

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エス・ディー・エス バイオテックにある。

7. 変異原性

(1) 遺伝子突然変異原性

(資料 7-1)

細菌を用いた復帰変異試験

試験機関:ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年:1997年

検体の純度:

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* 4 株 (TA1535、TA1537、TA98、TA100 株) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) 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。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、予備 (用量設定) 試験の結果、5000 µg/プレート の用量で検体の析出が認められたが、いずれの試験菌株に対しても抗菌性が認められないことから 5000 µg/プレートを最高用量とした。

試験濃度は 312.5~5000 µg/プレートの範囲で 5 用量とし、各用量 3 枚のプレートをを用いて試験を行い、2 回実施した。

試験結果 : 結果を次頁に示した。

用量設定試験及び本試験において、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 µg/プレート) においても、いずれの菌株で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 *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン、9-アミノアクリジン及び 2-ニトロフルオレンでは S-9 Mix の非存在下で、2-アミノアントラセンでは S-9 Mix の存在下で対照と比較して明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果から、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。

復帰変異試験成績

第1回目試験

(表中の数値は3プレートの平均値)

S-9 Mix の有無	用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		復帰変異コロニー数/プレート				
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
-	対照	DMSO	138	13	78	26	12
	検体	0	128	16	74	25	10
		312.5	134	11	68	25	6
		625	125	13	76	27	5
		1250	107	12	80	23	8
		2500	123 #	15 #	68 #	25 #	9 #
		5000	115 #	13 #	62 #	23 #	11 #
	陽性 対照	名称	ENNG ^{a)}	ENNG ^{a)}	ENNG ^{a)}	NF ^{b)}	9 AC ^{c)}
		$\mu\text{g}/\text{plate}$	3.0	5.0	2.0	1.0	80.0
		コロニ-数/plate	648	610	1004	519	多数
+	対照	DMSO	140	16	73	24	12
	検体	0	126	13	72	27	12
		312.5	135	11	68	24	11
		625	119	13	71	24	9
		1250	110	11	79	25	10
		2500	133 #	11 #	65 #	26 #	9 #
		5000	116 #	13 #	70 #	23 #	12 #
	陽性 対照	名称	AA ^{d)}	AA ^{d)}	AA ^{d)}	AA ^{d)}	AA ^{d)}
		$\mu\text{g}/\text{plate}$	1.0	2.0	10.0	0.5	2.0
		コロニ-数/plate	752	259	471	516	86

第2回目試験

(表中の数値は3プレートの平均値)

S-9 Mix の有無	用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		復帰変異コロニー/プレート				
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
-	対照	DMSO	114	15	50	24	9
	検体	0	120	17	57	23	11
		312.5	112	17	51	21	7
		625	110	14	55	24	5
		1250	109	10	53	21	7
		2500	112 #	13 #	47 #	19 #	10 #
		5000	102 #	12 #	53 #	20 #	9 #
	陽性 対照	名称	ENNG ^{a)}	ENNG ^{a)}	ENNG ^{a)}	NF ^{b)}	9 AC ^{c)}
		$\mu\text{g}/\text{plate}$	3.0	5.0	2.0	1.0	80.0
		コロニ-数/plate	319	126	576	155	多数
+	対照	DMSO	111	14	63	29	13
	検体	0	116	19	68	30	11
		312.5	110	16	68	21	9
		625	109	14	57	27	9
		1250	116	15	64	28	8
		2500	111 #	14 #	51 #	20 #	10 #
		5000	103 #	13 #	65 #	24 #	10 #
	陽性 対照	名称	AA ^{d)}	AA ^{d)}	AA ^{d)}	AA ^{d)}	AA ^{d)}
		$\mu\text{g}/\text{plate}$	1.0	2.0	10.0	0.5	2.0
		コロニ-数/plate	628	197	485	195	88

: 検体の析出が認められた

b) : 2-ニトロフルオレン

a) : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

c) : 9-アミノアクリジン

d) : 2-アミノアントラセン

(2) 染色体異常誘発性

(資料 7-2)

ヒト培養リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

試験機関：ライフ サイエンス リサーチ社

英国 [GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検体の純度：

試験方法： 男性ボランティア(喫煙しない健常者)から静脈採取した血液をヘパリン処理したものの 0.5 ml に、培養培地 9.0 ml 及びフィトヘマグルチン溶液 0.5 ml を加え 37℃で 48 時間培養し、供試細胞(リンパ球)を得た。この細胞を用い、ラット肝由来の代謝活性化系(S-9 Mix)の非存在下及び存在下で、染色体異常誘発性を検定した。検体の処理時間は S-9 Mix の非存在下及び存在下で、それぞれ 24 時間及び 3 時間とした。

検体は DMSO に溶解して用いた。

用量設定のために実施した予備試験(有糸分裂指数検査)の結果より、第一回目の本試験は、S-9 Mix の非存在下及び存在下とも 200、1000 及び 5000 µg/ml としたが、細胞の染色に影響する沈殿が 1000 及び 5000 µg/ml 処理で認められ、5000 µg/ml 処理は検査不能であった。そのため第二回目の本試験を行い、用量は S-9 Mix の非存在下及び存在下ともに 40、200 及び 1000 µg/ml の処理で行い、各用量 3 反復で試験した。検査は、はじめに各培養液から約 1000 個のリンパ球を観察し有糸分裂指数を計数し、その後、各培養液の 100 個の中期分裂像について染色体を観察した。

試験結果： 結果を次頁に示した。

S-9 Mix 存在下の 1000 µg/ml 処理において、有糸分裂指数が溶媒対照の値と比較し 52 %の低下が認められたが、その他の用量及びは S-9 Mix 非存在下の処理は溶媒対照と同等であった。S-9 Mix の有無に関わらず 1000 µg/ml 処理において、細胞の染色に影響して、中期分裂像の細胞の多くは観察できなかった。

ギャップを含めた場合及び除外した場合の染色体異常の発現頻度は、S-9 Mix の非存在下及び存在下の各用量において、溶媒対照の発現頻度と同程度であった。

一方、S-9 Mix 非存在下の陽性対照として用いたクロラムブシルあるいは S-9 Mix 存在下の陽性対照として用いたシクロホスファミドでは、顕著な染色体異常が観察された。

以上の結果から、検体は本試験条件下で、代謝活性化系の有無にかかわらずヒト培養リンパ球において染色体異常誘発性を有さないものと判断される。

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エス・ディー・エス バイオテックにある。

染色体異常試験結果

薬物	S-9 Mixの有無	処理濃度 (µg/ml)	観察細胞数	倍數性細胞		染色体構造異常細胞の出現數と出現頻度 (%)										判定
				出現數及び出現頻度 (%)	判定	ギャップ		染色分体型		染色体型		その他		合計		
						gap	Ctb	Cte	csb	cse	o	TA	TAG			
陰性対照 (DMSO)		-	300	0 (0.0)	-	7 (2.3)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.7)	3 (1.0)	10 (3.3)	-
検体		40	300	1 (0.3)	-	5 (1.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.7)	2 (0.7)	7 (2.3)	-
		200	300	2 (0.7)	-	2 (0.7)	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 (0.7)	-
		1000	300	4 (1.3)	-	2 (0.7)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	3 (1.0)	-
陽性対照 Chlram		2	300	3 (1.0)	-	32 (10.7)	77 (25.7)	15 (5.0)	6 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	32 (10.7)	108 (36.0)	124 (41.3)	***	+
陰性対照 (DMSO)		-	300	3 (1.0)	-	4 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.0)	2 (0.0)	6 (0.7)	-
検体		40	300	1 (0.3)	-	3 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.0)	-
		200	300	2 (0.7)	-	3 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)	4 (1.3)	-	
		1000	300	4 (1.3)	-	3 (1.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.0)	4 (1.3)	7 (2.3)	-	
陽性対照 Cyc1op		6	300	1 (0.3)	-	27 (9.0)	62 (20.7)	28 (9.3)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (6.3)	84 (28.0)	100 (33.3)	***	+

検体処理時間: S-9 Mix(-)の場合は24時間、S-9 Mix(+)の場合は3時間(処理後の培養時間は21時間)

備考: ギャップ(gap)には染色分体型と染色体型の両方を含める。TAGにはギャップを含む総異常細胞数、TAにはギャップを除いた総異常細胞数、()内に頻度%を表示する。

ctb; 染色分体切断、cte; 染色分体交換、cse; 染色体切断、csb; 染色体交換、o; 断片化(細粉化は除く)

DMSO; ジメチルスルホキシド、Chloram; クロラムブシル、Cyclo; シクロホスファミド

***: TA及びTAGについて統計処理を実施し、対照群と比較して有意差のあるもの(p<0.001)

(資料 7-3)

マウスにおける *in vivo* 染色体異常試験(小核試験)

試験機関:ハンティンドン リサーチ センター社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年:1989年

検体の純度:

試験動物 : ICR系雌雄マウス、5週齢、体重22~24g、一群雌雄各5匹の計10匹

試験方法 : 検体は1%メチルセルロース水溶液に懸濁し、0、1250、2500及び5000mg/kgの用量で単回経口投与した。投与後24、48及び72時間に全てのマウスから大腿骨を摘出して、牛胎児血清を用いて骨髓細胞を採取し、常法により骨髓標本を作製した。観察は1000個の多染性赤血球数について小核を有する多染性赤血球数を計数し、染色体異常誘発性を検定した。また、骨髓細胞の増殖抑制の指標として、1000個の全赤血球(多染性赤血球数+正染性赤血球)を観察し多染性赤血球数の割合を求めた。

予備試験において、最大耐量を確認する目的で500~6000mg/kgの範囲で5用量を単回経口投与し、投与後72時間動物を観察した。その結果、軽度の症状変化が認められたことから、本試験の最高用量は5000mg/kgとし、以下2で除した2500及び1250mg/kgの用量を設定し、骨髓採取時期は投与後24、48及び72時間とした。陽性対照としてマイトマイシンC(12mg/kg)を投与し、投与後24時間に骨髓標本を作製した。

試験結果 : 結果を次頁に示した。

各検体投与群のすべての観察時間において、小核を有する多染性赤血球の群平均出現頻度は0.04~0.13%であり、溶媒対照群との間に有意な差は認められなかった。2500mg/kg投与群の投与後48時間における、多染性赤血球と正染性赤血球の割合(p/n)が0.756であり、溶媒対照群の1.286との間に有意な差が認められた。なお、一般状態の異常は、5000mg/kg投与群のみに軽度の立毛及び円背位が認められた。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシンCでは、投与後24時間の観察で小核を有する多染性赤血球が有意に増加した。

以上の結果、検体投与による小核を有する多染性赤血球の出現頻度は、軽度の症状変化が認められる5000mg/kgにおいても溶媒対照群と同程度であることから、本試験条件下で、検体はマウス赤芽球に対する染色体異常誘発性を有しないものと判断される。

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エス・ディー・エス バイオテックにある。

小核試験成績

用量 (mg/kg)	投与後 時間 (hr)	性別	例数	p/n ^a		mnp (%) ^b		
				平均±標準偏差	最小値-最大値	総数 ^c	平均±標準偏差	最小値-最大値
溶媒 対照 ^d	24	♂	5	1.082±0.654	0.495-1.892	3	0.06±0.09	0.0-0.2
		♀	5	0.678±0.282	0.429-1.148	3	0.06±0.13	0.0-0.3
		♂+♀	10	0.880±0.521	0.429-1.892	6	0.06±0.11	0.0-0.3
1250		♂	5	1.118±0.364	0.805-1.748	3	0.06±0.05	0.0-0.1
		♀	5	0.844±0.151	0.651-1.018	8	0.16±0.13	0.0-0.3
		♂+♀	10	0.981±0.300	0.651-1.748	11	0.11±0.11	0.0-0.3
2500		♂	5	1.308±0.690	0.713-2.419	7	0.14±0.17	0.0-0.4
		♀	5	0.920±0.336	0.568-1.442	0	0.00±0.00	0.0-0.0
		♂+♀	10	1.114±0.551	0.568-2.419	7	0.07±0.13	0.0-0.4
5000		♂	5	1.301±0.415	0.876-1.971	3	0.06±0.05	0.0-0.1
	♀	5	0.813±0.429	0.439-1.459	4	0.08±0.04	0.0-0.1	
	♂+♀	10	1.057±0.474	0.439-1.971	7	0.07±0.05	0.0-0.1	
陽性 対照 ^e	♂	5	0.517±0.144	0.307-0.662	301	6.02±1.24	5.2-8.2	
	♀	5	0.408±0.265	0.090-0.807	217	4.34±2.16	1.7-6.6	
	♂+♀	10	0.462 [#] ±0.209	0.090-0.807	518	5.18 [#] ±1.88	1.7-8.2	
溶媒 対照 ^d	48	♂	5	1.736±0.820	0.892-2.748	7	0.14±0.13	0.0-0.3
		♀	5	0.836±0.318	0.555-1.217	3	0.06±0.09	0.0-0.2
		♂+♀	10	1.286±0.754	0.555-2.748	10	0.10±0.12	0.0-0.3
1250		♂	5	1.093±0.459	0.606-1.661	4	0.08±0.13	0.0-0.3
		♀	5	0.901±0.429	0.494-1.410	6	0.12±0.22	0.0-0.5
		♂+♀	10	0.997±0.431	0.494-1.661	10	0.10±0.17	0.0-0.5
2500		♂	5	0.700±0.192	0.472-0.994	7	0.14±0.13	0.0-0.3
		♀	5	0.811±0.267	0.443-1.125	1	0.02±0.04	0.0-0.1
		♂+♀	10	0.756 [*] ±0.227	0.443-1.125	8	0.08±0.11	0.0-0.3
5000		♂	5	1.143±0.401	0.695-1.598	5	0.10±0.14	0.0-0.3
	♀	5	0.947±0.512	0.514-1.745	8	0.16±0.11	0.0-0.3	
	♂+♀	10	1.045±0.446	0.514-1.745	13	0.13±0.13	0.0-0.3	
溶媒 対照 ^d	72	♂	5	1.623±0.416	1.100-2.142	9	0.18±0.16	0.0-0.4
		♀	5	0.928±0.206	0.699-1.253	0	0.00±0.00	0.0-0.0
		♂+♀	10	1.276±0.479	0.699-2.142	9	0.09±0.14	0.0-0.4
1250		♂	5	1.331±0.840	0.431-2.215	1	0.02±0.04	0.0-0.1
		♀	5	0.962±0.407	0.504-1.432	7	0.14±0.09	0.0-0.3
		♂+♀	10	1.147±0.652	0.431-2.215	8	0.08±0.09	0.0-0.3
2500		♂	5	1.654±0.561	0.909-2.252	3	0.06±0.09	0.0-0.2
		♀	5	1.268±0.515	0.833-1.951	1	0.02±0.04	0.0-0.1
		♂+♀	10	1.461±0.547	0.833-2.252	4	0.04±0.07	0.0-0.2
5000		♂	5	0.963±0.519	0.479-1.837	8	0.16±0.19	0.0-0.5
	♀	5	1.046±0.583	0.283-1.679	3	0.06±0.05	0.0-0.1	
	♂+♀	10	1.004±0.522	0.283-1.837	11	0.11±0.14	0.0-0.5	

^a: p/n=多染性赤血球数/正染性赤血球数

^b: mnp=小核を有する多染性赤血球数/多染性赤血球数×100

^c: 観察された小核を有する多染性赤血球数の群内総数

^d: 1%メチルセルロース水溶液

^e: マイトマイシンC (12 mg/kg)

*: Kruskal-Wallis の検定で溶媒対照群と有意差あり (P<0.05)

[#], ^{**}: Wilcoxon の順位和検定で溶媒対照群と有意差あり (それぞれ 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エス・ディー・エス バイオテックにある。

8. 生体の機能に及ぼす影響

(資料 8-1)

(1) Irwin 法を用いた一般状態観察

試験機関:ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年:2000 年

検体の純度:

供試動物 : ICR 系雄マウス、約 6 週齢、体重:22~26 g、一群 4 匹合計 16 匹

方 法 : 投与前一晩絶食させたマウスに 0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁させた検体を 0、500、1000 及び 2000 mg/kg(投与液量 10 ml/kg)で経口投与した。投与後 30、90、150、300 分及び 24 時間に、一般状態を詳細に観察した。また、投与後 7 日目まで、毎日死亡率及び肉眼的中毒症状を観察した。投与後 7 日目にマウスを頸椎脱臼により屠殺した。

結 果 : いずれの用量においてもマウスに対して、一般状態の変化及び生理学的変化を誘発しなかった。また、7 日間の観察期間中に死亡は認められなかった。

(資料 8-2)

(2) ヘキソバルピタール睡眠に及ぼす影響

試験機関:ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年:2000年

検体の純度:

供試動物 : ICR系マウス、約6週齢、体重:18~24g、一群雌雄各5匹

方 法 : 投与前一晩絶食させたマウスに0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁させた検体を0、500、1000及び2000mg/kg(投与液量10ml/kg)で経口投与し、45分後にヘキソバルピタールNa塩(100mg/kg)を腹腔内投与した。正向反射の喪失及び回復により睡眠継続時間を記録した。正向反射の回復時にマウスを頸椎脱臼により屠殺した。

結 果 :

群	用量(mg/kg)	平均睡眠時間(分±標準偏差)		
		雄	雌	雌雄合算
1 溶媒対照	—	77.7±22.0	50.8±10.6	64.3±21.6
2 検体	500	96.7±15.7	53.2±9.3	74.9±26.0
3 検体	1000	83.8±10.7	60.7±7.9	72.2±15.1
4 検体	2000	83.4±5.7	70.2*±14.8	76.8±12.7
5 陽性対照	15	173.9**±6.58	130.9**±21.8	152.4**±27.3

*, **: 溶媒対照と統計学的有意差あり、それぞれ $p < 0.05$ 、**: $P < 0.01$

溶媒対照:0.5%カルボキシメチルセルロース

陽性対照:塩酸クロルプロマジン

雄はすべての検体投与群において、溶媒対照群と比較して有意な変化は認められなかった。雌は2000mg/kg投与群において、有意な睡眠時間の延長が認められたが、500及び1000mg/kg投与群で有意な差は認められなかった。雌雄合算した比較は、いずれの検体投与群においても有意差は認められなかった。一方、陽性対照群は雌雄とも有意な睡眠時間の延長が認められた。

(資料 8-3)

(3) 循環器および呼吸器系に及ぼす影響

試験機関:ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年: 2000 年

検体の純度:

供試動物 : 雌ビーグル犬、約 10~15 ヲ月齡、体重 8.8~10.4 kg、合計 4 匹

方 法 : 約 16 時間絶食させた動物をチオペンタールナトリウム麻酔下で、麻酔維持のために α -クロラロース/ペントバルビタールナトリウム混合液(1 % α -クロラロース 20ml+Sagatal (60 mg/ml) 1 ml)を用いて試験を行った。検体は 0.5 %カルボキシメチルセルロースに懸濁し、0 及び 2000 mg/kg の用量で十二指腸へ投与した。血圧、心拍数、左心室収縮期血圧、心電図、大腿動脈血流量、大腿動脈抵抗、呼吸数及び呼気量について、投与後 4 時間まで連続的に記録した。

結 果 : 血圧、心拍数、左心室収縮期血圧、心電図、大腿動脈血流量、大腿動脈抵抗、呼吸数及び呼気量のいずれの検査項目においても、検体投与に関連した変動は認められなかった。

(資料 8-4)

(4) 自律神経系に対する影響

試験機関:ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年:2000年

検体の純度:

供試動物 : 雄ネコ、約15~28ヶ月、体重:4.2~5.2 kg、合計4匹

方法 : 約16時間絶食させた動物に約0.8 ml/kgのプロポフォル(10 mg/kg)の静脈内投与で麻酔した。麻酔維持は少量のプロポフォルの静脈内投与またはイソフルランの吸入にて行った。さらに、長期の麻酔維持には α -クロラロースの静脈内投与を用いた。検体は0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、0及び2000 mg/kgの用量で十二指腸内に投与した。

大腿動脈にカニューレを挿入し、血圧及び心拍数を測定した。

適当な長さの綿糸で瞬膜の外側周縁部を等張ひずみゲージに接続した。上頸部交感神経節前神経幹の下に双極電極を取り付けた。Grass 刺激剤隔離ユニットを接続したGrass S88 刺激装置を用い、2.5分ごとに10秒間(50 Hz、パルス幅1 ms)神経を刺激し、瞬膜を4回収縮させた。

両側の頸動脈を頸の基部まで露出させ、電極および神経をできるだけ妨害しないようにクランプで閉塞できるように準備した。クランプによる固定は、血圧が増加して安定状態に達するまで、または最高30秒間のいずれか短い時間にわたって行った。

ノルアドレナリン(1 μ g/kg)を橈側皮静脈に静脈内投与し、0.9%生理食塩水約1 mlで洗い入れた。

瞬膜の電氣的刺激、両側頸動脈の閉塞およびノルアドレナリンの静脈内投与の3つの手順を20分間で行い、この手順を繰り返した。

結果 : 血圧、心拍数、神経節前刺激瞬膜の反応、両側頸動脈閉塞およびノルアドレナリンの静脈内投与に対する血圧および心拍数の反応のいずれの検査項目においても、検体投与に関連した変動は認められなかった。

(資料 8-5)

(5) 小腸輸送能に及ぼす影響(炭末輸送能試験)

試験機関:ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年:2000年

検体の純度:

供試動物 : ICR 系雄マウス、約 4 週齢、体重:19~24 g、一群 10 匹合計 50 匹

方 法 : 投与前一晩絶食させたマウスに検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し 0、500、1000 及び 2000 mg/kg(投与液量 10 ml/kg)で経口投与し、また、陽性対照物質として硫酸モルヒネ 10 mg/kg を経口投与した。投与 45 分後に蒸留水を用いた炭末の 5%懸濁液 0.25 ml を経口投与した。炭末投与 30 分後、頸椎脱臼によりマウスを屠殺し全消化管を摘出した。炭末が幽門括約筋から盲腸間までの移動距離を測定し、全小腸に対する移動率を算出した。

結 果 : 500、1000 及び 2000 mg/kg の投与群すべてにおいて、溶媒投与群に比べて小腸における炭末移動距離に有意な影響は認められなかった。

一方、硫酸モルヒネの 10 mg/kg において、顕著で統計学的に有意な小腸輸送能の低下を示した。

(資料 8-6)

(6) 胃液分泌に及ぼす影響(幽門結紮法)

試験機関:ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]

報告書作成年:2000年

検体の純度:

供試動物 : Wistar 系雄ラット、約7週齢、体重:138~180 g、一群10匹合計50匹

方 法 : 投与前一晩絶食させた動物をイソフルラン麻酔下で幽門結紮を行い、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0,500,1000及び2000 mg/kgの用量で、また、陽性対照物質としてオメプラゾールを10 mg/kgの用量で十二指腸内投与を行った。投与4時間後に動物を頸椎脱臼により屠殺し、食道を縛り胃を摘出し、胃液容量を測定し、胃液の H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 及び Cl^- 濃度を測定した。また、胃の腺胃部粘膜の状態を検査した。

結 果 : 胃液量、胃液の H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 及び Cl^- 濃度、腺胃部粘膜いずれの検査項目においても、検体投与に関連した変動は認められなかった。

一方、オメプラゾールの10 mg/kgにおいて、胃液の H^+ 濃度が有意差は認められないが減少(49%)したが、胃液の K^+ 濃度は有意に増加した。腺胃部粘膜の傷害に対しては影響しなかった。

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エス・ディー・エス バイオテックにある。

(資料 8-7)

(7) 協調運動に及ぼす影響(回転棒試験)

試験機関:ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年:2000年

検体の純度:

供試動物 : ICR 系雌マウス、約 4 週齢、体重:17~22 g、一群 10 匹合計 50 匹

方 法 : マウスは予め回転棒での歩行訓練を投与前 2 日間受けさせた。投与前一晚絶食させたマウスに 0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁させた検体を 0、500、1000 及び 2000 mg/kg、陽性対照物質としてメフェネシンの 400 mg/kg を経口投与した(投与液量 10 ml/kg)。投与後 45 分に、各マウスを回転棒に乗せて連続 3 回の実験を行い、最長の歩行遂行時間を用いて、群平均を算出した。

結 果 : いずれの検体投与群においても歩行遂行時間は対照群と同等であり、協調運動に影響は認められなかった。

一方、陽性対照のメフェネシンは歩行遂行時間を顕著に、かつ統計学的に有意な短縮が認められた。

(資料 8-8)

(8)尿及び電解質排泄に及ぼす影響

試験機関:ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年:2000年

検体の純度:

供試動物 :SD系雄ラット、約6週齢、体重:202~250 g、一群8匹合計40匹

方 法 : 投与前一夜絶食および投与前2時間絶水したラットに、0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁した検体500、1000及び2000 mg/kg、陽性対照物質としてフルセミド20 mg/kgを経口投与した(投与液量25 ml/kg)。その後24時間尿を採取し1、2、3、4、5及び24時間の時点の尿量を記録した。5時間の時点の尿サンプルについて、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- および総蛋白含量の分析を行った。

結 果 : 検体の2000 mg/kg投与群において、投与後0~2時間の尿量が統計学的に有意な減少を示したが、その他の項目に変動は認められなかった。500及び1000 mg/kg投与群は、尿量または尿中電解質および蛋白の排泄に有意な影響は認められなかった。
フルセミドの20 mg/kg投与群において、投与後24時間の測定期間中の尿量に顕著で、統計学的に有意な増加が認められた。この尿量の増加は、顕著で統計学的に有意な尿中電解質排泄の増加を伴っていた。

(資料 8-9)

(9) 溶血作用の評価 (*in vitro* 試験)

試験機関: ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]

報告書作成年: 2000 年

検体の純度:

供試血液 : 3 人の健康な志願者から採取した血液

方 法 : 採取した血液を遠心分離し上清を廃棄した後、生理食塩水 (0.9 % NaCl) で再懸濁し、この操作を 3 回繰り返すことで赤血球を洗浄した。最終的に赤血球の 3 % 懸濁液を作製し試験に供した。生理食塩水を用いて検体液を調製し、赤血球懸濁液と最終濃度 0.1、0.3 及び 1.0 mg/ml となるように、また、陽性対照として蒸留水を用いて混合した。混合したものを 37℃ で 4 時間インキュベーションし、遠心分離後分光光度計を用いて吸光度を 540 nm で測定し、溶血率を算出した。

結 果 : 最高濃度の 1.0 mg/ml は対照群 (生理食塩水) と比較し、非常に弱い溶血作用が認められた。0.1 及び 0.3 mg/ml の濃度では、ヒト赤血球に及ぼす溶血作用は認められなかった。一方、陽性対照 (蒸留水) は強い溶血作用を示した。

(資料 8-10)

(10) 血液凝固に及ぼす影響

試験機関：ハンティンドン ライフ サイエンス社
英国 [GLP 対応]
報告書作成年：2000 年

検体の純度：

供試動物：Wistar 系雄ラット、約 6～7 週齢、体重：155～197 g、一群 12 匹合計 60 匹

方 法：投与前一晚絶食させたラットに 0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁させた検体を 0、500、1000 及び 2000 mg/kg の用量で、また、ワルファリンナトリウム（1日目は 0.5、2-4 日目は 0.25 mg/kg）を、それぞれ 10 ml/kg の一定容量に調整して経口投与した。投与 60 分後、各群 12 匹から尾静脈穿刺により採血し、Dale 及び Laidlaw の方法にしたがって全血凝固時間(WBCT)を測定した。

さらに、イソフルラン浅麻酔下で心臓穿刺により採血した血液試料を 3.2%クエン酸ナトリウムと混合し、Quick、A. J. の方法でプロトロンビン時間(PT)、及び Proctor, R. R. 及び Rapaport, S. I. の方法で活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した。

結 果：いずれの検体投与群においても WBCT、PT 及び APTT は対照群と同等であり、血液凝固系に影響は認められなかった。

一方、陽性対照のワルファリンナトリウムは測定した凝固パラメータに顕著で、統計学的に有意な増加が認められた。

「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/群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
Irwin (マウス)	経口 (0.5 %CMC)	0 500 1000 2000	♂4匹	—	2000	全用量で一般状態に対する影響は認められなかった。
ヘキソバルビ タール睡眠 (マウス)	経口 (0.5 %CMC)	0 500 1000 2000	♂♀各5 匹	2000	1000	雌の2000 mg/kgで睡眠時間の延長が認められた。その他の雌の用量及び雄の全用量で影響は認められなかった。また、2000 mg/kgの雌雄合算値では、対照群と同等であった。
循環器/呼吸器 (ビーグル犬)	十二指腸内 (0.5 %CMC)	0 2000	♀4匹	—	2000	血圧、心拍数、左心室収縮期血圧、心電図、大腿動脈血流量、大腿動脈抵抗、呼吸数、呼気量に、投与に関連した影響は認められなかった。
自律神経系 (ネコ)	十二指腸内 (0.5 %CMC)	0 2000	♂4匹	—	2000	神経節前刺激瞬膜の反応、両側頸動脈閉塞及びリズドレリンの静脈内投与に対する血圧及び心拍数の反応に、投与に関連した影響は認められなかった。
炭末輸送 (マウス)	経口 (0.5 %CMC)	0 500 1000 2000	♂10匹	—	2000	全用量で小腸における炭末移動距離に影響は認められなかった。
胃液分泌 (ラット)	十二指腸内 (0.5 %CMC)	0 500 1000 2000	♂10匹	—	2000	胃液量、胃液のH ⁺ 、Na ⁺ 、K ⁺ 及びCl ⁻ 濃度、腺胃部粘膜の損傷に、投与に関連した影響は認められなかった。
協調運動 (マウス)	経口 (0.5 %CMC)	0 500 1000 2000	♀10匹	—	2000	全用量で歩行遂行時間に対する影響は認められなかった。
尿/電解質排泄 (ラット)	経口 (0.5 %CMC)	0 500 1000 2000	♂8匹	2000	1000	2000 mg/kgにおいて、0~2時間の尿量が有意に減少したが、その他の項目に変動は認められなかった。他の用量で尿量または尿中電解質および蛋白の排泄に影響は認められなかった。
溶血作用 (ヒト血液)	<i>in vitro</i>	0 0.1 0.3 1.0 mg/ml	3人	1.0 mg/ml	0.3 mg/ml	1.0 mg/mlにおいて、非常に弱い溶血作用が認められた。他の濃度では血球に対して影響しなかった。
血液凝固 (ラット)	経口 (0.5 %CMC)	0 500 1000 2000	♂12匹	—	2000	全用量でトロンボプラスチン時間、プロトロン時間、全血凝固時間に影響は認められなかった。

「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総合考察

(株)エス・ディー・エス バイオテック

農薬の主たる暴露経路である経口(あるいはそれに準ずる十二指腸内投与)により、本検体の「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」を実施し、また、血球への直接作用に関して溶血を指標に *in vitro* 試験を実施した。

その結果、詳細な状態観察、循環器・呼吸器系、自律神経系、炭末輸送、胃液分泌、協調運動及び血液凝固への影響は、最高用量 2000 mg/kg の経口あるいは十二指腸内投与において、なんら異常は認められなかった。ヘキサバルピタール睡眠に及ぼす影響試験において、2000 mg/kg 投与群の雌マウスに有意な睡眠時間の延長が認められ、また、尿及び電解質の排泄に及ぼす影響試験において、2000 mg/kg 投与群で投与後 2 時間までの尿量が有意に減少した。しかし、ヘキサバルピタール睡眠における雌雄合算の平均睡眠時間では有意差が認められず、また、尿量は 2 時間以降の検査時期で対照群と同等となり、その他の項目に変動は認められなかった。血球への直接作用に関する試験において、最終濃度 1.0 mg/ml でわずかに溶血が認められた。

2000 mg/kg 投与群で認められたヘキサバルピタール睡眠の延長及び尿量の減少はわずかであり、1000 mg/kg 投与群では認められなかった。また、血球の溶血作用は 1.0 mg/ml においてのみ認められたが、ラットを用いた代謝試験で 1000 mg/kg の単回経口投与における検体の血中濃度(総放射活性)は $2\mu\text{g/g}$ 以下であり、溶血作用を示す濃度よりはるかに低かった。

一連の生体機能に及ぼす影響に関する試験の結果及び既に実施された急性毒性試験の結果は、本検体による急性中毒の可能性は少ないことを示していた。これらより本検体を含む製剤が散布作業に伴って暴露された場合あるいは誤って摂取された場合、本検体によって急性中毒が発現する可能性は低いものと考ええる。