

トリスビフェニルトリアジン

資料概要

資料概要目次

イ 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料		ページ
1	起源又は発見の経緯	3
2	外国における使用状況	3
3	特性及び他の成分との比較検討等	4
ロ 物理的・化学的性質等に関する資料		
1	構造決定	10
2	物理化学的性質等	14
ハ 安全性に関する資料		19
	本品の安全性試験概要一覧表	20
1	単回投与毒性	22
2	反復投与毒性	24
3	生殖発生毒性	30
4	皮膚一次刺激性	35
5	連続皮膚刺激性	37
6	感作性	38
7	光毒性、光感作性	39
8	眼刺激性	42
9	遺伝毒性	45
10	ヒトパッチ	60
11	吸収・分布・代謝・排泄	61
	安全性に関する総括	62

イ 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

1 起源又は発見の経緯

チバ スペシャルティケミカルズ スイス本社（現在は合併により BASF SE）は、過剰な日光紫外線照射により発生する健康被害を回避するため、広い波長領域の紫外線に対して吸収能力を有する有効性及び安全性の高い化合物で且つ環境汚染の恐れのない新規紫外線吸収剤の開発を行ってきた。既存のこの領域に有効な紫外線吸収・散乱剤として、酸化亜鉛(ZnO)、酸化チタン(TiO₂)或いはブチルメキシジベンゾイルメタン(BMBM)等があるが、例えば酸化チタンは紫外線吸収作用がやや弱く、その微粒子の後方散乱作用により皮膚上に白化作用が認められる。また、BMBM は強力な紫外線吸収能力を有するが、光安定性を欠いている等幾つかの短所も認められている。

また、サンスクリーン製品製造業者は製品を開発する上で処方上、より制限を受けることの少ない紫外線吸収成分・原料を期待している。

チバ社はその期待に添うことの出来る新規広帯域紫外線吸収成分:トリスビフェニルトリアジン(以下本品とする)を見いだした。本品の主な特徴は以下の通りである。

- UVB(290-320nm)、UVA2(320-340nm)の両波長領域に於いて紫外線吸収能力を有する
- 紫外線に対する吸収、散乱及び反射の3つの作用を有する有機微粒子系紫外線吸収剤である
- 光安定性が良く、高いサンケア指数(SPF)を有する本品は支障なく各種のサンスクリーン製品に配合しうる
- 他の紫外線吸収剤との配合性も良く、紫外線防御の相乗効果を期待できる

本品は先にポジティブリストに記載されたメチレンビスベンゾトリアゾリルテトラメチルブチルフェノール(BASF SE 製)と比較し、特に UV 低波長域において紫外線吸収能を有すると共に、安全性も高く、且つ光安定性も良好である。

2 外国における使用状況

2013年1月の時点で世界的に販売実績はなし。新規紫外線吸収剤としての承認、許可実績もなし。

国名	開発状況
EU	EU 委員会指令 67/548/EEC:1967/6/27 新規化学物質として届出、公示済み 公示番号:05-04-1927-00
EU	EU 委員会指令 76/768/EEC:1976/7/27 に従い新規紫外線吸収剤として申請し、Scientific Committee for Cosmetic Products (SCCP)による評価は終了しており、SCCP より 2011年12月本品10%の化粧品としての皮膚適用で安全であるとの最終意見が公示されている。現在、EU Commission による 当該委員会指令 76/768/EEC ANNEX VII への記載事務処理中。

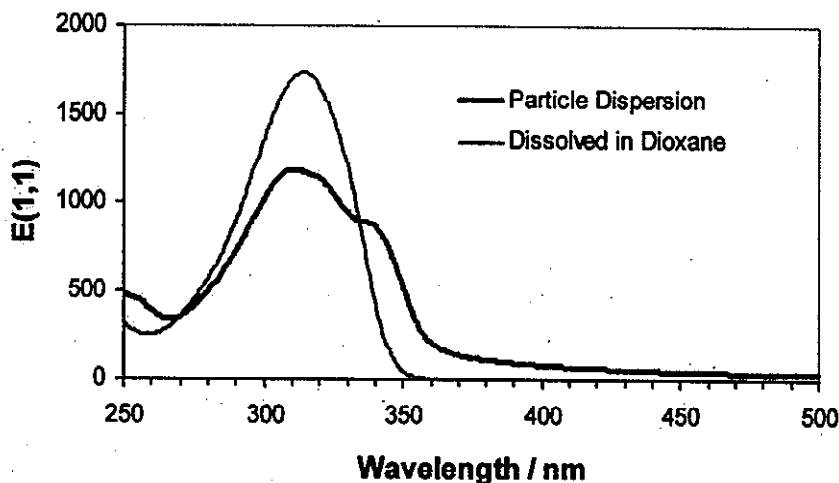
3 特性及び他の成分との比較検討等

特性及び他の成分との比較検討等に関する資料は添付資料イ-1 及びイ-2 を参照

3-1. 紫外可視吸収スペクトル

本品のジオキサン溶液及び本品微粒子(平均粒子径 $d(0.5)=105\text{nm}$)の水分散液の紫外可視吸収スペクトルを図イ-3-1に示す。本品のジオキサン溶液の $\lambda_{\text{max}}=314\text{nm}$ であった。本品微粒子(平均粒子径 $d(0.5)=105\text{nm}$)水分散液の吸収スペクトルは 340nm 付近に shoulder 吸収が認められたが、これは粒子内で重積した π 電子の分子間相互作用により生じたものである。

図イ-3-1 本品のジオキサン溶液及び本品微粒子水分散液 の紫外可視吸収スペクトル



本品のジオキサン溶液及び本品微粒子水分散液についての紫外吸収特性を下記表イ-3-1 に示す。

表 イ-3-1 本品ジオキサン溶液及び微粒子水分散液の紫外吸収特性

	本品ジオキサン溶液	本品微粒子水分散液
λ_{max}	314 nm	311
ϵ_{max}	93400 l/(mol·cm)	63200 l/(mol·cm)
$E(1, 1)$	1740	1180
$\langle E(1, 1) \rangle_{290\sim 400}$	623	600

ϵ_{max} 及び $E(1, 1)$ の数値そのものはこの物質の特性を示すものであるが、広帯域紫外線吸収剤としての有効性を特徴づける例えばスペクトル幅については考慮に入れていない。この点を考慮に入れたものとして、 $290\text{nm}\sim 400\text{nm}$ 間の average specific extinction $\langle E(1, 1) \rangle_{290\sim 400}$ を表イ-3-1 の下行に示した。これは $290\text{nm}\sim 400\text{nm}$ 間の $E(1, 1)$ の平均値で、この間の波長領域の各波長で平均的に 623 或いは 600 の $E(1, 1)$ を示しており、本品がこの点からも強力な広帯域紫外線吸収剤としての特性を有することを示しており、実際の紫外線吸収作

用を示すのに意味のある数値である。

$$\langle E(1, 1) \rangle_{290 \sim 400} = \int E(1, 1) d\lambda / \int d\lambda$$

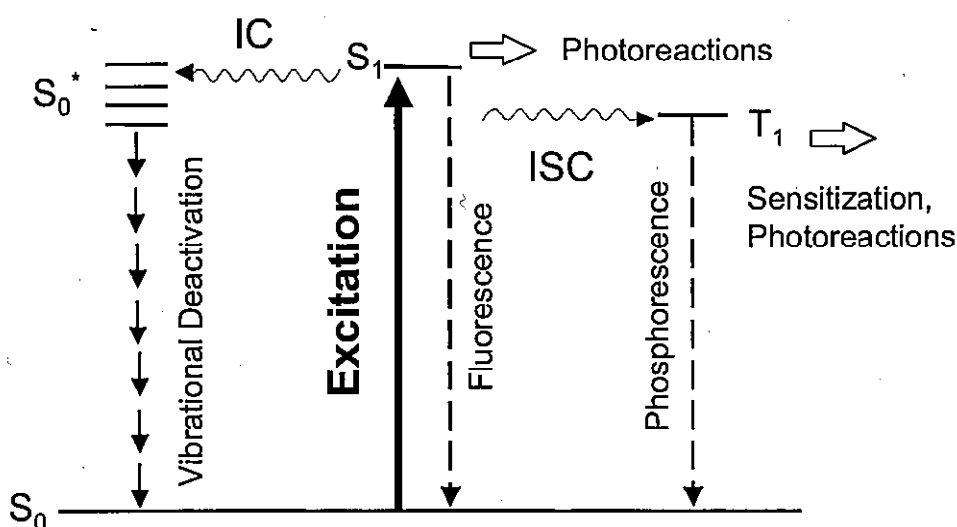
表イ-3-1 から本品の吸収極大波長に於ける比吸光度 $E(1, 1)$ はジオキサン溶液の方が水分散液に比して高いが、波長域 290nm~400nm における平均比吸光度 $\langle E(1, 1) \rangle_{290 \sim 400}$ についてはほとんど差がなく、水分散液の UV 吸収スペクトルがより幅の広い平坦な、しかも強度の吸収を有することが示されている。

3-2. 本品の紫外線吸収メカニズムと光安定性

光子による分子内電子の励起は電子の基底状態 S_0 から始まる。1 個の光子に対応した吸収エネルギー量は、 $E=h\nu$ の関係で示され、 h はプランク定数、 ν は光の振動数である。このエネルギーによる励起状態は分子の電子的励起状態をもたらし、多くの場合多原子有機分子に於いて通例 S_1 の状態にあるとされる(1 次励起状態)。

励起状態の分子は基底状態の分子に比してやや不安定であるので、エネルギーを放出し、理想的には基底状態に戻り、再び光を吸収する。光子の吸収によって励起後の分子中で起こるかもしれない過程は図イ-3-2 の Jablonski diagram にまとめられている。

吸収したエネルギーはいくつかの経路により取り除くことができる。 S_1 状態からは、蛍光(放射変遷)により、または、光反応により直接、エネルギーが失われるかもしれない。吸収されたエネルギーが放射を伴わない遷移によって分子の中で再配分されることもある。項間交差(ISC)は最初の 3 重項状態 T_1 に導き、更に内部変換(IC)により S_0^* 状態に導く、それは電子基底状態であるにも係わらず、励振エネルギーは分子の振動により消失する。 T_1 から、エネルギーは光子(燐光)の放出或いは、他の分子(増感)へのエネルギー伝達、または光化学反応により消失する。内部変換により振動励起基底状態 S_0^* に励起後のエネルギーの運命は、IR 光子の放出或いは周辺分子との衝突を通して振動モードの衝突による不活性化が行われている。IR 量子の放出のための速度定数が非常にわずかであるので、分子の励振エネルギーを熱に変換している間に電子基底状態 S_0 に於ける分子の変換行程として衝突不活性化は内部変換後に於ける主要な行程である。したがって、光安定化の領域に於いては、高速内部変換を示す光吸収剤が最も望ましいこととなる。



図イ-3-2. Jablonski diagram showing excitation of organic molecules by photons and deactivation pathways, explanation of the symbols in the text

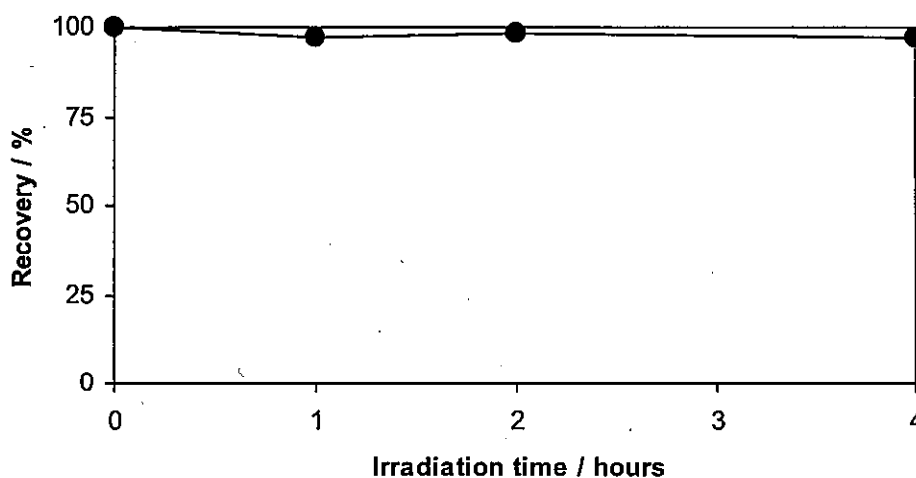
3-3. 本品の光安定性

光照射に対する安定性試験は、2%の本品を 2mg/cm² の割合に粗表面を有する水晶板に分散して行われた。試料には、Atlas CPS+solar simulator を用いて照射した。試料の温度は試料保持板を冷却し 35~40°C に保たれた。CPS+装置は照射総強度が 5MED/hr(1MED= 1 Minimal Erythemat Dose)に対応する様に 760W/m² で操作された。照射後に、試料について HPLC 法により定量分析した。

光安定性試験結果を、表イ-3-3 に、本品の回収率(%)として示す。信頼限界は 95%有意水準に基づいている。図イ-3-3 に同じ結果をグラフとして示した。4 時間照射後の照射量は 20MED に対応し、測定誤差を考慮するときこの条件下では有意な本品の分解は認められない。

表イ-3-3 本品の o/w エマルジョンにおける光安定性 回収率 (N=6)

Irradiation Dose (MED)	Recovery after Irradiation (%) Recovery ± confidence limit (N=6)
0	100.0 ± 0.8
1	97.2 ± 1.7
2	98.5 ± 2.0
4	97.3 ± 3.3



図イ-3-3 本品の o/w エマルジョンにおける光安定性

結論

本品による紫外線減衰メカニズムは $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移に基づいている。本品は次の理由から光照射に対して安定である：本品は分子中に大きなアリール基群を有し、その結果、多岐にわたる vibrational mode が可能となる。この特徴は内部の変換(IC)の過程を容易にし、よって光安定性に有利に作用している。

微粒子形態における紫外線吸収性物質の光安定性は溶液状態での化合物に比して光学的密度が高いため、常に高くなる。

本品の光安定性を確認するために設計した代表的処方に対する 200MEDの光照射により、本品の有意な分解は認められず、光安定性の良好な物質であるといえる。

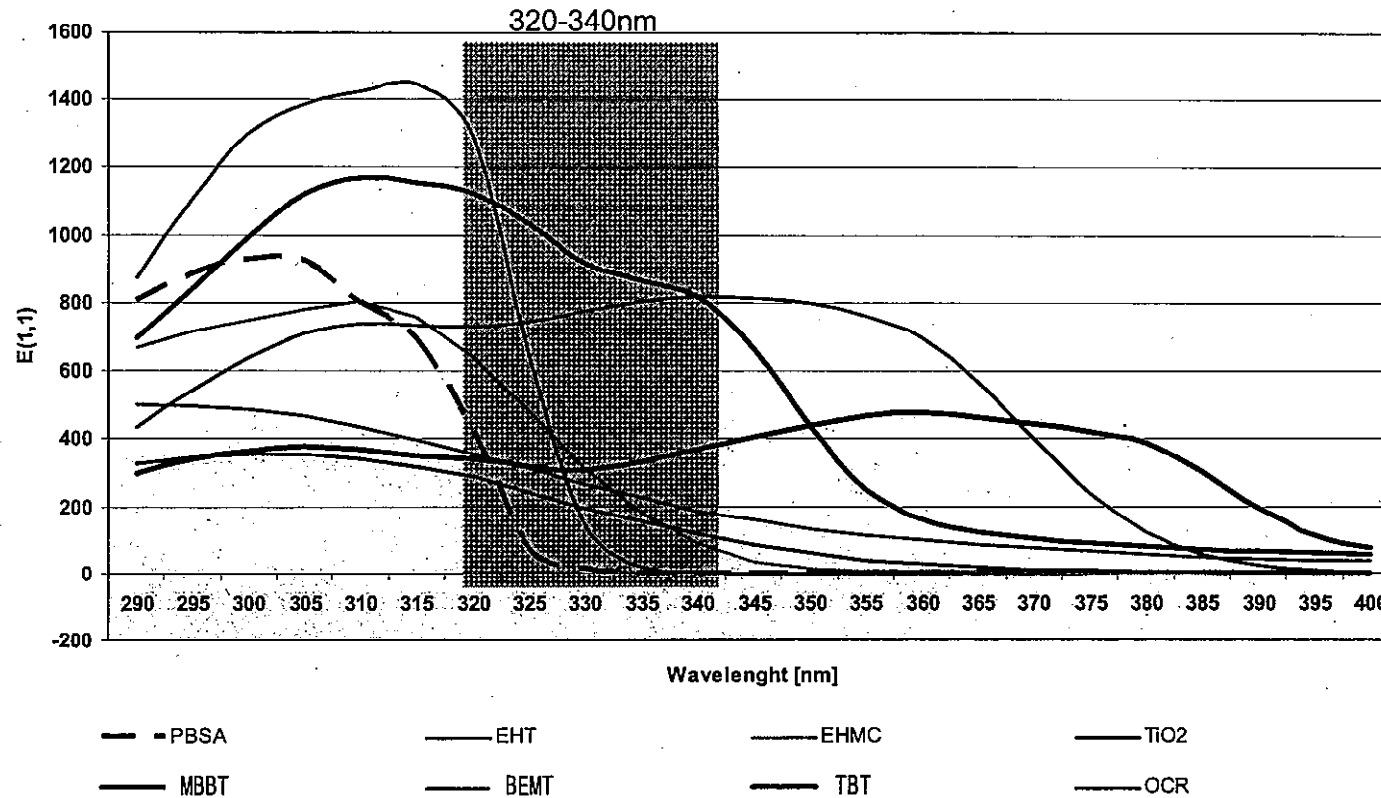
3-4. 他の成分との特性比較

UVB 領域に吸収作用のある代表的な紫外線吸収剤について表イ-3-4に一覧表とし、更に各々の紫外線吸収スペクトルを図イ-3-4 に示した。本品の特筆すべき点は、UVB 領域及び UVA2 領域に強い吸収を示し、既存の紫外線吸収剤で防御できない領域に対して吸収能をもつことで、他の紫外線吸収剤の性能を効果的に補完することである。従って、本品は UVA 波に対する防御及び UVB 波に対する防御の両方を有することになる。

表 イ-3-4 他の紫外線吸収剤との比較表

化粧品基準 収載名称	本品 トリスビフェニルトリアジン (収載希望名称)	2,4,6-トリス[4-(2-エチルヘキシルオキシカルボニル)アニリ ル]-1,3,5-トリアジン	2-シアノ-3,3-ジフェニルプロ パノ-2-エン酸 2-エチルヘキ シルエステル (別名オクトクリ レン)	ハラトキシケイ皮酸-2-エチル ヘキシル	フェニルベンズイミダゾールスルホ ン酸	2,2'-メチレンビス(6-(2H-ベンゾト リアゾール-2-イル)-4-(1,1,3,3- テトラメチルブチル)フェノール	2,4-ビス-[[4-(エチルヘキシルオ キシ)-2-ヒドロキシフェニ ル]-6-(4-オキシフェニル) -1,3,5-トリアジン
INCI名	Tris-Biphenyl Triazine	Ethylhexyl Triazone	Octocrylene	Ethylhexyl Methoxycinnamate	Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid	Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol	Bis-Ethylhexyloxy- phenolmethoxy phenyl Triazine
化学構造式							
分子量	537	823	361	290	274	659	628
処方時存在相 (溶解特性)	水相 (不溶性・水分散物)	油相 (油性)	油相 (油性)	油相 (油性)	水相 (水溶性)	水相 (不溶性・水分散物)	油相 (油性)
図イ-3-4中 表記略称	TBT	EHT	OCR	EHMC	PBSA	MBBT	BEMT
紫外線 吸収特性	次ページ紫外線吸収スペクトル参照 (図イ-3-4)						

図 イ-3-4 他の紫外線吸収剤の紫外線吸収スペクトル比較



UVB 波の防御に広く使われる紫外線吸収剤及び無機系の酸化チタン (TiO₂) の防御能を上記吸収スペクトルにまとめた。効果的に防御するものがなかった 320-340nm の UVA2 領域に本品 (TBT) の吸収がある。また、より紫外線防御能の高い化粧品処方を組むには水相・油相双方に紫外線吸収剤・散乱剤が存在することが望ましく、現在のところ水相に適用される吸収剤は PBSA (太点線：濃紺色) 及び MBBT (ブロードスペクトル太線：濃茶色) 等限られている。本品は水相に分散させることができ、ここでも効果的で安定な処方実現に更なる価値を付与できるものと思われる。

ロ 物理的・化学的性質等に関する資料

1. 構造決定

本品の構造を決定するために、1. 元素分析 2. 赤外吸収スペクトル及び 3. 核磁気共鳴スペクトルの分析を行った。

1～3 の分析結果から本品の構造を支持する結果が得られたので、本品の構造式は間違いないことを確認した。

構造決定に関する資料は添付資料ロ-1～ロ-3 を参照

1-1. 元素分析

本品に対する元素分析値は下記に示す結果の通りで、分子式：C₃₉H₂₇N₃ からの期待値とよく一致し、本品の構造を支持する結果が得られた。

元素分析値 試験結果

元素	期待値(%)	実測値(%)
C	87.12%	
H	5.06%	
N	7.82%	

1-2. 赤外吸収スペクトル

本品の ATR 法により測定した波数領域 4000～600cm⁻¹ の赤外吸収スペクトルを図 ロ-1-2 に、また特性的吸収の帰属を表 ロ-1-2 に示した。

これらは本品の化学構造を支持した。

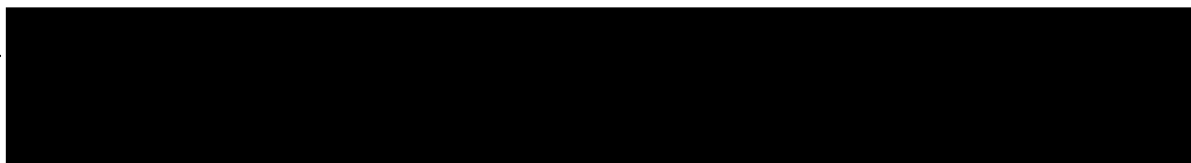




表 1-2. 本品の ATR 法による赤外吸収スペクトル： 特性吸収帯と化学構造について

波数(cm^{-1})	吸収強度	振動の形式	官能基	注

以上のおり、赤外吸収スペクトルも本品の構造を支持する結果が得られた。

1-3. 核磁気共鳴スペクトル

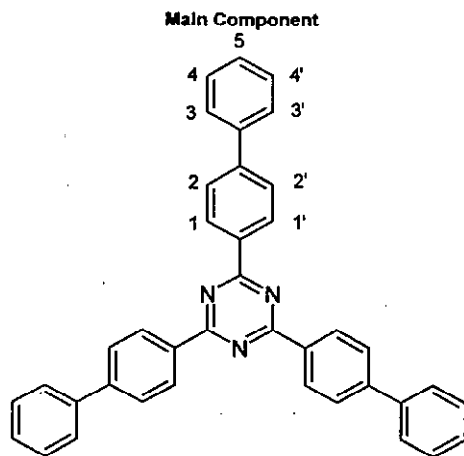
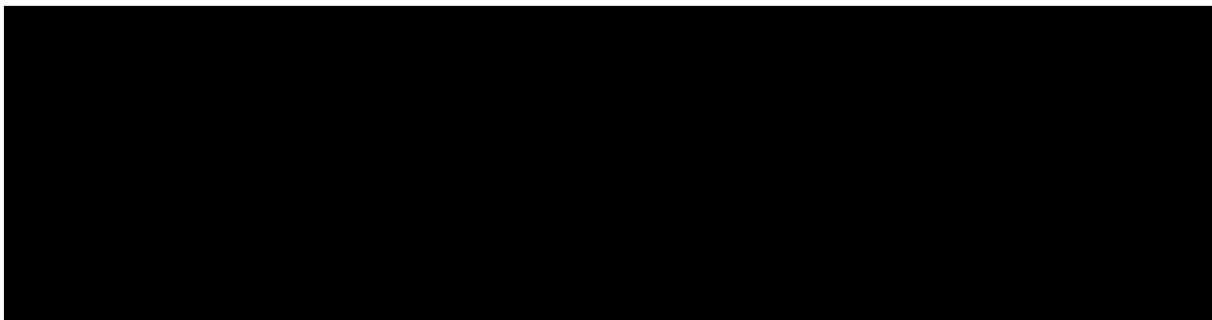


図 口-1-3-1
本品の化学構造とプロトン位置

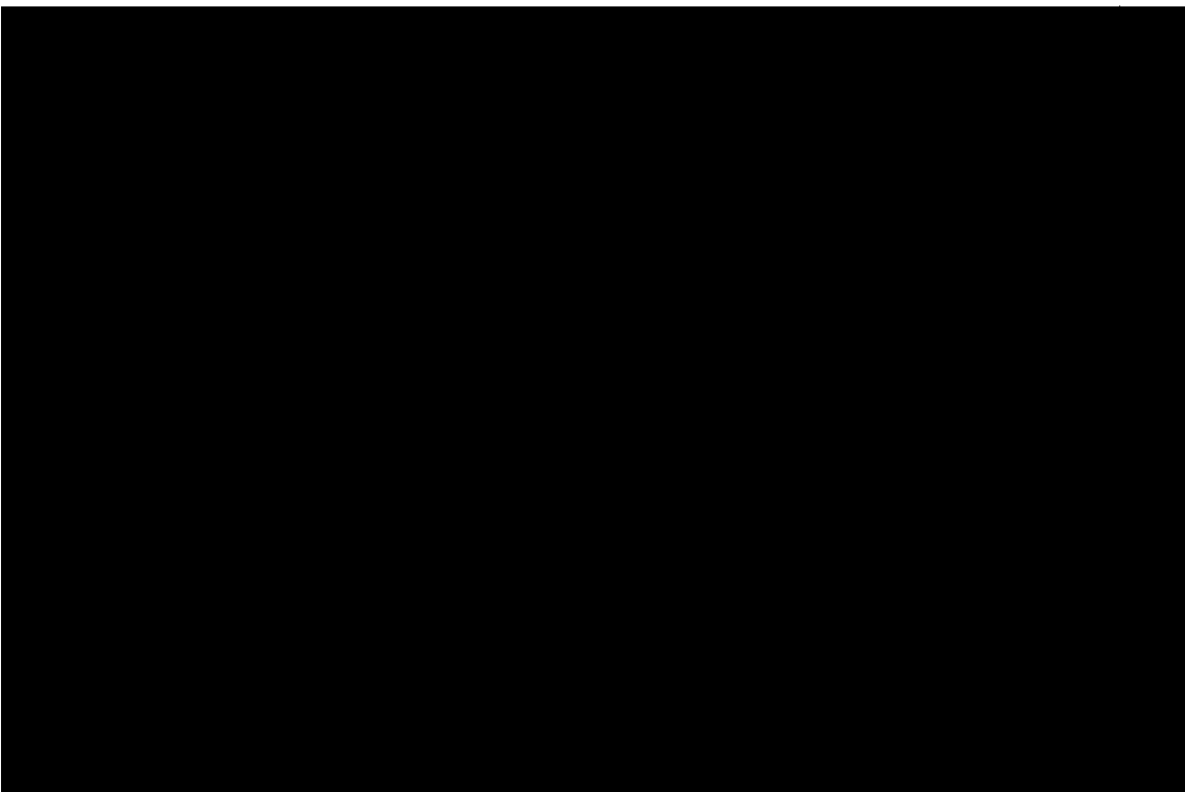


図 口-1-3-2 本品の NMR スペクトル

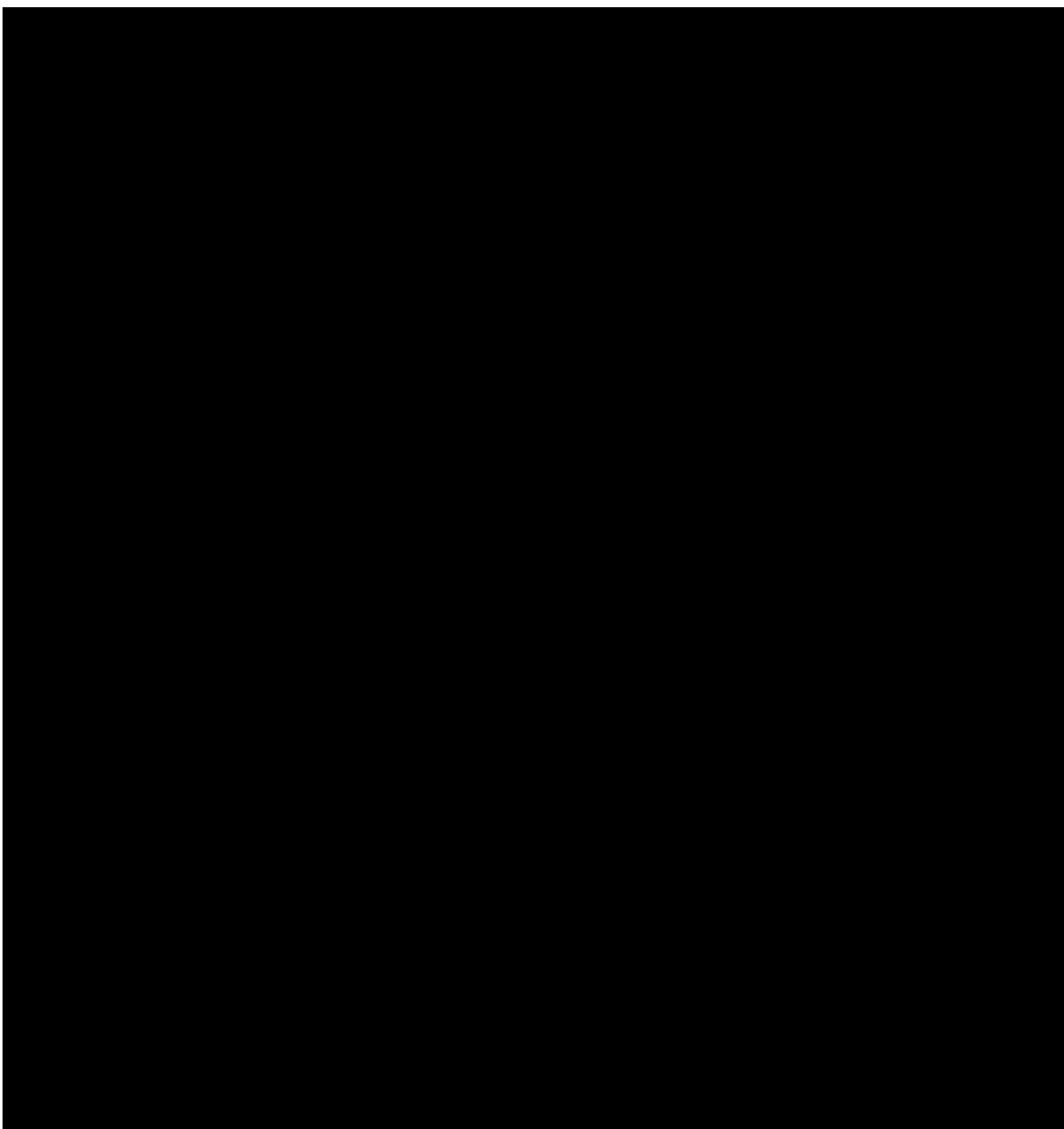


図 ロ-1-3-3 本品の高分解能 NMR スペクトルとシグナルの帰属

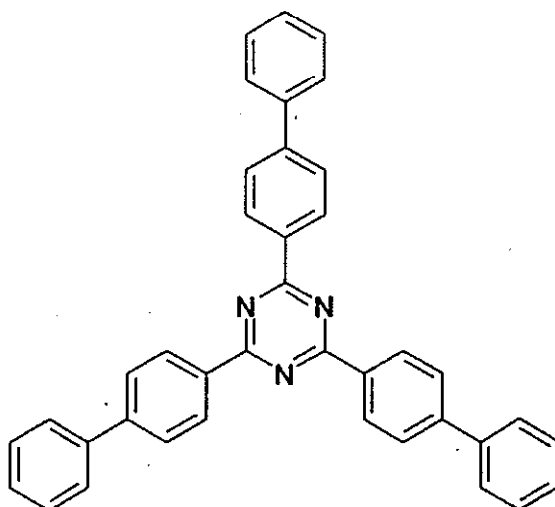
核磁気共鳴スペクトルも本品の構造を支持する結果が得られた。

2. 物理化学的性質等

2-1 物理化学的性質

本品成分名	トリスビフェニルトリアジン
化学名	1, 3, 5-Triazine, 2, 4, 6-tris[(1, 1'-biphenyl)-4-yl]-
INCI 名	Tris-Biphenyl Triazine
CAS	31274-51-8

化学構造, 分子式, 分子量



分子式： $C_{39}H_{27}N_3$ 分子量： 537.65

性状： 本成分は白色 ~ 淡黄色の粉末である。わずかに特異臭あり。

溶解度：

溶媒	溶解度
████████████████████	██████
██████████	██████
██████████████████	██████

融点： 281.3°C

蒸気圧： 4.15×10^{-21} Pa (25°C)

分配係数： $\log P_{ow} = 10.4$ (model calculation 法による計算値)

引火性： 引火性を有しない

爆発性： 化学構造から爆発性を有しない

物理化学的性質に関する資料は添付資料口-4~口-8を参照

2-2 安定性

本品 3 ロットについて、通常使用される保存容器 LDPE-Box に小分けし、加速経時試験(40℃、75%RH)を実施した。


加速試験のいずれの項目においても変化は認められず、本品は安定であると考えられる。加速試験結果要約を下記表 口 2-2 に示す。

安定性に関する資料は添付資料口-9～口-11 を参照。

加速試験

試験材料 : 本品 Lot. Partie 06/05, Lot. Partie 09/05, Lot.37878FC6

包装容器 : LDPE-Box

試験項目 : 

試験条件 : 温度 40℃、湿度 75%RH

(但し、重金属、ヒ素について、安定性では影響を受けないと考えられるため、1、3、6 ヶ月の試験を省略した)

(以下3枚不開示のため略)

八. 安全性に関する資料

ハ. 安全性に関する資料

本品の安全性に関する試験として、単回投与毒性、反復投与毒性、生殖発生毒性、皮膚一次刺激性、連続皮膚刺激性、皮膚感作性、光毒性、光感作性、眼刺激性、遺伝毒性、光遺伝毒性、ヒトパッチテスト及び吸収に関する試験を実施した。これらの試験概要一覧を表ハ-1に示す。安全性に関する資料詳細は、添付資料ハ-1～ハ-11を参照。

表 ハ-1. 本品の安全性試験概要一覧表

試験項目	動物種 又は 試験条件	投与(処理) 経路、期間	投与量又は処理濃 度 mg/kg	成績 mg/kg	実験施設	GLP 準 拠 /非準拠
単回投与毒性	ラット	経口	♂ : 200, 2000 ♀ : 2000	LD ₅₀ ♂ : 2000 以上 ♀ : 2000 以上	[Redacted]	GLP 準拠
	ラット	経皮	2000	LD ₅₀ ♂ : 2000 以上 ♀ : 2000 以上		GLP 準拠
反復投与毒性	ラット	経口、13週間	50, 250, 1000	無毒性量 (mg/kg/日) ♂♀ : 1000		GLP 準拠
生殖発生毒性	Seg. II ラット	経口	100, 300, 1000	無影響量 (mg/kg/日) 母動物 一般毒性 : 1000 生殖毒性 : 1000 胎児 胎児毒性 : 1000		GLP 準拠
皮膚一次刺激性	ウサギ	半閉塞塗布	500mg/一匹 (腹側部)	刺激性なし		GLP 準拠
連続皮膚刺激性	ウサギ	開放塗布	10, 20, 40% (PEG 400 を溶媒として使用)	連続皮膚刺激性 なし		GLP 準拠
感作性	マウス (リンパ節)	LLNA	0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10% (PEG を溶媒と して使用)	遅延性接触過敏 症誘発性なし		GLP 準拠
光毒性・光感 作性	モルモット	経皮	光毒性、光感作性誘 導 ; 10%/0.1ml/9cm ² (6回) 光感作性惹起 ; 10%/0.1ml/4cm ²	光毒性・光感作 性なし		GLP 準拠
眼刺激性	原体 ウサギ	点眼(洗浄せ ず)	100 mg/1匹	眼刺激性なし		GLP 準拠
	製剤 ウサギ	点眼	0.1mL/1匹	眼刺激性なし		GLP 準拠

試験項目		動物種 又は 試験条件	投与(処理) 経路、期間	投与量又は処理濃度 mg/kg	成績 mg/kg	実験施設	GLP 準 拠 /非準拠	
遺伝毒性	復帰突然変異	ネズミチ フス菌 大腸菌	プレート法 プレイン キューベ ーション法	62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/プレート	陰性	[Redacted]	GLP 準拠	
	染色体異常	培養ヒト リンパ球	実験Ⅰ ±S9 mix 3時間暴露 実験Ⅱ +S9 mix 3時間暴露 -S9 mix 標本作成時間 まで暴露	実験Ⅰ 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 μg/mL 実験Ⅱ 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 μg/mL	陰性		GLP 準拠	
光遺伝毒性	光復帰突然変異	ネズミチ フス菌	プレート法 プレイン キューベ ーション法	33, 100, 333, 1000, 2500, 5000 μg/プレート	陰性		GLP 準拠	
	光染色体異常	V79細胞	実験Ⅰ 125mJ/cm ² UVA 4.5mJ/cm ² UVB 18時間回収 実験Ⅱ 125mJ/cm ² UVA 6.5mJ/cm ² UVB 200mJ/cm ² UVA 4.5mJ/cm ² UVB 28時間回収	1.3, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 μg/mL	陰性		GLP 準拠	
ヒトパッチ		健常人	閉塞塗布	10%	ヒト皮膚に対し て刺激を示さず			
吸収・ 分布	in vitro 経皮吸 収試験	ラットお よびヒト 皮膚由来 の分層皮 膚膜	経皮24時間	97mg/cm ²	ヒト皮膚膜を透 過した比率は塗 布量の0.02%で あった。推定 Fluxは0.042 μ g/cm ² /hだった。 皮膚膜(灌流液) を通じて浸透し た量と剥離処理 後に皮膚膜下層 に残存していた 量は、ヒトでは それぞれ0.06% と1.2 μg/cm ² だった。		GLP 準拠	

本品の安全性データ概要

1. 単回投与毒性

1-1. ラット単回経口投与毒性試験

試験番号 : ██████████
試験施設 : ████████████████████
試験責任者 : ████████████████████
報告 : ████████年 ██████月 ██████日
ガイドライン : OECD No. 423 (1996) 及び EC ガイドライン 96/54/EC, B. 1, (1996)

【試験方法】

本品を 0.5% のカルボキシメチルセルロース懸濁液を用いて調製し、10mL/kg の用量で Sprague-Dawley 系ラットに強制経口投与した。試験条件は以下の通りで、本品を単回投与後 14 日間にわたり一般状態、死亡及び体重増加量を観察した。

投与量 (mg/kg)	投与用量 (mL/kg)	雄 (匹)	雌 (匹)
200	10	3	-
2000	10	3	-
2000	10	-	3

【結果】

ラット単回投与毒性試験結果要約

動物種 (系統, 週齢)	投与経路	投与量	性	動物数	結果	
					LD ₅₀	所見
Sprague-Dawley 系 ラット Rj SD (IOPS Han) 約 8 週齢	強制経口	200, 2000mg/kg 2000mg/kg	♂ ♀	3 3	2000mg/kg 以上 (雄雌とも)	立毛、呼吸困難、自発運動の低下、体重増加量の減少

200mg/kg を投与した動物において、一般状態変化及び死亡は認められなかった。

2000mg/kg の投与量において、死亡は起こらなかった。立毛及び呼吸困難が試験 1 日目の全動物に認められ、雌ではさらに自発運動の低下も同時に認められたが、これらの徴候は、2 日目に回復し、それ以降試験終了時まで観察されなかった。

歴史的背景データの対照動物と比較した場合、体重増加量のわずかな減少が試験の第 1 週あるいは 2 週の間、200mg/kg を投与した雄動物の 2/3 例に記録された。2000mg/kg では、体重増加量の減少が、試験の第 2 週の間、1/3 例の雌動物に認められた。他の動物の全体的な体重増加量は被験物質投与の影響を受けなかった。剖検において、明確な異常は観察されなかった。

【結論】

本実験条件下において、本品のラットにおける急性経口毒性の LD₅₀ 値は、2000mg/kg 以上であった。

EU 理事会 危険物質に関する指令 67/548/EEC (及びその後の改定) に定められた分類基準に従って、本品は経口投与による急性毒性物質と分類されなかった。

1-2. ラットを用いた急性経皮毒性試験

試験番号 : ██████████
試験施設 : ████████████████████
試験責任者 : ████████████████████
報告 : ███████ 年 █████ 月 █████ 日
ガイドライン : OECD No. 402(1987)及び EC ガイドライン 92/69/EEC, B.3 (1992)

【試験方法】

被験物質は、10 匹の Sprague-Dawley 系ラット(雄 5 匹及び雌 5 匹)の 1 群の皮膚に塗布した。被験物質は 2000mg/kg の濃度で毒性影響を誘発しないことが予想されたため、塗布は 2000mg/kg の投与量で未希釈の被験物質を用いて実施した。塗布後、試験部位は半閉塞包帯で 24 時間覆った。被験物質を単回投与後 14 日間にわたり一般状態、死亡及び体重増加量を観察した。全ての動物を剖検に供した。

【結果】

ラット急性経皮毒性試験結果要約

動物種 (系統, 週齢)	投与経路	投与量	性	動物数	結果	
					LD ₅₀	所見
Sprague-Dawley 系 ラット Rj SD (IOPS Han) 約 8 週齢	経皮	2000mg/kg (雌雄とも)	♂	5	2000mg/kg 以上 (雌雄とも)	皮膚の白色変色
			♀	5		

試験期間中に全身毒性徴候及び死亡は認められなかった。

動物の全体的な体重増加量は、被験物質投与の影響を受けなかった。

2 日目に皮膚の白色変色が全動物に認められた。試験期間中に他の皮膚反応は記録されなかった。剖検において、いずれの動物においても明確な異常は観察されなかった。

【結論】

本実験条件下において、本品のラットにおける急性経皮毒性の LD₅₀ 値は、2000mg/kg 以上であった。この投与量において毒性徴候は認められなかった。

EU 理事会 危険物質に関する指令 67/548/EEC(及びその後の改定)に定められた分類基準に従って、本品は経皮経路による急性毒性物質と分類されなかった。

[結果]

ラット 90 日間反復経口投与毒性試験結果要約

投与期間		■■■年■■月■■日 ~ ■■■年■■月■■日				
回復期間		■■■年■■月■■日 ~ ■■■年■■月■■日				
		投与量 (mg/kg)	第1群(対照)	第2群	第3群	第4群
			0	50	250	1000
死亡			0	0	0	0
体重 (g)	投与前1週		雄 148±4.7 雌 121±5.8	雄 147± 3.2 雌 122±6.0	雄 148±2.8 雌 121±6.3	雄 148±4.6 雌 123±6.3
	1週目		雄 216±7.0 雌 154±9.3	雄 212±5.7 雌 157±7.4	雄 217±7.0 雌 153±12.6	雄 213±8.8 雌 159±8.4
	2週目		雄 269±8.6 雌 170±12.8	雄 263±6.1 雌 176±13.5	雄 270±9.8 雌 166±13.5	雄 265±14.6 雌 175±11.6
	3週目		雄 320±14.3 雌 187±16.2	雄 315±8.5 雌 198± 21.9	雄 322±13.0 雌 185±17.7	雄 316±22.2 雌 196±17.5
	4週目		雄 352±20.5 雌 204±15.0	雄 349±10.4 雌 210±21.0	雄 360± 17.6 雌 197±20.8	雄 351±29.2 雌 210±20.2
	5週目		雄 381± 24.9 雌 214±19.1	雄 379± 12.1 雌 221±19.1	雄 395±19.0 雌 208±22.1	雄 384±35.3 雌 223±20.1
	6週目		雄 407±30.6 雌 227±18.2	雄 405±14.1 雌 236±25.6	雄 423± 20.2 雌 218±19.6	雄 410±37.3 雌 235±21.5
	7週目		雄 430±35.8 雌 239±21.7	雄 428±18.1 雌 250±33.3	雄 447±22.3 雌 227±23.6	雄 433±39.6 雌 245±24.0
	8週目		雄 446± 38.1 雌 250±20.6	雄 448±17.5 雌 260±35.7	雄 467±24.6 雌 238±23.4	雄 450±41.9 雌 251±23.8
	9週目		雄 460±38.6 雌 258±21.0	雄 465±19.7 雌 270±36.8	雄 484± 24.1 雌 245±24.2	雄 469±46.0 雌 261±23.8
	10週目		雄 478±39.1 雌 262±22.7	雄 484±22.9 雌 276±40.7	雄 507±25.1 雌 250±21.6	雄 489±48.1 雌 266±24.5
	11週目		雄 491±41.0 雌 270±24.1	雄 498±25.3 雌 285±41.4	雄 526± 26.4 雌 260±22.2	雄 507±51.6 雌 273±26.3
	12週目		雄 507±41.5 雌 277±24.0	雄 516±27.4 雌 290±42.3	雄 545±30.2 雌 265±21.4	雄 521±52.0 雌 281±26.2
	13週目		雄 514±42.3 雌 284±26.7	雄 528±27.6 雌 303±41.2	雄 553±32.5 雌 276±26.8	雄 530±54.9 雌 287±27.1
	14週目		雄 514±40.4 雌 282±25.2	雄 521± 27.1 雌 299±41.8	雄 551±30.5 雌 272±29.2	雄 529±58.4 雌 286±28.8
摂餌量 g/匹/日	1週目		雄 25.8±0.94 雌 17.1±1.80	雄 25.8±1.44 雌 17.8±1.75	雄 25.5±1.53 雌 16.6±1.83	雄 25.2±2.26 雌 17.3±1.22
	2週目		雄 26.7±1.67 雌 17.8±2.49	雄 26.8±1.88 雌 18.7±2.86	雄 27.1±1.73 雌 17.1±2.15	雄 27.1±2.33 雌 18.2±1.68
	3週目		雄 28.6±5.53 雌 18.2±1.68	雄 26.8±1.70 雌 18.3±1.80	雄 27.1±1.49 雌 17.0±1.77	雄 26.9±2.91 雌 18.3±1.27
	4週目		雄 27.4±2.30 雌 18.3±2.07	雄 26.9±1.72 雌 18.8±2.03	雄 28.2±1.35 雌 17.2±2.02	雄 27.5±3.04 雌 18.7±1.32
	5週目		雄 27.4±2.05 雌 18.8±1.82	雄 27.3±1.78 雌 19.6±2.66	雄 27.9±1.39 雌 17.6±1.80	雄 27.3±2.83 雌 18.6±1.48
	6週目		雄 26.9±2.38 雌 19.4±1.92	雄 27.6±2.33 雌 20.2±3.69	雄 27.5±1.75 雌 17.9±2.00	雄 28.1±4.40 雌 18.8±1.72
	7週目		雄 27.7±2.22 雌 20.4±2.19	雄 28.1±2.46 雌 21.1±4.23	雄 28.1±1.99 雌 18.3±1.98	雄 27.0±3.10 雌 19.3±1.74
	8週目		雄 26.5±2.10 雌 19.8±2.37	雄 27.4±2.61 雌 20.2±2.65	雄 27.6±2.12 雌 18.2±2.12	雄 27.1±3.38 雌 19.3±1.62

	9週目	雄 26.1±2.15 雌 18.7±2.04	雄 27.6±2.52 雌 19.7±3.31	雄 28.2±2.00 雌 18.4±1.93	雄 27.5±3.62 雌 19.3±1.53
	10週目	雄 26.8±2.17 雌 19.1±2.09	雄 27.6±2.34 雌 19.7±2.54	雄 29.4±2.56 雌 19.0±2.49	雄 28.1±3.45 雌 19.1±1.69
	11週目	雄 27.2±2.14 雌 18.7±1.77	雄 27.8±1.91 雌 18.5±1.78	雄 28.4±2.78 雌 17.9±1.81	雄 27.4±4.11 雌 18.6±1.42
	12週目	雄 26.4±2.14 雌 18.9±2.62	雄 27.6±1.93 雌 19.4±2.87	雄 27.1±2.37 雌 19.0±3.17	雄 26.4±3.35 雌 18.8±2.31
	13週目	雄 24.0±1.94 雌 17.2±2.44	雄 23.6±1.55 雌 17.5±2.39	雄 24.2±1.84 雌 16.7±3.52	雄 24.3±3.83 雌 18.1±3.59
一般状態 (立毛)		雄 0%	雄 0%	雄 10%	雄 19%
一般状態 (脱毛 右前足、左前足、腹部)		雄 6%、6% 雌 6%、13%、0%	雄 10%、10% 雌 0%、0%、0%	雄 0%、0% 雌 0%、0%、10%	雄 13%、13% 雌 6%、6%、0%
一般状態 (かさぶた、雄：頭、頸背部 雌：左前足)		雄 0%、6% 雌 6%	雄 10%、0% 雌 0%	雄 0%、0% 雌 0%	雄 0%、0% 雌 0%
一般状態 (縮瞳 右眼、左眼)		雄 0%、0%	雄 0%、0%	雄 10%、10%	雄 6%、6%
一般状態 (右眼 眼球混濁、眼球突出)		雌 0%、0%	雌 10%、20%	雌 0%、0%	雌 0%、0%
自発運動量 水平方向		雄 515.3±80.5 雌 700.8±167.9	雄 547.7±90.6 雌 671.5±180.6	雄 432.8±129.4 雌 571.1±131.3	雄 572.8±157.2 雌 633.1±129.3
自発運動量 立ち上がり		雄 228.0±46.9 雌 271.9±76.7	雄 251.8±58.7 雌 278.7±82.4	雄 192.5±50.0 雌 242.7±42.0	雄 257.8±66.0 雌 257.1±57.1
機能観察総合検査		—	—	—	—
血液学的検査		白血球数 (後述) 以外特に変化なし	白血球数 (後述) 以外特に変化なし	白血球数 (後述) 以外特に変化なし	白血球数 (後述) 以外特に変化なし
血液生化学的検査		カリウム、カルシウム、無機リン以外 (後述) 特になし	カリウム、カルシウム、無機リン以外 (後述) 特になし	カリウム、カルシウム、無機リン以外 (後述) 特になし	カリウム、カルシウム、無機リン以外 (後述) 特になし
ホルモン検査		テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン以外 (後述) 特になし	テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン以外 (後述) 特になし	テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン以外 (後述) 特になし	テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン以外 (後述) 特になし
尿検査 13週	尿量 mL	雄 13±6.3 雌 11±7.3	雄 11±5.2 雌 12±5.6	雄 11±4.7 雌 7±5.2	雄 9±4.4 雌 6±3.8
	比重	雄 1019±7.7 雌 1018±11.4	雄 1021±7.4 雌 1014±9.9	雄 1021±4.6 雌 1023±7.5	雄 1024±10.2 雌 1025±13.3
	pH	雄 6.9±0.52 雌 6.3±0.26	雄 6.9±0.24 雌 6.5±0.44	雄 7.0±0.24 雌 6.2±0.35	雄 7.1±0.37 雌 6.2±0.354
臓器重量		—	—	—	—
剖検		—	—	—	—
病理組織学的検査		—	—	—	—
NOAEL (mg/kg/日)		1000mg/kg/日 以上			

—：特筆すべき所見なし

死亡率

試験期間中に途中死亡あるいは切迫殺はみられなかった。

一般状態

250mg/kg/日群の雄 1 例及び 1000mg/kg/日群の雄 3 例に立毛が認められたのを除いて、いずれ

の投与群においても投与に関連した一般状態変化はみられなかった。

機能観察バッテリー試験

各群及び各性のいずれの動物においても神経機能に対する投与の影響はみられなかった。

体重

いずれの性別及び投与期間においても投与による体重あるいは体重増加量への影響はみられなかった。

摂餌量

いずれの性別及び投与期間においても投与による摂餌量への影響はみられなかった。

発情周期

発情周期の障害は、検査期間中に記録されなかった。

眼科学的検査

眼科学的検査において、投与に関連した所見はみられなかった。

血液学的検査

第13週に、リンパ球数及び単球数の有意な低下により、低及び高用量群の雄の白血球数が対照群より中等度に低下した（最高-25%）。しかし、動物間で高い変動が存在し（対照群の雄の間で2倍）、中間用量群と対照群の間に差異はみられなかった（以下の表を参照）。従って、これらの変化は投与に関連しないものと判断された。雌あるいは回復期間終了時に白血球数の有意な変化はみられなかった。

血液学的検査において、投与に関連した生物学的に有意な変化はみられなかった。

投与群及び対照群の雄ラットにおける白血球数（平均±標準偏差）

群		1	2	3	4
投与量 (mg/kg/日)		0	50	250	1000
白血球数 (G/L)	13週 ^a	13.00 ±3.098	9.80** ±1.975	10.78 ±1.440	9.92* ±2.066
	18週 ^b	13.70 ±3.407	ND	ND	11.83 ±2.053

* : p<0.05、** : p<0.01 ; ND : 未測定

対照群の参考データ—平均範囲 a: 7.29~24.90 G/L、b: 9.09~16.19 G/L。

血液生化学的検査

血液生化学的検査においては、第13週及び18週に、いくつかのわずかな変化（-14%~-7%）が高用量群の雄の血漿中リン、カルシウムあるいはカリウムレベルが対照群と比較した場合に認められたが、全ての値は正常範囲内であり、雌では時々正反対の傾向を示したため、これらの所見は投与に関連しないものと判断された。

血液生化学的検査において、投与に関連した生物学的に有意な変化はみられなかった。

投与群及び対照群のラットにおける血液生化学的検査所見 (mmol/L)

群		1		2		3		4	
投与量 (mg/kg/日)		0		50		250		1000	
性別		M	F	M	F	M	F	M	F
カリウム	13週	3.70	3.71	3.86	3.58	3.80	3.80	3.64	3.82
	18週	3.80	3.77	ND				4.06*	3.63
カルシウム	13週	2.61	2.58	2.55	2.57	2.59	2.64	2.50**	2.59
	18週	2.58	2.56	ND				2.59	2.60
無機リン	13週	1.99	1.57	1.91	1.53	1.89	1.75	1.72**	1.68
	18週	1.84	1.20	ND				1.71*	1.15

* : p<0.05; ** : p<0.01 ; ND : 測定しなかった。

尿検査

用量相関性だが、対照群に対し有意差のみられなかった平均尿量の減少が、250（雌：-36%）あるいは1000（雌：-45%、雄：-31%）mg/kg/日群に認められた。この検査項目の重要な個体間の変動及び生物学的あるいは腎機能障害を示す病理組織学的所見がみられなかったことから、これらの差異は生物学的に重要ではないと判断された。他の尿検査項目は投与による影響を受けなかった。尿検査において、投与に関連した生物学的に有意な変化はみられなかった。

ホルモン検査

ホルモン検査による結果では、T3、T4及びTSHの血漿中レベルに対し影響を及ぼさなかった。第6週に、平均テストステロン（高用量群の雄で+89%）及びエストラジオール（高用量群の雌で+103%）レベルの用量相関性に高い傾向が対照群と比較した場合に認められたが、動物間の重要な変動（少なくとも3倍）が存在したため、統計学的有意差は認められなかった。プロゲステロンレベルが用量依存的に低下（対照群に対し高用量群の雌で-37%）したが、その変動は、統計学的に有意ではなかった。被験物質投与群の動物におけるこれら性ホルモンの変化は、投与による影響ではなく発情周期に関連するものと考えられ、投与に関連した影響よりも生物学的変動を反映していると判断された。さらに、第13週及び18週における値は、6週よりも低い振幅で正反対の傾向を示したか、あるいは投与に関連しなかった。

血中性ホルモンレベル

群		1	2	3	4
投与量 (mg/kg/日)		0	50	250	1000
雄					
テストステロン (nmol/L)	6週	6.6	6.1	7.5	12.5
	13週	3.4	3.4	3.2	4.3
雌					
エストラジオール (pmol/L)	6週	32.7	48.6	35.6	66.5
	13週	45.3	25.5	52.8	55.2
プロゲステロン (nmol/L)	6週	61.7	46.0	52.8	39.0
	13週	58.6	84.0	63.9	28.2

投与に関連した生物学的に有意な変化はみられなかった。

トキシコキネティクス

本品の血漿中濃度は、いずれの検査時点においても全動物について定量されなかった。

臓器重量

臓器重量において認められた変化は、いずれもその程度は低く用量依存性を伴わない性別間で正反対に検出された及び／あるいは体重において記録された変化に相関したため、毒性学的重要性はないものと判断された。

臓器重量において、投与に関連した生物学的に有意な変化はみられなかった。

肉眼的死後検査

肉眼的検査は投与に関連した影響の証拠を示さなかった。

病理組織学的検査

投与に関連した所見はみられなかった。

【結論】

雌雄ラットに本品を最高 1000mg/kg/日までの濃度で毎日 13 週間強制経口投与し、その後 4 週間の回復期間において試験した結果、毒性影響は認められなかった。従って、本試験条件下において強制経口投与における NOAEL（無毒性量）は、1000mg/kg/日であると判断された。

【結果】

ラットにおける生殖発生毒性試験の結果要約

		第1群 (対照)	第2群	第3群	第4群	
投与量		0	100	300	1,000	
妊娠雌動物数		24	21	22	24	
死亡		0	0	0	0	
体重平均 (g)	および 標準偏差	交尾後0日	231±17	226±16	226±16	225±14
		3日	254±20	249±19	251±15	249±16
		6日	272±22	266±19	267±15	269±17
		9日	285±23	278±21	280±15	281±18
		12日	303±24	295±22	297±16	300±18
		15日	323±25	317±25	318±159	321±21
		18日	363±35	355±28	356±22	360±24
		20日	396±40	388±29	389±26	393±25
摂餌量 平均 (g)	動物	交尾後0~3日	23±2	23±2	23±3	23±2
		3~6日	26±2	26±2	26±2	26±2
		6~9日	26±2	26±2	26±2	26±2
		9~12日	27±3	27±3	27±2	27±2
		12~15日	27±2	27±3	28±2	27±3
		15~18日	29±3	29±3	29±2	29±3
		18~20日	29±3	29±2	29±3	29±3
一般状態		—	—	—	—	
剖検		—	—	—	—	
黄体数/1動物		362±15.1	318±15.1	346±15.7	367±15.3	
着床部位数/1動物		322±13.4	302±14.4	324±14.7	351±14.6	
着床前損失率		362±15.1	318±15.1	346±15.7	367±15.3	
胎児数(生存/死亡)		317(100%/0%)	292(100%/0%)	307(100%/0%)	346(100%/0%)	
着床部位あたり生存胎児(率)		98.4%	96.7%	94.8%	98.6%	
動物あたり生存胎児数		13.2±3.6	13.9±2.0	14.0±2.7	14.4±1.8	
着床痕		0	0	0	0	
早期吸収		4	9	14	5	
後期吸収		1	1	3	0	
着床後損失率		1.6%	3.3%	5.2%	1.4%	

		第1群 (対照)	第2群	第3群	第4群
胎児	胎児数	317	292	307	346
	平均胎児体重(g)	3.77±0.22	3.72±0.21	3.78±0.36	3.77±0.26
	性比(雄性児%)	53.9%	44.5%	50.2%	45.4%
	外表検査用試験胎児数(試験腹数)	257(20)	279(20)	281(20)	282(20)

外表検査		—	—	—	小顎症(下顎) 1例	
軟組織検査用試験胎児数(試験腹数)		123 (20)	135 (20)	136 (20)	135 (20)	
軟組織検査 (異常所見)	小舌症/重度の脳室拡張	—	—	—	1 (0.7%)	
	腎盂拡張	2 (1.6%)	—	1 (0.7%)	—	
	尿管拡張	3 (2.4%)	—	2 (1.5%)	—	
骨格検査用試験胎児数(試験腹数)		134 (20)	144 (20)	145 (20)	147 (20)	
骨格検査	腰椎・未骨化	—	—	1 (0.7%)	—	
	頭頂間骨・不完全骨化	4 (3.0%)	2 (1.4%)	5 (3.4%)	1 (0.7%)	
	上後頭骨・不完全骨化	4 (3.0%)	2 (1.4%)	—	3 (2.0%)	
	頭頂骨・不完全骨化	1 (0.7%)	2 (1.4%)	1 (0.7%)	—	
	前頭骨・不完全骨化	1 (0.7%)	2 (1.4%)	—	—	
	鼻骨・不完全骨化	1 (0.7%)	3 (2.1%)	—	—	
	舌骨・不完全骨化	8 (6.0%)	7 (4.9%)	16 (11.0%)	9 (6.1%)	
	頸椎弓骨・不完全骨化	1 (0.7%)	3 (2.1%)	2 (1.4%)	—	
	胸椎骨・不完全骨化	9 (6.7%)	10 (6.9%)	14 (9.7%)	9 (6.1%)	
	仙骨・不完全骨化	2 (1.5%)	2 (1.4%)	1 (0.7%)	—	
	尾椎・不完全骨化	3 (2.2%)	3 (2.1%)	3 (2.1%)	—	
	尾椎・未骨化	3 (2.2%)	3 (2.1%)	2 (1.4%)	—	
	胸椎・ 不完全骨化	胸椎分節 5	101 (75.4%)	99 (68.8%)	104 (71.7%)	109 (74.1%)
		胸椎分節 6	92 (68.7%)	100 (69.4%)	87 (60.0%)	91 (61.9%)
		胸椎文節 1-4	28 (20.9%)	50 (34.7%)	30 (20.7%)	25 (17.0%)
	胸椎・ 未骨化	胸椎分節 5	17 (12.7%)	34 (23.6%)	30 (20.7%)	25 (17.0%)
		胸椎分節 6	2 (1.5%)	3 (2.1%)	2 (1.4%)	1 (0.7%)
		胸椎文節 1-4	1 (0.7%)	1 (0.7%)	1 (0.7%)	—
	過剰短肋骨 14		0	1 (2%)	6 (6%)	—
	中手骨 4・未骨化		2 (1.5%)	3 (2.1%)	1 (0.7%)	1 (0.7%)
中手骨 1-3・不完全骨化		1 (0.7%)	1 (0.7%)	—	—	
中足骨・不完全骨化		2 (1.5%)	4 (2.8%)	2 (1.4%)	—	
その他の骨格検査		—	—	—	—	
NOEL 無影響量 (mg/kg/日)		母動物：一般毒性、生殖毒性ともに 1000mg/kg/日以上 胎児：胎児毒性、1000mg/kg/日以上				

母動物結果

死亡率

試験期間中に早期死亡はみられなかった。

一般状態

いずれの被験物質投与群においても投与に関連した一般状態変化はみられなかった。

体重及び摂餌量

体重、妊娠後 6 日からの正味の体重変化、カーカス重量及び平均妊娠子宮重量は、被験物質投与の影響を受けなかった。投与は、いずれの投与群に対しても平均摂餌量に影響を及ぼさな

かった。

剖検所見

いずれの被験物質投与群の雌においても投与に関連した所見はみられなかった。

胎児結果

いずれの投与濃度においても妊娠関連項目に対する投与の影響はみられなかった。

胎児の外表及び内臓検査において全ての胎児は、高用量群の1胎児が小舌症と関連する下顎の小顎症を示した。この胎児は重度の脳室拡張も存在したのを除いて正常であった。影響を受けたのがこの1胎児のみであったため、投与に関連しないものと判断された。投与に関連した奇形あるいは変異は骨格検査において認められなかった。

【結論】

本品を Sprague-Dawley 系妊娠雌ラットに 100、300 あるいは 1000mg/kg/日の投与量で交尾確認後（妊娠）6 日から 19 日まで毎日強制経口投与した結果、母動物に対する毒性徴候を誘発しなかった。従って、この試験条件下において、母動物に対する毒性における無影響量 (NOEL) は、1000mg/kg/日であるとされた。妊娠関連項目に対する影響及び胎児に対し投与に関連した奇形及び投与に関連した変異の発生率に対する影響はいずれの投与群においてもみられなかった。従って、これら試験条件下における胎児に対する無影響量 (NOEL) は 1000mg/kg/日とした。

なお、セグメント I（妊娠前および初期）およびセグメント III（周産期および授乳期）における生殖発生毒性試験を実施しなかった理由は、下記の通りである。

- ① ラット13週間反復経口投与毒性試験において1000mg/kg体重/日の投与量まで死亡、体重増加、摂餌量、機能観察バッテリーにおける行動、臨床的兆候、甲状腺ホルモンやプロゲステロン、エストラジオール、テストステロンの血中濃度において本品に由来するいかなる悪影響も観察されなかった。雌の発情周期は、本品によって影響を受けなかった。また、各器官の重量（副腎、脳、肝臓、腎臓、胸腺、甲状腺、脾臓、精巣）もなんら悪影響を受けなかった。投与期間終了後の回復期間において、群あたり6匹の雄ならびに6匹の雌は標準のパラメーターにおいてなんら悪影響を示さなかった。剖検においても本品由来の変化は認められなかった。副腎、精巣、リンパ節、乳腺、卵巣、下垂体精嚢、脾臓、胸腺、甲状腺、子宮ならびに膣を含む検査したいかなる生殖関連器官や組織にも、病理学的変化は観察されなかった。
- ②最近実施された *in vitro* の分析において本品はアンドロゲン受容体およびエストロゲン受容体に結合しなかった。(Draper, C.: *In vitro* androgen receptor binding assay. Central Toxicology Laboratory Regulatory Report CTL/XR7473 dated 15 June 2005, Draper, C.: *In vitro* estrogen receptor binding assay. Central Toxicology Laboratory, Regulatory Report CTL/XR7474 dated 15 June 2005) 未成熟雌ラットに本品を経口投与し、卵巣の成熟期の開始時の変化は卵巣へのエストロゲン様作用を示さなかった。(Draper, C.: *Uterotrophic assay in immature female rats*. Central Toxicology Laboratory Regulatory Report CTL/RR1054 dated 10 June 2005) すなわちこれらの事実は本品が男性および女性ホルモンのバランスをくずさないことを示唆している。
- ③ 本品は、バクテリアまたは哺乳動物の培養細胞内で遺伝子毒性を持たなかった。

- ④ 本品のラットを用いた強制経口投与による胚-胎児発生毒性試験（セグメントII）において全ての投与群（100、300、1000mg/kg/日）で対照群と比較して何の悪影響も認められなかったこと。
- ⑤ ラットの経皮吸収試験において、本品はほとんど皮膚を透過しないため、生物学的利用能が非常に低いことが示された。また、in vivo で行われた反復投与毒性試験（ラット 90 日間反復経口投与毒性試験）において、本品は血中に検出されなかった。

以上、実施された反復経口投与試験または経皮吸収試験の結果から本品は、

- ・ ラットにおいていかなる器官、組織に毒性を示さない
- ・ 内分泌バランスを壊さない
- ・ 感作性が認められないことから、免疫学的に不活性である
- ・ 遺伝子や染色体を損傷しない
- ・ 胚や胎児の形成発達過程で毒性を示さない

ことから、セグメントIまたはセグメントIIIのそれぞれの生殖に関わるエンドポイントで毒性影響はないと考えられる。従って、これらの試験を省略した。

4. 皮膚一次刺激性

白ウサギにおける皮膚一次刺激性試験

試験番号 : ██████████
 試験施設 : ████████████████████
 試験責任者 : ████████████████████
 報告 : ██████年 █████月 █████日
 ガイドライン : OECD No. 404(1992)及び EC ガイドライン 92/69/EEC, B.4 (1992)

【試験方法】

本品を1匹のニュージーランド白色種雄ウサギに3分間(片側の腹側部)及び4時間(反対側の腹側部)塗布した。本品はこの最初の供試動物に対し、重度の刺激性を誘発しなかったため、次に他の2匹の動物に対し4時間塗布し、半閉塞包帯によって皮膚に密着させた。本品の塗布量は、500mgである。無処置皮膚は、対照皮膚として保持した。皮膚反応は包帯除去後約1、24、48及び72時間に観察し、紅斑及び浮腫の平均評点を算出した。

結果の解釈は、EU 理事会 危険物質に関する指令 67/548/EEC(及びその後の改定)に定められた分類基準に従って行った。

【結果】

白ウサギでの皮膚1次刺激性試験の結果要約

動物番号	皮膚反応	スコア				平均刺激性 スコア (1)	刺激性評価 (+) (-)
		1時間 1日目	24時間 2日目	48時間 3日目	72時間 4日目		
901 (3分間塗布)	紅斑	1	1	0	0	0.3	
	浮腫	0	0	0	0	0.0	
	その他	*	*	*	*		
901 (4時間塗布)	紅斑	1	0	0	0	0.0	(-)
	浮腫	0	0	0	0	0.0	(-)
	その他	*	*	*	*		
929 (4時間塗布)	紅斑	0	0	0	0	0.0	(-)
	浮腫	0	0	0	0	0.0	(-)
	その他	*	*	*	*		
930 (4時間塗布)	紅斑	0	0	0	0	0.0	(-)
	浮腫	0	0	0	0	0.0	(-)
	その他	*	*	*	*		

(1) 24, 48, 72時間後の平均刺激性スコア

刺激性評価 (+) = E. E. C. 基準により刺激性あり (-) = E. E. C. 基準により刺激性あり

* = 無し

3 分間暴露（1 匹）後、非常に軽度な紅斑が 1 日及び 2 日目に観察された。

4 時間暴露（3 匹）後、包帯除去後 1 時間に 1/3 例の動物に非常に軽度な紅斑が認められたのを除いて、試験期間中に皮膚反応は記録されなかった。

24、48 及び 72 時間にわたって各動物について算出された平均評点は、紅斑について 0.0、0.0 及び 0.0、浮腫について 0.0、0.0 及び 0.0 であった。

【結論】

本試験条件下において本品は、ウサギの皮膚に局所適用した場合、非刺激性であった。

EU 理事会 危険物質に関する指令 67/548/EEC（及びその後の改定）に定められた分類基準に従って、本品は皮膚に刺激を与える物質として分類されなかった。

5. 連続皮膚刺激性

ウサギでの2週間連続皮膚刺激性試験

試験番号 : ██████████
試験施設 : ████████████████████
試験責任者 : ████████████████████
報告 : ████████年███月███日
ガイドライン : 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2006

【試験方法】

本品の2週間連続皮膚刺激性についてNZW (Yac: NZW (KBL)) 種雄性ウサギ3匹を用い、投与濃度10、20及び40%で検討した。投与開始前日に剪毛したウサギ背部に左右2ヵ所、計4ヵ所の投与部位を設けて、0.03mLずつ各1ヵ所の投与部位に、10、20および40%本品を1日1回、2週間連続で14回、開放経皮投与した。対照部位には溶媒であるPEG400を投与した。投与0日の投与前を除き投与期間中の投与前および最終投与24時間後に投与部位を観察し、本品の連続皮膚刺激性を判定した。皮膚刺激性の判定は、Draizeの皮膚反応の判定基準に従って採点した。全例の一般状態を毎日観察し、体重は投与開始日および最終判定日に測定した。

【結果】

ウサギでの2週間連続皮膚刺激性試験結果要約

投与日	平均刺激スコア			
	対照 (PEG400)	本品 10%	本品 20%	本品 40%
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0

濃度10、20および40%において、すべての観察期間において紅斑および浮腫等の皮膚刺激性の変化は全例で認められなかった。

観察期間を通して死亡例はなく、一般状態の変化および体重において、全例で本品投与による影響は認められなかった。

【結論】

本試験条件下において本品は連続皮膚刺激性がないものであると判断した。

6. 感作性

マウス局所リンパ節試験 (LLNA)

試験番号 : ██████████
試験施設 : ████████████████████
試験責任者 : ████████████████████
報告 : ███████ 年 █████ 月 █████ 日
ガイドライン : OECDNo. 429(2002)

【試験方法】

28 匹の CBA/J 系雌マウスを 1 群 4 匹で 7 群にグループ分けした。

- ・ 5 投与群に 0.5、1、2.5、5 あるいは 10%の濃度の本品を投与した。
- ・ 4 匹から成る陰性対照群 1 群に溶媒 (ポリエチレングリコール) を投与した。
- ・ 陽性対照群 1 群には、中等度の感作性を示す標準物質の α -hexylcinnamaldehyde (HCA) を 25%の濃度で投与した。

被験物質、溶媒あるいは陽性対照標準物質は、耳全体に 3 日間連続塗布した。2 日間の回復期間後、塗布部位直下のリンパ節から得たリンパ節細胞の増殖率を ^3H -メチルチミジンの取り込みによって測定した (6 日目)。得られた値は、刺激指数 (SI) を算出するのに使用した。被験物質の刺激性誘発能は、1、2、3 及び 6 日目に同時に耳の厚さを測定することによって評価した。投与群の SI が 3 以上の場合、皮膚感作性物質と判断される。

【結果】

マウスにおける局所リンパ節試験結果要約

投与	濃度 (%)	局所刺激性症状	刺激係数 (SI)
投与群 1	0.5	なし	3.98
投与群 2	1	なし	0.86
投与群 3	2.5	なし	1.65
投与群 4	5	なし	1.17
投与群 5	10	なし	1.34
陽性対照群 (HCA)	25	—	21.96

0.5%の濃度で陽性リンパ増殖性反応 ($SI > 3$) が認められたが、最高試験濃度において陽性反応はみられず用量相関性がなかったため、この陽性反応は、生物学的有意性があると判断されなかった。従って、本試験中に遅延性接触過敏症に起因するリンパ増殖性反応は認められなかった。また、本品は試験したいずれの濃度においても皮膚反応及び耳の肥厚の増加は認められなかった。

【結論】

本品は、本試験条件下におけるマウス局所リンパ節試験において、遅延性接触過敏症を誘発しないと判断された。

7. 光毒性・光感作性

モルモットを用いた経皮投与による光毒性及び光感作性試験

試験番号 : ██████████
 試験施設 : ██████████
 試験責任者 : ██████████
 報告 : ████████年███月███日
 ガイドライン : OECDNo. 429(2002)

【試験方法】

25 匹の Dunkin-Hartley 系雄モルモットを以下のとおり 4 群準備した。

試験群	動物数	感作段階 (6 回適用-1~8 日)		惹起適用 (29 日)	
		投与	照射	投与	照射
1	5	—	UV A + UV B	—	UV A or UV B
2	5	被験物質	—	被験物質	—
3	10	被験物質	UV A + UV B	被験物質	UV A or UV B
4	5	溶媒	UV A + UV B	溶媒	UV A or UV B

本品の光毒性誘発能は、全群の動物について 1 日目に行われた最初の投与及び/あるいは紫外線照射後に評価した。皮膚反応を単回適用及び/あるいは紫外線照射の前、及び 1, 4 及び 24 時間後に採点した。

光アレルギー誘発能は次の通り評価した：

- ・ 8 日間の感作期間中、6 回の局所適用及び/あるいは UV A + UV B 照射（光毒性誘発能評価のためのそれらを含む）は、全群の動物の肩甲骨間の皮膚領域（9cm²）に対し実施した。
- ・ 20 日間の休息期間中、動物に投与及び紫外線照射は行わなかった。
- ・ 29 日目に惹起は、動物の後背部の右（UV A）及び左（UV B）腹側部（各 4cm²）に局所適用及び/あるいは紫外線照射によって実施した。

各投与は、プロピレングリコール中に 10% (w/w) の濃度の本品を含有する溶液を 0.1mL の投与容量で経皮適用した。UV A 及び UV B の照射線量は、紅斑を誘発する下限線量であった。惹起適用及びあるいは、紫外線照射の前、及び 1, 4, 24, 及び 48 時間後の適用部位の皮膚反応を評価した。

皮膚反応は以下の評価システムに従って採点した：

- ・ 紅斑なし..... 0
- ・ 疑わしい紅斑（紅斑誘発下限線量）..... 0.5
- ・ 散在性あるいは斑点状紅斑..... 1
- ・ 中等度及び集簇性紅斑..... 2
- ・ 高度の紅斑..... 3

【結果】

試験期間中に、一般状態変化及び死亡は認められなかった。

投与動物の体重増加量は、対照群の動物と同等であった。

光毒性誘発能：1及び2日目の光毒性反応評価結果要約

群	動物番号	投与前	1日目 1時間後	1日目 4時間後	2日目 24時間後
1 照射のみ	81	0	1	1	1
	82	0	1	1	0
	83	0	0	0	0
	84	0	1	1	0
	85	0	1	0.5	0
2 本品	86	0	1	1	1
	87	0	1	1	0
	88	0	1	1	0
	89	0	0	0	0
	90	0	1	1	1
3 本品 及び照射	91	0	0	0	0
	92	0	0	0	0
	93	0	2	1	0
	94	0	1	1	0
	95	0	1	1	1
	96	0	0.5	0.5	0
	97	0	0.5	0.5	0
	98	0	1	1	0
	99	0	0.5	0.5	1
	100	0	0.5	0.5	0
4 溶媒 及び照射	101	0	0.5	0.5	0
	102	0	1	2	1
	103	0	0.5	0.5	0
	104	0	0.5	0.5	0.5
	105	0	0.5	1	0

第1群の対照群（紫外線照射のみ）において、疑わしい紅斑あるいは散在性の紅斑が、1及び4時間後の判定時に4/5例の動物及び24時間後の判定時に1/5例の動物に認められた。

第2群の対照群（投与のみ）において、1及び4時間後の判定時に4/5例の動物に散在性の紅斑が認められた；これは2/5例において24時間後の判定時まで持続した。

第3群の投与群（投与及び紫外線照射）において、疑わしい～中等度の紅斑が1及び4時間後の判定時に8/10例の動物に記録された；これは2/10例の動物において、24時間後の判定時まで持続した。

第4群の対照群（溶媒投与及び紫外線照射）において、疑わしい～中等度の紅斑が1及び4時間後の判定時に全動物に認められ、24時間後の判定時には2/5例の動物に認められた。

被験物質の光刺激性反応に起因する皮膚反応は記録されなかった。

光アレルギー誘発能：29日目～31日目までの光アレルギー反応評価結果要約

群	動物 番号	投与前		29日目 1時間後		29日目 4時間後		30日目 24時間後		31日目 48時間後	
		LF	RF	LF	RF	LF	RF	LF	RF	LF	RF
1 照射	81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	82	0	0	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0
	83	0	0	0.5	1	0	1	0	0.5	0	0
	84	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5
	85	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0
2 被験物質	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 被験物質 及び照射	91	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0
	92	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0
	93	0	0	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0
	94	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5
	95	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0
	96	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0	0.5
	97	0	0	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0
	98	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	1
	99	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0
	100	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0
4 溶媒 及び照射	101	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0
	102	0	0	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0
	103	0	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0	0
	104	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5
	105	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0	0.5

LF：左腹側 (UV B) RF：右腹側 (UV A)

第1群の対照群（紫外線照射のみ）において、疑わしいあるいは散在性の紅斑が、1、4、24及び48時間の判定時にそれぞれ4/5、2/5、2/5及び1/5例の動物の片側あるいは両側の腹側部に認められた。

第2群の対照群（投与のみ）において、皮膚反応は認められなかった。

第3群の投与群（投与及び紫外線照射）において、疑わしいあるいは散在性の紅斑が、1、4、24及び48時間の判定時にそれぞれ10/10、7/10、2/10及び3/10例の動物の片側あるいは両側の腹側部に認められた。被験物質の光アレルギー反応に起因した皮膚反応は観察されなかった。

第4群の対照群（溶媒投与及び紫外線照射）において、疑わしいあるいは散在性の紅斑が、1、4、24及び48時間の判定時にそれぞれ5/5、5/5、4/5及び2/5例の動物の片側あるいは両側の腹側部に認められた。

【結論】

本実験条件下において、本品の局所適用及びその後の紫外線照射は、モルモットに対し光毒性あるいは光アレルギー反応を誘発しなかった。

ウサギの眼刺激性反応結果要約

動物 番号	眼の 部位	反応	スコア				平均刺激性 スコア (1)	刺激性評価 (+) (-)
			1 時間	24 時間	48 時間	72 時間		
			1 日目	2 日目	3 日目	4 日目		
901	結膜	浮腫	2	1	0	0	0.3	(-)
		発赤	2	2	1	0	1.0	(-)
		分泌物	2	0	0	0	0.0	
	虹彩		1	0	0	0	0.0	(-)
	角膜混濁	強さ	0	0	0	0	0.0	(-)
		範囲	0	0	0	0	0.0	
	その他		Su	*	*	*		
	フルオレセイン		/	U	/	/		
929	結膜	浮腫	1	0	0	0	0.0	(-)
		発赤	0	1	0	0	0.3	(-)
		分泌物	1	0	0	0	0.0	
	虹彩		0	0	0	0	0.0	(-)
	角膜混濁	強さ	0	0	0	0	0.0	(-)
		範囲	0	0	0	0	0.0	
	その他		Su	*	*	*		
	フルオレセイン		/	U	/	/		
930	結膜	浮腫	1	1	0	0	0.3	(-)
		発赤	1	0	0	0	0.0	(-)
		分泌物	1	0	0	0	0.0	
	虹彩		0	0	0	0	0.0	(-)
	角膜混濁	強さ	0	0	0	0	0.0	(-)
		範囲	0	0	0	0	0.0	
	その他		Su	*	*	*		
	フルオレセイン		/	U	/	/		

(1) 2, 3, 4 日目の平均刺激性スコア

(+) = E. E. C. 基準により刺激性あり

(-) = E. E. C. 基準により刺激性なし

* = 無し

U = フルオレセイン バッチ No. H004

/ = フルオレセイン未使用

Su = 被験物質残留

8-2. ウサギを用いた眼刺激性試験（本品 10%配合クリーム製剤）

試験番号 : ██████
試験施設 : ██████████
試験責任者 : ██████████
報告 : █████年██月██日
ガイドライン : 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2011-2012

【試験方法】

NZW系ウサギ（雄）3匹を用いて評価した。

本品を10%配合した████クリーム0.1mlを右眼結膜嚢内に1回点眼した。左眼は無処置対照眼とした。

眼の反応を投与後約1、24、48、72および96時間に角膜、虹彩および結膜について肉眼および細隙灯顕微鏡で観察し、眼反応の評価表（Draizeの基準：1959年）に従い評価した。さらに投与後24時間にフローレス試験紙を用いたフルオレセイン染色による角膜異常の有無について観察した。眼刺激性の評価は、Kay and Calandraの方法を参照してその程度を区分した。投与後96時間に眼刺激性が認められなかったことから、実験を終了した。

【結果】

投与後1、24、48、72および96時間において、3例全例の角膜、虹彩および結膜等に眼刺激性は認められなかった。MTSはそれぞれ‘0’であった。

投与後24時間に実施したフルオレセインの染色による角膜検査では、全例とも角膜はフルオレセインに染色されず、角膜異常も認められなかった。

被験物質のMMTSは‘0’であり、Kay and Calandraの方法に従って眼に対する刺激性の暫定的評価は‘刺激性なし’と分類された。最終評価においても投与後24時間のMTSが‘0’であることから、同様に‘刺激性なし’と分類された。

【結論】

████クリームのウサギの眼に対する刺激性はないものと結論した。

9. 遺伝毒性

9-1. 細菌を用いた復帰突然変異試験

試験番号 : ██████████
試験施設 : ████████████████████
試験責任者 : ████████████████████
報告 : ███████ 年 █████ 月 █████ 日
ガイドライン : OECD No. 471 (1997) 及び EC ガイドライン 2000/32/EC, B.13/14 (2000) 及び日本国化審法「新規化学物質等に係る試験の方法について」(昭和 61 年)

【試験方法】

ネズミチフス菌株 TA 1535、TA 1537、TA 98、TA 100、TA 102 及び大腸菌株 WP2uvrA を使用して本品の変異原性をプレートあたり 62.5~1000µg の 5 段階濃度範囲で S9mix 代謝活性化あり/代謝活性化なしで調べた。予備試験及び 2 回の独立した変異原性試験によって評価された。予備試験、S9 mix 非存在下実験 I、II 及び S9 mix 存在下における実験 I は、プレート法に従って実施した。S9 mix 存在下における実験 II は、プレインキュベーション法で実施した。本品はジメチルスルホキシド (DMSO) で懸濁して各濃度を調製した。陰性対照は溶媒 (DMSO) のみとした。陽性対照は以下のとおりである。

陽性対照

代謝活性化なし (-S9mix)		
菌株	陽性対照物質	濃度
TA 100 TA 1535	アジ化ナトリウム (NaN ₃)	1.0 µg/プレート
TA 1537	9-アミノアクリジン (9AA)	50.0 µg/プレート
TA 98	2-ニトロフルオレン (2NF)	0.5 µg/プレート
TA 102	マイトマイシン C (MMC)	0.5 µg/プレート
WP2uvrA	4-ニトロキノリン-1-オキシド (4NQO)	2.0 µg/プレート
代謝活性化あり (+S9mix)		
菌株	陽性対照物質	濃度
TA 100 TA 1535 TA 1537 TA 98	2-アミノアントラセン (2AM)	2.0 µg/プレート
TA 102 WP2uvrA	2-アントラミン (2AM)	10.0 µg/プレート

[結果]

実験 I プレート法 S9Mix 存在/非存在下 試験結果要約

菌株	試験物質	用量 $\mu\text{g}/$ プレート	S9 mix	平均復帰コ ロニー数	S D	復帰 変異率	各復帰コロニー数
TA 1535	溶媒 DMSO		-	10	3		7, 12, 11
	本品	62.5	-	14	2	1.4	12, 14, 16
		125	-	13	7	1.3	13, 19, 6
		250	-	10	3	1.0	11 Mp, 12 Mp, 7 Mp
		500	-	16	2	1.6	17 Mp, 16 Mp, 14 Mp
		1000	-	9	4	0.9	10 Sp, 12 Sp, 5 Sp
	NaN ₃	1	-	475	13	47.5	464, 473, 499
	溶媒 DMSO		+	14	4		17, 10, 16
	本品	62.5	+	14	3	1.0	11, 16, 14
		125	+	10	3	0.7	7, 13, 10
		250	+	12	1	0.8	13, 11, 12
		500	+	17	2	1.2	16 Mp, 19 Mp, 16 Mp
		1000	+	13	3	0.9	16 Sp, 13 Sp, 10 Sp
	2AM	2	+	263	26	18.4	248, 249, 293
	TA 1537	溶媒 DMSO		-	3	3	
本品		62.5	-	3	2	0.8	1, 5, 2
		125	-	4	1	1.3	4, 4, 5
		250	-	4	3	1.2	1, 7, 4
		500	-	5	2	1.4	2 Mp, 6 Mp, 6 Mp
		1000	-	7	2	2.0	7 Sp, 5 Sp, 8 Sp
9AA		50	-	577	202	173.0	355, 749, 626
溶媒 DMSO			+	9	2		7, 8, 11
本品		62.5	+	6	6	0.7	1, 12, 4
		125	+	7	1	0.8	6, 7, 8
		250	+	5	1	0.6	5, 6, 5
		500	+	6	2	0.7	4 Mp, 7 Mp, 7 Mp
		1000	+	9	3	1.0	10 Sp, 11 Sp, 5 Sp
2AM		2	+	121	16	13.9	105, 137, 120
TA 98		溶媒 DMSO		-	18	5	
	本品	62.5	-	22	11	1.2	18, 34, 14
		125	-	17	6	0.9	24, 14, 12
		250	-	23	9	1.3	32, 22, 14
		500	-	12	3	0.6	13 Sp, 8 Sp, 14 Sp
		1000	-	20	6	1.1	24 Sp, 24 Sp, 13 Sp
	2NF	0.5	-	140	21	7.8	157, 147, 117
	溶媒 DMSO		+	20	6		25, 13, 22
	本品	62.5	+	18	7	0.9	26, 12, 16
		125	+	18	2	0.9	20, 16, 18
		250	+	18	6	0.9	18, 12, 24
		500	+	15	3	0.7	14 Mp, 12 Mp, 18 Mp
		1000	+	17	2	0.9	16 Sp, 19 Sp, 17 Sp
	2AM	2	+	1213	561	60.7	715, 1820, 1104

菌株	試験物質	用量 $\mu\text{g}/$ プレート	S9 mix	平均復帰コ ロニー数	S D	復帰 変異率	各復帰コロニー数
TA 100	溶媒 DMSO		-	74	9		84, 71, 66
	本品	62.5	-	82	13	1.1	97, 77, 73
		125	-	77	12	1.0	91, 73, 67
		250	-	98	9	1.3	92, 108, 95
		500	-	76	12	1.0	79 Mp, 62 Mp, 86 Mp
		1000	-	90	9	1.2	91 Sp, 98 Sp, 80 Sp
	NaN ₃	1	-	538	26	7.3	508, 552, 553
	溶媒 DMSO		+	106	7		105, 99, 113
	本品	62.5	+	103	20	1.0	119, 80, 109
		125	+	120	6	1.1	121, 113, 125
		250	+	104	12	1.0	91, 114, 108
		500	+	104	20	1.0	127 Mp, 95 Mp, 89 Mp
		1000	+	133	5	1.3	132 Sp, 138 Sp, 128 Sp
	2AM	2	+	1366	114	12.9	1448, 1413, 1236
	TA 102	溶媒 DMSO		-	420	16	
本品		62.5	-	368	27	0.9	340, 393, 371
		125	-	394	26	0.9	387, 372, 422
		250	-	429	7	1.0	425, 437, 425
		500	-	437	24	1.0	422 Mp, 465 Mp, 424 Mp
		1000	-	429	11	1.0	430 Sp, 418 Sp, 440 Sp
MMC		0.5	-	1628	48	3.9	1604, 1597, 1683
溶媒 DMSO			+	484	21		467, 477, 508
本品		62.5	+	510	23	1.1	515, 485, 531
		125	+	491	50	1.0	549, 467, 458
		250	+	494	53	1.0	514, 434, 534
		500	+	467	13	1.0	472 Mp, 453 Mp, 477 Mp
		1000	+	516	24	1.1	504 Sp, 544 Sp, 504 Sp
2AM		10g	+	2502	110	5.2	2513, 2607, 2387
WP2uvrA		溶媒 DMSO		-	27	1	
	本品	62.5	-	31	3	1.1	34, 29, 29
		125	-	34	3	1.2	32, 32, 37
		250	-	32	10	1.2	44, 29, 24
		500	-	26	4	1.0	31 Mp, 24 Mp, 23 Mp
		1000	-	28	8	1.0	20 Sp, 28 Sp, 35 Sp
	4NQO	2	-	397	35	14.5	411, 423, 357
	溶媒 DMSO		+	26	6		19, 20, 29
	本品	62.5	+	37	7	1.4	38, 44, 30
		125	+	33	4	1.3	34, 29, 36
		250	+	29	8	1.1	24, 25, 38
		500	+	38	5	1.5	38 Mp, 43 Mp, 34 Mp
		1000	+	32	3	1.2	35 Sp, 32 Sp, 30 Sp
	2AM	10	+	387	16	14.9	405, 383, 374

SD 標準偏差
- S-9 なし
+ S-9 あり

Mp 中等度沈殿
Sp 強度沈殿

実験 II S9Mix 非存在下プレート法 S9Mix 存在下プレインキュベーション法 試験結果要約

菌株	試験物質	用量 μ g/ プレート	S9 mix	平均復帰コ ロニー数	S D	復帰 変異率	各復帰コロニー数
TA 1535	溶媒 DMSO		-	9	3		11, 11, 6
	本品	62.5	-	15	4	1.6	12, 13, 19
		125	-	14	4	1.5	10, 18, 14
		250	-	13	3	1.4	11, 13, 16
		500	-	17	7	1.8	17 Mp, 23 Mp, 10 Mp
		1000	-	18	5	1.9	23 Sp, 13 Sp, 17 Sp
	NaN ₃	1	-	550	32	58.9	567, 513, 570
	溶媒 DMSO		+	36	7		14, 24, 11
	本品	62.5	+	21	1	1.3	20, 22, 22
		125	+	21	8	1.3	20, 14, 30
		250	+	20	3	1.2	22, 17, 22
		500	+	18	3	1.1	14 Mp, 20 Mp, 20 Mp
		1000	+	20	2	1.2	20 Sp, 19 Sp, 22 Sp
	2AM	2g	+	203	19	12.4	216, 213, 181
	TA 1537	溶媒 DMSO		-	4	2	
本品		62.5	-	4	3	0.9	2, 7, 2
		125	-	5	1	1.2	6, 4, 4
		250	-	3	2	0.8	4, 4, 1
		500	-	4	2	1.0	2 Mp, 5 Mp, 5 Mp
		1000	-	7	1	1.8	7 Sp, 6 Sp, 8 Sp
9AA		50g	-	378	26	94.6	408, 359, 368
溶媒 DMSO			+	5	1		5, 5, 4
本品		62.5	+	6	3	1.4	10, 5, 4
		125	+	5	1	1.1	6, 6, 4
		250	+	7	1	1.6	7, 8, 7
		500	+	5	5	1.0	10 Mp, 2 Mp, 2 Mp
		1000	+	9	4	1.9	8 Sp, 6 Sp, 13 Sp
2AM		2	+	107	19	23.0	123, 108, 91
TA 98		溶媒 DMSO		-	17	6	
	本品	62.5	-	18	5	1.1	20, 22, 12
		125	-	17	6	1.0	23, 16, 11
		250	-	20	3	1.2	17, 22, 20
		500	-	19	6	1.1	25 Mp, 18 Mp, 14 Mp
		1000	-	21	2	1.2	18 Sp, 22 Sp, 22 Sp
	2NF	0.5	-	171	23	10.1	149, 194, 171
	溶媒 DMSO	2	+	20	2		20, 19, 22
	本品	62.5	+	27	8	1.3	36, 24, 20
		125	+	21	7	1.0	16, 29, 19
		250	+	23	5	1.2	24, 30, 20
		500	+	17	4	0.8	13 Mp, 17 Mp, 20 Mp
		1000	+	32	10	1.6	23 Sp, 43 Sp, 31 Sp
	2AM	2	+	1357	110	66.7	1254, 1344, 1473

菌株	試験物質	用量 μ g/ プレート	S9 mix	平均復帰コ ロニー数	S D	復帰 変異率	各復帰コロニー数
TA 100	溶媒 DMSO		-	105	3		108, 102, 105
	本品	62.5	-	110	7	1.0	104, 117, 109
		125	-	127	18	1.2	110, 146, 126
		250	-	111	4	1.1	115, 108, 109
		500	-	117	14	1.1	129 Mp, 102 Mp, 119 Mp
		1000	-	121	16	1.2	110 Sp, 115 Sp, 139 Sp
	NaN ₃	1	-	589	19	5.6	582, 574, 610
	溶媒 DMSO		+	105	4		102, 110, 103
	本品	62.5	+	114	4	1.1	116, 117, 109
		125	+	115	13	1.1	102, 128, 114
		250	+	117	13	1.1	132, 111, 109
		500	+	121	4	1.2	125 Mp, 117 Mp, 122 Mp
		1000	+	122	15	1.2	139 Sp, 111 Sp, 115 Sp
	2AM	2	+	1391	18	13.2	1411, 1375, 1386
	TA 102	溶媒 DMSO		-	298	6	
本品		62.5	-	312	19	1.0	291, 320, 326
		125	-	327	16	1.1	343, 311, 326
		250	-	363	11	1.2	361, 375, 353
		500	-	348	23	1.2	349 Mp, 371 Mp, 325 Mp
		1000	-	361	14	1.2	350 Sp, 377 Sp, 356 Sp
MMC		0.5	-	1357	27	4.6	1363, 1381, 1328
溶媒 DMSO			+	530	12		534, 540, 516
本品		62.5	+	445	35	0.8	423, 485, 424
		125	+	519	27	1.0	491, 545, 522
		250	+	547	53	1.0	486, 572, 584
		500	+	444	34	0.8	414 Mp, 437 Mp, 481 Mp
		1000	+	471	19	0.9	449 Sp, 481 Sp, 483 Sp
2AM		10	+	1879	67	3.5	1841, 1957, 1840
WP2uvrA		溶媒 DMSO		-	25	10	
	本品	62.5	-	26	2	1.0	25, 28, 24
		125	-	28	14	1.1	41, 30, 13
		250	-	39	20	1.6	62, 32, 23
		500	-	30	5	1.2	30 Mp, 25 Mp, 26 Mp
		1000	-	35	4	1.4	38 Sp, 35 Sp, 31 Sp
	4NQO	2	-	188	14	7.6	178, 182, 204
	溶媒 DMSO		+	38	9		43, 43, 28
	本品	62.5	+	34	12	0.9	47, 32, 23
		125	+	42	4	1.1	38, 42, 46
		250	+	32	6	0.9	35, 26, 36
		500	+	45	6	1.2	52 Mp, 41 Mp, 43 Mp
		1000	+	36	9	0.9	26 Sp, 44 Sp, 38 Sp
	2AM	10	+	210	20	5.5	190, 211, 230

SD 標準偏差 - S-9なし + S-9あり Mp 中等度沈殿 Sp 強度沈殿

上記の結果のとおり、本品は S9Mix 存在下・非存在下とも 6 種のいずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数の有意な増加を誘発しなかった。

【結論】

本品は代謝活性の有無にかかわらず、すべての濃度において両試験ともネズミチフス菌、大腸菌いずれにおいても変異原性なしと判断された。

9-2. 哺乳動物細胞の培養ヒトリンパ球での in vitro 染色体異常試験

試験番号 : ██████████
試験施設 : ████████████████████
試験責任者 : ██████████
報告 : ███████ 年 █████ 月 █████ 日
ガイドライン : OECD No. 473 (1997) 及び ICH ガイドライン 医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンスについて (1995)、遺伝毒性試験: 医薬品の遺伝毒性試験の標準的組み合わせ (1997)

【試験方法】

本品の染色体異常誘発能を S9 mix の存在下及び非存在下における 2 回の独立した実験 (実験 I、実験 II) により評価した。

実験 I において、リンパ球培養は、本品 (3.91、7.81、15.6、31.3、62.5、125、250 及び 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) あるいは対照物質 (S9 mix 存在下及び非存在下) に 3 時間暴露させた後洗浄した。細胞は、正常な細胞周期の約 1.5 倍に相当する投与開始後 20 時間で回収した。

実験 II は以下の通り実施した：

- S9 mix 非存在下では、標本作製時間まで継続して本品 (15.6、31.3、62.5、125、250 及び 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) あるいは対照物質に細胞を暴露させた。
- S9 mix 存在下では、本品 (上記と同じ濃度) あるいは対照物質に細胞を 3 時間暴露させた後、洗浄した。

細胞は、正常な細胞周期の約 1.5 倍に相当及びさらにその 24 時間後に相当するそれぞれ投与開始後 20 時間及び 44 時間に回収した。

細胞回収の 1.5 時間前に、各培養にコルセミド溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えて、細胞分裂を分裂中期で停止させた。低張処理後、細胞を固定しスライドグラスに展開、ギムザ染色した後、被験物質及び溶媒対照の各培養について染色体異常を分析した。本品は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に懸濁させた。

陽性対照物質の用量は以下の通り：

- S9 mix 非存在下：マイトマイシン 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3 時間処理) あるいは 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (連続処理)。
- S9 mix 存在下：シクロホスファミド 12.5 及び 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

[結果] 染色体試験結果要約

実験 I (S9 mix 非存在下: 3 時間暴露、20 時間回収) 結果

処理濃度 μg/mL	スライド番号	観察細胞数	数的異常	染色体構造異常 (型ならびに数)							染色体構造異常細胞					
				G	染色分体		染色体		多発異常	粉砕	合計 +G	合計 -G	数 +G	平均 %	数 -G	平均 %
					欠失	交換	欠失	交換								
0	9M	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0.0	
	22F	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0.0	
125	15M	100	0	0	1	0	0	0	0	0	4	4	2	1.5	2	1.5
	20F	100	0	0	1	0	2	0	0	0	4	4	1	1.5	1	1.5
250	40M	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1.0	0	1.0
	5F	100	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1.0	2	1.0
500	6M	100	0	0	2	0	2	0	0	0	2	2	2	1.0	2	1.0
	38F	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1.0	0	1.0
MMC 3	41M	50	0	1	30	23	0	0	1	0	98	97	32	54.0	32	54.0
	33F	50	0	0	28	12	2	0	1	0	98	97	22	54.0	22	***

G: ギャップ, M: 男性, F: 女性, 0: 溶媒対照 (DMSO), MMC: Mytomycin C

統計解析: X²テスト ***: p<0.001 (ギャップを除く構造異常細胞についてのみ実施)

実験 II (S9 mix 非存在下: 20 時間暴露、20 時間回収) 結果

処理濃度 μg/mL	スライド番号	観察細胞数	数的異常	染色体構造異常 (型ならびに数)							染色体構造異常細胞					
				G	染色分体		染色体		多発異常	粉砕	合計 +G	合計 -G	数 +G	平均 %	数 -G	平均 %
					欠失	交換	欠失	交換								
0	46M	100	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	2	1.0	2	1.0
	65F	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1.0	0	1.0
125	47M	100	0	0	1	0	0	0	0	0	3	3	1	1.5	1	1.5
	60F	100	0	0	2	0	0	0	0	0	3	3	2	1.5	2	1.5
250	54M	100	0	0	3	0	0	0	0	0	4	4	3	2.0	3	2.0
	75F	100	0	0	1	0	0	0	0	0	4	4	1	2.0	1	2.0
500	62M	100	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0.5	1	0.5
	48F	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.5	0	0.5
MMC 0.2	50M	50	0	0	9	3	0	0	0	0	26	26	11	21.0	11	21.0
	61F	50	0	0	9	3	2	0	0	0	26	26	10	21.0	10	***

G: ギャップ, M: 男性, F: 女性, 0: 溶媒対照 (DMSO), MMC: Mytomycin C

統計解析: X²テスト ***: p<0.001 (ギャップを除く構造異常細胞についてのみ実施)

実験 II (S9 mix 非存在下: 44 時間暴露、44 時間回収) 結果

処理濃度 μg/mL	スライド番号	観察細胞数	数的異常	染色体構造異常 (型ならびに数)							染色体構造異常細胞					
				G	染色分体		染色体		多発異常	粉砕	合計 +G	合計 -G	数 +G	平均 %	数 -G	平均 %
					欠失	交換	欠失	交換								
0	88M	100	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	1	1.0	1	1.0
	98F	100	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	1	1.0	1	1.0
500	95M	100	0	0	2	0	0	0	0	0	3	3	2	1.5	2	1.5
	82F	100	0	0	1	0	0	0	0	0	3	3	1	1.5	1	1.5

G: ギャップ, M: 男性, F: 女性, 0: 溶媒対照 (DMSO)

統計解析: X²テスト (ギャップを除く構造異常細胞についてのみ実施)

実験 I (S9 mix 存在下 : 3 時間暴露、20 時間回収) 結果

処理 濃度 μ μ g/mL	スライド 番号	観察 細胞 数	数的 異常	染色体構造異常 (型ならびに数)								染色体構造異常細胞					
				G	染色分体		染色体		多 発 異 常	粉 碎	合 計 +G	合 計 -G	数 +G	平均 %	数 -G	平均 %	
					欠 失	交 換	欠 失	交 換									
0	28M	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	17F	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125	12M	100	0	0	2	0	1	0	0	0	3	3	3	1.5	3	0	1.5
	10F	100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	31M	100	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0.5	1	0	0.5
	30F	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	39M	100	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0.5	1	0	0.5
	14F	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CPA 12.5	11M	50	0	2	28	7	1	0	0	0	71	68	17	38.0	17	0	38.0
	37F	50	0	1	28	3	1	0	0	0	0	0	21	38.0	21	0	***

G : ギャップ、M : 男性、F : 女性、0 : 溶媒対照 (DMSO)、CPA : Cyclophosphamide
統計解析 : X²テスト *** : p<0.001 (ギャップを除く構造異常細胞についてのみ実施)

実験 II (S9 mix 存在下 : 3 時間暴露、20 時間回収) 結果

処理 濃度 μ μ g/mL	スライド 番号	観察 細胞 数	数的 異常	染色体構造異常 (型ならびに数)								染色体構造異常細胞					
				G	染色分体		染色体		多 発 異 常	粉 碎	合 計 +G	合 計 -G	数 +G	平均 %	数 -G	平均 %	
					欠 失	交 換	欠 失	交 換									
0	52M	100	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0.5	1	0	0.5
	45F	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125	44M	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.5	0	0	0.5
	76F	100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.5	1	0	0.5
250	70M	100	0	0	2	0	0	0	0	0	4	4	2	2.0	2	0	2.0
	51F	100	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2.0	2	0	2.0
500	74M	100	0	0	2	0	0	0	0	0	3	3	2	1.5	2	0	1.5
	58F	100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.5	1	0	0.5
CPA 12.5	57M	50	0	1	12	2	1	0	0	0	39	38	14	28.0	13	0	27.0
	49F	50	0	0	21	2	0	0	0	0	0	0	14	28.0	14	0	***

G : ギャップ、M : 男性、F : 女性、0 : 溶媒対照 (DMSO)、CPA : Cyclophosphamid
統計解析 : X²テスト *** : p<0.001 (ギャップを除く構造異常細胞についてのみ実施)

実験 III (S9 mix 非存在下 : 3 時間暴露、44 時間回収) 結果

処理 濃度 μ μ g/mL	スライド 番号	観察 細胞 数	数的 異常	染色体構造異常 (型ならびに数)								染色体構造異常細胞					
				G	染色分体		染色体		多 発 異 常	粉 碎	合 計 +G	合 計 -G	数 +G	平均 %	数 -G	平均 %	
					欠 失	交 換	欠 失	交 換									
0	84M	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1.0	0	0	1.0
	78F	100	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	1.0	0	0	1.0
500	91M	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.5	2	0	0.5
	81F	100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.5	0	0	0.5

G : ギャップ、M : 男性、F : 女性、0 : 溶媒対照 (DMSO)
統計解析 : X²テスト (ギャップを除く構造異常細胞についてのみ実施)

500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量において、培養液中に中等度の沈殿が認められた。この用量における pH 及び浸透圧は溶媒対照の培養と同等であった。

処理期間終了時に軽度～中等度の沈殿が全般的に 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で認められた。

S9 mix 非存在下における実験

細胞毒性：

3 時間処理後、軽度～高度な分裂指数の減少が認められたが、明確な用量反応関係はなかった（26-62%の減少）。20 時間回復処理後、軽度な分裂指数の減少が 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に認められた（33%の減少）。44 時間回復処理後、分裂指数の減少はいずれの用量においても認められなかった。

分裂中期像の分析：

分裂中期像の分析に選択した用量は次の通りであった：

- ・ 3 時間処理において 125、250 及び 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を選択。500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は 62%の分裂指数の減少を誘発し、達成可能な最高適用濃度であった。
- ・ 20 時間処理において、125、250 及び 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を選択。500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は達成可能な最高適用濃度であった。
- ・ 44 時間処理において、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を選択。この用量は、達成可能な最高用量であった。

試験を通して、注目すべき数値的異常の増加はみられなかった。

染色体構造異常を有する細胞の発生頻度の有意な増加は、3、20 及び 44 時間処理において認められなかった。

S9 mix 存在下における実験

細胞毒性：

実験 I の標本作製時間 20 時間において、軽度～中等度の分裂指数の減少が認められたが、明確な用量反応関係はなかった（26-43%の減少）。

実験 II の標本作製時間 20 時間において、分裂指数の中等度の減少が 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で認められた（45%の減少）。

44 時間後の標本作製時間において、軽度～中等度の分裂指数の減少がみられたが、明確な用量反応関係はなかった（25-39%の減少）。

分裂中期像の分析：

分裂中期像の分析のために選択した用量は次の通りであった：

- ・ 両試験の標本作製時間 20 時間において、125、250 及び 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を選択。500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は、達成可能な最高適用濃度であり、実験 I 及び II でそれぞれ 43%及び 45%の分裂指数の減少を誘発した。
- ・ 標本作製時間 44 時間において、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を選択。この用量は達成可能な最高用量であり、39%の分裂指数の減少を誘発した。

【結論】

試験を通して、注目すべき数値的異常の増加はみられなかった。

本実験条件下において、本品は培養ヒトリンパ球に対し染色体異常を誘発しなかった。

9-3. 光遺伝毒性

9-3. ネズミチフス菌での光復帰突然変異試験

試験番号 : ██████
 試験施設 : ████████████████████
 試験責任者 : ████████████████
 報告 : █████年██月██日
 ガイドライン : OECD No. 471 (1997), Commission Directive 2000/32/EC L1362000, Annex 4D (2000), SCC guide CSC/803-5/90 (1990), Guideline for assessing the potential for toxicity of compounds used as sunscreen agents in Cosmetics, Annex 1, Committee for Proprietary Medicinal Products: Note for guidance on photosafety Testing (CPMP/SWP/398/01, 2002)

[試験方法]

人工太陽光を用いた照射下での遺伝子復帰突然変異性誘発能を検討するためにネズミチフス菌 TA1537、TA98、TA100 及び TA102 を用いて二つの独立した試験: プレート法 (実験 I) 及びプレインキュベーション法 (実験 II) を実施した。

本品は以下の濃度で試験した: 33; 100; 333; 1000; 2500 及び 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
 溶媒にはアセトンを使用した。各プレートにつき培養後復帰コロニー数を計測した。

紫外線照射は、擬似太陽光のスペクトルを連続照射するキセノン・ランプ (Sunset CPS, ATLAS, d-63558 Gelnhausen) を用いて実施した。各細菌の目標線量は下記の通り:

照射強度: 0.1 - 0.3 mW/cm^2

試験菌株	照射線量範囲	
	UVA (mJ/cm^2)	UVB (mJ/cm^2)
TA1537	49.5	1.8
TA98	27*	1
TA100	6	0.22
TA102	81	3

陽性対照は以下の通りである。

紫外線非照射下		
菌株	陽性対照物質	濃度 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
TA 100	アジ化ナトリウム (NaN_3)	10
TA 1537 TA98	4-ニトロ-o-フェニレンジアミン (4-NOPD)	TA 1537:50 TA98:10
TA 102	メタンスルホン酸メチル (MMS)	4
紫外線照射下		
菌株	陽性対照物質	濃度
TA 102	8-メトキシブソラレン (8-MOP)	125

【結果】光復帰突然変異試験結果要約

実験Ⅰ プレート法結果

	試験群	用量 μg/プレート	復帰突然変異体数/プレート (平均±標準偏差)				
			TA 1537	TA 98	TA 100	TA 102	
非照射	アセトン		10±4	20±4	135±20	347±29	
	未処理		11±4	22±5	130±15	299±35	
	4-NOPD	10		217±14			
	4-NOPD	50	55±4				
	NaN ₃	10			1865±56		
	MMS	4				4865±395	
照射	アセトン		13±6	36±6	217±7	538±39	
	未処理		15±1	36±7	224±33	565±46	
	被験物質	33	33	11±3	24±3	212±27	527±104
		100	100	12±8	36±8	231±31	674±23
		333	333	15±5 ^{PM}	30±5 ^{PM}	204±19 ^{PM}	606±19 ^{PM}
		1000	1000	16±3 ^{PM}	29±4 ^{PM}	188±27 ^{PM}	430±42 ^{PM}
		2500	2500	15±4 ^{PM}	34±2 ^{PM}	213±11 ^{PM}	464±35 ^{PM}
		5000	5000	15±2 ^{PM}	28±6 ^{PM}	207±13 ^{PM}	296±66 ^{PM}
	8-MOP	125				2662±150	

実験Ⅱ プレインキュベーション法結果

	試験群	用量 μg/プレート	復帰突然変異体数/プレート (平均±標準偏差)				
			TA 1537	TA 98	TA 100	TA 102	
非照射	アセトン		10±3	26±4	151±13	280±11	
	未処理		11±8	33±10	151±12	304±7	
	4-NOPD	10		352±22			
	4-NOPD	50	97±9				
	NaN ₃	10			1927±32		
	MMS	4				1925±21	
照射	アセトン		11±3	26±3	140±6	315±19	
	未処理		14±2	23±3	168±23	282±27	
	被験物質	33	33	10±2	28±5	151±18	320±55
		100	100	11±5	29±7	144±10	342±2
		333	333	11±3	32±3	145±9	350±25
		1000	1000	8±2 ^{PM}	23±3 ^{PM}	168±18 ^{PM}	237±15 ^{PM}
		2500	2500	8±3 ^{PM}	19±2 ^{PM}	120±12 ^{PM}	229±11 ^{PM}
		5000	5000	9±2 ^{PM}	18±6 ^{PM}	123±12 ^{PM}	219±12 ^{PM}
	8-MOP	125				1976±64	

P 沈殿 M マニュアル計測

陽性対照： NaN₃：アジ化ナトリウム、MMS：硫酸メチルメタン、8-MOP：8-メトキシプソラレン

4-NOPD：4-ニトロ-o-フェニレンジアミン

4種の試験菌株のいずれにおいても人工太陽灯を用いた照射下で本品を処置した全濃度において、復帰変異コロニー数の実質的な増加は認められなかった。

予備試験において、非照射下の TA102 菌株の陰性及び溶媒対照群のコロニー数が当研究所の歴史的背景対照データの範囲をわずかに上回った。実験Ⅱにおいて、照射下の TA102 菌株の陰性及び溶媒対照群のコロニー数が歴史的背景対照データの範囲に達しなかった。これらの逸脱は非常に小さなものであったことから、これらの影響はコロニー数の生物学的重要性をもたない変動に基づくものと判断され、試験の結果に影響を与えなかったと判断された。

【結論】

本試験条件下において、本品は、使用した菌株の塩基対置換型あるいはフレームシフト型の遺伝子突然変異を誘発しないと判断された。

9-4. 光遺伝毒性

9-4. チャイニーズハムスター卵巣細胞での光染色体異常試験

試験番号 : [REDACTED]
試験施設 : [REDACTED]
試験責任者 : [REDACTED]
報告 : [REDACTED] 年 [REDACTED] 月 [REDACTED] 日
ガイドライン : OECD No. 473 (1997), Commission Directive 2000/32/EC L1362000, Annex 4A (2000), SCC guide CSC/803-5/90 (1990), Guideline for assessing the potential for toxicity of compounds used as sunscreen agents in Cosmetics, Annex 1, Committee for Proprietary Medicinal Products: Note for guidance on photosafety Testing (CPMP/SWP/398/01, 2002)

[試験方法]

本品の紫外線照射下 (UVA/UVB) での染色体異常誘発性の試験および評価のため、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 培養細胞 V79 を使い、独立した 2 回の試験 (実験 I, II) を以下の条件で実施した。

光染色体異常試験の条件

	照射下			非照射下	
	実験 I	実験 II		実験 I	実験 II
被験物質と細胞の前培養	30 分間	30 分間	30 分間	30 分間	30 分間
照射強度 (UVA)	0.3 mW/cm ²	0.3 mW/cm ²	0.3 mW/cm ²	0 mW/cm ²	0 mW/cm ²
UVA/UVB 線量 [mj/cm ²]	125/4.5	125/6.5	200/10.4	0/0	0/0
総暴露期間	3 時間	3 時間	3 時間	3 時間	3 時間
回復期間	15 時間	25 時間	25 時間	15 時間	25 時間
標本作製時間	18 時間	28 時間	28 時間	18 時間	28 時間

本品はテトラヒドロフラン (THF) に溶解して試験液とし、培養細胞中に 1.3~15.0 μg/mL とするように加えた。陰性対照は HBSS (Hanks Buffered Salt Solution)、溶媒対照は HBSS/THF を用いた。陽性対照は照射する場合は 8-メトキシプソラレン (8-methoxypsoralene; 8-MOP)、照射しない場合はエチルメタンスルホン酸 (Ethyl methane sulfonate; EMS) を用いた。

照射開始時から 30 分後に試験液は除去し、培地を加えて上記条件の時間回復させた。回復後細胞を回収し、染色体異常の細胞数を数えた。

【結果】光染色体異常試験の結果要約

実験	標本作製時間	被験物質の濃度 (μg/ml)	倍数体細胞 (%)	細胞数 (%)	分裂指数 (%)	異常細胞 (%)		
						ギャップを含む	ギャップを除く*	交換
非照射、暴露時間 3 時間								
I	18 時間	陰性対照	1.4	n. t.	100	1.5	1.0	0.0
		溶媒対照 ¹	1.5	100	100	0.5	0.0	0.0
		陽性対照 ²	1.2	n. t.	90	15.0	15.0 ^s	3.0
		1.3	1.8	102	107	2.5	2.5 ^s	0.0
		2.5	1.4	77	108	1.0	0.0	0.0
		5.0 ^p	2.3	103	96	3.0	2.0 ^s	0.5
UVA/UVB 125/4.5 mJ/cm ² 照射、暴露時間 3 時間								
I	18 時間	陰性対照	1.8	n. t.	100	1.0	1.0	0.5
		溶媒対照 ¹	2.0	100	100	2.5	2.0	1.0
		陽性対照 ³	1.3	n. t.	99	13.5	11.5 ^s	3.0
		1.3	2.8	95	117	1.5	1.5	0.5
		2.5	2.0	99	111	1.5	1.0	0.0
		5.0 ^p	1.8	91	127	3.0	2.0	0.5
非照射、暴露時間 3 時間								
II	28 時間	陰性対照	3.3	n. t.	100	1.5	1.0	0.5
		溶媒対照 ¹	2.7	100	100	2.0	1.5	0.0
		陽性対照 ²	1.6	n. t.	78	21.0	20.5 ^s	7.0
		1.3	2.8	123	104	0.5	0.0	0.0
		2.5	2.1	145	105	1.0	0.5	0.0
		5.0 ^p	1.9	115	107	0.5	0.5	0.0
UVA/UVB 125/6.5 mJ/cm ² 照射、暴露時間 3 時間								
II	28 時間	陰性対照	2.0	n. t.	100	1.0	0.5	0.0
		溶媒対照 ¹	2.1	100	100	2.5	1.5	0.0
		陽性対照 ³	1.2	n. t.	72	10.0	10.0 ^s	4.5
		1.3	2.2	118	88	0.5	0.5	0.0
		2.5	1.2	99	88	1.0	0.5	0.0
		5.0 ^p	1.8	115	107	1.5	1.5	0.5
UVA/UVB 200/10.4 mJ/cm ² 照射、暴露時間 3 時間								
II	28 時間	陰性対照	2.9	n. t.	100	4.0	3.0	1.0
		溶媒対照 ¹	1.1	100	100	7.0	6.5	0.5
		陽性対照 ^{3**}	3.4	n. t.	22	91.0	91.0 ^s	2.0
		1.3***	2.4	73	111	7.0	6.3	1.5
		2.5***	1.9	103	107	5.3	5.0	0.8
		5.0 ^{p***}	2.5	100	105	5.3	4.0	0.8

* : 交換を有する細胞を含む

** : 重度の染色体異常誘発性のため、培養当り 50 個の良く拡がった分裂中期像を観察

*** : データが不均一のため、培養当り 200 個の良く拡がった分裂中期像を観察

n. t. 未試験 p 沈澱 s 異常の出現頻度が溶媒対照値に比して統計学的に有意に高い

溶媒対照 1 : THF 0.5% (v/v) 陽性対照 2 : EMS 400 μg/ml 3 : 8-メトキシピソラレン 0.5 μg/ml

実験Ⅰ及びⅡにおいて、照射の有無にかかわらず、被験物質処理による染色体構造異常を有する細胞数の生物学的有意性の増加は観察されなかった。しかしながら、実験Ⅰの非照射条件下において、2用量に統計学的に重要な増加（それぞれ2.5%及び2.0%）が認められが、非照射下で培養した当試験施設の歴史的対照データの範囲内（ギャップを除く異常細胞数0.0-4.0%）であったため、これらの変化は生物学的重要性はないものと考えられた。被験物質処理による倍数体を有する分裂中期細胞の発生頻度の明らかな増加は、対照群の発生頻度及び当試験施設の歴史的対照データの範囲と比較した場合に認められなかった。

【結論】

紫外線照射下及び非照射下での本染色体異常試験において本品は、沈澱がみられる濃度まで試験した場合に光染色体異常誘発物質ではないと判断される。本試験条件下において、倍数性及び異数性の増加は発現しなかった。

10. ヒトパッチ

ヒト皮膚に対するパッチテスト

本品を 50%含む***■** 製剤の 20%溶液（精製水で希釈、本品濃度 10%）及び **■** 製剤を 20% 配合したサンスクリーン製剤（本品濃度 10%）を用いてヒトパッチ試験を実施した。各々の対照として、本品を含まない **■** 基剤（**■** から本品を除いたもの）の 20%水溶液、**■** 基剤配合（20%）サンスクリーン製剤ならびに対照サンスクリーン（**■** をサンスクリーン製剤から除いたもの）のパッチ試験が行なわれた。同時に生理食塩水も対照とした。試料 0.01g を 24 時間閉鎖貼付し、パッチ除去 1 時間および 24 時間後の皮膚の状態を観察し、下記判定基準にて判定を行った。

パッチテスト判定基準（本邦基準）

症状	判定
反応なし	—
軽い紅斑	±
紅斑	+
紅斑+浮腫、丘疹	++
紅斑+浮腫+丘疹+小水疱	+++
大水疱	++++

***■** 製剤の組成

成分名		配合量	
紫外線吸収剤	本品	50.0%	
界面活性剤	デシルグルコシド	■	
緩衝剤	リン酸水素二ナトリウム		
消泡剤	ジメチコン		
溶剤	ブチレングリコール		
粘稠化剤	キサンタンガム		
pH調整剤	水酸化ナトリウム		
溶剤	精製水		ad. 100

【結果】

ヒトパッチ試験結果要約

		試験検体		対照			
検体名		■ 20%溶液	■ 配合サンスクリーン	■ 基剤 20%溶液	■ 基剤 配合サンスクリーン	対照サンスクリーン製剤	生理食塩水
本品濃度		10 %		0 %			
判定	除去 1 時間後	(-) 42 名	(-) 42 名	(-) 42 名	(-) 42 名	(-) 42 名	(-) 42 名
	除去 24 時間後	(-) 42 名	(-) 42 名	(-) 42 名	(-) 42 名	(-) 42 名	(-) 42 名

【結論】

被験者 42 名について行ったパッチテストの結果は、すべての製剤について除去後 1 時間の反応も 24 時間の反応もすべて (-) で異常は認められなかった。

11. 吸収・分布・代謝・排泄

ラット及びヒト皮膚を用いた経皮吸収試験 (in vitro)

試験番号 : ██████████
試験施設 : ██████████
試験責任者 : ██████████
報告 : ████████年 ██████月 ██████日
ガイドライン : OECDNo. 428 (2004)

【試験方法】

24 時間にわたり非閉塞的環境にて行った。試験期間中、レセプター液である 6 % (w/v) polyethoxyoleate (PEG 20 oleyl ether) を含む生理食塩水 (0.9 % NaCl (w/v)) を当初の 0~6 時間は毎時、それ以降は実験終了まで 2 時間ごとに採取した。浸透期間終了後は皮膚膜を低刺激性石けん液にて 3 回、次いで THF にて 1 回洗浄することにより [14C] ██████████ を皮膚膜から除去した。さらに皮膚膜を拡散セルから取り出し、角質層が皮膚膜から除去されるまで剥離処理を行った。

【結果】

24 時間の浸透によりヒト皮膚膜を透過した比率は塗布量の 0.02% であった。推定 Flux は $0.042 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ だった。皮膚膜 (灌流液) を通じて浸透した量と剥離処理後に皮膚膜下層に残存していた量は、ヒトではそれぞれ 0.06 % と $1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ だった。

【結論】

ラットおよびヒト皮膚膜に塗布した微粒化 ██████████ の皮膚への浸透速度は極めて低く、浸透した量も非常に限られていた。

安全性に関する総括

ラット単回投与毒性試験

雄雌ともに強制経口または経皮投与で $LD_{50} > 2000\text{mg/kg}$ であった。

ラットを用いた 13 週間経口（強制経口）投与毒性試験

試験期間中にラットの死亡は認められず、その他各種実施した検査において本品の投与に関連する毒性影響はなんら認められなかった。本試験条件下において強制経口投与における本品の NOAEL（無毒性量）は、 1000mg/kg/日 であると判断された。

ラットを用いた経口（強制経口）投与による胚-胎児発生毒性試験

本品は母動物に対する毒性徴候を誘発しなかった。妊娠関連項目に対する影響及び胎児での投与に関連した奇形及び投与に関連した変異の発生率に対する影響は、高用量群の 1 胎児を除きなんら観察されなかった。また、この胎児は脳室拡張が存在したのを除いて正常であった。影響を受けたのがこの 1 胎児のみであったため、投与に関連しないものと判断された。投与に関連した奇形あるいは変異は、骨格検査において認められなかった。従って、この実験条件下における無影響量（NOEL）は 1000mg/kg/日 であった。

ウサギを用いた急性皮膚刺激性試験

本実験条件下において、本品はウサギの皮膚に局所適用した場合、非刺激性であった。

ウサギでの連続皮膚刺激性試験

本品は 10%、20% および 40% の濃度で、ウサギの健常皮膚に対し連続皮膚刺激性がないものと結論した。

マウス局所リンパ節試験（LLNA）を用いた皮膚感作性試験

本品は、マウス局所リンパ節試験において遅延性接触過敏症を誘発しなかった。

モルモットを用いた経皮投与による光毒性及び光感作性試験

本品は、モルモットに対し光毒性あるいは光アレルギー反応を誘発しなかった。

ウサギを用いた急性眼刺激性試験

本品および本品を配合した製剤はウサギの眼に適用した場合、非刺激性および刺激性なしであった。

細菌を用いた復帰突然変異試験

本品は、ネズミチフス菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験において突然変異誘発活性を示さなかった。

哺乳動物細胞の培養ヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験

本品は、培養ヒトリンパ球に対し染色体異常を誘発しなかった。

ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験による光変異原性試験

本品は、使用した菌株の塩基対置換型あるいはフレームシフト型の遺伝子突然変異を誘発しなかった。

チャイニーズ・ハムスターの V79 細胞を用いた光変異原性試験

本品は本染色体異常試験において、光染色体異常誘発物質ではないと判断された。

ヒトパッチ試験

本品 10%配合のサンスクリーン製剤を用いてヒトパッチ試験を実施した結果、本品は皮膚に対し何の刺激も示さなかった。

ラット及びヒト皮膚を用いた経皮吸収試験 (in vitro)

24 時間の浸透によりヒト皮膚膜を透過した比率は塗布量の 0.02%であった。推定 Flux は $0.042 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ だった。皮膚膜 (灌流液) を通じて浸透した量と剥離処理後に皮膚膜下層に残存していた量は、ヒトではそれぞれ 0.06 % と $1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ だった。

本品の安全性について

本品の経皮吸収の情報として、in vitro のヒト皮膚を用いた経皮吸収試験より得られた 1) 適用量に対する割合、2) 面積あたりの吸収量、3) 浸透率の数値を用い、安全係数を試算した。

安全係数の計算			
	1) 適用量に対する割合	2) 面積あたりの吸収量	3) 浸透率
ヒトの典型的な体重 (kg)	60	60	60
総体表面積 (cm^2)	17500	17500	17500
適用した製剤の量 (mg g)	18	18	18
適用した本品の総量 (mg)	1800	1800	1800
本品の吸収	適用量の 0.06%	$1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$0.026 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$
暴露時間	1 日	1 日	6 時間
全身暴露量 SED (mg/kg 体重)	0.018	0.35	0.046
NOAEL (ラット 13 週間経口投与試験)	1000	1000	1000
安全係数	55555	2800	21978

経皮吸収の情報として用いたいずれの場合でも安全係数は 100 以上であるため、本品を最大 10%の配合でヒトに用いる化粧品として使用することは安全であると考えます。