA1535	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (アセトン)	20 μL	-	89	144	23	25	15	19
検 体	31.25	-	84	131	24	27	11	27
	62.50	-	109	136	28	29	14	23
	125.00	-	116	165	29	32	17	24
	250.00	-	110	144	27	24	13	19
	500.00	-	101	119	23	30	12	26
	1000.00	-	86	116	25	21	11	16
	2000.00	-	76	131	27	28	11	18
	5000.00	-	84	133	24	33	9	17
陽性対照								
NaN ₃	2.0	-	N	N	427	N	N	N
NaN ₃	5.0	-	N	839	N	N	N	N
PD	20	-	385	N	N	N	N	N
AAC	25	-	N	N	N	N	140	N
NF	5	-	N	N	N	447	N	693
溶媒対照 (アセトン)	20 μL	+	92	113	22	34	24	27
検 体	31.25	+	98	104	23	34	25	29
	62.50	+	105	117	21	42	20	31
	125.00	+	100	146	25	40	18	30
	250.00	+	97	113	18	39	18	23
	500.00	+	85	94	21	37	17	34
	1000.00	+	74	114	21	40	18	28
	2000.00	+	68	122	21	36	12	25
	5000.00	+	68	115	20	39	10	26
陽性対照								
BP	10	+	594	415	N	248	N	190
AAN	5	+	N	N	147	N	N	N
NR	20	+	N	N	N	N	222	N

N : 試験を行っていない

NaN₃ : アジ化ナトリウム, PD : 重クロム酸カリウム, AAC : 9-アミノアクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン, BP : ベンズ(a)ピレン, AAN : 2-アミノアントラセン

NR : ニュートラルレッド

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-2 復帰突然変異試験成績 (2回目の実験)

(表中の値は3枚のプレートの平均値)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/$ 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		
			WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA100	TA1535	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (アセトン)	20 μL	-	111	111	23	28	17	23
検 体	31.25	-	115	89	27	27	21	22
	62.50	-	126	79	27	27	14	18
	125.00	-	120	88	25	32	20	24
	250.00	-	110	81	25	20	14	26
	500.00	-	101	95	33	31	16	20
	1000.00	-	88	110	27	29	18	27
	2000.00	-	87	90	25	25	13	24
	5000.00	-	104	115	33	34	18	27
陽性対照								
NaN ₃	2.0	-	N	N	424	N	N	N
NaN ₃	5.0	-	N	442	N	N	N	N
PD	20	-	549	N	N	N	N	N
AAC	25	-	N	N	N	N	N	N
NF	5	-	N	N	N	725	59	452
溶媒対照 (アセトン)	20 μL	+	94	90	24	34	22	29
検 体	31.25	+	112	73	17	34	25	29
	62.50	+	115	89	22	37	22	30
	125.00	+	124	119	20	34	25	28
	250.00	+	111	96	19	38	22	30
	500.00	+	103	95	23	32	22	31
	1000.00	+	61	109	21	32	26	28
	2000.00	+	76	110	19	29	15	32
	5000.00	+	81	123	22	38	24	30
陽性対照								
BP	10	+	420	349	N	274	N	166
AAN	5	+	N	N	137	N	N	N
NR	20	+	N	N	N	N	290	N

N : 試験を行っていない

NaN₃ : アジ化ナトリウム, PD : 重クロム酸カリウム, AAC : 9-アミノアクリジン

NF : 2-ニトロフルオレン, BP : ベンズ(a)ピレン, AAN : 2-アミノアントラセン

NR : ニュートラルレッド

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

2) チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (資料 2-16-②)

試験機関：Sittingbourne Research Centre

[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いて、検体の染色体異常誘発性を薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で検索した。

検体に最も適した溶媒としてアセトンを選択した。検体はアセトンに 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで溶解した。

S9 mix を添加しない染色体異常試験においては細胞播種 24 時間後に検体溶液を添加し、24 時間ならびに 48 時間連続して検体処理した後、染色体標本作製した。

S9 mix を添加する試験においては細胞播種 24 時間後に培地を交換し、S9 mix 存在下で 3 時間検体処理した。検体処理後新しい培地に交換し、検体処理開始から 24 時間ならびに 48 時間培養後に染色体標本作製した。

何れの場合も無処理対照、溶媒対照ならびに陽性対照を同時に試験し、すべて各濃度あたり 2 系列で培養した。

可能な限り各用量群につき 200 個の分裂中期像を観察した。200 個のうち、倍数性細胞を除く 20 ± 2 動原体の染色体数を有する細胞についてのみ染色体異常を観察した。

データはロジットリンクおよび二項誤差構造を用いる一般線形モデルを用いて解析し、溶媒対照に異常が認められない場合はフィッシャーの直接確率法を用いて各処理群と溶媒対照群を比較した。また、用量相関性についての傾向検定を実施した。

用量設定根拠：

結果： 結果を次頁以降の表に示した。

検体は S9 mix 非存在下では何れの標本作製時間においても構造的染色体異常を有する細胞ならびに倍数性細胞の有意な増加を誘発しなかった。陽性対照であるメチルメタンサルフォネートは構造的染色体異常の明らかな増加を誘発した。

一方、S9 mix 存在下で 3 時間検体処理し、検体処理開始から 24 時間後に標本作製する群において、最高用量である 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で構造的染色体異常を有する細胞数に溶媒対照に比べて有意な上昇が認められた。1 回目の実験ではデータの不均一性を考慮して検定した場合には統計学的有意差は認められなかったが、不均一性を考慮せずに検定した場合にはギャップを含まない構造的染色体異常を有する細胞数に有意な上昇が認められた。同じ用量で実施した 2 回目の実験においては、最高用量である 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においてギャップを含むならびに含まない構造的染色体異常を有する細胞数に溶媒対照に比し有意な上昇が認められ、ギャップを含まない構造的染色体異常を有する細胞については正の用量反応関係も有意であった。何れの試験においても陽性対照であるベンズ (a) ピレンは構造的染色体異常の明らかな増加を誘発した。

S9 mix 存在下で 3 時間検体処理し、検体処理開始から 48 時間後に標本作製する群において

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。
は、検体処理群の何れの用量においても構造的染色体異常を有する細胞の有意な増加は認められなかった。陽性対照であるシクロフォスファミド処理群では染色体異常の上昇が認められなかったが、検体処理時間が短く（3 時間）、回復期間が長い（45 時間）ことから予想されなかったことではなかった。同じ細胞を用いて同じ培養条件で実施した 24 時間標本作製群においてベンズ(a)ピレン処理群で陽性結果が得られているため、この試験は有効とした。
S9 mix 存在下の何れの標本作製時間、何れの検体用量においても倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、本検体はチャイニーズハムスター卵巣細胞において S9 mix 存在下で弱い構造的染色体異常誘発性を有するものと結論された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-1 染色体異常試験結果 (-S9 mix)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間	標本作製時間	S9 mixの有無	相対分裂指数(%)	倍数性細胞(%)	構造異常細胞観察数	各染色体異常を有する細胞の頻度(%)							異常を有する細胞の頻度(%)		判定
								Gap	染色分体型			染色体型		その他	+Gap	-Gap	
									切断	断片	交換	断片	交換 ^a				
無処理対照		24	24	-	85	0.0	200	3.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	3.5	0.5	/
溶媒対照 (アセト)		24	24	-	100	0.0	200	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	/
検体	1.56 6.25 12.5	24	24	-	95 91 55	0.0 0.0 0.0	200 200 200	2.0 2.5 2.5	0.5 0.5 0.0	0.0 0.0 0.0	0.0 0.0 0.0	0.0 0.0 0.0	0.0 0.0 0.0	2.5 3.0 2.5	0.5 0.5 0.0	-	
陽性対照 (MMS)	20	24	24	-	61	0.0	200	5.5	5.5	0.0	6.5	4.5	1.0	0.0	19.5 ⁺⁺	15.0 ^{**}	+
無処理対照		48	48	-	122	1.0	198	2.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	3.03	1.01	/
溶媒対照 (アセト)		48	48	-	100	0.0	200	4.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.00	0.50	/
検体	0.625 2.500 5.000	48	48	-	68 107 91	0.0 0.0 0.0	200 200 200	6.0 4.5 3.5	0.0 0.5 0.0	0.0 0.0 0.0	0.0 0.0 0.0	0.5 0.0 0.0	0.0 0.0 0.0	6.50 5.00 3.50	0.50 0.50 0.00	-	
陽性対照 (MMS)	20	48	48	-	85	0.5	199	15.1 ⁺⁺	16.6	2.0	28.1	18.1	0.5	4.5	56.28 ⁺⁺	52.76 ⁺⁺	-

各濃度あたり計 200 個の細胞を観察し、倍数性細胞以外の細胞について構造的染色体異常を観察した
標本作製時間には処理時間を含む

相対分裂指数：溶媒対照の分裂指数（分裂中期の細胞数/観察細胞数）を 100%として表示

Gap：ギャップ，交換^a：二動原体および環，+Gap：ギャップを含める，-Gap：ギャップを含めない

MMS：メチルメタンスルフォネート

溶媒対照群に対し，⁺⁺： $p \leq 0.01$ （ロジットリンクおよび二項誤差構造を用いた一般線形モデルにより

解析），^{**}： $p \leq 0.01$ （溶媒対照に異常が認められない場合，Fisher の直接確率法により解析）

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-2 染色体異常試験結果 (+S9 mix, 実験1)

薬剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間	標本作製時間	S9 mixの有無	相対分裂指数 (%)	倍数性細胞 (%)	構造異常観察細胞数	各染色体異常を有する細胞の頻度 (%)							異常を有する細胞の頻度 (%)		判定
								Gap	染色分体型			染色体型		その他	+Gap	-Gap	
									切断	断片	交換	断片	交換 ^a				
無処理対照		3	24	+	116	1.5	197	3.6	1.0	0.0	1.0	0	0.0	0.0	4.57	2.03	
溶媒対照 (アト)		3	24	+	100	1.0	198	7.0	1.0	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	9.09	2.53	
検体	6.25	3	24	+	101	3.5	193	4.1	1.6	0.0	2.6	0.5	0.0	0.0	7.25	4.15	(+) (+)
	25.00				96	0.5	199	3.0	0.5	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	4.02	1.51	
	50.00				156	0.5	199	8.5	1.5	0.0	5.0	3.0	0.0	1.0	16.08 ^{††}	9.05 ^{††}	
陽性対照 (BP)	25	3	24	+	87	0.5	199	6.0	1.5	0.0	4.5	3.5	0.0	0.0	12.06	9.55 ^{††}	+
無処理対照		3	48	+	73	0.0	200	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.50	0.00	
溶媒対照 (アト)		3	48	+	100	0.0	200	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.00	0.00	
検体	4.375	3	48	+	112	0.0	200	1.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	2.00	0.50	-
	17.500				116	0.0	200	1.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	2.50	1.50	-
	35.000				95	1.0	198	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.03	1.02	-
陽性対照 (CP)	60	3	48	+	74	0.0	200	1.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	2.50	1.50	+

各濃度あたり計 200 個の細胞を観察し、倍数性細胞以外の細胞について構造的染色体異常を観察した
標本作製時間には処理時間を含む

相対分裂指数：溶媒対照の分裂指数 (分裂中期の細胞数/観察細胞数) を 100%として表示

Gap：ギャップ, 交換^a：二動原体および環, +Gap：ギャップを含める, -Gap：ギャップを含めない

BP：ベンズ(a)ピレン, CP：シクロフォスファミド

溶媒対照群に対し, †： $p \leq 0.05$ (ロジットリンクおよび二項誤差構造を用いた一般線形モデルにより解析)

^a：データの不均一性を考慮しないで検定した場合は有意差あり, 考慮して検定した場合はなし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

表-3 染色体異常試験結果 (+S9 mix, 実験 2)

薬 剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処 理 時 間	標 本 作 製 時 間	S9 mix の 有 無	倍 数 性 細 胞 (%)	構 造 異 常 観 察 細 胞 数	各染色体異常を有する細胞の頻度(%)						異常を有する 細胞の頻度(%)		判 定	
							Gap	染色分体型			染色体型		そ の 他	+Gap		-Gap
								切 断	断 片	交 換	断 片	交 換 ^a				
無処理対照		3	24	+	0.0	200	1.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	2.00	0.50	
溶媒対照 (アト)		3	24	+	0.0	200	2.5	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	3.50	1.00	
検 体	6.25	3	24	+	0.0	200	2.0	0.0	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	3.50	1.50 \$	+
	25.00				0.0	200	2.0	0.5	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.50	1.50*\$	
	50.00				0.0	200	4.5	1.0	0.0	5.5	2.0	0.0	0.0	11.50 [†]	7.00*\$	
陽性対照 (BP)	25	3	24	+	0.0	200	4.0	0.0	0.5	10.5	4.0	0.5	0.0	17.00 ^{††}	14.00 ^{††}	+

各濃度あたり計 200 個の細胞を観察し、倍数性細胞以外の細胞について構造的染色体異常を観察した。

標本作製時間には処理時間を含む

相対分裂指数：溶媒対照の分裂指数（分裂中期の細胞数/観察細胞数）を 100%として表示

Gap：ギャップ，交換^a：二動原体および環，+Gap：ギャップを含める，-Gap：ギャップを含めない

BP：ベンズ(a)ピレン

溶媒対照群に対し，[†]： $p \leq 0.05$ ^{††}： $p \leq 0.01$ （ロジットリンクおよび二項誤差構造を用いた一般線形モデルにより解析）

\$：傾向検定の結果，正の用量反応関係有意

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

3) マウスを用いた小核試験

(資料 2-16-③)

試験機関：SITEK Research Laboratories

[GLP 対応]

報告書作成年：1995 年

検体純度：

供試動物： CD-1 マウス，（入荷時 42 日齢，7 日間馴化，用量設定試験投与時体重範囲：雄 25～31 g，雌 21～26 g，小核試験投与時平均体重 23～29 g，雌 19～26 g）
1 群雌雄各 5 匹

試験方法： 検体を 0.5% カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し，400，1000 および 2000 mg/kg の用量で胃ゾンデを用いて単回経口投与した。陰性対照群は媒体である 0.5% カルボキシメチルセルロース水溶液を同様に単回経口投与した。検体投与群および溶媒対照群ともに投与容量は 20 mL/kg とした。陽性対照群はトリエチレンメラミン（TEM）を 1.0 mg/kg の用量，10 mL/kg の容量で単回腹腔内投与した。

投与 24，48 および 72 時間後に動物を二酸化炭素で窒息させて屠殺し，各動物から大腿骨の骨髓を採取して骨髓塗沫標本を作製した。スライド標本はメタノールで固定後，Wright-Giemsa 染色した。陽性対照群は投与 24 時間後に屠殺し，同様に骨髓塗沫標本を作製した。

すべてのスライドにコード番号を付し，ブラインドで観察した。各標本について細胞毒性を調べるために 1000 個の赤血球を観察し，多染性赤血球（PCE）数と正染性赤血球（NCE）数を計数した。さらに，多染性赤血球 2000 個を観察し，小核を有するものの数を計数すると同時に小核を有する正染性赤血球についても計数した。

用量設定根拠：

結果： 骨髓標本の観察結果を表に示した。

検体投与により，体重が 10%低下した動物は認められなかった。

雌雄ともに，検体投与群では，いずれの用量，標本作製時間においても小核を有する多染性赤血球の頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。また，雌雄ともに検体投与群のすべての標本作製時間，すべての用量群で多染性赤血球の割合が溶媒対照に比し減少したことから，検体は標的である骨髓に達し，細胞毒性を示したことが確認された。一方，雌雄ともにトリエチレンメラミンを投与した陽性対照群では小核を有する多染性赤血球の頻度に明らかな増加が認められ，また，多染性赤血球の割合の減少も認められた。よって，本小核試験は有効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株式会社クレハにある。

観察結果

採取時間	性	薬物	投与量 (mg/kg)	観察 動物数	MNPCE % (平均±SD) #	PCE/(PCE+NCE) % (平均値±SD) #
24 時間	雄	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.10±0.05	69.2± 5.4
		検体	400	5	0.04±0.04	59.5± 3.7
			1000	5	0.09±0.04	64.4±10.1
			2000	5	0.10±0.06	53.4± 7.6
	陽性対照 (TEM)	1.0	5	6.66±0.13 *	34.9± 8.0	
	雌	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.07±0.04	65.1± 5.4
		検体	400	5	0.12±0.06	47.4± 5.6
			1000	5	0.03±0.04	49.6±10.9
			2000	5	0.07±0.06	47.9± 9.3
陽性対照 (TEM)	1.0	5	6.56±0.13 *	31.3± 6.2		
48 時間	雄	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.06±0.04	72.5± 2.9
		検体	400	5	0.05±0.04	38.3± 4.6
			1000	5	0.08±0.03	46.8±19.5
	2000	5	0.08±0.03	42.9±17.7		
	雌	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.04±0.02	70.9± 8.1
		検体	400	5	0.02±0.03	55.0± 6.1
			1000	5	0.08±0.04	39.6±13.0
	2000	5	0.05±0.04	47.1± 8.4		
72 時間	雄	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.06±0.07	72.1± 4.7
		検体	400	5	0.03±0.03	28.5±15.8
			1000	5	0.03±0.03	24.5± 9.2
	2000	5	0.04±0.04	57.8±16.1		
	雌	陰性対照 (0.5%CMC)	20 mL/kg	5	0.09±0.04	75.4± 2.2
		検体	400	5	0.05±0.06	38.5±10.9
			1000	5	0.07±0.04	38.7±13.4
2000	5	0.05±0.05	26.5±12.7			

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

CMC:カルボキシメチルセルロース，TEM：トリエチレンメラミン

検体投与群の MNPCE 頻度を溶媒対照の値と Student の t-検定を用いて比較した（検体投与群の各用量の平均値が溶媒対照の平均値以下である場合は実施しなかった）。*； $p \leq 0.05$

#（平均±SD）：申請者が計算

結論： 以上の結果より，本試験条件下において，検体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株式会社クレハにある。

4) ラットの初代培養肝細胞を用いた in vivo 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (資料 2-16-④)

試験機関：SITEK Research Laboratories

[GLP 対応]

報告書作成年：1995 年

検体純度：

試験方法： 検体を in vivo で投与したラットから調製した初代培養肝細胞における不定期 DNA 合成誘発能をオートラジオグラフィ測定法により検索した。検体は 0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁した。用量設定試験の結果に基づき、雄 Sprague-Dawley ラット(体重 125～150 g) に 400, 1000 および 2000 mg/kg の検体溶液および溶媒対照として溶媒を経口投与し、投与 4 時間および 16 時間後に屠殺して肝細胞を採取した。各肝細胞採取時間ならびに各用量あたり 3 匹のラットを用いた。陽性対照として 4 時間後肝細胞採取群はメチルメタンスルフォネートを 100 mg/kg の用量で屠殺 2 時間前に、16 時間後肝細胞採取群は 2-アセチルアミノフルオレンを 50 mg/kg の用量で屠殺 18 時間前に経口投与した。投与容量は検体投与群および溶媒対照群は 20 mL/kg (ただし 1000 mg/kg のみ 10 mL/kg)、陽性対照群は 10 mL/kg とした。屠殺後、Williams および Bradlaw の方法の改良法に従い、肝臓を灌流し、肝細胞を分離した。トリパンプルー排除法により生細胞を計数し、約 5×10^5 個の生細胞をカバーグラスを入れた培養用プレートに播種した。各ラットにつき 3 枚のプレートを用いた。約 2 時間培養後、初代培養肝細胞を洗い、 ^3H -チミジンを最終濃度 10 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ で加えた血清を含まない培地に再播種した。18 時間培養後、オートラジオグラフィにより ^3H -チミジンの取り込みを測定した。各ラットにつき無作為に (正常な形態を示す細胞についてのみ) 選択した 150 個の核 (および核の大きさに相当する核に近接した 3 箇所の細胞質) グレイン数をコロニーカウンターで計数した。さらに、各動物につき無作為に 1500 個の核を観察し、S 期合成期核 (複製 DNA 合成中の核) の割合を求めた。平均細胞核グレイン数から核の大きさに相当する核に近接した 3 箇所の細胞質グレイン数の平均を引いて、正味の核グレイン数を求め、各処理群の平均および標準偏差ならびに正味核グレイン数が 5 個以上の細胞の割合について求めた。

次の基準が満たされる場合、当該試験は有効であると判断した：溶媒対照の正味核グレイン数が 1 以下であり、正味核グレイン数が 5 個以上の細胞の割合が 20%未満。陽性対照群において計数した細胞の少なくとも 30%が 5 個以上の正味核グレインを有し、また細胞あたりの正味核グレイン数が 5 個以上。溶媒対照の動物における S 期合成期核の割合が 0.2%以上。

平均正味核グレイン数が溶媒対照に比し少なくとも 5 個増加した場合、あるいは計数した細胞の 25%以上が 5 個以上の正味核グレインを有する場合に各用量における結果を有意であると判断した。試験結果の判定は、少なくとも 1 用量で平均正味核グレイン数の有意な増加が認められ用量相関性を伴う場合、ならびに用量相関性は欠くが、平均正味核グレイン数の有意な上昇が連続した 2 用量で認められる場合は陽性と判定した。いかなる用量においても正味核グレイン数に有意な上昇が認められない場合は陰性であると判定した。

用量設定根拠：

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果： 結果を表に示した。

UDS 試験の結果、検体は何れの肝細胞採取時間およびいかなる用量においても有意な平均正味核グレイン数の上昇を誘発しなかった。また、試験の有効性基準はすべて満たされた。検体処理群および溶媒対照群の S 期合成期核の割合は 0.2%以上であったため、UDS 試験の陰性結果は DNA 合成の抑制によるものではないことが示された。

以上の結果より、検体は本試験条件下では、検体投与ラットの初代培養肝細胞を用いた in vivo 不定期 DNA 合成試験において陰性であると結論された。

表 UDS 試験成績

薬剤	濃度 (mg/kg)	肝細胞 採取時間	動物 数	計数 核数	正味核グレイン数 平均±標準偏差	正味核グレイン数が5個 以上の細胞の割合	S 期合成期 核の割合
溶媒対照 (0.5%CMC)	20 μL/mL	4	3	450	-1.90 ± 0.58	1.56%	0.45%
検体	400	4	3	450	-2.00 ± 0.80	2.00%	0.78%
	1000	4	3	450	-1.69 ± 0.61	1.33%	0.54%
	2000	4	3	450	-1.48 ± 0.31	1.33%	0.89%
陽性対照 MMS	100	2	3	450	14.05 ± 1.47	97.56%	0.69%
溶媒対照 (0.5%CMC)	20 μL/mL	16	3	450	-1.81 ± 0.23	1.11%	1.00%
検体	400	16	3	450	-2.33 ± 0.50	1.33%	1.89%
	1000	16	3	450	-2.32 ± 0.48	1.33%	1.22%
	2000	16	3	450	-1.76 ± 0.40	2.22%	0.98%
陽性対照 2 AAF	50	18	3	450	11.7 ± 0.14	96.22%	1.02%

CMC ; カルボキシメチルセルロース, MMS ; メチルメタンサルフォネート
2AAF ; 2-アセチルアミノフルオレン

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

VIII.1.10. 生体機能への影響に関する試験

メトコナゾールにおける薬理試験

(資料 2-17)

試験機関：株式会社環境バイリス研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：2002 年

検体の純度：

中枢神経系に対する作用

マウスにおける一般状態

供試動物：ICR系マウス (Crj:CD-1, SPF), 5週齢(試験開始時), 体重 雄 23.8~26.9 g, 雌 21.1~24.0 g, 1群雌雄各3匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し, 0, 128, 320, 800 および 2000 mg/kg を単回経口投与し, 一般状態を観察した(投与前, 投与 1, 3, 6, 24 時間後)。なお, 用量設定は

結果：

投与量(mg/kg)	結果	24 時間後の体重
128	影響無し	増加
320	警戒性, 受動性及び正向反射の低下, 歩行失調・・・24 時間後に回復	増加
800, 2000	警戒性及び受動性の低下, 異常姿勢, 歩行失調あるいは歩行不能, 刺激に対する各種反応・反射機能の低下, 筋緊張度低下, 呼吸数減少, 体温低下等	体重減少

ラットにおける一般状態

供試動物：SD系ラット (Crj:CD, SPF), 4~5週齢(試験開始時), 体重 雄 100.0~110.2 g, 1群雄5匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し, 0, 128, 320, 800 および 2000 mg/kg を単回経口投与し, 一般状態を観察した(投与前, 投与 1, 3, 6, 24 時間後)。なお, 用量設定は

結果：

投与量(mg/kg)	結果	24 時間後の体重
128	影響無し	増加
320	正向反射の低下, 尿失禁・・・24 時間後に回復	増加
800, 2000	警戒性及び受動性の低下, 異常姿勢, 歩行失調あるいは歩行不能, 刺激に対する各種反応・反射機能の低下, 筋緊張度低下, 呼吸数減少, 自発運動の減少等	体重減少

800 mg/kg 群の 1 例および 2000 mg/kg 群の 4 例が, 投与 24 時間後に瀕死状態に陥った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。
着地開脚幅 (mm)

投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間 (時間)			
		1	3	6	24
0	49.6	50.7 (103.0)	47.4 (96.0)	46.1 (93.6)	53.9 (109.2)
128	48.7	47.1 (98.3)	50.5 (105.1)	54.2 (117.7)	48.3 (98.1)
320	39.7	46.6 (118.9)	42.9 (109.9)	42.8 (106.5)	44.9 (113.9)
800	58.3	59.0 (99.5)	55.1 (93.4)	50.6 (85.8)	35.3 (62.6↓)
2000	65.8	60.1 (96.3)	47.4 (73.6)	45.0 (68.7)	25.0↓ (38.8↓)

(下段の数値) は投与前の値に対するパーセンテージ

Dunnett 検定 ↓ p<0.01

800 及び 2000 mg/kg 群において、投与 24 時間後の着地開脚幅に有意な低下が認められた。

マウスの hexobarbital 誘発睡眠に対する作用

供試動物：ICR 系マウス (Crj:CD-1, SPF), 5 週齢 (試験開始時), 体重 雄 24.1~27.6 g,
1 群雄 8 匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し、0, 0.3, 1, 3 および 10 mg/kg を単回経口投与し、1 時間後に hexobarbital 80 mg/kg を腹腔内投与した。Hexobarbital 投与後睡眠導入時間と睡眠時間を測定した。なお、投与量の設定は、

結果：

投与量 (mg/kg)	睡眠時間 (分)
0	36
0.3	38
1	45
3	86↑
10	108↑

Dunnett 検定 ↑ p<0.01

0.3 及び 1 mg/kg 投与群では対照群と比較し hexobarbital 誘発睡眠時間の延長は認められなかった。3 及び 10 mg/kg 投与群では有意な延長が認められた。

ラットの体温に関する作用 (一般状態と同じラット使用)

供試動物、投与方法等はラットにおける一般状態を参照。投与前、投与 1, 3, 6 及び 24 時間後に直腸温を測定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果：体温 (°C)

投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間 (時間)			
		1	3	6	24
0	38.0	38.3 (100.8)	38.2 (100.6)	38.2 (100.6)	37.6 (98.9)
128	37.5	37.9 (100.9)	37.9 (101.1)	37.5 (99.9)	37.6 (100.2)
320	37.5	38.0 (101.4)	37.3 (99.5)	37.2 (99.2)	37.8 (100.9)
800	38.0	36.5↓ (96.1↓)	35.5↓ (93.6↓)	33.1↓ (87.2↓)	34.0 (89.4)
2000	37.5	35.2↓ (94.0↓)	33.1↓ (88.3↓)	29.6↓ (78.8↓)	27.9↓ (74.4↓)

(下段の数値) は投与前の値に対するパーセンテージ

Dunnett 検定 ↓ p<0.01

128 及び 320 mg/kg 投与群は投与による影響がみられなかった。

800 及び 2000 mg/kg 投与群は投与後 1 時間から体温の有意な低下が認められた。

循環器系に対する作用

ラットの血圧, 心拍数に対する作用

供試動物：SD 系ラット (Crij:CD, SPF), 5~7 週齢 (試験開始時), 体重 雄 142.5~208.1 g,
1 群雄 5 匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し, 0, 128, 320, 800 および 2000 mg/kg を単回経口投与し,
tail-cuff 法で無麻酔下の収縮期血圧及び心拍数を測定した (投与前, 投与 1, 3, 6 時間後)。
なお, 用量設定は一般症状観察と同じとした。

結果：

検査項目	投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間 (時間)		
			1	3	6
血圧 (mmHg)	0	126	125 (98.8)	124 (98.3)	129 (102.3)
	128	132	127 (96.7)	122 (92.9)	123 (93.7)
	320	130	127 (97.7)	115 (87.9↓)	105↓ (80.7↓)
	800	131	120 (91.2)	114 (87.2↓)	104↓ (79.6↓)
	2000	127	118 (93.3)	108↓ (85.3↓)	97↓ (76.5↓)
心拍数 (beat/min)	0	402	400 (99.4)	400 (99.4)	386 (95.8)
	128	398	384 (96.8)	374 (94.6)	383 (96.8)
	320	382	373 (98.1)	325↓ (85.4)	297↓ (78.1↓)
	800	396	316↓ (80.6↓)	278↓ (71.5↓)	251↓ (64.9↓)
	2000	406	330↓ (81.2↓)	251↓ (61.8↓)	211↓ (51.9↓)

(下段の数値) は投与前の値に対するパーセンテージ, Dunnett 検定 ↓ p<0.05, ↓ p<0.01

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

128 mg/kg 投与群では血圧及び心拍数ともに影響がなかった。320 mg/kg 以上の投与群では、血圧が投与後3時間から有意な低下を示し、心拍数も投与後1ないし3時間から有意な低下を示した。

自律神経系に対する作用

ラットの瞳孔径に対する作用（一般状態と同じラット使用）

供試動物、投与方法等はラットにおける一般状態を参照。投与前、投与1, 3, 6及び24時間後にミニマスタールーペで瞳孔径を測定した。

結果：瞳孔径 (mm)

投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間 (時間)			
		1	3	6	24
0	0.52	0.52 (100)	0.48 (92.7)	0.56 (108.0)	0.56 (108.0)
128	0.54	0.52 (96.7)	0.46 (85.3)	0.54 (100.7)	0.56 (104.7)
320	0.60	0.54 (90.5)	0.56 (93.8)	0.58 (97.1)	0.58 (96.7)
800	0.50	0.54 (109.0)	0.60 (122.7)	1.04↑ (209.3↑)	0.64 (129.0)
2000	0.54	0.64 (120.0)	0.94↑ (179.3↑)	1.40↑ (264.0↑)	0.54 (100.0)

(下段の数値)は投与前の値に対するパーセンテージ

Dunnett 検定 ↑ p<0.05, ↑↑ p<0.01

128及び320 mg/kg 投与群では投与による影響がなかった。800 mg/kg 以上では投与後3ないし6時間で有意な瞳孔径の拡大が認められたが、24時間後には800 mg/kg の1例を除いて回復した。

消化器系に対する作用

マウスの小腸炭末輸送能に対する作用

供試動物：ICR系マウス (Crj:CD-1, SPF), 5週齢(試験開始時), 体重 雄 27.6~31.9 g,
1群雄8匹

投与方法：検体をコーンオイルに懸濁し, 0, 128, 320, 800 および 2000 mg/kg を単回経口投与し, 1時間後に5%活性炭末懸濁液を経口投与した。炭末投与30分後にマウスを屠殺し腸管を摘出し, 胃幽門部から盲腸開口部間の距離及び炭末の最長到達距離を測定した。なお, 投与量の設定は,

結果：128及び320 mg/kg 投与群では, 対照群と比較し小腸炭末輸送能に影響は認められなかった。800及び2000 mg/kg では炭末移行率の軽度の低下が見られたが有意差は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

骨格筋に対する作用

ラットの握力に対する作用（一般状態と同じラット使用）

供試動物、投与方法等はラットにおける一般状態を参照。投与前、投与1, 3, 6及び24時間後に前肢及び後肢の圧力を測定した。

結果：

検査項目	投与量 (mg/kg)	投与前	投与後時間 (時間)			
			1	3	6	24
前肢 (kgf)	0	0.385	0.396 (104.1)	0.351 (93.9)	0.375 (101.4)	0.460 (123.7)
	128	0.358	0.468 (132.5)	0.456 (130.3)	0.434 (123.9)	0.479 (136.6)
	320	0.301	0.387 (140.6)	0.381 (138.6)	0.366 (133.1)	0.467 (164.4)
	800	0.338	0.317 (97.8)	0.280 (88.6)	0.277 (88.9)	0.237↓ (88.2)
	2000	0.362	0.292 (84.8)	0.237 (72.7)	0.163 (47.6)	0.058↓ (17.5↓)
後肢 (kgf)	0	0.098	0.134 (133.9)	0.146 (147.3)	0.125 (126.1)	0.138 (143.3)
	128	0.115	0.107 (94.1)	0.099 (88.1)	0.111 (99.9)	0.129 (113.8)
	320	0.136	0.099 (77.5)	0.120 (93.5)	0.125 (98.5)	0.133 (103.9)
	800	0.133	0.094 (95.1)	0.100 (90.5)	0.081 (87.7)	0.100 (83.3↓)
	2000	0.110	0.101 (99.8)	0.123 (128.7)	0.058↓ (55.7)	0.051↓ (52.5↓)

(下段の数値)は投与前の値に対するパーセンテージ

Dunnett 検定 ↓ p<0.05, ↓↓ p<0.01

128及び320 mg/kg 投与群では、有意な影響は認められなかった。800 mg/kg では、投与24時間後に前後肢の握力の有意な低下が認められた。2000 mg/kg では、投与6時間後に後肢の握力の低下が、24時間後には前後肢に有意な握力の低下が認められた。

腎機能に対する作用

ラットの尿量、尿中電解質排泄量、浸透圧、pH、潜血、蛋白質、ケトン体及びグルコースに対する作用

供試動物：SD系ラット (Crj:CD, SPF), 6週齢(試験開始時), 体重 雄 177.2~199.1 g,
1群雄5匹

投与方法：ラットを強制排尿させた後、検体をコーンオイルに懸濁し、0, 51.2, 128, 320, 800および2000 mg/kgを単回経口投与し、その直後と30分後に生理食塩液2.5 mL/100g体重の割合で経口負荷した。最初の生理食塩液負荷直後1匹ずつ採尿ケージに入れ、投与後6時間まで尿を採取し、上記項目を測定した。なお、用量設定は

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

結果：

投与量 (mg/kg)	尿量 (mL/100g/6hr)	K ⁺ 排泄量 (μ Eq/100g/6hr)	Na/K 比 (μ Eq/100g/6hr)
0	2.3	73	4.81
51.2	2.5	70	5.92
128	3.2	83	4.89
320	3.4 \uparrow	103	4.92
800	3.6 \uparrow	109	5.25
2000	1.3	27 \downarrow	10.97 \uparrow

Dunnett 検定 $\uparrow\downarrow$ $p<0.05$, \uparrow $p<0.01$

128 mg/kg までは、腎機能への影響は認められなかった。800 mg/kg 以上では、尿 pH が中性～アルカリ性の個体が散見され、尿糖陽性例と尿蛋白出現例数が増加し腎機能への影響が認められた。なお、320～800 mg/kg で用量に依存した尿量の増加が認められた。2000 mg/kg 群では K⁺排泄量の有意な減少と Na/K 比の有意な増加が認められた。

以上の試験結果より、本剤は 3 mg/kg で肝臓の代謝酵素阻害に起因すると考えられる hexobarbital 誘発睡眠時間延長が認められた。その他の生体機能に対する影響は、投与 24 時間後に回復する一過性の変化が 320 mg/kg で、さらに重篤な変化は死亡を生じる用量である 800 及び 2000 mg/kg で認められたが、これらの変化は全身状態の悪化をもたらした非特異的な反応と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

メトコナゾールの「生体機能への影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数/ 群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 一般状態 [Irwin 法]	マウス	経口 (コーオイル)	0, 128, 320, 800, 2000	雄 3 雌 3	320	128	警戒性, 受動性 及び正向反射の 低下, 歩行失調
	ラット	経口 (コーオイル)	0, 128, 320, 800, 2000	雄 5	320	128	正向反射の低 下, 警戒性, 受 動性の低下, 歩 行失調
中枢神経系 体温	ラット	一般状態と同じ動物使用			800	320	体温の低下
中枢神経系 hexobarbital 誘発睡眠	マウス	経口 (コーオイル)	0, 0.3, 1, 3, 10	雄 8	3	1	睡眠延長
循環器系 血圧・心拍数	ラット	経口 (コーオイル)	0, 128, 320, 800, 2000	雄 5	320	128	血圧及び心拍数 ともに低下
自律神経系 瞳孔径	ラット	経口 (コーオイル)	一般状態と同じ動物使用		800	320	瞳孔径の拡大 1例を除き24時 間で回復
消化器系 小腸炭末輸送 能	マウス	経口 (コーオイル)	0, 128, 320, 800, 2000	雄 8	—	2000	800 mg/kg 以上 で炭末移行率の 低下が見られた 有意差なし
骨格筋 握力	ラット	経口 (コーオイル)	一般状態と同じ動物使用		800	320	前後肢握力の 低下
腎機能	ラット	経口 (コーオイル)	0, 51.2, 128, 320, 800, 2000	雄 5	320	128	尿 pH の中性～ アルカリ性, 尿 糖陽性, 尿蛋白 出現の増加

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

VIII.1.11. その他

- 1) ラットの妊娠後期における血清中ステロイドホルモン濃度及び肝臓薬物代謝酵素含量の測定

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

以上の結果から、本剤を 750ppm (43.0 mg/kg/日) の濃度で雌ラットに投与すると、主として妊娠 19 日及び 21 日における E/P 比の上昇が抑制されるため、分娩の発来遅延や娩出困難が引き起こされ、妊娠期間の延長と一部の雌に分娩時死亡が発現したと結論される。この E/P 比の上昇抑制には、少なくとも肝臓のミクロソーム CYP3A2 含量が著しく増加したことによる 17β-エストラジオールの過度の代謝促進と黄体細胞の増殖活性が持続したことによるプロジェステロン産生の長期化が関連していると推察される。本剤は、150ppm(8.89 mg/kg/日)の濃度でミクロソーム蛋白含量とチトクローム P-450 含量を増加させる可能性があるが、E/P 比の上昇に悪影響を及ぼすことはなく無毒性量と考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。
表 2 検査結果の概要

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

2) カニクイザルにおける 13 週間反復経口投与眼毒性試験

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

以上の結果から、イヌの亜急性毒性試験および慢性毒性試験でみられた眼の水晶体の異常は、カニクイザルでは認められず、イヌに特有な症状と判断される。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

3) マウスを用いた肝薬物代謝酵素誘導，細胞増殖及び活性酸素産生能試験 (資料 2-32)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社クレハにある。

以上の結果より、本検体はフェノバルビタールに類似した肝薬物代謝酵素誘導剤であり、また、細胞分裂促進作用のある既知の非変異原性肝発癌物質 nongenotoxic-mitogenic hepatocarcinogen と同様な細胞増殖能(mitogenic activity)を有することが示唆された。加えて、酸化ストレスを介しての細胞障害性も併せ持つことが示唆された。なお、本試験における無毒性量 no-observed-adverse-effect level (NOAEL) は 30ppm (4.49 mg/kg/日) であると判断され、本剤の肝薬物代謝酵素誘導、細胞増殖および酸化ストレスを介しての細胞障害作用にはそれぞれ閾値があることが確認された。