

ネオロンTM950 ポジティブリスト収載申請書添付資料概要

2004年3月10日付最終版


ローム・アンド・ハース・ジャパン株式会社

名称リスト

本資料概要および添付資料中に用いたネロン™ 950防腐剤に関する名称について、下記に示す。

日本語名称	英語名称	簡単な説明
ネロン™ 950防腐剤	Neolone™ Preservative	今回、登録申請する化粧品用防腐剤処方の名称で、メチルイソチアゾリノン9.5%を含む水製剤
ネロン™	Neolone™	ネロン™ 950と同じ活性成分を含む化粧品/家庭用品用防腐剤処方全体の登録商標
2-メチル-4-イソチアゾリノン-3-オン	2-Methyl-4-isothiazoline-3-one	ネロン™ 950活性成分の IUPAC名称
メチルイソチアゾリノン	Methylisothiazolinone	ネロン™ 950活性成分の INCI名称
コーデック™ 573T	Kordek™ 573T	ネロン™ 950活性成分の工業用原体名称で、95%以上の活性成分を含んでいる。
コーデック™ 50C	Kordek™ 50C	ネロン™ 950と同じ活性成分50%を含むグリコール製剤の登録商標
ケーソン® CG	Kathon® CG	化粧品用の防腐剤処方で、クロロメチルイソチアゾリノン(75部)とメチルイソチアゾリノン(25部)を合計1.5%の割合で含有する水製剤
ケーソン® 886F Biocide	Kathon® 886F Biocide	クロロメチルイソチアゾリノン(11.1部)とメチルイソチアゾリノン(3.7部)を合計14.8%の割合および9%MgCl ₂ , 15%Mg(NO ₃) ₂ を含有する水製剤
ケーソン®	Kathon®	抗菌活性成分としてイソチアゾリノン類を含む工業用殺菌剤処方全体に対する登録商標
5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリノン-3-オン	5-Chloro-2-methyl-4-isothiazoline-3-one	ケーソン® CGに含有される抗菌活性主成分の IUPAC名称
クロロメチルイソチアゾリノン	Chloromethylisothiazolinone	ケーソン® CGに含有される抗菌活性主成分の INCI名称
		メチルイソチアゾリノンの社内コード名称
		メチルイソチアゾリノンの略式社内コード名称
		クロロメチルイソチアゾリノンの略式社内コード名称
		クロロメチルイソチアゾリノンとメチルイソチアゾリノンを、それぞれ75部及び25部の割合で含有する活性成分混合物に対する略式社内コード名称
アボベンゾン	Avobenzone	4-tert-ブチル-4'-メトキシベンゾイルメタン(#500605)として CLSに収録あり。 INCI名称は、Butyl methoxydibenzoylmethane
DMDM ヒダントイン	DMDM Hydantoin	1,3-ジメチロール-5,5-ジメチルヒダントインの略称。
ジアゾリジンウレア	Diazolidinyl urea	N-[1,3-ビス(ヒドロキシメチル)-2,5-ジキソ-4-イミダゾリジン]-ウレアの略称
イミダゾリジンウレア	Imidazolidinyl urea	N,N'-メチルビス[N'-(3-ヒドロキシメチル-2,5-ジキソ-4-イミダゾリジン)]ウレアの略称

目次

	頁
イ. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況等	
1. 発見の経緯	1
2. 外国における使用状況	2
(1) 規制登録の状況	2
3. ネオロン TM 950 防腐剤の特性及び他の成分との比較検討等	4
(1) 製品規格	4
(2) 試験方法	5
(3) 各種化粧品基材中での化学的安定性	9
(4) アポベンゾン(PARSOL 1789)との相容性	11
(5) 微生物学的特徴	13
1) 抗菌作用のメカニズム	13
2) 最小生育阻止濃度(MIC)	13
3) 微生物暴露試験：化粧品防腐剤としての性能	16
① アニオン系ポディローション防腐性能	17
② ヨーロッパ仕様サンスクリーン防腐性能	18
③ 米国仕様高遮光性サンスクリーン防腐性能	19
④ 酸化亜鉛/酸化チタン-サンスクリーン防腐性能	20
⑤ ネオロン TM 950 防腐剤の特性及び性能に関する要約	21
(6) 推奨使用法	22
ロ. 物理化学的性質等	
総括	23
1. ネオロン TM 950 活性成分、メチルイソチアゾリンの合成法	24
	
2. ネオロン TM 950 活性成分、メチルイソチアゾリンの物理化学的性状および構造決定	27
ハ. 安全性	
総括	30
1. 単回投与毒性(急性毒性)試験	40
(1) ラット単回経口投与毒性試験	40
(2) ラット単回皮膚投与毒性試験	41

2. 反復投与毒性試験	42
(1) ラット3ヶ月間投与毒性試験	42
3. 生殖発生毒性試験	46
(1) ラットにおける二世代生殖発生毒性試験	46
4. 皮膚一次刺激性試験	56
(1) ウサギ皮膚一次刺激性試験	56
5. 連続皮膚刺激性試験	57
(1) ヒト連続皮膚刺激性試験	57
(2) ウサギ連続皮膚刺激性試験	60
6. 感作性試験	62
(1) モルモット皮膚感作性試験(マキシミゼーション試験)	62
(2) モルモット皮膚感作性試験(ビューラー試験)	66
(3) ヒト皮膚感作性試験－試験1－	68
(4) ヒト皮膚感作性試験－試験2－	70
(5) ヒト皮膚感作性試験－試験3－	71
7. 光毒性試験	72
(1) ヒト皮膚光毒性試験	72
(2) モルモット皮膚光毒性試験	74
8. 光感作性試験	76
(1) ヒト皮膚光感作性試験	76
(2) モルモット皮膚光感作性試験	78
9. 眼刺激性試験	80
(1) ウサギ眼刺激性試験	80
10. 遺伝毒性試験	81
(1) 復帰突然変異試験	81
(2) 染色体異常試験	84
(3) 小核試験	88
(4) 遺伝子突然変異試験	90
11. ヒトパッチ試験	93
(1) 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのヒトパッチ試験	93
(2) ネオロン TM 950を含む試験製剤化粧品を用いたヒトパッチ試験	95
1) シャンプー(Rinse offタイプ)のヒトパッチ試験	95
2) サンスクリーン(Leave onタイプ)のヒトパッチ試験	97
3) ボディローション(Leave onタイプ)のヒトパッチ試験	99
12. 吸収・分布・代謝・排泄試験	101
(1) ラット吸収、分布、代謝および排泄試験	101

イ. 発見の経緯および外国における使用状況等 添付資料イ-1、2

1. 発見の経緯

1960年代半ばに、殺菌剤として水銀化合物を使用することへの懸念が高まり、ローム・アンド・ハース社でもサッカリン同族体および化学的に関連性のある構造を有する化合物の殺菌性について研究していた。その結果、合成されたイソチアゾリノン類が、広域スペクトルを有する強力な抗菌作用を示し、種々の無機および有機薬品によって不活性化されないことを発見した。この発見をもとに、ローム・アンド・ハース社によって、イソチアゾリノン類を活性成分とする何種類かの工業用防腐剤が開発され、商品化されてきた。塗装用防カビ剤である、スケーン® (SKANE) M-8 が市販された最初の製剤であった。その後、一連の防腐剤がケーソン® (KATHON) という登録商標で次々に上市された。

1980年代初頭には、ローム・アンド・ハース社は他社に先駆けメチルクロロイソチアゾリノン/メチルイソチアゾリノンを活性成分とするケーソン® CG 防腐剤を開発するに至った。現在、ケーソン® CG 防腐剤は広域抗菌スペクトルを有する化粧品用防腐剤としてリンスオフ製品に汎用されている。

本邦においても、薬事法の規定に基づき成分の名称を記載しなければならない医薬部外品および化粧品の成分の一つとして、ケーソン® CG に対応する指定成分名、メチルクロロイソチアゾリノン・メチルイソチアゾリノンが、1987年5月1日付けで収載された(厚生省告示第97号)。さらに、ケーソン® CG は、化粧品原料基準外成分規格(1993追補)および化粧品種別許可基準リスト(1994)に、「メチルクロロイソチアゾリノン・メチルイソチアゾリノン液」として収載されている製品と合致する。

ケーソン® CG 防腐剤の応用技術研究で培った知識をもとに、さらに幅広い応用価値を追求した結果として、ローム・アンド・ハース社はメチルイソチアゾリノンを単独活性成分とするネオロン™ 950 防腐剤を開発した。特に、この製品は従来ケーソン® CG 防腐剤の応用が困難であった、下記の化粧品処方群に対しても優れた応用性能を示すことが明らかになってきている。

- スキンケア(肌用処方)製品およびサンスクリーン(日避け処方)製品
- ジンクピリチオンを主剤とするふけ取りシャンプー
- pHの高い界面活性剤を含んだ、種々の処方
- pHの高い液状洗剤

2. 外国における使用状況

(1) 規制登録の現状

ローム・アンド・ハース社は、メチルイソチアゾリノンの工業用原体(コーデックTM 573T、95%以上の活性成分含有)、および50%グリコール製剤(コーデックTM 50C)のEPA製剤認可を受け、工業用殺菌剤として1995年以来、北米、ヨーロッパ、日本で製造販売している。これらの殺菌剤の主たる応用分野は、金属加工油、塗料の缶内防腐、ラテックス処方防腐等の用途であり、その抗菌効果と使用安全性実績は期待通りに推移している。

2001年4月には、FDAは、メチルイソチアゾリノンに食品包装紙用の接着剤(21 CFR 175.105)、塗料およびその他添加剤(21 CFR 176.170(b))の防腐剤としての使用認可を与えた。またFDAは、この防腐剤を含有する原材料を用いて製造された包装紙、厚紙を食品包装に用いることに対しても認可(21 CFR 176.170)を与えている。

一方、ネオロンTM 950(9.5%~10.0%未満の活性成分含有)の化粧品分野への応用申請に対して、CTFAは1999年にINCI名、メチルイソチアゾリノンを与えた。カナダにおいても同様の使用許可が与えられている。抗菌活性成分であるメチルイソチアゾリノンは、米国において100ppm濃度でシャンプー等のRinse-off製品およびローション等のLeave-on製品に使用することが、FFDCAに基づいて許可されている。また、ヨーロッパにおいても、2000年6月にCOLIPAを經由して欧州連合へ登録申請され、さらにメキシコ(Mexican Cicoplafest)へも、登録申請が行われ、それぞれ現在審査中である。なお、欧州連合および日本における本抗菌成分の申請内容は、米国と同様メチルイソチアゾリノン100ppmをシャンプー等のRinse-off製品およびローション等のLeave-on製品に使用することを目的とするものである。

また、抗菌活性成分メチルイソチアゾリノンは、工業用用途として使用する場合、既存化学物質としての登録が各国でなされており、その登録状況は次表のとおりである。

EPA : 米国環境保護庁(Environmental Protection Agency)

FDA : 米国食料医薬品局(Food and Drug Administration)

CTFA : 米国化粧品工業会(Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association)

INCI : 化粧品原料の国際命名法(International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)

FFDCA : 米国連邦食品、医薬品及び化粧品法(Federal Food, Drug and Cosmetic Act)

COLIPA : 欧州化粧品工業会(European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association)

国名	規制	登録 (登録番号)
オーストラリア	オーストラリア化学物質インベントリー (AICS)	有り
カナダ	カナダ環境保護法・国内物質リスト (DSL)	有り
欧州連合	欧州既存商業化学物質リスト (EINECS)	有り (2202396)
日本	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)既存化学物質(ENCS)	有り (5-5235)
韓国	既存化学物質目録収載物質 (ECL)	有り (3-903)
米国	連邦殺虫剤、殺菌剤および殺鼠剤法 (FIFRA)	有り (707-298)

3. ネオロン™ 950 防腐剤の特性および他の成分との比較検討・・・添付資料イ-1、2

(1) 製品規格

ネオロン™ 950防腐剤は、抗菌活性成分である、メチルイソチアゾリノン9.5%を水に溶解した製品である。それぞれの製品ロットは、厳密な製造基準に従い調製され、品質保証のための分析を経て出荷される。表イ-1および表イ-2に、一般的な製品組成および製品の物理化学的性状についてそれぞれ示した。

表イ-1 ネオロン™ 950 防腐剤の製品組成

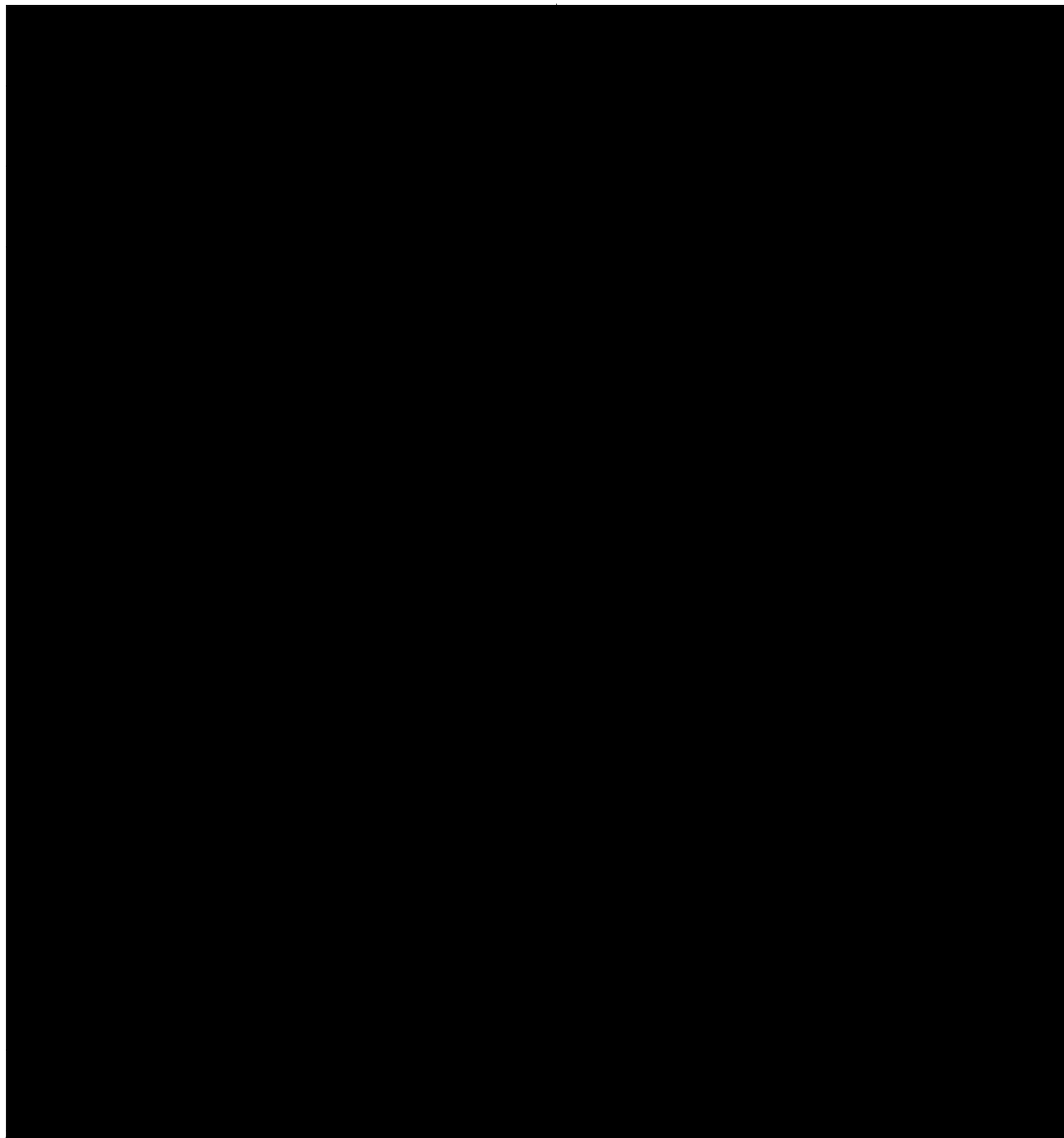
成分名	CAS 番号	重量組成
2-メチル-4-イソチアゾリノン	2682-20-4	9.5%~10.0%未満
[Redacted content]		

表イ-2 ネオロン™ 950 防腐剤の一般的物理化学的性状

抗菌活性成分濃度	9.5%
[Redacted content]	

但し、表イ-1あるいはイ-2のそれぞれの値が必ずしも製品仕様を規定するものではない。

(2) 試験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料イ-1



(3) 各種化粧品基材中での化学的安定性・・・・・・・・・・添付資料イ-2

ネオロン™ 950 防腐剤中の活性成分は、pH2~10 の範囲および 50℃の温度条件下で安定であり、種々の化粧品原材料、たとえば界面活性剤や蛋白質との相容性も良い。それゆえ、従来ケーソン® CG の応用が困難であった、4-tert-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタン（以下、アポベンゾンと略称）を含有する日焼け止めローションやクリーム、あるいはジンクピリチオンを主剤としたふけ取りシャンプー中에서도安定であった。安定性の目安として、種々の pH 域に 22 °Cおよび 50℃で 3 および 12 週間放置した後、製品中に残存する活性成分量について測定した結果を、表イ-5 に示した。

表イ-5 ネオロン 950 活性成分の pH および保存温度における安定性

		有効成分の残存率(%)				
温度 (°C)	放置時間 (週)	pH2	pH6	pH8	pH10	pH12
22	0	100	100	100	100	100
	3					
	12					
50	0					
	3					
	12					

また、同様に種々の界面活性剤、蛋白質溶液および化粧品処方に添加した場合の活性成分の安定性について検討した結果を、それぞれ表イ-6、表イ-7 および表イ-8 にまとめた。

表イ-6 ネオロン™ 950 防腐剤の各種界面活性剤中での安定性

界面活性剤	4週間放置後の活性成分残存率 (%)		
	25° C	42° C	50° C
ラウリル硫酸エーテルナトリウム			
ラウリル硫酸ナトリウム			
カカオ酸アミドプロピルベタイン			
C ₁₄₋₁₆ オレフィンスルホン酸ナトリウム			
ラウリル硫酸アンモニウム			
ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム			
ラウロイルサルコシン酸ナトリウム	■ (25° C、52週)		

表イ-7 ネオロン™ 950 防腐剤の各種蛋白質溶液中での安定性

蛋白質基材	35° Cに12週間放置後の活性成分残存率 (%)
2% ケラチン	
1% コラーゲン	
8% エラスチン	
2% 動物性蛋白質加水分解物	

表イ-8 ネオロン™ 950 防腐剤の各種パーソナルケア製品中での安定性

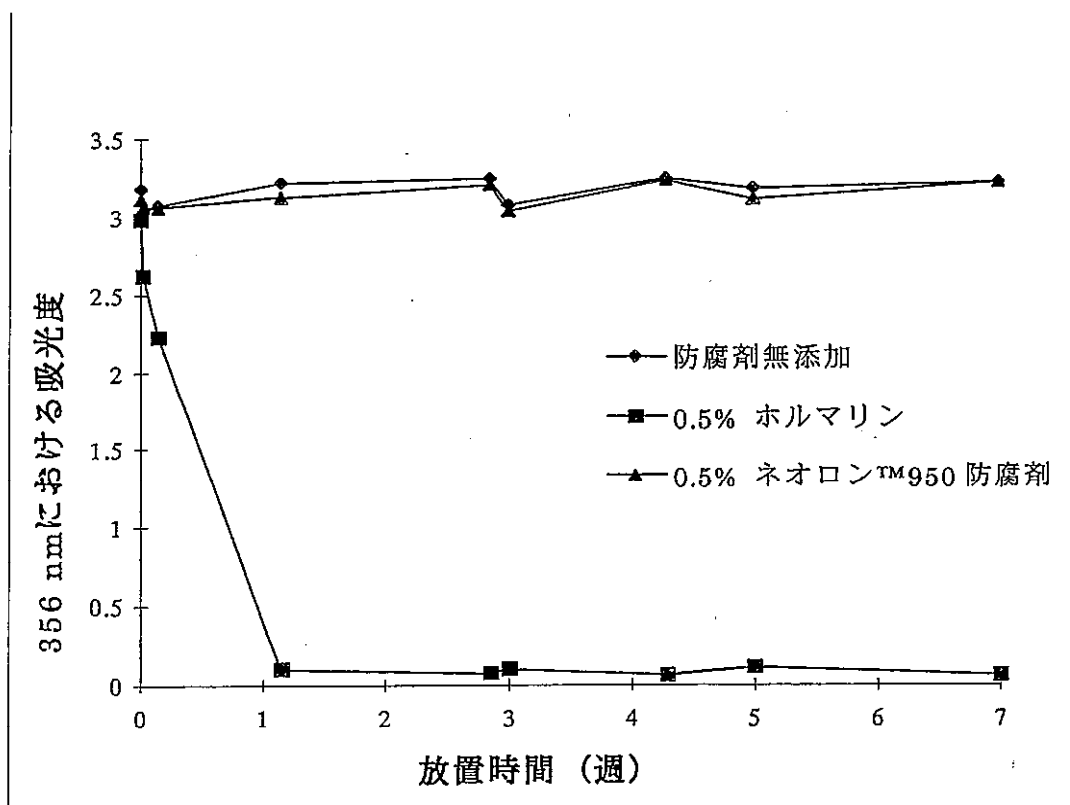
パーソナルケア製品	放置温度 (°C)	放置時間 (週)	活性成分残存率 (%)
アニオン系ボディローション	45	4	
ジンクピリチオンシャンプー	45	4	
高遮光性サンスクリーン (米国仕様)	42	8	
酸化亜鉛/酸化チタンサンスクリーン	42	8	

(4) アボベンゾン(PARSOL 1789)との相容性・・・・・・・・・・添付資料イー2

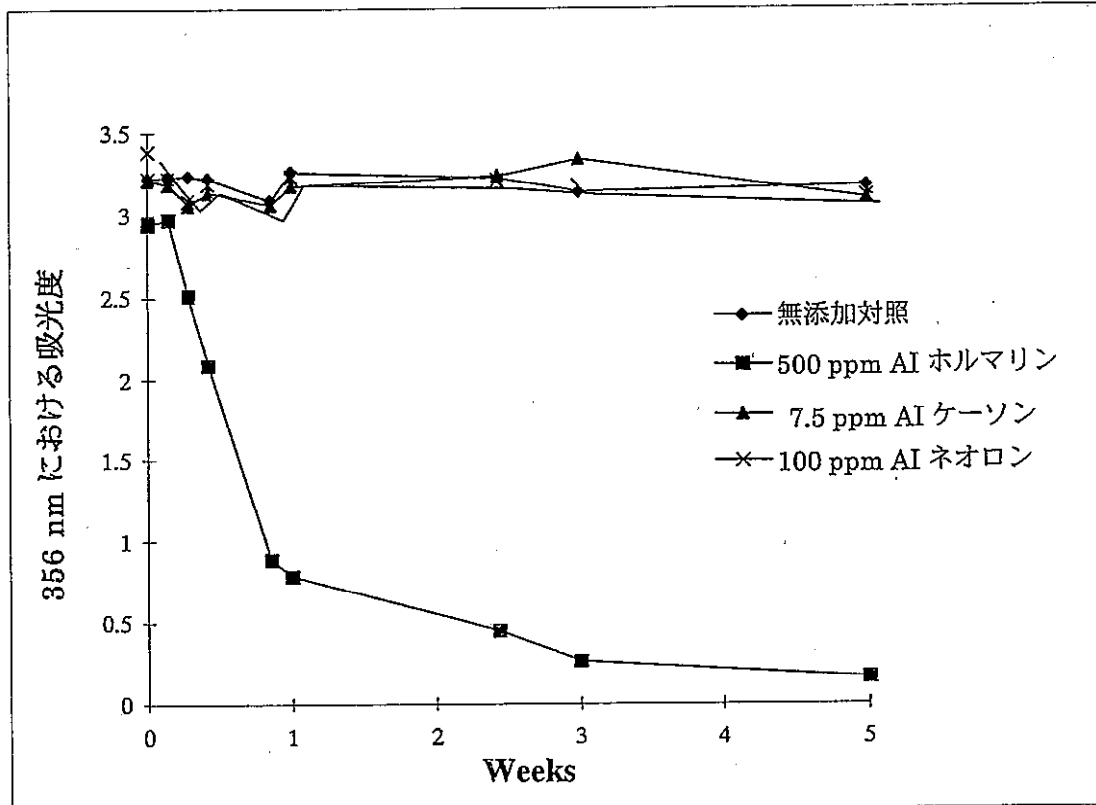
ネオロン™ 950 防腐剤は、殆どのサンスクリーン処方に UVA 遮光剤として用いられるアボベンゾンときわめて良い相容性を示す事が確認されている。すなわち、ネオロン™ 950 防腐剤の活性成分は 2%アボベンゾンを含む種々のサンスクリーン処方中できわめて安定であり、しかもホルマリンやホルマリン遊離剤と異なりネオロン™ 950 防腐剤はアボベンゾンの遮光性能安定性を妨げることもなかった。

相容性について検討した実験結果について一例を以下に述べる。ネオロン™ 950 防腐剤とアボベンゾンをアセトニトリル-エチルアルコール混合溶媒(10:90 v/v%)に溶かし込み、50℃に放置して、経時的に混合液の UV 吸光度の変化を観察した。図イー2 および 3 に示したように、使用推奨濃度の 50 倍濃度のネオロン™ 950 防腐剤(0.5%)をアボベンゾン(0.5%)に混合しても、356 nm における UV 吸光度の変化は殆ど認められなかった。

図イー2 0.5%アボベンゾンと0.5%ネオロン™ 950 防腐剤の相容性



図イー3 0.5%アボベンゾンと通常使用濃度のメチルイソチアゾリノンの相容性



AI : Active Ingredient (活性成分)

(5) 微生物学的特徴 添付資料イー2

1) 抗菌作用のメカニズム

2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンは、イソチアゾリン環の S-N 結合が開環して生じた S と蛋白のチオール基(SH 基)が求核反応を起こし、結合してジスルフィド結合を持つ化合物となることが知られている¹⁾。この 2-メチルイソチアゾリン-3-オンとデヒドロゲナーゼ等の SH 酵素及びその他の蛋白性 SH との結合が細胞の活性(生育、呼吸及び ATP 合成等)を抑制し、死に至らしめる。このように微生物と哺乳類動物細胞への 2-メチルイソチアゾリン-3-オンの作用機作は同じであるが、哺乳類動物の真核細胞に比べ微生物の原核細胞は、チオール基がエンベロプに多く存在するため²⁾、2-メチルイソチアゾリン-3-オンの作用は真核細胞に比べ反応性に富み、制菌作用並びに殺菌効果が生じると考えられている^{3) 4)}。

- 1) Collier, P.J., A. Ramsey, R.D. Waigh, K.T. Douglas, P. Austin, and P. Gilbert, Chemical reactivity of some isothiazolone biocides, *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 578-584, 1990
- 2) Collier, P.J., P. Austin, and P. Gilbert, Uptake and distribution of some isothiazolone biocides into *Escherichia coli* ATCC8739 and *Schizosaccharomyces pombe* NCYC 1354, *International Journal of Pharmaceuticals*, 66, 201-206, 1990
- 3) J. S. Chapman and Megan A. Diehi, Methylchloroisothiazolone-induced growth inhibition and lethality in *Escherichia coli*, *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 134-141, 1995
- 4) Megan A.D., J.S. Chapman, Association of the biocide 5-chloro-2-methyl-isthiazol-3-one with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 44, 191-199, 1999

2) 最小生育阻止濃度(MIC)

ネオロン™ 950 防腐剤は種々の微生物に対して強い抗菌活性を示し、幅広い範囲の細菌類および真菌類の生育を低濃度で阻害する。表イー9に、細菌類 8 菌株および真菌類 3 菌株に対して測定した MIC 値データの一例を示した。種々の濃度のネオロン™ 950 防腐剤を含む普通栄養液体培地(pH 7)中でそれぞれの菌株を、30°C、24 時間培養した。培養終了後、それら細菌の生育有無を目視判定し、最小生育阻止濃度(ppm)を決定した。

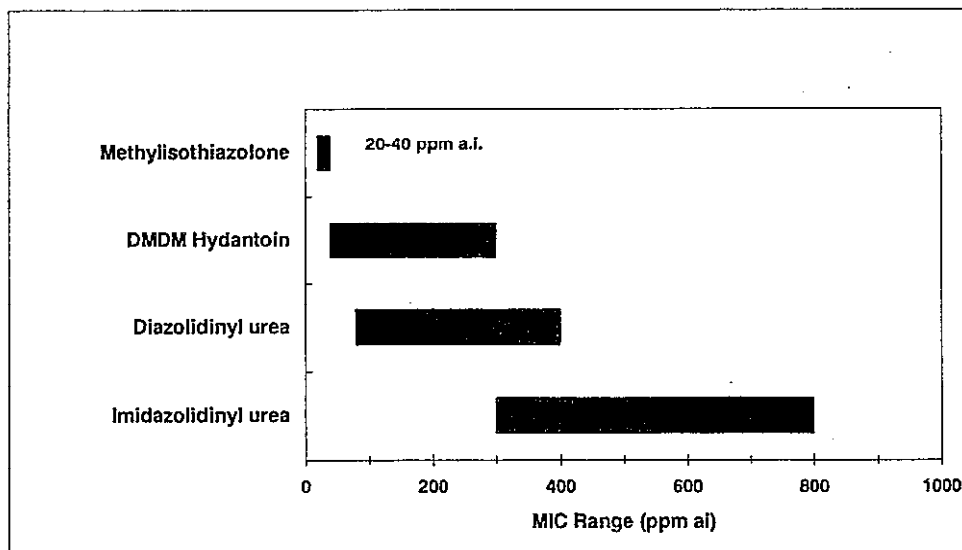
また、同様にして得られた他の防腐剤の MIC 値を比較のため図イー4 および表イー10に要約したが、図より明らかなようにネオロン™ 950 防腐剤の MIC 値は、他の防腐剤のものより全体的に低いものであった。

表イ-9 ネオロン™ 950 防腐剤活性成分の各種微生物に対する最小発育阻止濃度 (MIC)

微生物種	菌株名 (および ATCC 番号)	最小発育阻止濃度 (ppm AI)	
細菌類	<i>Enterobacter aerogenes</i>	15038	30
	・ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442	40
	・ <i>Burkholderia cepacia</i>	17765	20
	・ <i>Pseudomonas oleovorans</i>	8062	30
	・ <i>Pseudomonas putida</i>	795	20
	・ <i>Escherichia coli</i>	8739	35
	・ <i>Staphylococcus aureus</i>	6538	40
	・ <i>Serratia marcescens</i>	Lab Isolate*	30
真菌類	<i>Aspergillus niger</i>	6275	3
	・ <i>Penicillium oxalicum</i>	24784	80
	・ <i>Candida albicans</i>	11651	40

* 腐敗した化粧品製品からの分離同定株

図イ-4 各種防腐剤成分の細菌類に対する MIC 値範囲の比較



DMDM Hydantoin: 1,3-ジメチロール-5,5-ジメチルヒダントイン

・ Diazolidinyl urea: N-[1,3-ビス(ヒドロキシメチル)-2,5-ジオキソ-4-イミダゾリジン]ウレア
(以下、チアゾリジンウレアと略称)

Imidazolidinyl urea:

N,N'-メイルビス[N'-(3-ヒドロキシメチル-2,5-ジオキソ-4-イミダゾリジン)ウレア]
(以下、イミダゾリジンウレアと略称)

表イ-10 ネオロン™ 950 および比較用防腐剤の MIC 値と配合上限の比較

防腐剤名	最小生育阻害濃度 ⁽¹⁾ (ppm 有効成分)		配合上限 ⁽⁴⁾ (g/100g)	備考
	対グラム陰性菌 ⁽²⁾	対グラム陽性菌 ⁽³⁾		
ネロン™ 950	15	40	0.1 ⁽⁴⁾	
DMDM ヒantalin	200	60	0.3	rinse-off
ジアルジニル	300	100	-	未収載
イタリジニル	400	300	0.3	rinse-off
メチルパレン	1,500	1,500	1.0	as total
プロピルパレン	1,500	300	1.0	as total
安息香酸ナトリウム	6,000	5,000	1.0	as total
フェノキシエタノール	3,000	4,000	1.0	

- (1) 最小生育阻害濃度 (MIC) は普通栄養培地を用いて、30° C で 24 時間培養後、判定した。測定菌株には、以下の二株を選んだ。
- (2) グラム陰性菌としては、*Pseudomonas aeruginosa* 9027 株を用いた。
- (3) グラム陽性菌としては、*Staphylococcus aureus* 6538 株を用いた。
- (4) 配合上限は、本邦ポジティブリストの記載を転記した。ただし、ネオロン™ 950 については弊社推奨の配合上限値を記載した。

3) 微生物暴露試験：化粧品防腐剤としての性能

既述のデータより、ネオロン™ 950 防腐剤活性成分の化学的安定性と抗菌活性が優れていることが明らかであるが、実際の化粧品処方中でも期待通りの防腐性能を発揮し得るかかどうかについて検討した結果を以下に述べる。

ローム・アンド・ハース社では防腐剤製品の化粧品処方中での性能を調べるために、HPLC を用いた安定性試験と併行して、通常 4 週間の微生物暴露試験を行っている。微生物暴露試験は、表イー11 に示した腐敗細菌株および腐敗真菌株の接種混合液を別々に用意し、あらかじめ各種濃度の防腐剤を添加した被験処方に、それぞれ 10^5 - 10^6 CFU/g になるように接種した。腐敗細菌混合液を接種した試験サンプルは 30°C で、また真菌混合液を接種したのものについては 25°C で、所定の日数培養した後の微生物生菌数を経時的に寒天平板法で調べることによって評価を行った。4 週間培養後、それぞれの被験サンプルに生菌数が 10 CFU/g 以下しか認められなかったものを合格と判定した。

表イー11 微生物暴露試験に用いた微生物菌株

微生物種名	菌株番号	簡単な説明
<u>腐敗細菌類</u>		
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 9027)	グラム染色陰性細菌
2. <i>Burkholderia cepacia</i>	(ATCC 17765)	グラム染色陰性細菌
3. <i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 6538)	グラム染色陽性細菌
4. <i>Klebsiella pneumonia</i>	(ATCC 13883)	グラム染色陽性細菌
5. <i>Escherichia coli</i>	(ATCC 8739)	グラム染色陰性細菌
<u>腐敗真菌類</u>		
1. <i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)	表皮常在性酵母菌
2. <i>Aspergillus niger</i>	(ATCC 16404)	一般的糸状菌

① アニオン系ポディローション防腐性能

アニオン系ポディローション処方中に、微生物暴露試験結果について表イ-12 に要約した。試験した3種類いずれの防腐剤系でも4週間の細菌類暴露試験に合格したが、ネオロン™ /メチルパラベン/プロピルパラベン系では、他の2種類の防腐剤系よりも短期間で接種した菌株生菌数を合格レベルまで減少させた。また同系では、真菌類に対する防腐効果も同様に認められ、ネオロン™ の優れた防腐性能を確かめた。

表イ-12 ネオロン™ 950 によるアニオン系ポディローション防腐性能

防腐剤系	活性成分濃度 (% AI)	培養後の菌数 (CFU/g)			
		培養3日	7日	14日	28日
細菌類に対して:					
防腐剤無添加対照	0	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
ネオロン™ 950/ MP ¹ / PP ²	0.0050 / 0.2 / 0.1	<10	<10	<10	<10
イミダゾリジニル/ MP / PP	0.25 / 0.2 / 0.1	10 ⁵	<10	<10	<10
DMDMH ³ / IPBC ⁴	0.095 / 0.005	10 ⁵	<10	<10	<10
真菌類に対して:					
防腐剤無添加対照	0	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵
ネオロン™ 950/ MP / PP	0.0050 / 0.2 / 0.1	<10	<10	10 ²	<10
イミダゾリジニル/ MP / PP	0.25 / 0.2 / 0.1	>10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ³
DMDMH ³ / IPBC ⁴	0.095 / 0.005	>10 ⁵	<10	<10	<10

¹ MP - Methylparaben (メチルパラベン)

² PP - Propylparaben (プロピルパラベン)

³ DMDMH - Dimethyldimethyl Hydantoin (ジメチルジメチル・ヒダントイン)

⁴ IPBC - Iodopropynyl butylcarbamate (ヨウ化プロピニル・ブチルカーバメイト)

② ヨーロッパ仕様サンスクリーン防腐性能

ヨーロッパ仕様サンスクリーン処方中での微生物暴露試験結果について表イ-13 に要約した。ネオロン™ /メチルパラベン/プロピルパラベン系が、試験した4種類の防腐剤系の中で最も優れた防腐効果を細菌類および真菌類暴露に対して示すことを確認した。

表イ-13 ネオロン™ 950 によるヨーロッパ仕様サンスクリーン防腐性能

防腐剤系	活性成分濃度 (% AI)	培養後の菌数 (CFU/g)		
		培養 7 日	14 日	28 日
細菌類に対して:				
防腐剤無添加対照	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷
ネオロン™ 950/MP ¹ /PP ²	0.0100 / 0.20 / 0.10	<10	<10	<10
DMDMH ³ / IPBC ⁴	0.052 / 0.005	<10	<10	<10
イタザリジニル/MP/PP	0.24 / 0.20 / 0.10	10 ⁸	<10	<10
MP / PP	0.20 / 0.10	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁷
真菌類に対して:				
防腐剤無添加対照	0	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
ネオロン™ 950/MP ¹ /PP ²	0.0100 / 0.20 / 0.10	<10	<10	<10
DMDMH ³ / IPBC ⁴	0.052 / 0.005	10 ⁵	10 ³	10 ⁵
イタザリジニル/MP/PP	0.24 / 0.20 / 0.10	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁶
MP / PP	0.20 / 0.10	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵

¹ MP - Methylparaben (メチルパラベン)

² PP - Propylparaben (プロピルパラベン)

³ DMDMH - Dimethyldimethyl Hydantoin (ジメチルジメチル・ヒダントイン)

⁴ IPBC - Iodopropynyl butylcarbamate (ヨウ化プロピニル・ブチルカーバメイト)

③ 米国仕様高遮光性サンスクリーン防腐性能

米国仕様高遮光性サンスクリーン中での微生物暴露試験結果について表イ-14 に要約した。本処方、細菌類による腐敗に対してはやや抵抗性を認めるが、真菌類による腐敗に対しては、前述の処方同様抵抗性がない。この処方に対してもネオロン™ 950 と他の防腐剤を組み合わせた3種類の防腐剤系で、真菌類に対する優れた防腐効果を示すことを確認した。

表イ-14 ネオロン™ 950 による米国仕様高遮光性サンスクリーン防腐性能

防腐剤系	活性成分濃度 (% AI)	培養後の菌数 (CFU/g)		
		培養7日	14日	28日
細菌類に対して:				
防腐剤無添加対照	0	<10	<10	10 ²
ネオロン™ 950 / MP ¹ / PP ²	0.0050 / 0.20 / 0.10	<10	<10	<10
ネオロン™ 950 / IPBC ³	0.0075 / 0.0100	<10	<10	<10
ネオロン™ 950 / ベンジルアルコール	0.0075 / 0.4	<10	<10	<10
イミダゾリジニル / MP / PP	0.3 / 0.11 / 0.03	<10	<10	<10
フェノキシエタノール / MP / EP ⁴ / PP / BP ⁵	0.5 / 0.12 / 0.014 / 0.014 / 0.049	<10	<10	<10
ベンジルアルコール / MP / PP	0.44 / 0.11 / 0.055	<10	<10	<10
真菌類に対して:				
防腐剤無添加対照	0	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
ネオロン™ 950 / MP ¹ / PP ²	0.0050 / 0.20 / 0.10	<10	<10	<10
ネオロン™ 950 / IPBC ³	0.0075 / 0.0100	<10	<10	<10
ネオロン™ 950 / ベンジルアルコール	0.0075 / 0.4	<10	<10	<10
イミダゾリジニル / MP / PP	0.3 / 0.11 / 0.03	<10	<10	<10
フェノキシエタノール / MP / EP ⁴ / PP / BP ⁵	0.5 / 0.12 / 0.014 / 0.014 / 0.049	10 ⁴	10 ²	<10
ベンジルアルコール / MP / PP	0.44 / 0.11 / 0.055	10 ⁴	10 ²	<10

¹ MP - Methylparaben (メチルパラベン)

² PP - Propylparaben (プロピルパラベン)

³ IPBC - Iodopropynyl butylcarbamate (ヨウ化プロピニル・ブチルカーバメイト)

⁴ EP - Ethylparaben (エチルパラベン)

⁵ BP - Butylparaben (ブチルパラベン)

④ 酸化亜鉛/酸化チタン-サンスクリーン防腐性能

酸化亜鉛/酸化チタン-サンスクリーン中での微生物暴露試験結果について表イ-15に要約した。この処方に対してもネオロン™950 と他の防腐剤を組み合わせた3種類の防腐剤系が、細菌類および真菌類に対する優れた防腐効果を示すことを確認した。

表イ-15 ネオロン™ 950 による酸化亜鉛/酸化チタン-サンスクリーン防腐性能

防腐剤系	活性成分濃度 (% AI)	培養後の菌数 (CFU/g)		
		培養7日	14日	28日
細菌類に対して:				
防腐剤無添加対照	0	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁸
ネロン™ 950 / MP ¹ / PP ²	0.0050 / 0.20 / 0.10	<10	<10	<10
ネロン™ 950 / IPBC ³	0.0075 / 0.0100	<10	<10	<10
ネロン™ 950 / ベンジルアルコール	0.0075 / 0.4	<10	<10	<10
イダリジニル / MP / PP	0.3 / 0.11 / 0.03	<10	<10	<10
フェキシタール / MP/EP ⁴ /PP/BP ⁵	0.5/0.12/0.014/0.014/ 0.049	<10	<10	<10
ベンジルアルコール / MP / PP	0.44 / 0.11 / 0.055	<10	<10	<10
真菌類に対して:				
防腐剤無添加対照	0	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
ネロン™ 950 / MP ¹ / PP ²	0.0050 / 0.20 / 0.10	<10	<10	<10
ネロン™ 950 / IPBC ³	0.0075 / 0.0100	<10	<10	<10
ネロン™ 950 / ベンジルアルコール	0.0075 / 0.4	<10	<10	<10
イダリジニル / MP / PP	0.3 / 0.11 / 0.03	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
フェキシタール / MP/EP ⁴ /PP/BP ⁵	0.5/0.12/0.014/0.014/ 0.049	10 ⁴	10 ¹	<10
ベンジルアルコール / MP / PP	0.44 / 0.11 / 0.055	10 ⁵	10 ³	10 ¹

¹ MP - Methylparaben (メチルパラベン)

² PP - Propylparaben (プロピルパラベン)

³ IPBC - Iodopropynyl butylcarbamate (ヨウ化プロピニル・ブチルカーバメイト)

⁴ EP - Ethylparaben (エチルパラベン)

⁵ BP - Butylparaben (ブチルパラベン)

⑤ ネオロン™ 950 防腐剤の特性および性能に関する要約

- ネオロン™ 950 防腐剤は、活性成分濃度で 50 ppm から 100 ppm を他の抗カビ剤と併用して添加することにより、腐敗しやすいスキンケア製品を効果的に防腐することができる。
- ネオロン™ 950 防腐剤は、単独でも活性成分濃度で 50 ppm から 75 ppm 添加すれば、十分な防腐効果が期待できる。
- ネオロン™ 950 防腐剤は、パラベン等の防カビ剤と併用することにより、細菌および真菌の複合した腐敗がしばしば問題となるサンスクリーンの防腐効果を顕著に改善する。

(6) 推奨使用法 添付資料イ-2

各種の化粧品処方中でのネオロン™ 950 防腐剤の微生物学的性能は優れたものであるが、長期にわたる防腐効果を期待するには、通常ネオロン™ 950 防腐剤を製品濃度で0.05%–0.1%を使用すると良い。この製品濃度は、抗菌活性成分に換算すると、50–100 ppm に相当する。下表に製品濃度と活性成分濃度との関係を参考のため表イ-16 に示した。

表イ-16 製品濃度と活性成分濃度との関係

活性成分		%製品
ppm	%	ネオロン™ 950
25	0.0025	0.03
50	0.0050	0.05
75	0.0075	0.08
100	0.0100	0.11

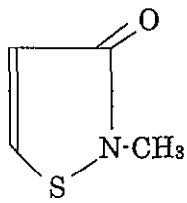
また、化粧品等を処方する最終段階にできるだけ低い温度で添加するのが望ましい。化粧品等の処方は多岐にわたるため、ネオロン™ 950防腐剤がその他の諸成分にどのような影響を与えるかについては完全に理解されているとは云えない。それゆえ、化粧品処方等の製造者は使用に際して、製品中でのネオロン™ 950防腐剤の安定性と効能を確認する必要がある。一般的に云えばネオロン™ 950防腐剤は、以下に示すような応用分野で特に優れた性能を発揮した。すなわち、

- リーブオン製品の防腐に使用されているホルムアルデヒド供与体の代替としての応用
 - スキンクリーム
 - サンスクリーン
 - 紙タオル
- ケーソン® CG の安定性が不十分なリンスオフ製品への応用 CG
 - ジンクピリチオンを主剤とするふけ取りシャンプー
 - pH の高い(pH 8 以上)界面活性剤、あるいは化粧品処方

ロ. 物理化学的性質等に関する資料

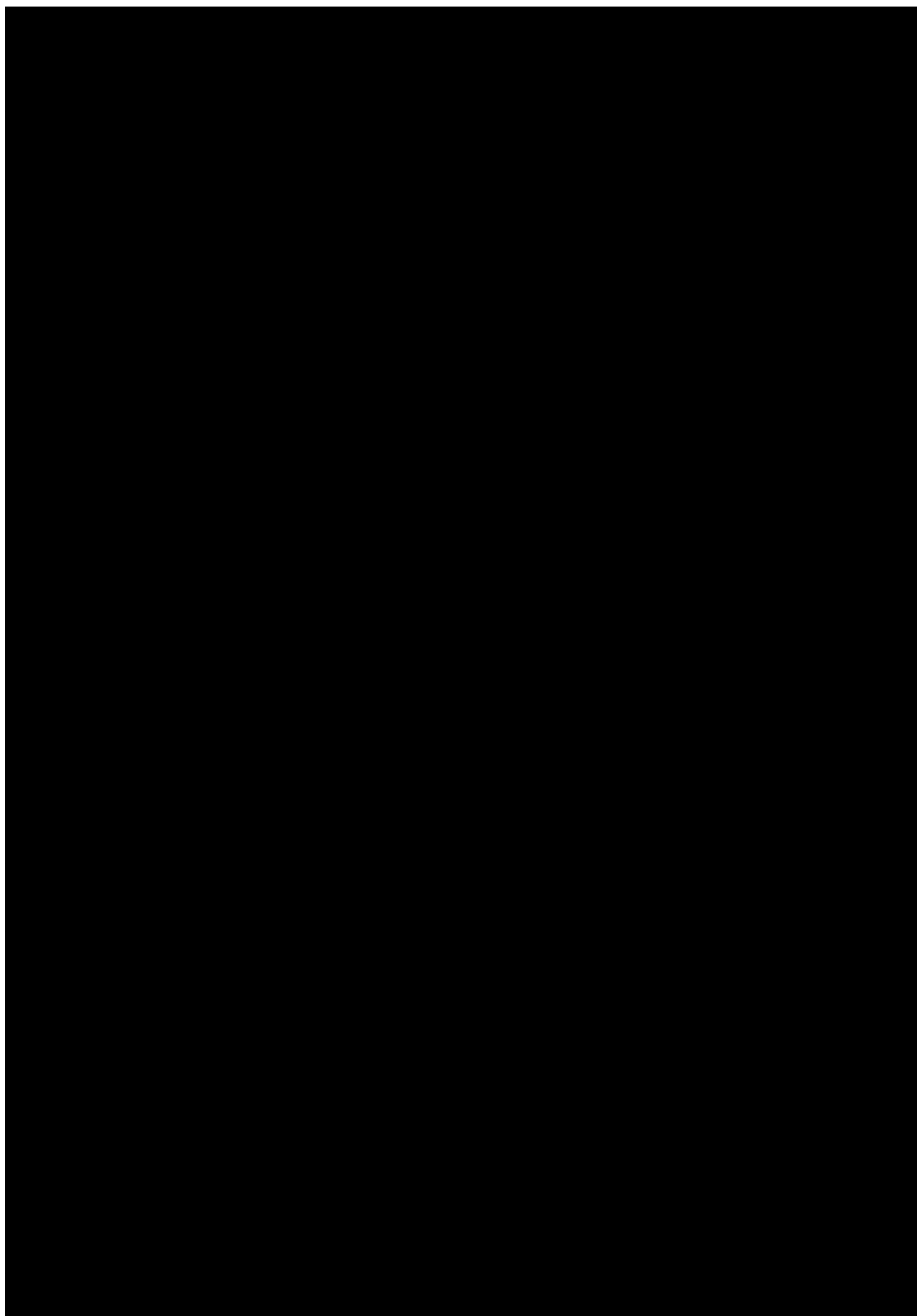
総括

表ロ-1 構造決定および物理化学的性質一覧表

項目		試験結果
名称	一般的名称	メチルイソチアゾリノン
	化学名	和名 : 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン 英名 : 2-methyl-4-isothiazolin-3-one
	化学構造式	
分子式および分子量		C ₄ H ₅ NOS : 115.2
構造決定		
物理化学的性質		

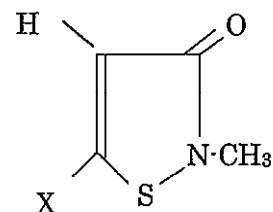
ロ. 物理的・化学的性質に関する資料

1. ネオロンTM 950活性成分、メチルイソチアゾリノンの合成法



2. ネオロン™ 950活性成分、メチルイソチアゾリノンの物理化学的性状および構造決定

前項の [redacted]
[redacted] 合成を行うと、 [redacted]
[redacted] メチルイソチアゾリノン
(Ia: X=H) が主生成物として得られた。このものの物理化学的性状を、表ロ-2にまとめて示した。



表ロ-2 ネオロン™ 950活性成分の物理化学的性状

[redacted]

また、その化学構造については、 [redacted]
[redacted] により上記の式に示したものであると同定した。すなわち、 [redacted]
[redacted]
[redacted] 上記の化学構造が正しいことを支持した。

[redacted]

八. 安全性 添付資料ハ-1~26

総 括

	動物種	投与(処置)経路, 期間	投与量(mg/kg/日) または処置濃度	試験結果(mg/kg/日)		実施施設	GLP 準拠	頁	資料 番号
単回投与毒性	ラット	経口	ネオロン TM 950 ^{#1} ♂: 2000, 2500, 3000, 5000 ♀: 1000, 1500, 2000	LD ₅₀	♂: 2834(280.6) ^{#2} ♀: 1091(105.7) ^{#2}	A	準拠	40	ハ-1
		皮膚	ネオロン TM 950 ^{#1} ♂♀: 2000, 3500, 5000	概略の致死量	♂♀: >5000 (484.5) ^{#2}	A	準拠	41	ハ-2
反復投与毒性	ラット	経口3ヶ月(混水)	75, 250, 1000ppm	無毒性量	250ppm (♂: 19.0mg/kg/日) ^{#2} (♀: 24.6mg/kg/日) ^{#2}	A	準拠	42	ハ-24
生殖発生毒性試験	ラット	経口 交配15週間前より F2の離乳時まで	ケーソン886F [#] Biocide ^{#4} 30, 100, 300ppm	無一般毒性	30ppm (P1: 0.73~0.93mg/kg/日) ^{#2} (P2: 1.10~1.20mg/kg/日) ^{#2}	A	準拠	46	ハ-25
				無生殖能および次世代量	300ppm (P1: 5.70~7.00mg/kg/日) ^{#2} (P2: 8.55~9.05mg/kg/日) ^{#2}				
皮膚一次刺激性	ウサギ	皮膚 4時間 半閉塞	100ppm	刺激性	なし	A	準拠	56	ハ-3
連続皮膚刺激性	ヒト	感作: 皮膚23時間/日 ×21日間 惹起: 皮膚24時間×1回	50, 100, 250, 500, 1000ppm	刺激性/感受性 の閾値	1000ppm付近	B	—	57	ハ-4
	ウサギ	皮膚 1回/1日、14日間連続 開放塗布	100, 300, 1000ppm	累積刺激性	なし	C	準拠	60	ハ-5
感作性	モルモット	マキシミゼーション法 感作: 皮内(1回目) 皮膚48時間×1回 惹起: 皮膚24時間×1回	550, 800ppmで感作 550, 800, 1000ppm で惹起	一次皮膚刺激性 遅延型接触過敏 誘発能	なし なし (<30%)	A	準拠	62	ハ-6
	モルモット	ビューラー法 感作: 皮膚10回 (6時間/回×3回/週) 惹起: 皮膚24時間×1回	1000, 5000, 15000, 30000ppm	一次皮膚刺激性 遅延型接触過敏 誘発能(BC ₅₀)	なし 感作: >5000ppm 惹起: >15,000ppm	A	準拠	66	ハ-7
	ヒト	感作: 24時間/回, 4回/週×3週 惹起: 24時間×1回	100ppm	感作性	なし (1名に刺激, 感作性が 認められたが除外)	D	—	68	ハ-8
	ヒト	感作: 皮膚24時間×9回 惹起: 皮膚24時間×1回	200ppm	感作性	なし	E	—	70	ハ-9
	ヒト	感作: 皮膚24時間×9回 惹起: 皮膚24時間×1回	300ppm	感作性	なし	E	—	71	ハ-10

	動物種	投与(処置)経路, 期間	投与量(mg/kg/日) または処置濃度	試験結果(mg/kg/日)		実施施設	GLP 準拠	頁	資料 番号
光毒性	ヒト	皮膚24時間×1回 照射: UVA 20J/cm ² UVB 0.5MED	200ppm	陰性		E	—	72	ハ-11
	モルモット	皮膚1回 照射: UVA 10.0~11.9J/cm ²	200ppm	陰性		C	準拠	74	ハ-12
光感作性	ヒト	感作: 皮膚24時間/回 ×6回/週 惹起: 皮膚24時間 照射: UVA 10J/cm ² UVB 0.5MED	200ppm	光感作性	なし	E	—	76	ハ-13
	モルモット	感作: 皮膚1回/日 ×5日間連続 惹起: 皮膚, 初回投与後21日目 照射: UVA 9.9~11.2J/cm ²	200ppm	光感作性	なし	C	準拠	78	ハ-14
眼刺激性	ウサギ	点眼1回	100ppm	刺激性	なし	A	準拠	80	ハ-15
遺傳 毒 性	復帰突然 変異 染色体 異常	サルモ ネラ菌	直接法	5~600 μg/プレート	陰性	A	準拠	81	ハ-16
			代謝活性化法	20~1000 μg/プレート	陰性				
	CHO細 胞	直接法	1.25~12.7 μg/ml	3.75~12.7 μg/mlで細胞毒性を伴う陽性 →疑陽性	F	準拠	84	ハ-17	
			代謝活性化法	1.25~16.9 μg/ml					7.50~16.9 μg/mlで細胞毒性を伴う陽性 →疑陽性
	小核	マウス	経口(単回)	10, 50, 100mg/kg	陰性	A	準拠	88	ハ-18
	遺伝子突 然変異	CHO細 胞	直接法	0.5~40 μg/ml	陰性	G	準拠	90	ハ-19
				代謝活性化法	0.5~40 μg/ml				
ヒトパッチ	ヒト	皮膚24時間×1回	100, 300, 600ppm	刺激性	なし	I	—	93	ハ-20
			シャンプー(100ppm) ^{#3}	刺激性	許容品	I	—	95	ハ-21
			サンスクリーン(100ppm) ^{#3}	刺激性	安全品	I	—	97	ハ-22
			ボディローション(100ppm) ^{#3}	刺激性	安全品	I	—	99	ハ-23
吸収・分布・ 代謝・排泄	ラット	皮膚 経口 静注: 単回	2-メチル-4-イソチアゾ リン-3-オンと5-クロロ- 2-メチル-4-イソチアゾ リン-3-オンの混合物 (25:75) 皮膚: 2.5, 25ppm 経口および静注: 25 μg/kg	皮膚投与	残存: 54~73% 吸収: 26~43% 排泄: 糞中へ全排泄 の58~78%	A	準拠	101	ハ-26
				経口投与	吸収: 90% 排泄: 尿中へ全排泄 の99.6%				

#1: 9.69% 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン水溶液

#2: () 内は2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの概算値

#3: () 内は試験製剤中に含まれる2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの濃度

#4: 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを3.7%含有する防腐剤製品

実施施設: A; Rohm & Haas Company, B; [REDACTED], C; [REDACTED], D; [REDACTED],

E; [REDACTED], F; [REDACTED], G; [REDACTED], I; [REDACTED]

単回投与毒性：

ネオロン TM950(9.69% 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン水溶液)の経口投与によるラットのLD50値は雄雌それぞれ2834mg/kg、1091mg/kgであった。また、皮膚投与によるラットの概略致死量は雌雄ともに5000mg/kg以上であった。

反復投与毒性試験：

飲料水に溶解し、ラットに3ヵ月間自由経口摂取させた。摂水量の減少が雄の75ppm濃度以上投与群、雌の250ppm濃度以上投与群に、摂餌量の減少が雄の1000ppm濃度群に、体重の増加抑制が雌雄の1000ppm濃度投与群に認められたが、その他の検査項目に影響は認められず、無毒性量は250ppm濃度(雄：19.0mg/kg/日、雌：24.6mg/kg/日)と判断される。

生殖発生毒性試験：

雌雄ラットの第一世代親動物(P1)に交配10週間前からケーソン886Fを飲料水に添加して自由摂取させ、二世代間の生殖発生に及ぼす影響を検討した。その結果、親動物(P1およびP2)では100ppm濃度以上で胃部に粘膜びらん等の所見が認められたが他の検査項目や生殖発生に対してなんら異常は認められなかった。親動物の一般毒性学的無毒性量は30ppm(被験物質：P1:0.73~0.93mg/kg/日、P2:1.10~1.20mg/kg/日)であり、生殖能および次世代に対する無毒性量は300ppm(被験物質:P1:5.70から7.00mg/kg/日、P2:8.55~9.05mg/kg/日)以上であると判断される。

皮膚一次刺激性試験：

ウサギの除毛した無傷皮膚に100ppm濃度で4時間、半閉塞投与したが、紅斑および浮腫の発現はなく刺激性はないと判断される。

連続皮膚刺激性試験：

- ① ヒト皮膚に50、100、250、500および1000ppm濃度で1日23時間21日間感作した後惹起した。その結果、1000ppm濃度で感作期間中16名のうち5名に、また惹起後2名に軽度の反応がみられたことから刺激性/感受性の閾値は1000ppmあるいはその付近と判断される。
- ② ウサギの剃毛背部皮膚に100、300および1000ppm濃度で1日1回14日間連続開放塗布し、皮膚刺激性を評価した。その結果、いずれの投与群においても、異常は認められず、刺激性はないと判断される。

感作性試験：

- ① マキシミゼーション法 — モルモットに550および800ppm濃度で感作した後に惹起し、さらに1000ppm濃度で再惹起した。800ppm濃度でも皮膚刺激性は認められず、また、800ppm濃度で感作し1000ppm濃度で惹起した場合も、皮膚反応は26%にすぎなかった(過敏症>30%)。以上より、感作性の閾値は800ppmを超える濃度と考えられる。
- ② ビューラー法 — モルモットに1000、5000、15000および30000ppm濃度で10回6時間(3回/週)感作し、2週間後に惹起した。30000ppm濃度でも皮膚刺激性は認められなかった。5000ppm濃度以上(15000ppmで惹起)および15000ppm濃度以上(3000ppmで感作)の場合、遅延型接触過敏症が認められ、感作および惹起のEC50は5000ppm濃度以上および15000ppm濃度以上と判断される。
- ③ ヒト皮膚で3試験実施した。即ち、100ppm濃度で98名、200ppm濃度で100名、300ppm濃度で98名の各志願者の背部皮膚に感作および惹起した。100ppm濃度で1名に感作、惹起ともに反応が認められた以外、何ら反応は認められなかった。なお、100ppm濃度で感作、惹起ともに反応が認められた1名については、試験期間の極めて早期から反応しており(誘発期の5日目)、イソチアゾリン関連物質に以前感作されていたと思われること、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのより高い用量(200および300ppm AI)の試験で反応が見られなかったこと、ヒト繰り返し障害パッチテストにおいて、100人の患者のうち一人の割合でバックグランドノイズがあること、さらに日本でもアレルギーとして蒸留水を用いた場合0.5%の割合で陽性反応を示すことが報告されている¹⁾ことから、この被験者が不適当でない場合においても誤差範囲の反応と思われる。従って、以上のことから被験物質による皮膚感作性の発症の可能性は低いものと考えられる。

- 1) Masaru Natuaki: Results of patch testing with standard allergens of the Japanese Society for Contact Dermatitis and topical nonsteroidal anti-inflammatory preparatins in 1998: Environ. Dermatol 7:1-5, 2000

光毒性試験：

- ① 志願者 12 名の背部に 200ppm 濃度で実施したが、反応は認められず光毒性の誘発性はないと判断される。
- ② モルモットの除毛背部皮膚に 200ppm 濃度で実施したが、反応は認められず光毒性の誘発性はないと判断される。

光感作性試験：

- ① 志願者 26 名の背部に 200ppm 濃度で感作および惹起、光照射をしたが、光アレルギーは認められず、光感作誘発性はないと判断される。
- ② モルモットの剃毛背部皮膚に 200ppm 濃度で感作および惹起、光照射をしたが、光アレルギーは認められず、光感作誘発性はないと判断される。

眼刺激性試験：

ウサギの結膜嚢内に 100ppm 濃度で投与したが、影響は認められず眼粘膜に対し、刺激性を有しないと判断される。

遺伝毒性試験：

- ① 復帰突然変異試験 — サルモネラ菌を用いて実施したが、代謝活性化系の存在下および非存在下ともに陰性であった。
- ② 染色体異常試験 — CHO 細胞を用い代謝活性化系の存在下および非存在下で実施したが、細胞毒性の認められた濃度(代謝活性化系の非存在下：3.75~12.7 μg/ml、存在下：7.50~16.9 μg/ml)では、染色体異常を生じたことから、Hilliard et al らの説²⁾に従い疑陽性と判断される。
- ③ 小核試験 — マウスに経口投与で実施したが、小核誘発性は認められなかった。
- ④ 遺伝子突然変異 — CHO 細胞の HGPRT 遺伝子での変異誘発能を代謝活性化系の存在下および非存在下で調べたが、誘発能は認められなかった。

なお、本被験物質(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン)と類似化合物(5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン)の混合物を用いたマウス *in vivo* 染色体異常試験³⁾においても、染色体異常を誘発させなかった。以上の成績から総合的に判断すると、本物質は遺伝毒性を有する可能性は低いものと考えられる。

²⁾ Hilliard, C.A., Armstrong, M.J., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K. and Galloway, S.M. Chromosome Aberration In Vitro Related to Cytotoxicity of Nonmutagenic Chemicals and Metabolic Poisons, Environmental and Molecular Mutagenesis 31: 315-326, 1998

³⁾ Acute Test for Chemical Induction of Chromosome Aberration in Mouse Bone Marrow Cells In Vivo (Kathon 886 MW Biocide), Sitek Research Laboratories, Report No. 92RC-0054

ヒトパッチ試験：

志願者 40 名の背部に 24 時間閉塞貼付で実施したが、対照群(精製水)と同等であり「安全品」の範囲であった。また、試験製剤品であるシャンプー、サンスクリーンおよびボディローションについても同様に実施したが、シャンプーは「許容品」の範囲にサンスクリーンおよびボディローションは「安全品」の範囲であった。

吸収・分布・代謝・排泄：

14C-標識した 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンと 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンとの混合物(25:75)としてラットに皮膚投与すると、投与部位に 54~73% 残留し、吸収は 26~43% にすぎなかった。また、全排泄の 58~78% が糞中に排泄された。一方、経口投与の場合 90% が吸収され、全排泄の 99.6% が尿中に排泄された。

本品の安全性について

1. 種々の化粧品製品の実使用時の1日推定全身暴露量と皮膚刺激性の閾値との比較：

2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのヒトへの皮膚刺激性を評価する場合、「既存の科学的情報に基づいて、物質が定められた条件下でヒトに対してどのような有害影響をどの程度及ぼすかを予測する」、すなわちリスクアセスメントを基に評価すべきと考える。リスクは、日常生活での暴露等の定められた条件において対象とする物質がヒトに有害性を発生させる確率と定義され、「リスク＝ハザード(ヒトへの健康障害を起こす物質の性質)×暴露」の式で表される。また、暴露は「暴露＝濃度×時間」で表される。皮膚暴露は皮膚のユニット面積あたりの用量で示される。これらに基づき、ヒト連続皮膚刺激性試験成績から、次のことが計算できる。本暴露計算については、Robinson et al. : Contact Dermatitis 42 : 251-259, 2000 に従って行った。

① シャンプーについての暴露計算

・暴露についての仮定

女性の体表面積の中央値 = 1.69m^2

体表面積に対する頭部表面積の割合 = 7.1%

頭部の表面積 (= 0.071×1.69) = 0.12m^2

頭半分の表面積 (即ち、頭皮 = $0.12 \div 2$) = 600cm^2

体表面積に対する手の表面積の割合 = 5.1%

手の表面積 (= 0.051×1.69) = $0.086\text{m}^2 = 860\text{cm}^2$

一日あたりに用いられるシャンプーの量 = 12g

頭皮に1%保持されると仮定して = 0.01 (保持ファクター)

皮膚吸収が100%と仮定して = 1.0 (吸収ファクター)

・シャンプー中の2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンに対する暴露(用量/ユニット面積)の計算

成分の1日当たりの暴露 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) =

$$\frac{[\text{製品中の量}(\mu\text{g/g 製品}) \times \text{製品適用量}(\text{g})]}{\text{表面積}(\text{cm}^2)} \times 0.01(\text{保持ファクター}) \times 1.0(\text{吸収ファクター})$$

従って、

2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの1日当たりの暴露(シャンプー中100ppmの場合)は、以下のとおりとなる。

$$(100\mu\text{g/g} \times 12\text{g} \div 1460\text{cm}^2) \times 0.01 \times 1.0 = 0.008\mu\text{g}/\text{cm}^2$$

感作最終ポイントに対する比較：

暴露 $0.008\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 対 NOEL $88.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1000ppm = 刺激/感作に対する閾値)

従って、安全性限界 = NOEL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \div 暴露 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

$$= 88.5 \div 0.008$$

$$= 11063 \text{ となる。}$$

② Leave-on 製品 (その1、ここでは顔クリームを例示) に対する暴露計算

・暴露についての仮定

女性の体表面積の中央値 = 1.69m^2

体表面積に対する頭部表面積の割合 = 7.1%

頭部の表面積 (= 0.071×1.69) = 0.12m^2

頭半分の表面積 (即ち、顔 = $0.12 \div 2$) = 600cm^2

一回適用あたりのクリームの量 = 0.8g

一日あたりに用いられるクリームの適用回数 = 2回

一日あたりに用いられるクリームの量 = 1.6g

- 皮膚に 100%保持されると仮定して = 1.0 (保持ファクター)
 皮膚吸収が 100%と仮定して = 1.0 (吸収ファクター)
 ・顔クリーム中の 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンに対する暴露 (用量/ユニット面積) の計算

$$\frac{\text{成分の 1 日当たりの暴露 } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = [\text{製品中の量}(\mu\text{g}/\text{g 製品}) \times \text{製品適用量}(\text{g})]}{\text{表面積 } (\text{cm}^2)} \times 1.0(\text{保持ファクター}) \times 1.0(\text{吸収ファクター})$$

従って、
 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 1 日当たりの暴露(顔クリーム中 100ppm の場合) は、以下のとおりとなる。

$$(100 \mu\text{g}/\text{g} \times 1.6\text{g} \div 600\text{cm}^2) \times 1.0 \times 1.0 = 0.27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

感作最終ポイントに対する比較:

暴露 $0.27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 対 NOEL $88.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1000ppm = 刺激/感作に対する閾値)

$$\begin{aligned} \text{従って、安全性限界} &= \text{NOEL } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) \div \text{暴露 } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) \\ &= 88.5 \div 0.27 \\ &= 328 \text{ となる。} \end{aligned}$$

③ Leave-on 製品 (その 2、ここではボディローションを例示) に対する暴露計算

- ・暴露についての仮定

女性の体表面積の中央値 = 1.69m^2

体表面積に対する頭部以外の表面積の割合 = 92.8%

頭部以外の体表面積 (= 0.928×1.69) = 15683cm^2

一回(一日)適用あたりのボディローションの量 = 8g

皮膚に 100%保持されると仮定して = 1.0 (保持ファクター)

皮膚吸収が 100%と仮定して = 1.0 (吸収ファクター)

- ・ボディローション中の 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンに対する暴露(用量/ユニット面積)の計算

$$\frac{\text{成分の 1 日当たりの暴露 } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = [\text{製品中の量}(\mu\text{g}/\text{g 製品}) \times \text{製品適用量}(\text{g})]}{\text{表面積 } (\text{cm}^2)} \times 1.0(\text{保持ファクター}) \times 1.0(\text{吸収ファクター})$$

従って、

2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 1 日当たりの暴露(ボディローション中 100ppm の場合)は、次のとおりとなる。

$$(100 \mu\text{g}/\text{g} \times 8\text{g} \div 15683\text{cm}^2) \times 1.0 \times 1.0 = 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

感作最終ポイントに対する比較:

暴露 $0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 対 NOEL $88.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1000ppm = 刺激/感作に対する閾値)

$$\begin{aligned} \text{従って、安全性限界} &= \text{NOEL } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) \div \text{暴露 } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) \\ &= 88.5 \div 0.05 \\ &= 1770 \text{ となる。} \end{aligned}$$

以上のように刺激/感作について閾値が $88.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (あるいは 1000ppm)以上を示すヒト連続刺激性試験の結果は、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの使用最大濃度においても大きな安全性限界が認められることを証明した。

2. 種々の皮膚感作性試験結果に関する考察並びに化粧品製品の実使用時の1日推定全身暴露量と皮膚感作性の閾値との比較：

2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの潜在的感作性は種々の動物試験で検討されており、その要約は下記の通り。

試験名	結果(要約)	備考
マウス局所リンパ節感作性試験	10000ppm(200 μ g/cm ²)以上の用量で感作性が観察された。	4)
モルモット皮膚感作性試験 (Buehler 法)	感作性の閾値：1000ppm(100 μ g/cm ²)を超える濃度	資料概要 32 及び 66~67 ページ
モルモット Open epicutaneous test	感作性の閾値：3000ppm(38 μ g/cm ²)を超える濃度	5)
モルモット皮膚感作性試験 (Maximization 法)	800ppm で惹起した場合に感作性はみられず、1000ppm で再惹起した場合に遅発性接触感作性を示す最小反応とされる30%を超えなかった。従って、感作性の閾値は800ppm(35 μ g/cm ²)を超える濃度と判断した。	資料概要 32 及び 62~65 ページ

4) Potter D.W. and Hazelton, G.A., Evaluation of auricular lymph node cell proliferation in isothiazolione treated mice. Fund. App. Toxicol. 24, 165-172, 1995

5) Methylisothiazolione 20% Open epicutaneous test in guinea pigs, Report 01RC-1031

以上の動物試験の成績から、動物における被験物質の感作性の閾値は 35 μ g/cm² を超える濃度と判断した。

一方、ヒトにおける被験物質の潜在感作性を評価するため、一連の Human Repeat Insult Patch 試験を実施し、その要約は以下のとおり。

試験濃度	被験者数	結果(要約)	備考
100ppm (4 μ g/cm ²)	98 名	陽性：1 名* 陰性：97 名	資料概要 32 及び 68~69 ページ
200ppm (10 μ g/cm ²)	100 名	陰性：100 名	資料概要 32 及び 70 ページ
300ppm (15 μ g/cm ²)	98 名	陰性：98 名	資料概要 32 及び 71 ページ
600ppm (30 μ g/cm ²)	106 名	陰性：106 名	6)

* 本事象の考察は資料概要 32 ページを参照

6) Repeated Insult Patch Study With 2-Methylisothiazolin-3-One At an Aqueous Concentration Of 600ppm Active Ingredient, Report No. 00R-0099

以上のヒトでの試験の結果から、被験物質に対する感作の閾値は、600ppm(30 μ g/cm²) を超える濃度と考えられ、動物における試験成績とよく一致している。

上記のヒトでの感作性の結果を基に、シャンプー、顔クリーム及びボディローション化粧品各製品についての暴露を仮定した場合(上記1項、種々の化粧品製品の実使用時の1日推定全身暴露量と皮膚刺激性の閾値との比較と同様)を比較すると以下のとおりとなる。

- ① シャンプー中の 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン(100ppm)に対する皮膚暴露 (用量/ユニット面積)
2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの1日当たりの暴露(シャンプー中 100ppm の場合)は、次のとおりとなる。

$$(100 \mu\text{g/g} \times 12\text{g} \div 1460\text{cm}^2) \times 0.01 \times 1.0 = 0.008 \mu\text{g/cm}^2$$

感作最終ポイントに対する比較：

暴露 $0.008 \mu\text{g/cm}^2$ 対 NOEL $30 \mu\text{g/cm}^2$ 以上 (= 感作に対する閾値)

安全性限界=NOEL ($\mu\text{g/cm}^2$) / 暴露 ($\mu\text{g/cm}^2$)

$$=30/0.008$$

=3750 従って、3750 倍以上となる

- ② Leave-on 製品(顔クリーム)中の 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン(100ppm)に対する皮膚暴露 (用量/ユニット面積)

2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 1 日当たりの暴露(顔クリーム中 100ppm の場合)は、以下のとおりとなる。

$$(100 \mu\text{g/g} \times 1.6\text{g} \div 600\text{cm}^2) \times 1.0 \times 1.0 = 0.27 \mu\text{g/cm}^2$$

感作最終ポイントの比較：

暴露 $0.27 \mu\text{g/cm}^2$ 対 NOEL $30 \mu\text{g/cm}^2$ 以上

安全性限界=NOEL ($\mu\text{g/cm}^2$) / 暴露 ($\mu\text{g/cm}^2$)

$$=30/0.27$$

=111 従って、111 倍以上となる。

- ③ Leave-on 製品(ボディローション)中の 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン(100ppm)に対する皮膚暴露 (用量/ユニット面積)

2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 1 日当たりの暴露 (ボディローション中 100ppm の場合) は、以下のとおりとなる。

$$(100 \mu\text{g/g} \times 8\text{g} \div 15683\text{cm}^2) \times 1.0 \times 1.0 = 0.05 \mu\text{g/cm}^2$$

感作最終ポイントの比較：

暴露 $0.05 \mu\text{g/cm}^2$ 対 NOEL $30 \mu\text{g/cm}^2$ 以上

安全性限界=NOEL ($\mu\text{g/cm}^2$) / 暴露 ($\mu\text{g/cm}^2$)

$$=30/0.05$$

=600 従って、600 倍以上となる。

以上、述べたところから 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの動物及びヒト皮膚の感作の閾値と rinse-off 及び leave-on 製品での使用暴露における量の間には、大きな安全域があることを証明した。

3. ヒト実使用時における 1 日推定全身暴露量と反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験の無毒性量との比較：

・ 一日推定暴露量

ヒトに暴露のパラメーターはヨーロッパ委員会のガイダンス⁷⁾を参考にした。

ヒトが 24 時間暴露期間中一度に数多くの Leave-on type および Rinse-off type の製品を何回も使用した条件で推測している。

⁷⁾ European Commission, Enterprise Directorate-General, Directorate-General Health and Consumer Protection, Volume 3, Guidelines for Cosmetic Products, Notes of guidance for testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation, 1999 Edition.

Leave-on type 製品 :

製品タイプ	適用総量 (g)	1日の適用頻度(回/日)	保持力(%)	1日当たりの暴露量 (g)
Face cream	0.8	2	100	1.6
General cream	1.2	2	100	2.4
Body lotion	8.0	1	100	8.0
Anti-perspirant (roll-on)	0.5	1	100	0.5
Hair styling	5.0	2	10	1.0
			総計	13.5

Rinse-off type 製品 :

製品タイプ	適用総量 (g)	1日の適用頻度(回/日)	保持力(%)	1日当たりの暴露量 (g)
Make up remover	2.5	2	10	0.5
Shower gel	5.0	2	1	0.1
Shampoo	8.0	1	1	0.08
Hair conditioner	14.0	0.28	1	0.0392
			総計	0.72

- ・ 毎日の統計暴露量(すべての化粧品に対する暴露量)

Leave-on type 製品総計 13.5 g
 Rinse-off type 製品総計 0.72 g

全ての化粧品に対する総暴露量 14.22 g

全ての製品における推測最大許容濃度 : 100 ppm AI
 全ての製品からの総暴露量(mg) : $14220 \times 0.0001 = 1.422\text{mg}$

体重を 50kg とした場合、
 体重 kg 当たりの総暴露量(mg/kg/日) : $1.422 \div 50(\text{kg}) = 0.0284\text{mg/kg/日}$

皮膚からの吸収率 : 最大 43%(概要 103 ページ参照)
 1日の総吸収量(mg/kg/日) : $0.0284 \times 0.43 = 0.0122\text{mg/kg/日}$

- ・ 反復毒性及び生殖発生毒性についての無毒性量と暴露量の比較

- 1) 反復投与毒性試験における被験物質の無毒性量は、雄が 19.0mg/kg/日で、雌が 24.0mg/kg/日である。従って、
 安全限界 : 雄 $19.0 \div 0.0122 = 1557.3$
 雌 $24.6 \div 0.0122 = 2032.8$
- 2) 生殖発生毒性試験における被験物質の無毒性量は生殖毒性では P1 で 5.70~7.00mg/kg/日、P2 で 8.55~9.05mg/kg/日である。従って、低い数値の 5.70mg/kg/日を採用すると、安全限界 : $5.70 \div 0.0122 = 467.2$
 親動物における一般毒性の無毒性量は P1 で 0.73~0.93mg/kg/日、P2 で 1.10~1.20mg/kg/日である。従って低い数値の 0.73mg/kg/日を採用すると、安全限界 : $0.73 \div 0.0122 = 59.8$ となる。

しかし、生殖試験は被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン(以下、MI)と類似

構造を持つ 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン(以下、CMI)を各々3.7%、及び11.1%計 14.8%の活性体を含むケーソン 886F Biocide を用いて実施されている。CMIを主成分(44%)とするケーソン 886T のラット単回経口投与による CMI の LD50 値は雄で44mg/kg、雌で51mg/kg(ケーソン CG 申請概要 43 ページ参照、参考資料ハ-1)であり、今回の申請被験化合物 MI の LD50 値の概算値、雄 274.6mg/kg(=2834×0.0969)、雌 105.7mg/kg(=1091×0.0969)に比べ、雄で約4倍、雌で約2倍毒性が強い。従って CMI の毒性をゼロと仮定して求めた上記の安全限界とは別に CMI と MI の毒性が同等として安全域を求めると、生殖試験の CMI+MI の無毒性量は P1 が 22.7~28.0mg/kg/日、P2 が 33.5~35.7mg/kg/日である。従って低い数値を採用すると

安全限界：22.7÷0.0122=1860.7

親動物における CMI+MI の一般毒性の無毒性量は P1 では 2.8~3.7mg/kg/日、P2 では 4.3~4.8mg/kg/日である。従って、低い数値を採用すると、

安全限界：2.8÷0.0122=229.5 となる。

安全域を考える場合、CMI の毒性をゼロと仮定するより、考慮したほうが現実に即していると思われる。

被験物質の安全限界は反復投与毒性、生殖発生毒性試験における親動物の一般毒性及び生殖毒性共に 200 倍を上回り、安全と言える。

1. 単回投与毒性(急性毒性)試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-1、2

(1) ラット単回経口投与毒性試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-1

ネオロン™950(9.69% 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン水溶液)を CrI:CD*BR 雄雌ラットに経口投与し 14 日間観察した。

その結果、雄雌ともに投与量に依存した死亡率の増加傾向が認められた。

一般状態では、投与 1 時間後から 4 日の観察期間を通し、すべての投与群に呼吸雑音、不動態、運動失調、流涙、流ぜん、排糞減少、軟糞、下痢および糞中粘液が認められた。

各投与群の生存例の体重には被験物質の影響はなく、剖検においても特記すべき所見は認められなかった。一方、死亡例の剖検では、胃粘膜および腸の赤色化、胃拡張などの胃腸の変化が認められた。

雄ラットの LD₅₀ 値は 2834mg/kg、雌ラットの LD₅₀ 値は 1091mg/kg であった。

試験成績を表ハ-2 に示した。

表ハ-2 ネオロン™950 のラット単回経口投与毒性試験成績

動物種、系統、性、週齢、体重	ラット、CrI:CD*BR、♂：8 週齢(206~234g)、 ♀：9 週齢(180~212g)						
投与経路(投与方法)	単回経口投与 (ネオロン™950 を希釈しないでそのまま用いた。)						
性	♂				♀		
投与量 (mg/kg)	2000	2500	3000	5000	1000	1500	2000
動物数	5	6	6	6	6	6	6
死亡数	1	3	2	6	1	6	5
一般状態	各投与群雄雌共通して、呼吸雑音、不動態、運動失調、流涙、流ぜん、排糞減少、軟糞、下痢、糞中粘液が認められた。						
体重	生存例：特記すべき所見なし						
剖検	生存例：特記すべき所見なし 死亡例：胃腸の変化(胃粘膜および腸の赤色化、胃拡張など)						
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	2834 [2047~4377]				1091 [891~1334]		

LD₅₀ 値：雄は Probit 分析法で算出、雌は Thompson 移動平均法で算出

[]内数値：95%信頼限界(mg/kg)

(2) ラット単回皮膚投与毒性試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-2

ネオロン™950(9.69% 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン水溶液)を CrI:CD*BR 雄雌ラットの皮膚(6×6-7cm)に24時間処置し、2000、3500および5000mg/kgの3用量で試験を実施した。

その結果、最高投与量の5000mg/kgまでの雄雌のいずれにも死亡例は認められなかった。概略の致死量は、雄雌ともに5000mg/kg以上と判断され、性別による差は認められなかった。

一般状態の変化として、投与1日目から14日間の観察期間を通して皮膚への影響があり、囊浮腫/浮腫、紅斑、青白、乾皮、黒色或いは赤色化した部位、痂皮、焼痂および/あるいは痂皮がすべての投与量で認められた。また、雄の5000mg/kg群で投与後3日目に、雌の3500および5000mg/kgで投与後2および3日目に糞の減少がそれぞれ認められた。その他、体重および剖検においては、特記すべき所見はなかった。

以上の結果から、概略の致死量はラットにおける単回皮膚投与で5000mg/kg以上と判断される。

試験成績を表ハ-3に示した。

表ハ-3 ネオロン™950のラット単回皮膚投与毒性試験成績

動物種、系統、週齢、体重	ラット、CrI:CD*BR、♂：8~9週齢(248~334g)、 ♀：9~10週齢(200~244g)					
投与経路(投与方法)	皮膚投与(ネオロン™950を希釈しないでそのまま用いた。)					
性	♂			♀		
投与量(mg/kg)	2000	3500	5000	2000	3500	5000
動物数	6	6	6	6	6	6
死亡数	0	0	0	0	0	0
一般状態	皮膚所見：囊浮腫、浮腫、紅斑、青白、乾皮、黒色或いは赤色化部位、痂皮、 焼痂 (観察期間を通じて)					
				糞の減少 (投与後3日目)	糞の減少 (投与後2および3日目)	
体重	特記すべき所見なし					
剖検	特記すべき所見なし					
概略の致死量(mg/kg)	>5000			>5000		

2. 反復投与毒性試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-24

(1) ラット3ヵ月間投与毒性試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-24

被験物質である2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを75、250および1000ppmの濃度に飲料水に溶解し、6週齢の雄雌ラット(Crl:CD®BR)に3ヵ月間自由経口摂取させた。

1群雄雌各10匹の4群を設定し、7日/週投与した。対照群には水のみを投与した。投与量は用量設定試験から選定し、1000ppm濃度以上で動物への影響が認められたことから1000ppmを最高投与濃度とした。

体重、摂餌量および摂水量は毎日測定し、最終投与後一夜絶食した後剖検に供すと共に血液学的検査^{a)}、血液生化学的検査^{b)}、器官重量および病理組織学的検査を測定した。また、投与前および投与終了時に眼科学的検査を実施した。

その結果、全投与期間を通して、摂水量の減少が雄の75、250および1000ppm濃度投与群に、雌の250および1000ppm濃度投与群に認められた。さらに、摂餌量の減少が雄の1000ppm濃度投与群に、体重増加抑制が雌雄の1000ppm濃度投与群に認められた。また、雌雄の1000ppm濃度投与群で腎、雄の1000ppm濃度投与群で脳の相対重量の増加がみられた。

血液学的検査において、雌の250ppm以上の群でのみに認められた赤血球(RBC)、ヘモグロビン(HGB)及びヘマトクリット(HCT)に統計学的に有意な減少がみられたが、これらの所見の変動幅は対照群の値と比較して小さく(<10%)、各群のこれらの値の平均値は実験施設の正常範囲(45ページ)内であった。また、貧血に通常関連のある脾臓あるいは他の臓器において被験物質の投与に関連したと思われる剖検所見及び病理組織学的所見は認められなかったことなどから、RBC、HGB及びHCTにみられた有意な減少は偶発的なものであり、毒性学的意味は無いと判断した。

その他の血液学的および血液生化学的検査、器官重量、剖検および病理組織学的所見には被験物質の影響は認められず、また、全身性の毒性も観察されなかった。眼科学的検査においては、投与前の検査では限局性網膜症が雄1例に、硝子体内出血が雌1例に認められたため、これらのラットは除いて試験に供した。3ヵ月後の検査では限局性網膜症が75ppm濃度群の雄1例の右眼に、1000ppm濃度群の雄2例の右眼ないし左眼に、血涙症(紅涙症)が対照群の雄1例の右眼に、250ppm濃度群の雄雌各1例(雄:左眼、雌:右眼)に、1000ppm濃度群の雄2例の右眼ないし左眼に認められたが、他の異常は認められなかった。限局性網膜症、硝子体内出血および血涙症は、ラットではよく見られる症状であり、投与とは関連が無いと判断した。

摂水量の減少が投与量に依存して認められ、雄は75ppm以上で、雌は250ppm以上の濃度群で有意であった。投与液濃度、体重、摂水量及び被験物質摂取量(1日平均暴露量)を比較すると次頁の通りとなる。

雄：

投与液濃度 (ppm)	投与液濃度比	体重			摂水量			1日平均暴露量 (単位：mg/kg/日)		
		実測値 ¹⁾ (g)	%	%	実測値 ¹⁾ (g/week)	%	%	理論値 ²⁾	実績値	% ³⁾
0	—	454.1	100	—	298.1	100	—	0	0	—
75	1	439.8	96.9	100	259.4	87.0	100	6.51	6.51	100
250	3.33	436.9	96.2	99.3	225.7	75.7	87.0	21.7	19.0	87.6
1000	13.3	407.0	89.6	92.5	182.6	61.3	70.4	86.6	65.7	75.9

雌：

投与液濃度 (ppm)	投与液濃度比	体重			摂水量			1日平均暴露量 (単位：mg/kg/日)		
		実測値 ¹⁾ (g)	%	%	実測値 ¹⁾ (g/week)	%	%	理論値 ²⁾	実績値	% ³⁾
0	—	250.7	100	—	230.1	100	—	0	0	—
75	1	251.0	100.1	100	228.3	99.2	100	9.78	9.78	100
250	3.33	244.7	97.6	97.5	166.7	72.4	73.0	32.6	24.6	75.5
1000	13.3	230.7	92.0	91.9	149.8	65.1	65.6	130.1	93.5	71.9

1) 13週間の投与期間中の平均値

2) 75ppm群と体重及び摂水量が同じと仮定した場合の被験物質摂取量(1日平均暴露量)

3) 理論値に対する実績値の割合(%)

250及び1000ppm濃度群の投与濃度は、75ppm濃度群に比べそれぞれ3.33倍及び13.3倍である。75、250及び1000ppm濃度群の摂水量及び体重が同じだとすれば、250及び1000ppm濃度群の被験物質の摂取量(一日平均暴露量)は、雄ラットでは21.7及び86.6mg/kg/日(理論値)となる。しかし、上記の表に示したように250及び1000ppm濃度群の摂水量は、75ppm濃度群に比べてそれぞれ87.0及び70.4%に抑制され、また体重はそれぞれ99.3及び92.5%であった。これらの結果より、雄ラットにおける250及び1000ppm濃度群の被験物質の摂取量(一日平均暴露量)はそれぞれ19.0及び65.7mg/kg/日であり、上記に示した理論値の87.6及び75.9%であった。一方、雌ラットの場合も同様に75、250及び1000ppm群の摂水量及び体重が同じだとすれば、250及び1000ppm群の被験物質の摂取量(一日平均暴露量)は32.6及び130.1mg/kg/日(理論値)となる。しかし、250及び1000ppm濃度群の摂水量は75ppm濃度群に比べそれぞれ73.0及び65.6%に抑制され、また体重はそれぞれ97.5及び91.9%であったことから雌ラットにおける250及び1000ppm濃度群の被験物質の摂取量(一日平均暴露量)はそれぞれ24.6及び93.5mg/kg/日であり、理論値の75.5及び71.9%であった。従って、被験物質の摂取量(一日平均暴露量)には、濃度に依存した摂水量の減少と1000ppm濃度群の体重増加抑制が影響を与えていた。しかし、摂水量の濃度に依存した減少は、口腔、食道及び胃腸管に投与に関連した病理組織学的障害が認められなかったことから、この減少は被験物質を飲料水に混ぜていることによる味の悪いことに起因するものと考え、毒性とは判断しなかった。

以上の結果から、最高用量の1000ppm群で体重および摂餌量の減少がみられ、250ppmでは毒性学的変化がみられなかったことから、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの3ヵ月

間飲料水投与による無毒性量は 250ppm 濃度(雄：19.0mg/kg/日、雌：24.6mg/kg/日)と判断した。

- a) 血液学的検査項目：白血球数、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、赤血球恒数[MCV、MCH および MCHC]、血小板数、プロトロンビン時間および白血球百分率[好中球、リンパ球、好酸球および単球]
- b) 血液生化学的検査項目：酵素[AST、ALT、ALP およびγ-GTP]、リン脂質、トリグリセライド、コレステロール、アルブミン、総蛋白、A/G 比、グロブリン、尿素窒素、クレアチニン、ビリルビン(BILI)、グルコース(GLU)、カルシウム、ナトリウム、カリウムおよびクロール

()は、試験成績表ハ-4 中の略号を示す。

試験成績を表ハ-4 に示した。

表ハ-4 ラット3ヵ月投与毒性試験成績

動物種、系統、週齢	ラット、Cr:CD®BR、6週齢（実験開始時）							
投与量設定根拠	用量設定試験を実施し、その結果、1000ppm 投与で動物への影響が認められたことを参考に設定した。							
投与経路（方法）	経口（飲料水により、3ヵ月間投与）							
投与濃度（ppm）	0		75		250		1000	
投与量(mg/kg/日) ^{a)}	0	0	6.51	9.78	19.0	24.6	65.7	93.5
性	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
死亡数	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態	/		—		—		—	
体重（増加率）	/		—		—		♂(5-13%)↓ ♀(4-10%)↓	
摂餌量（変化率）	/		—		—		♂(12-20%)↓	
摂水量（変化率）	/		♂(7-21%)↓		♂(18-31%)↓ ♀(16-43%)↓		♂(32-46%)↓ ♀(24-45%)↓	
眼科学的検査 限局性網膜症	—		♂(1例:右眼)		—		♂(1例:右眼, 1例:左眼)	
血涙症	♂(1例:右眼)		—		♂(1例:左眼), ♀(1例:右眼)		♂(1例:右眼, 1例:左眼)	
血液学的検査*	/		—		♀:RBC(5.3%), HGB(6.3%), HCT(7.9%); ↓		♀:RBC(6.5%), HGB(7.0%), HCT(7.3%); ↓	
血液生化学的検査	/		—		—		♂:BILI(14.8%); ↓ ♀:GLU(12.7%); ↓	
剖検	/		—		—		—	
器官重量	/		—		—		♂:脳(相対, 14.0%)↑ ♂:腎(相対, 10.0%)↑ ♀:腎(相対, 15.4%)↑	
病理組織学的検査	/		—		—		—	

—：特記すべき所見なし、↑：増加、↓減少(Dunnett 検定、 $p < 0.05$)

/：有意差検定の対照

a)：摂水量から換算した1日当たりの平均投与量

*：これらの値は試験実施施設正常範囲内における変動値であり、被験物質と関係はないものと判断した。

性	項目	施設正常範囲	対照群(10)	250ppm(10)	1000ppm(10)
♀	RBC	6.05~8.47	7.56±0.44	7.16±0.30	7.07±0.31
	HGB	13.2~17.7	15.8±0.8	14.8±0.6	14.7±0.8
	HCT	38.6~52.8	44.3±2.5	40.8±1.7	41.0±1.9

平均±SD

()：例数

3. 生殖発生毒性試験 添付資料ハ-25

(1) ラットにおける二世世代生殖発生毒性試験 添付資料ハ-25

被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンおよび類似物質である 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを各々3.7 および 11.1%計 14.8%の活性体(AI)を含むケーソン 886F® Biocide を0(対照群)、30、100 および 300ppm 濃度に飲料水に添加してラットに自由摂取(投与)させた。第2の対照群(塩含有)はケーソン高投与群(300ppm)の塩濃度と等濃度に MgCl₂ と Mg(NO₃)₂ を含有する飲料水を与えた。

被験物質の用量設定は、Kathon 886F® Biocide のラットを用いた 24 ヶ月間飲料水投与による慢性/癌原性試験(報告書 No : 90R-149)において、摂水量に重大な影響を与えない上限濃度が 300ppm であったことから、300ppm を最高用量(濃度)に設定した。

第一世代親動物(P1 : 26/性/群)は 6 週齢から投与し、第二世代親動物(P2 : 26/性/群)は P1 の仔(F1)から選択して、離乳時(21 日齢)から親と同群の飲料水を投与した。親動物(P1 および P2)の投与は交配 10 週間前より行い、妊娠期、授乳期を通して剖検時まで行った。親動物では体重、摂餌量、摂水量、一般症状、精子検査(雄)、発情周期(雌)、剖検、臓器重量および病理検索を行った。また、F1 および F2 動物では外形、成長、発育、性成熟度、剖検、臓器重量および病理検索を行った。

その結果、親動物(P1 および P2)では摂水量において交配前、妊娠期、授乳期を通して濃度に依存した減少が認められた。これは、ケーソン 886F® Biocide 添加により、飲料水の味の悪いことによると思われた。また、100 および 300ppm で胃の腺胃部粘膜に限局性表層びらん、粘膜下組織に浮腫や炎症さらには非腺胃部に過形成や角質増殖の発現増加が認められた。その他死亡、一般症状、肉眼的所見、臓器重量をはじめ、生殖に何ら異常は認められなかった。また、F1 および F2 においても生存能、発育能、性成熟、臓器重量等に影響は認められなかった。

これらの結果から、親動物の一般毒性学的無毒性量は 30ppm(被験物質 : P1 ; 0.73~0.93mg/kg/日、P2 ; 1.10~1.20mg/kg/日)であり、生殖能および次世代に対する無毒性量は 300ppm(被験物質 : P1 ; 5.70~7.00mg/kg/日、P2 ; 8.55~9.05mg/kg/日)であった。

試験結果を表ハ-5(ケーソン 886F® Biocide 二世世代生殖能に関する成績)、表ハ-6(ケーソン 886F® Biocide の摂水量に及ぼす影響)、表ハ-7(ケーソン 886F® Biocide の病理組織検索 [胃部])に示す。

試験結果表ハ-5~7 についての説明を以下に記す。

1. 被験物質摂取量の算出：

ラット 1 例毎に測定した一週間毎の飲料水摂取量と体重から、各週毎に 1 日当たりの平均被験物質摂取量が計算した(mg/kg/日)。この結果を基に、投与期間中の 1 日当たり被験物質摂取量の平均値を、ラット 1 例毎に算出した。さらに、各群のすべての動物における投与期間中の 1 日当たり平均被験物質摂取量を集計し、その群平均値と SE を算出した。これらの値は被験物質を含んだ混合物であるケーソン 886F Biocide の値であり、被験物質はその 1/4 を占めるに過ぎないため、混合物の値に 1/4 を乗じて、各群毎の被験物質摂取量 (mg/kg/日)を算出して、表ハ-5 に記載した。

2. 統計学的解析方法：

表ハ-5 の各項目に関する統計学的解析方法は、下記のとおりである。

① Fisher's exact test

交尾率、授胎率(受胎率)、妊娠率、授乳率、分娩仔数、生存仔数、死産仔数、性比、4 日生存率、母動物の死亡、死産仔出産親

② Analysis of Variance(ANOVA)

精子検査、体重、摂餌量、発情周期、性成熟、着床数、臓器重量

表ハ-6 の摂水量についての統計学的解析方法は、Analysis of Variance(ANOVA)である。

表ハ-7 の病理組織検索[胃部]についての統計学的解析方法は、Fisher's exact test である。

表ハ-5 ラットにおけるケーソン 886F Biocide の二世世代生殖能に関する成績

動物種、系統、週齢		ラット、CrI:CD®BR、6週齢						
投与方法		経口投与：被験物質を3.7%および類似物質を11.1%の計14.8%の活性体を含むケーソン 886F® Biocide をそれぞれ飲料水に0(対照群)、30、100 および 300ppm 濃度に飲料水に添加してラットに自由摂取させた。なお、ケーソン高投与群(300ppm)と同塩濃度を含む群を対照群(塩含有)とした。						
群構成		対照群	対照群 (塩含有)	ケーソン 886F® Biocide				
ケーソン 886F® Biocide 濃度(ppm)		0	0	30	100	300		
P1 親動物	♂	被験物質摂取量 (mg/kg/日)	0	0	0.73±0.02	2.18±0.07	5.70±0.15	
		動物数	26	26	26	26	26	
		死亡(屠殺)	1 ^{a)}	1 ^{b)}	1 ^{c)}	0	1 ^{d)}	
		一般症状	—	—	—	—	—	
		体重	—	—	—	—	—	
		摂餌量	—	—	—	—	—	
		交尾率(%)	96	92	92	100	100	
		授胎率(%)	80	83	100	85	96	
		精子検査	—	—	—	—	—	
		剖検時	—	—	—	—	—	
		体重(g)	—	—	—	—	—	
		肉眼的所見	—	—	—	—	—	
	♀	交配前	被験物質摂取量 (mg/kg/日)	0	0	1.13±0.05	3.00±0.14	7.00±0.22
			動物数	26	26	26	26	26
			死亡	0	0	0	0	0
			一般症状	—	—	—	—	—
			体重	—	—	—	—	—
			摂餌量	—	—	—	—	—
			発情周期	—	—	—	—	—
妊娠および分娩期		被験物質摂取量 (mg/kg/日)	0	0	0.93±0.03	2.75±0.11	7.35±0.28	
		死亡	0	0	0	0	0	
		一般症状	—	—	—	—	—	
		体重	—	—	—	—	—	
		摂餌量	—	—	—	—	—	
		交尾率(%)	96	92	92	100	100	
		受胎率(%)	80	83	100	85	96	
		交配日数	3.1±0.54	2.8±0.51	3.0±0.38	3.0±0.63	2.5±0.24	
		妊娠動物数	20	20	24	22	25	
		妊娠率(%)	90	100	100	100	100	
		妊娠期間(日)	22.2±0.09	22.3±0.10	22.1±0.11	22.1±0.08	22.2±0.09	
		死産仔出産親(%)	0	15	0	0	4.0	
分娩仔数(匹数/親)	12.7±0.61	14.0±0.51	14.3±0.58	13.5±0.71	12.6±0.79			
生存仔数	228	275	343	297	310			
死産仔数	0	5	0	0	3			

—：特記すべき変化なし、測定値(XX.XX±XX.XX)：平均値±S.E.

a) 体調悪化と摂水量減少のため13週目に屠殺

b) 膀胱障害により瀕死の状態となったため11週目に屠殺

c) 7週目に口蓋破裂(bloken palate)で屠殺

d) 21週目に6日間の摂食および摂水量が著しく減少したため屠殺

表ハ-5 ラットにおけるケーソン 886F Biocide の二世代生殖能に関する成績【続き①】

群構成			対照群	対照群 (塩含有)	ケーソン 886F® Biocide			
ケーソン 886F® Biocide 濃度(ppm)			0	0	30	100	300	
P1 親動物	♀	授乳期	被験物質摂取量 (mg/kg/日)	0	0	1.48±0.04	4.35±0.23	11.35±0.49
			死亡	0	0	0	0	0
			一般症状	—	—	—	—	—
			体重	—	—	—	—	—
			摂餌量	—	—	—	—	—
			着床数	12±1	15±0	15±0	14±1	14±1
			授乳率(%)	98.6±0.95	100±0.00	98.4±0.86	98.3±0.94	99.5±0.50
	剖検時	体重(g)	—	—	—	—	—	
		肉眼的所見	—	—	—	—	—	
	出生仔 F1	4日生存率(%)		98.1±1.11	96.1±2.12	97.9±1.17	98.5±0.70	95.4±3.44
性比(♂%)		50.2±3.14	54.0±3.73	52.6±3.28	50.4±3.17	49.0±3.06		
外形変異		—	—	—	—	—		
外形奇形		—	—	—	—	—		
性成熟 (♂および♀)		—	—	—	—	—		
体重 (♂および♀)		—	—	—	—	—		
臓器重量 (♂および♀)		—	—	—	—	—		
P2 親動物	♂	被験物質摂取量 (mg/kg/日)	0	0	1.10±0.03	3.40±0.09	9.05±0.21	
		動物数	26	26	26	26	26	
		死亡	0	0	0	0	0	
		一般症状	—	—	—	—	—	
		体重	—	—	—	—	—	
		摂餌量	—	—	—	—	—	
		交尾率(%)	92	96	96	92	100	
		授胎率(%)	88	96	88	100	96	
		精子検査	—	—	—	—	—	
		剖検時	体重(g)	—	—	—	—	—
	肉眼的所見		—	—	—	—	—	
	交配前		被験物質摂取量 (mg/kg/日)	0	0	1.40±0.05	4.08±0.12	9.88±0.32
	♀	動物数	26	26	26	26	26	
死亡		0	0	0	0	0		
一般症状		—	—	—	—	—		
体重		—	—	—	—	—		
摂餌量		—	—	—	—	—		
発情周期		—	—	—	—	—		

— : 特記すべき変化なし、測定値(XX.XX±XX.XX) : 平均値±S.E.

表ハ-5 ラットにおけるケーソン 886F Biocide の二世代生殖能に関する成績 (続き②)

群構成		対照群	対照群 (塩含有)	ケーソン 886F [®] Biocide				
ケーソン 886F [®] Biocide 濃度(ppm)		0	0	30	100	300		
P2 親動物	♀ 妊娠および分娩期	被験物質摂取量 (mg/kg/日)	0	0	1.20±0.07	3.05±0.10	8.55±0.45	
		死亡	0	0	0	0	0	
		一般症状	—	—	—	—	—	
		体重	—	—	—	—	—	
		摂餌量	—	—	—	—	—	
		交尾率(%)	96	100	96	92	100	
		受胎率(%)	88	96	88	100	96	
		交配日数	2.5±0.30	2.8±0.23	2.6±0.52	3.1±0.33	3.2±0.51	
		妊娠動物数	22	25	22	24	25	
		妊娠率(%)	100	88	100	100	96	
		妊娠期間(日)	22.2±0.09	22.2±0.08	22.0±0.00	22.0±0.07	21.9±0.07	
		死産仔出産親(%)	0	8.7	0	13	0	
		分娩仔数(匹数/親)	13.0±0.73	12.7±0.90	13.4±0.70	14.4±0.42	14.0±0.64	
		生存仔数	285	290	293	341	337	
	死産仔数	0	2	0	3	0		
	授乳期	被験物質摂取量 (mg/kg/日)	0	0	1.63±0.07	5.08±0.23	15.13±0.67	
		死亡	0	0	0	0	0	
		一般症状	—	—	—	—	—	
		体重	—	—	—	—	—	
		摂餌量	—	—	—	—	—	
		着床数	14±1	13±1	14±1	15±0	14±1	
		授乳率(%)	97.7±1.77	95.5±1.94	98.3±1.25	88.5±5.97	98.4±1.14	
		剖検時	体重(g)	—	—	—	—	—
			肉眼的所見	—	—	—	—	—
		出生仔 F2	4日生存指数(%)	99.7±0.32	98.7±1.01	98.2±0.76	89.5±4.93	99.5±0.35
			性比(♂%)	50.9±3.31	47.8±2.81	46.9±3.87	49.1±2.41	53.4±2.45
外形変異			—	—	—	—	—	
外形奇形	—		—	—	—	—		
性成熟 (♂および♀)	—		—	—	—	—		
出生日体重(g) (♂および♀)	6.4±0.15		6.5±0.14	6.3±0.10	6.3±0.10	6.2±0.09		
剖検時	♂		体重(g)	—	—	—	—	
			臓器重量	—	—	—	—	
	♀		体重(g)	—	—	—	—	
			臓器重量	—	—	—	—	

—: 特記すべき変化なし、測定値(XX.XX±XX.XX): 平均値±S.E.

表ハ-6 ラットにおけるケーソン 886F Biocide の摂水量に及ぼす影響

群構成			対照群	対照群 (塩含有)	ケーソン 886F® Biocide			
ケーソン 886F® Biocide 濃度 (ppm)			0	0	30	100	300	
P1 親動物	♂	交配前	動物数	26	26	26	26	26
			投与前1週	38.1±0.97 [25]	38.3±1.14 [24]	37.5±0.82 [26]	39.3±0.90 [25]	38.1±1.37 [26]
			投与初日	41.1±1.06 [26]	41.7±1.29 [25]	40.0±1.41 [26]	34.6±1.38** [26]	28.6±1.08** [26]
			投与5週	40.6±1.35 [23]	43.5±2.08 [25]	38.2±1.64* [25]	34.8±2.14** [25]	28.5±0.77** [26]
			投与9週	41.7±2.30 [22]	40.4±1.87 [22]	35.0±1.08** [25]	29.4±0.76** [24]	28.3±1.32** [25]
	♀	交配前	動物数	26	26	26	26	26
			投与前1週	32.5±1.19 [26]	31.3±1.22 [26]	34.3±1.81 [25]	35.6±2.03 [26]	33.0±1.74 [26]
			投与初日	36.9±1.56 [26]	36.0±1.76 [26]	34.2±1.90 [25]	28.2±2.15** [26]	20.6±0.64** [26]
			投与5週	38.5±1.82 [22]	37.7±2.87 [19]	33.7±2.20 [21]	30.9±1.99** [26]	21.9±1.17** [25]
			投与9週	40.3±2.24 [24]	35.9±2.48 [23]	34.5±2.22* [26]	27.3±1.63** [25]	19.9±0.78** [26]
		妊娠期	動物数	18	20	23	21	25
			妊娠1週	40.9±2.82 [18]	37.5±1.67 [20]	32.9±1.37* [23]	30.4±1.80** [21]	27.9±1.56** [25]
			妊娠2週	49.2±2.32 [18]	47.5±2.33 [20]	39.1±1.70** [23]	34.9±1.44** [21]	30.2±1.11** [25]
			妊娠3週	55.3±1.90 [18]	54.3±1.59 [20]	46.7±1.57** [22]	41.6±1.36** [21]	35.8±1.54** [25]
		授乳期	動物数	18	20	24	22	25
			分娩後1週	60.4±1.58 [17]	57.4±1.32 [20]	55.9±1.42 [24]	52.1±1.84* [22]	45.2±1.62** [25]
			分娩後2週	82.3±4.22 [18]	78.5±4.63 [19]	75.6±2.05 [24]	65.2±5.15** [22]	55.8±3.29** [25]

測定値：平均値±S.E.、単位：g/匹/日

[]：測定に用いた動物数

*：P<0.05 (vs：Control)

*：P<0.05 (vs：Salt control)

表ハ-6 ラットにおけるケーソン 886F Biocide の摂水量に及ぼす影響【続き】

群構成			対照群	対照群 (塩含有)	ケーソン 886F® Biocide			
ケーソン 886F® Biocide 濃度 (ppm)			0	0	30	100	300	
P2 親 動物	♂	交 配 前	動物数	26	26	26	26	26
			投与初日	23.8±0.74 [26]	22.2±0.77 [26]	20.9±0.66* [25]	20.1±0.90* [25]	17.7±0.60** [26]
			投与 5 週	47.1±1.60 [25]	43.3±1.47* [24]	40.5±1.53* [25]	36.9±1.03** [26]	32.1±0.76** [26]
			投与 9 週	46.9±1.86 [24]	44.9±1.66 [25]	40.3±1.50** [24]	35.7±1.39** [26]	31.4±0.95** [26]
			投与 11 週 ^{a)}	44.9±2.72 [15]	39.8±1.41* [20]	38.1±1.38* [19]	36.4±1.93* [22]	29.9±0.96** [18]
	♀	交 配 前	動物数	26	26	26	26	26
			投与初日	22.6±0.76 [26]	20.8±1.09 [26]	20.2±0.59* [26]	18.6±0.54* [26]	14.6±0.86** [26]
			投与 5 週	43.5±2.76 [23]	38.7±2.54 [17]	32.0±1.85** [21]	31.7±2.45** [24]	23.9±1.08** [26]
			投与 9 週	47.9±2.61 [25]	50.1±2.77 [24]	38.9±2.19** [24]	31.4±2.14** [26]	23.8±1.01** [26]
			投与 11 週 ^{a)}	41.2±3.99 [12]	46.9±3.15 [15]	38.6±2.68# [19]	35.6±2.44# [22]	23.5±1.18** [18]
		妊 娠 期	動物数	21	22	22	24	24
			妊娠 1 週	43.1±2.81 [21]	38.5±1.06 [22]	38.3±2.78 [22]	30.1±1.04** [24]	28.4±2.72** [24]
			妊娠 2 週	53.6±3.00 [21]	50.3±1.65 [22]	48.7±3.09 [22]	39.0±2.06** [24]	35.7±2.11** [24]
			妊娠 3 週	57.5±1.50 [17]	63.1±2.79* [21]	60.7±3.72 [21]	46.8±1.24** [24]	37.8±1.85** [24]
		授 乳 期	動物数	22	23	22	24	24
			分娩後 1 週	60.6±1.80 [20]	56.6±3.51 [19]	56.6±2.28 [22]	56.7±2.34 [24]	53.6±1.69 [23]
			分娩後 2 週	91.6±3.79 [22]	92.9±5.43 [23]	85.0±4.07 [22]	78.7±3.07** [24]	74.3±3.09** [24]

測定値：平均値±S.E.、単位：g/匹/日

[]：測定に用いた動物数、なお、吸水器から水をこぼしたと判断された動物は除外した。

*：P<0.05 (vs：Control)

#：P<0.05 (vs：Salt control)

a)：11 週の測定時の n 数が少ないのは、10 週で離乳した動物を除いたためである。

表ハ-7 ラットにおけるケーソン 886F Biocide の病理組織検索[胃部]

群構成		対照群	対照群 (塩含有)	ケーソン 886F® Biocide			
ケーソン 886F® Biocide 濃度(ppm)		0	0	30	100	300	
P1 親 動物	♂	動物数	26	26	26	26	
		正常	20	19	23	17	5
		浮腫/炎症、粘膜下組織、腺胃部領域	1	2	0	3	16***
		浮腫/炎症、粘膜下組織、非腺胃部領域	0	1	0	1	4
		びらん、腺胃部粘膜	0	1	0	0	9***
		過形成/角質増殖、境界縁	1	0	0	6*	13***
		充血、腺胃部粘膜、限局性	0	1	0	0	2
		拡張、粘膜腺	4	4	3	2	1
		びらん、非腺胃部粘膜	0	0	0	0	1
		出血、非腺胃部粘膜	0	0	0	0	1
	♀	動物数	26	26	26	26	26
		正常	20	20	21	13	2
		浮腫/炎症、粘膜下組織、腺胃部領域	1	0	2	2	6*
		浮腫/炎症、粘膜下組織、非腺胃部領域	0	0	0	1	1
		びらん、腺胃部粘膜	2	0	2	0	6*
		過形成/角質増殖、境界縁	1	3	0	13***	24***
		充血、腺胃部粘膜、限局性	0	0	0	0	0
		拡張、粘膜腺	3	3	2	1	2
		びらん、非腺胃部粘膜	0	0	0	0	1
		出血、非腺胃部粘膜	0	0	0	0	0
過形成/角質増殖、非腺胃部粘膜、び慢性	0	0	0	0	0		

* : P<0.05 (vs : Control)

** : P<0.01 (vs : Control)

: P<0.05 (vs : Salt control)

: P<0.01 (vs : Salt control)

表ハ-7 ラットにおけるケーソン 886F Biocide の病理組織検索[胃部][続き①]

群構成		対照群	対照群 (塩含有)	ケーソン 886F® Biocide			
ケーソン 886F® Biocide 濃度(ppm)		0	0	30	100	300	
P2 親 動物	♂	動物数	26	26	26	26	
	正常	24	20	23	22	3	
	浮腫/炎症、粘膜下組織、腺胃部領域	0	1	0	1	6*	
	浮腫/炎症、粘膜下組織、非腺胃部領域	0	0	0	2	0	
	びらん、腺胃部粘膜	0	0	0	1	5	
	過形成/角質増殖、境界縁	0	5	0	2	23***	
	充血、腺胃部粘膜、限局性	0	0	0	0	2	
	拡張、粘膜腺	2	0	3	1	1	
	びらん、非腺胃部粘膜	0	0	0	0	0	
	出血、非腺胃部粘膜	0	0	0	0	0	
	過形成/角質増殖、非腺胃部粘膜、び慢性	0	0	0	0	0	
	♀	動物数	26	26	26	26	26
	正常	24	24	21	12	1	
	浮腫/炎症、粘膜下組織、腺胃部領域	0	0	0	3	9***	
	浮腫/炎症、粘膜下組織、非腺胃部領域	0	0	0	4	3	
	びらん、腺胃部粘膜	1	0	0	5	11***	
	過形成/角質増殖、境界縁	1	1	3	9**	24***	
	充血、腺胃部粘膜、限局性	0	0	0	0	0	
	拡張、粘膜腺	0	1	2	3	0	
	びらん、非腺胃部粘膜	0	0	0	0	1	
出血、非腺胃部粘膜	0	0	0	1	0		
過形成/角質増殖、非腺胃部粘膜、び慢性	0	0	0	0	1		

* : P<0.05 (vs : Control)

** : P<0.01 (vs : Control)

: P<0.05 (vs : Salt control)

: P<0.01 (vs : Salt control)

表ハ-7 ラットにおけるケーソン 886F Biocide の病理組織検索[胃部] [続き②]

群構成		対照群	対照群 (塩含有)	ケーソン 886F® Biocide			
				0	30	100	300
ケーソン 886F® Biocide 濃度(ppm)		0	0	30	100	300	
F1 出生仔	♂	動物数	17	20	NE	NE	23
		正常	12	16	NE	NE	11
		嚢胞性/拡張腺	5	4	NE	NE	11
		過形成、腺胃部粘膜、限局性	0	0	NE	NE	1
	♀	動物数	18	20	NE	NE	23
		正常	12	18	NE	NE	18
		嚢胞性/拡張腺	6	2	NE	NE	5
		過形成、腺胃部粘膜、限局性	0	0	NE	NE	0
F2 出生仔	♂	動物数	21	22	NE	NE	24
		正常	11	14	NE	NE	19
		嚢胞性/拡張腺	10	8	NE	NE	5
		過形成/角質増殖、境界線	0	2	NE	NE	0
		過形成、腺胃部粘膜、限局性	0	0	NE	NE	0
	♀	動物数	22	22	NE	NE	24
		正常	15	14	NE	NE	17
		嚢胞性/拡張腺	6	7	NE	NE	7
		過形成/角質増殖、境界線	1	0	NE	NE	0
		過形成、腺胃部粘膜、限局性	1	1	NE	NE	0

NE : 実施せず

Fisher's exact test を用いて統計学的解析を行ったが、有意な差はみられなかった。

4. 皮膚一次刺激性試験 添付資料ハ-3

(1) ウサギ皮膚一次刺激性試験 添付資料ハ-3

ネオロンTM950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 100ppm 濃度水溶液) 0.5ml を成熟ニュージーランド雄白色ウサギの除毛した無傷皮膚に 4 時間、半閉塞投与し、パッチ除去後 1、24、48 および 72 時間目に皮膚一次刺激を Draize 法により評価した。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である 100ppm を用いた。

その結果、紅斑および浮腫の出現は認められなかった。また、一般状態の変化は認められず、死亡例もなかった。

以上の結果から、ネオロンTM950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 100ppm 濃度水溶液)はウサギの皮膚に対し刺激性がないと判断される。

試験成績を表ハ-8、Draize 採点法による判定基準を表ハ-9 に示した。

表ハ-8 ネオロンTM950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 100ppm 濃度水溶液)のウサギ皮膚一次刺激性試験成績

動物種、系統、性、 週齢、体重	ウサギ、ニュージーランド白色種、♂：17~18 週齢(2566~3231g)							
投与方法	ネオロン TM 950 を希釈した 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 100ppm 水溶液を除毛した無傷皮膚に 0.5ml を投与した。							
動物数	6							
反応病変の種類	紅斑				浮腫			
パッチ除去後の時間(hr)	1	24	48	72	1	24	48	72
判定*	0	0	0	0	0	0	0	0

*：Draize 採点法(5 段階)

表ハ-9 Draize 採点法による判定基準

紅斑と痂皮形成
0：紅斑なし
1：ごく軽度の紅斑(やっと認める程度)
2：明らかな紅斑
3：中等度から強い紅斑
4：深紅色の強い紅斑に軽い痂皮形成(傷害は深部に)
浮腫形成
0：浮腫なし
1：ごく軽度の浮腫(やっと認める程度)
2：明らかな浮腫(周囲と明らかに区別可能)
3：中等度の浮腫(1mm 程盛り上がっている)
4：強い浮腫(1mm 程盛り上がり、周囲にも広がる)

5. 連続皮膚刺激性試験 添付資料ハ-4、5

(1) ヒト連続皮膚刺激性試験 添付資料ハ-4

被験物質である2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを用い、ヒト皮膚に連続処置(1日23時間で21日間：感作、10-14日間休止後24時間：惹起)し、惹起終了48および96時間後に8段階にスコア化し、強度により5クラスに分別するパッチ法で皮膚刺激性を調べた。

被験物質は50、100、250、500および1000ppm濃度の水溶液として0.1mlを感作および惹起に用いた。試験は、低濃度から順次安全性を確認して、用量を上げて行った。陽性対照には、ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)を用いた。被験物質の溶媒には蒸留水を用いた。

志願被験者は全体で103名であったが、すべての試験期間(感作および惹起期間)を終了した被験者は79名であった。その内訳は、グループI(50ppm)の16名、グループII(100ppm)の15名、グループIII(250ppm)の17名、グループIV(500ppm)の15名、グループV(1000ppm)の16名であった。

その結果、被験物質の50、100および250ppm濃度で感作および惹起した被験者には影響は認められなかったが、500ppmで感作した15名のうち1名が軽度の反応(過敏症)を示し、さらに250および500ppmで惹起した場合も、それぞれ軽度の反応を示した。この被験者はスキンマーカーにも反応したことから種々の物質に対し高感受性を有していたと思われる。1000ppm濃度処置した16名のうち感作期間中に5名が、また惹起96時間後に2名に軽度の反応が認められた。

一方、陽性対照に用いたSLSではクラス3~4の刺激性を示した。

以上の結果から、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのヒト皮膚に対する刺激性/感受性の閾値は1000ppmか、あるいはその附近と判断される。

試験成績を表ハ-10および11に示した。

表ハ-10 ヒト皮膚による連続刺激性試験成績

被験者数		全 103 名：感作および惹起全期間終了した被験者：79 名				
脱落者数		29 名				
群	被験者数	試験物質	濃度 ^{a)}	21 日間感作期間中の総合計反応数	被験者数 10 名あたりの総合計反応数 ^{b)}	分類
I	16	蒸留水	0	64	40.0	クラス 1
		2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン	50	28	17.5	クラス 1
		SLS	0.05	760	475.0	クラス 4
II	15	蒸留水	0	10	6.7	クラス 1
		2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン	100	12	8.0	クラス 1
		SLS	0.05	618	412.0	クラス 3
III	17	蒸留水	0	4	2.4	クラス 1
		2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン	250	20	11.8	クラス 1
		SLS	0.05	784	461.2	クラス 4
IV	15	蒸留水	0	7	4.7	クラス 1
		2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン	500	20	13.3	クラス 1
		SLS	0.05	560	373.3	クラス 3
V	16	蒸留水	0	39	24.4	クラス 1
		2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン	1000	55	34.4	クラス 1

- a) : 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン(ppm), SLS(w/v%)
 b) : 21 日間感作期間中の総合計反応数/被験者数×10

*感作時 21 日間 21 回計 21 回の皮膚反応を次のスコアで判定し、その累積スコアにより 5 クラスに分類した。

スコア	反応	
0	刺激なし	
1	わずかに認識できる最小紅斑	
2	容易に確認できる紅斑あるいは最小浮腫あるいは最小皮膚炎反応	
3	紅斑、丘疹	
4	浮腫	
5	紅斑、浮腫、丘疹	
6	小胞性発疹	
7	試験部分より拡がった強力な反応	
クラス	累積スコア (10 人あたり)	判定
1	0-49	刺激の少ない物質—実験的刺激はない
2	50-199	正常使用時には、おそらく刺激のない物質
3	200-449	正常使用時には、刺激がない可能性がある物質
4	450-580	実験的累積刺激性を示す物質
5	581-630	実験的主要刺激性物質

表ハ-11 ヒト皮膚連続感作後の感受性

		惹起濃度(ppm)										ICDRG ^{a)} スケール ^{b)}		
		0		50		100		250		500			1000	
惹起終了後 の時間(hr)		48	96	48	96	48	96	48	96	48	96	48	96	
感作 濃度 (ppm)	50	0/16	0/16	0/16	0/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	0/15	0/15	-	-	0/15	0/15	-	-	-	-	-	-	-
	250	0/18	0/18	-	-	-	-	0/18	0/18	-	-	-	-	-
	500	0/15	0/15	-	-	0/15	0/15	1/15	1/15	2/15	1/15	-	-	+
	1000	0/16	0/16	-	-	-	-	1/4	1/4	1/4	1/4	3/16	2/16	+

結果は、分母＝被験者数、分子＝反応者数を示す。

a) : 国際接触皮膚炎研究グループ(International Contact Dermatitis Research Group)

b) : 肉眼的所見[- : 反応なし、+ : 発赤(紅班)]

(2) ウサギ連続皮膚刺激性試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-5

ネオロンTM950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 100、300 および 1000ppm 濃度水溶液)をニュージーランドホホワイト雄ウサギの剃毛背部皮膚に 14 日間連続開放塗布し、皮膚刺激性を Draize 法で評価した。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である 100ppm を低用量として用い、その 10 倍量である 1000ppm を高用量として設定し、その half-log doses である 300ppm を中間用量に設定した。

その結果、いずれの投与群においても、皮膚面に異常は認められなかった。また、一般状態にも異常は認められなかった。

以上の結果から、ネオロンTM950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン水溶液)は、ウサギ皮膚に対し、累積刺激性を有しないと判断した。

試験成績を表ハ-12 に示した。

表ハ-12 ネオロン™950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン水溶液)の
ウサギ連続皮膚刺激性試験成績

動物種、系統、性、 週齢、体重	ウサギ、ニュージーランドホワイト種(Kbl:NZW)、17週齢、 ♂：3.17~3.52kg						
投与経路(投与方法)	皮膚投与[剃毛された背部皮膚1区画(2.5×2.5cm)に0.5mLの容量で、14 日間連続投与した。]						
動物数	6						
被験物質中の2-メチル -4-イソチアゾリン-3-オ ンの濃度(ppm)	100		300		1000		
一般状態	—		—		—		
判定項目	投与日数	赤斑および 焼痂	浮腫	赤斑および 焼痂	浮腫	赤斑および 焼痂	浮腫
		判定結果*	1日	0	0	0	0
		2日	0	0	0	0	0
		3日	0	0	0	0	0
		4日	0	0	0	0	0
		5日	0	0	0	0	0
		6日	0	0	0	0	0
		7日	0	0	0	0	0
		8日	0	0	0	0	0
		9日	0	0	0	0	0
		10日	0	0	0	0	0
		11日	0	0	0	0	0
		12日	0	0	0	0	0
		13日	0	0	0	0	0
		14日	0	0	0	0	0

* Draize 評点法(5段階、表ハ-5に記載)

—：特記すべき所見なし

6. 感作性試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-6~10

(1) モルモット皮膚感作性試験(マキシミゼーション試験)・・・・・・・・添付資料ハ-6

本試験には、雌の5週齢のハートレイ系モルモット(計58匹)を使用して、遅延型接触過敏症の有無を検討した。被験物質である2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの濃度は、本化合物の工業的適用における最大濃度に関してヨーロッパにおけるハザードおよびラベリング分類を考慮して、550および800ppmの濃度を設定した。

感作初日に、被験物質投与群のI群(550ppm, n=20)およびII群(800ppm, n=20)の動物では、あらかじめ刈毛した頸部背側皮膚へ下記の3種の試料を左右対称に0.1mlづつ皮内注射した。

- ・ Freund's Complete Adjuvant(FCA)と滅菌食塩水(1:1)の乳化物
- ・ 被験物質を滅菌食塩水に溶解した液(550または800ppm)
- ・ 被験物質とFCA/滅菌食塩水(1:1)の乳化物

また、刺激対照のIII群(n=10)の動物には、FCAと滅菌食塩水(1:1)乳化物、滅菌食塩水およびFCA/滅菌食塩水と50%滅菌食塩水の乳化物を同様に皮内投与した。

1週間後、各群の全動物の皮内注射部位に10%ラウリル硫酸ナトリウムを塗布した。翌日、同一部位に滅菌食塩水に溶解した被験物質(I群およびII群)または滅菌食塩水(III群)を0.35ml、48時間閉塞パッチをした。閉塞パッチ終了2週間後、I、IIおよびIII群の全動物に被験物質550ppm(IおよびIII群)、800ppm(IIおよびIII群)を右側に、滅菌食塩水を左側に0.15ml、24時間閉塞パッチした。パッチ剥離後洗浄し、24および48時間目に惹起部の皮膚感作性を評価した。

惹起1週間後I群およびII群の動物は被験物質1000ppmで再惹起した。惹起時と同様、滅菌食塩水に溶解した被験物質を右側に、滅菌食塩水を左側に0.25ml、24時間閉塞パッチを行い、パッチ剥離後24および48時間目に被験物質の皮膚感作性を評価した。

その結果、被験物質は800ppm濃度においても皮膚刺激性を示さず、また惹起および再惹起期間中、各群ともに遅延型接触過敏を示す皮膚反応は感作濃度800ppm、惹起濃度1000ppmで26%(5/19)にすぎず、過敏症の指標である最小反応の30%^{a)}およびそれ以上の紅班反応は認められなかった。

本試験は2000年8月~12月に実施しているが、本試験において陽性対照群は設定していない。当該試験実施施設(Rohm and Haas Toxicology Laboratories)において、1997~2001年に陽性対照としてヘキシルシンナムアルデハイドを用いて実施した18試験での陽性出現率は、60~100%の範囲であった(表ハ-15)。さらに、当該試験実施直前に実施した試験(試験報告書番号00R-140)における陽性対照群の陽性出現頻度は100%(10例中10例陽性)であったことから、当該施設において用いられている試験方法は、評価に耐えうる方法であると判断しえる。また、使用した動物は、十分な感度を有するものと推察でき、当

該試験においても十分な感度を有する動物が用いられたものと考えられる。

以上の結果から、本試験濃度条件下では、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンはモルモットに遅延型接触過敏症を発現させる作用はみられず、本物質の感作性の閾値は 800ppm を超える濃度と考えられる。

試験成績を表ハ-13（皮膚刺激性）および表ハ-14（皮膚感作性、遅延型接触過敏症）を示した。

a) Sensitization by Skin Contact, Official Journal of the European Communities, No. L 110A/59; Section 3.2.7.2, May 04, 1993.

表ハ-13 モルモット皮膚感作性試験 皮膚刺激性成績（フロインド完全アジュバンド、滅菌食塩水）

動物種、系統、性、週齢、体重	モルモット、ハートレイ系、♀：5週齢（353～418g）					
投与方法	除毛したモルモット肩皮内に滅菌食塩水、フロインド完全アジュバンド(0.1ml)を、局所に滅菌食塩水を 0.35ml を投与して、感作処置をした後惹起した。					
惹起処置濃度(ppm)	0*		550		800	
判定時間(hr)**	24	48	24	48	24	48
判定結果 ^{a)}	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)

*：滅菌食塩水、**：惹起部位洗浄後の時間、

a)：Magnusson-Kligman マキシミゼーション法による

0：反応なし

()内数字：反応匹数/使用匹数を示す。

表ハ-14 モルモット皮膚感作性試験 皮膚感作性試験(遅延型接触過敏症)成績

動物種、系統、性、週齢、体重	モルモット、ハートレイ系、♀：5週齢(353~418g)								
投与方法	除毛したモルモット肩の皮膚に、滅菌食塩水およびフロイド完全アジュバント溶液中含有の被験物質を皮内投与(0.1ml)および局所的(0.35ml)に適用し、感作を行った後惹起し、さらに局所適用で再惹起を行った。								
惹起処置濃度(ppm)	0**		550		800		1000*		
判定時間(hr)***	24	48	24	48	24	48	24	48	
感作処置濃度(ppm)	550	0/20 ^a (0/20)	0/20	0/20	0/20	—	—	3/20	3/20
	800	0/20 (0/19)	0/20	—	—	0/20	1/20	5/19	4/19

*：再惹起濃度(再惹起用量 0.25ml)、**：滅菌食塩水、***：惹起部位洗浄後の時間

^a：反応匹数/使用匹数

()数字：再惹起 1000ppm 処置時の対照結果を示す。

判定結果：グレード1 およびそれ以上の反応を示した動物とした。

—：実施せず

表ハ-15 試験実施施設における陽性対照背景データ (■■■■~■■■■)

試験実施時期 (月/日/年)	試験施設 報告書番号	陽性出現頻度 (陽性動物数/使用動物数)	陽性出現率(%)
■■■■	96R-158	9/10	90
	97R-161	7/10	70
	97R-197	10/10	100
	98R-016	9/10	90
	98R-015	10/10	100
	97R-067	10/10	100
	97R-247	10/10	100
	97R-233	10/10	100
	98R-182	10/10	100
	98R-221	9/10	90
	99R-107	9/10	90
	99R-181	10/10	100
	99R-196	8/9	89
	00R-065	9/10	90
	00R-140	10/10	100
	00R-203	6/10	60
	00R-261	8/10	80
	00R-241	8/9	89

試験実施施設：Rohm and Haas Company Toxicology Department

陽性対照物質：ヘキシルシンナムアルデハイド

(2) モルモット皮膚感作性試験(ビューラー試験) 添付資料ハ-7

5週令の雄雌ハートレイ系モルモットを使用し、ビューラー法を用いて皮膚感作性試験を実施した。

被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンは、蒸留水中に 1000、5000、15000 および 30000ppm の濃度に溶解して用いた。

本試験の感作濃度および惹起濃度の選択のために、4匹のモルモットを用いて、一次皮膚刺激性を検討した。あらかじめ除毛した背部に上記4濃度の被験物質を0.4ml適用して6時間閉塞パッチした。パッチ剥離後、24および48時間目に皮膚刺激性を評価した。その結果、30000ppmにおいて、わずかな紅斑(±)が4例中2例において観察され、この濃度は最小刺激濃度(Minimal irritation concentration)と考えられた。5000~15000ppmの濃度においては、5000ppmで1例のみにわずかな紅斑(±)が観察されたが、他の濃度では全く反応は観察されなかった。このことから、15000ppmの濃度がこの試験における最高非刺激濃度(Highest non-irritation concentration)と判定された。以上の成績から、本試験の感作濃度および惹起濃度の最高濃度として、それぞれ30000ppmおよび15000ppmを用いた。

皮膚感作性は、あらかじめ除毛したモルモットの背部に、左右対称の6箇所(左側3箇所)に0.4mlの蒸留水(対照)または各濃度の被験物質(1000、5000、15000および30000ppm)を、1回6時間、週3回(月、水、金)計10回閉塞パッチ法により感作を行った。最終感作の2週間後に、モルモット背部右側に3種の濃度(1000、5000および15000ppm)の被験物質(0.4ml)で6時間、閉塞パッチ法により惹起を行った。パッチを剥離後24および48時間目に皮膚感作性をRitz&Buehler法で評価した。

その結果、感作は5000ppm濃度以上(15000ppmで惹起)、および惹起は15000ppm濃度以上(30000ppmで感作)で遅延型接触過敏症が認められた。

以上の結果から、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのモルモットにおける感作および惹起のEC₅₀は、5000ppm濃度以上および15000ppm濃度以上とそれぞれ判断される。

試験成績を表ハ-16(一次皮膚刺激性)および表ハ-17(皮膚感作性、遅延型接触過敏症)に示した。

表ハ-16 モルモット皮膚感作性試験 一次皮膚刺激性成績

動物種、系統、性、週齡、体重	モルモット、ハートレイ系 (CrI:(HA)BR) , ♂♀5 週齡(365~514g)							
投与方法	被験物質を蒸留水に溶解し、無処置のモルモットの除毛した背部皮膚に 0.4ml を投与した。							
処置濃度 (ppm)	5000		7500		15000		30000	
判定時間 (hr) *	24	48	24	48	24	48	24	48
判定**	± (1/4)	± (1/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	± (2/4)	0 (0/4)

* : 惹起後の時間を示す。

** : Ritz&Buehler(1980)の方法による。

0 : 反応なし、± : 軽度の紅班反応

()内数字 : 反応匹数 / 使用匹数を示す。

表ハ-17 モルモット皮膚感作性試験 皮膚感作性 (遅延型接触過敏症) 成績

動物種、系統、性、週齡、体重	モルモット、ハートレイ系 (CrI:(HA)BR) , ♂♀5 週齡(365~514g)			
投与方法	被験物質を蒸留水に溶解し、Buehler の閉塞パッチ法により除毛した背部皮膚に 0.4ml を投与した。			
惹起濃度 (ppm)	1000	5000	15000	
判定結果	感作濃度(ppm)	惹起後の紅班反応 (反応匹数 ^{a)} / 使用匹数)		
	0	0/10	0/10	0/10
	1000	0/10	0/10	1/10
	5000	0/10	2/10	6/10
	15000	1/10	1/10	3/10
	30000	0/10	2/10	5/10

* : Ritz&Buehler(1980)の方法による。

^{a)} : 惹起後 24 および / あるいは 48 時間でグレード 1、ならびにそれ以上の紅班反応を示した動物匹数。

(3) ヒト皮膚感作性試験 - 試験1- 添付資料ハ-8

被験物質である2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの100ppm濃度水溶液を用い、閉塞反復貼付パッチ法によりヒト背部皮膚に処置し、皮膚刺激性および/あるいは感作性の反応の有無を調べた。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である100ppmを用いた。

健康な98名の志願被験者の背部に0.15ml(2×2cm webril pad表面に均一処置)で感作および惹起した。本試験の感作は、試験の1、2および3週に4回/週行い、5週目に惹起した。貼付除去は監視下で行い、検索およびグレード化(7段階)した。

その結果、被験者1名(女性：#63)に陽性反応(最終判定：グレード4)が認められたが、98名の被験者の内97名には何ら反応は認められなかった。また、惹起期間を終了した97名の内、上述の被験者(#63)を除き、96名には反応は認められなかった。#63の被験者は試験期間の極めて早期から反応しており、(誘発期のパッチナンバー4の後)、イソチアゾリン関連物質に以前感作されていたと思われるため、本被験者は評価に不相当と考えられた。

以上の結果から、反応を示した1名の被験者を除き評価すると、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンはヒト皮膚に対し接触性アレルギー反応を有しないと判断される。

試験成績を表ハ-18に示した。

表ハ-18 ヒト皮膚感作性試験-試験1- 成績

被験者数 (性別)	98名 (男:26名、女:72名)						
平均年齢	男:22-75歳、女:24-80歳						
グレード	週毎の反応出現数					観察された肉眼的反応数	
	1週	2週	3週	4週	5週	感作期間	惹起期間
0	97	97	97	97	97	97	96
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	1	1	0	0	1	1	1
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0

【グレード】

0: 反応なし

1: ごく軽い発赤

2: 中等度の発赤

3: 強い発赤

4: 発赤、浮腫および/あるいは丘疹

5: 発赤および水疱

6: 発赤およびパッチ周辺部へも影響有り

(4) ヒト皮膚感作性試験－試験 2－ 添付資料ハ－9

被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 200ppm 濃度水溶液を用い、ヒト皮膚感作性試験を閉塞反復貼付パッチ試験法により健常志願者 113 名(男：2 名、女：111 名)で実施した。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である 100ppm の 2 倍濃度である 200ppm を用いた。

本試験は、24 時間貼付後除去して皮膚反応を観察した。さらに 24 時間貼付後に観察することを 9 回反復感作した。その後 10～15 日後さらに 24 時間貼付して惹起し、24 および 48 時間後に観察して皮膚反応を 5 段階で判定した。

試験終了時まで、113 名の内 13 名が脱落(追跡困難：9 名、志願中止：2 名、試験計画書逸脱：2 名)し、最終の判定被験者は 100 名(感作者数：101 名)であった。

その結果、惹起 24 時間後、被験者 1 例に弱い感作反応(グレード+)が認められたが、惹起 48 時間後には認められなかった。この被験者は感作期間中にも弱い刺激性(グレード+)を示した。このことから、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 200ppm 濃度水溶液はヒト皮膚に対し、感作反応を示さないと判断した。

試験成績を表ハ－19 に示した。

表ハ－19 ヒト皮膚感作性試験－試験 2－ 成績

人種(人数)	アジア系 (2 名)、白人 (111 名)			
志願者数 (性別数)	113 名 (男：12 名、女：101 名)			
平均年齢(範囲)	48.2 歳 (20.5～76.0 歳)			
脱落者数(理由)	13 名 (追跡困難、志願中止、試験計画書逸脱)			
判定 結果	反応	感作期間中の反応 ^{a)}	惹起 24 時間後の反応 ^{a)}	惹起 48 時間後の反応 ^{a)}
	－	95/101(94.1%)	100/101(99.0%)	99/100(99.0%)
	±	5/101(5.0%)	0/101(0.0%)	1/100(1.0%)
	+	1/101(1.0%)	1/101(1.0%)	0/100(0.0%)
	++	0/101(0.0%)	0/101(0.0%)	0/100(0.0%)
	+++	0/101(0.0%)	0/101(0.0%)	0/100(0.0%)

－：反応なし

±：最小或いは疑われる反応、僅かに周囲の皮膚と異なる

＋：明らかな紅班、浮腫なし

++：明らかな紅班、明らかな浮腫

+++：明らかな紅班、明らかな浮腫、水疱

^{a)}：反応した人数/判定被験者数を示す。

(5) ヒト皮膚感作性試験－試験 3－ 添付資料ハ－10

被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 300ppm 濃度の水溶液を用い、試験 2 と同様にヒト皮膚感作性試験を閉塞反復貼付パッチ試験法により健常志願者 107 名（男：19 名、女：88 名）で実施した。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である 100ppm の 3 倍濃度である 300ppm を用いた。

試験終了時間までに、107 名の内 9 名が脱落（追跡困難:1 名、志願中止:7 名、その他の理由:1 名）し、最終の判定被験者は 98 名(感作者数:99 名)であった。

その結果、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 300ppm 濃度水溶液はヒト皮膚に対し感作反応を示さないことが認められた。

試験成績を表ハ－20 に示した。

表ハ－20 ヒト皮膚感作性試験－試験 3－ 成績

人種 (人数)	アジア系(1 名)、黒人(6 名)、白人(92 名)、ラテンアメリカ系(8 名)			
志願者数 (性別数)	107 名 (男 : 19 名、女 : 88 名)			
平均年齢 (範囲)	51.1 歳 (21.3~75.2 歳)			
脱落者数 (理由)	9 名 (追跡困難、志願中止、その他)			
判定結果	反応	感作期間中の反応 ^{a)}	惹起 24 時間後の反応 ^{a)}	惹起 48 時間後の反応 ^{a)}
	－	99/99 (100.0%)	99/99 (100.0%)	98/98 (100.0%)
	±	0/99(0.0%)	0/99(0.0%)	0/98(0.0%)
	+	0/99(0.0%)	0/99(0.0%)	0/98(0.0%)
	++	0/99(0.0%)	0/99(0.0%)	0/98(0.0%)
	+++	0/99(0.0%)	0/99(0.0%)	0/98(0.0%)

－：反応なし

±：最小或いは疑われる反応、僅かに周囲の皮膚と異なる

＋：明らかな紅斑、浮腫なし

++：明らかな紅斑、明らかな浮腫

+++：明らかな紅斑、明らかな浮腫、水疱

^{a)}：反応した人数／判定被験者数を示す。

7. 光毒性試験 添付資料ハ-11、12

(1) ヒト皮膚光毒性試験 添付資料ハ-11

被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 200ppm 濃度水溶液を用い、閉塞パッチ法によりヒト背部に 15 μ l、24 時間処置した後、UVA および UVB を照射することにより光毒性誘発性の有無を調べた。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である 100ppm の 2 倍濃度である 200ppm を用いた。

照射暴露はキセノンランプを用い、UVA(320-400nm)の 20J/cm²および UVB (290-320nm)の 1/2MED(最小紅班出現量)とし、パッチ除去 15 分後に実施した。判定は 5 段階で照射 24 および 48 時間後に行った。

試験終了時の被験者は 12 名であった。

その結果、200ppm 濃度の 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン水溶液投与の照射群は、無投与照射群と同一被験者 1 名にわずかな紅斑が認められたにすぎず、両群の間に差は認められなかった。

以上の結果から、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 200ppm 濃度水溶液はヒト皮膚に対し光毒性誘発性を持たないと判断される。

試験成績を表ハ-21 に示した。

表ハ-21 ヒト皮膚光毒性試験成績

人種 (人数)		白人(11名), アメリカ先住民(1名)			
被験者数 (性別数)		12名 (女: 12名)			
平均年齢 (範囲)		44.8歳 (24-57歳)			
投与物質		2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン			—
判定結果 a)	24	グレード	照射	非照射	照射
		0	11	12	11
		1	1	0	1
		2	0	0	0
		3	0	0	0
	48	0	11	12	11
		1	1	0	1
		2	0	0	0
		3	0	0	0
		4	0	0	0

a) : 反応人数

[グレード]

0 : 反応なし、1 : 最小可視紅斑、2 : 明瞭な境界を有する明らかな紅斑

3 : 強度の紅斑と浮腫、4 : 小疱または水疱反応

(2) モルモット皮膚光毒性試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-12

ネオロンTM950水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの200ppm濃度水溶液)を用い、Crj:Hartley 雄モルモット背部除毛皮膚に0.02mL塗布し、塗布30分後にUVAを照射することにより光毒性誘発性の有無を調べた。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である100ppmの2倍濃度である200ppmを用いた。

照射暴露はBLB蛍光ランプを用い、UVA(300-400nm)の10.0~11.9J/cm²とした。また、陰性対照物質として蒸留水を、陽性対照物質として8-methoxypsoralen(8-MOP)の1%溶液をそれぞれ用いた。紫外線照射終了後4、24および48時間に、皮膚を確認して5段階で評価した。

その結果、被験物質投与の紫外線照射群および非照射群ともに皮膚反応は認められなかった。一方、陰性対照群では紫外線照射群および非照射群ともに皮膚反応は認められず、陽性対照群では紫外線照射群で照射後4時間から皮膚反応が認められた。

以上の結果から、ネオロンTM950水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの200ppm濃度水溶液)は、モルモット皮膚に対し光毒性誘発性を持たないと判断される。

試験成績を表ハ-22に示した。

表ハ-22 ネオロン™950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの200ppm濃度
水溶液)のモルモット皮膚光毒性試験成績

動物種、系統、性、週齢、 体重		モルモット、Crj:Hartley、♂：6週齢、319~363g						
投与経路(投与方法)		皮膚投与(除毛された背部皮膚2cm ² に0.02mLづつ単回塗布した。)						
動物数		10						
投与物質		蒸留水		200ppm 2-メチル-4- イソチアゾリン-3-オン		8-MOP		
a) 判定 結果	判定時間 (hr)	グレード ^{b)}	照射	非照射	照射	非照射	照射	非照射
	4	0	10	10	10	10	8	10
		1	0	0	0	0	0	2
	24	0	10	10	10	10	0	10
		1	0	0	0	0	2	0
		2	0	0	0	0	7	0
	48	3	0	0	0	0	1	0
		0	10	10	10	10	1	10
		1	0	0	0	0	2	0
		2	0	0	0	0	4	0
		3	0	0	0	0	2	0
	4	0	0	0	0	0	1	0

a)：反応例数

b)：0-反応なし、1-ごく軽い紅斑、2-明らかな紅斑、3-強い紅斑、4-紅斑に浮腫を伴う

8. 光感作性試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-13、14

(1) ヒト皮膚光感作性試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-13

被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 200ppm 濃度水溶液を用い、閉塞パッチ法によりヒト背部に処置した後、UVA および UVB を照射することにより光アレルギー誘発性の有無を調べた。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である 100ppm の 2 倍濃度である 200ppm を用いた。

照射暴露はキセノンランプを用い UVA(320-400nm)の 10J/cm²および UVB (290-320nm)の 0.5MED(最小紅班出現量)で実施した。被験物質の処置は 24 時間の閉塞反復パッチ法を用い 3 週間に 6 回行った。惹起処置は 9-14 日の休止後、無処置の部位で 24 時間閉塞パッチ後に行い、その後照射した。判定は 5 段階で照射 48 および 72 時間後に行った。

志願被験者は 32 名であったが、本試験のすべての過程を終了した被験者は 26 名であった。

6 名の被験者から頭痛(3 名)、咳(1 名)、胃痛(1 名)および眼周囲発赤(1 名)が報告されたが、本試験との因果関係の詳細は不明であった。

200ppm 濃度の 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン水溶液処置照射群は、無処置照射群に比べ、反応人数はほぼ同数であり、反応グレードは軽度で両群の間に差はみられなかった。

以上の結果から、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 200ppm 濃度水溶液はヒト皮膚に対し光感作誘発性を持たないと判断される。

試験成績を表ハ-23 に示した。

表ハ-23 ヒト皮膚光感作性試験成績

人種 (人数)		白人(27名)、アジア系(2名)、ラテンアメリカ系(2名)、その他(1名)			
志願者数 (性別数)		32名			
平均年齢 (範囲)		42.3歳(19-59歳)			
最終被験者数 (性別数)		26名 (男:3名、女:23名)			
投与物質		2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン		—	
判定結果 a)	判定時間 (hr)	グレード	照射	非照射	照射
	48	0	22	26	23
		1	4	0	3
		2	0	0	0
		3	0	0	0
		4	0	0	0
	72	0	24	26	25
		1	2	0	1
		2	0	0	0
		3	0	0	0
4		0	0	0	

a) : 反応人数

[グレード]

0 : 反応なし、1 : 最小可視紅斑、2 : 明瞭な境界を有する明らかな紅斑

3 : 強度の紅斑と浮腫、4 : 小疱または水疱反応

(2) モルモット皮膚光感作性試験・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-14

ネオロンTM950水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの200ppm濃度水溶液)を用い、Adjuvant and Strip 法により、Crj:Hartley 雄モルモット背部剃毛皮膚に処置した後にUVAを照射することにより光アレルギー誘発性の有無を調べた。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である100ppmの2倍濃度である200ppmを用いた。

照射暴露はBLB 蛍光ランプを用い、UVA(300-400nm)の9.9~11.2J/cm²とした。また、陰性対照物質として蒸留水を、陽性対照物質として6-methylcoumarin をそれぞれ用いた。惹起時の紫外線照射終了後24 および48 時間に、惹起部位の皮膚を確認して赤斑と浮腫の評点から評価した。

その結果、陰性対照および被験物質感作群において、蒸留水および2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの200ppm濃度水溶液でそれぞれ惹起させた場合、いずれの動物においても紫外線照射群および非照射群ともに皮膚反応は認められなかった。一方、陽性対照として用いた5.0% 6-methylcoumarin で感作させた群では、1.0% 6-methylcoumarin の惹起により、紫外線照射群で皮膚反応を示し、皮膚光感作性が認められた。

以上の結果から、ネオロンTM950水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの200ppm濃度水溶液)は、モルモット皮膚に対し光感作性を持たないと判断される。

試験成績を表ハ-24に示した。

表ハ-24 ネオロン™950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの200ppm濃度水溶液)のモルモット皮膚光感作性試験成績

動物種、系統、性、週齢、体重		モルモット、Crj:Hartley、♂：6週齢、322~377g(初回感作時)												
投与方法	感作時	FCA投与：初回感作日(皮内投与) Stripping、各投与物質の塗布、紫外線照射：1回/1日、5日間連続 各投与物質の塗布量：0.1mL												
	惹起時	初回感作後21日目に各投与物質を塗布し、塗布後30分に紫外線照射。 各投与物質の塗布量：0.02mL												
動物数		5				5				5				
投与物質	感作時	蒸留水				200ppm 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン				6-methyl-coumarin				
	惹起時	蒸留水		200ppm MI ^{a)}		蒸留水		200ppm MI ^{a)}		6-methyl-coumarin				
判定結果	判定時間(hr)	グレード ^{b)}	照射	非照射	照射	非照射	照射	非照射	照射	非照射	照射	非照射	照射	非照射
	24	赤斑	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5
			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	48	赤斑	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	5
			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
	浮腫	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	浮腫	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

a)：200ppm 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン

b)：反応匹数

c)：紅斑；0-反応なし、1-ごく軽い紅斑、2-明らかな紅斑

浮腫；0-反応なし

9. 眼刺激性試験 添付資料ハ-15

(1) ウサギ眼刺激性試験 添付資料ハ-15

ネオロン™950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 100ppm 濃度水溶液)0.1ml を成熟ニュージーランド雄白色ウサギの結膜嚢内に投与し、投与後およそ 1, 24, 48, および 72 時間目に眼粘膜刺激性を Draize 法で評価した。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である 100ppm を用いた。

その結果、被験物質による角膜、結膜および紅彩への影響を認められなかった。

一般状態の変化はなく、死亡例も認められなかった。

以上の結果から、ネオロン™950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 100ppm 濃度水溶液)はウサギの眼粘膜に対し刺激性を有しないと判断される。

試験成績を表ハ-25 に示した。

表ハ-25 ネオロン™950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 100ppm 水溶液)のウサギ眼粘膜刺激性成績

動物種、系統、性、週齢、体重	ウサギ、ニュージーランド白色種、♂：19～21 週齢 (2854～3086g)					
投与方法	ネオロン™950 を希釈した 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 100ppm 濃度水溶液を結膜嚢内に 0.1ml を投与した。					
動物数	6					
判定器官	角膜		紅彩	結膜		
判定項目	混濁度	面積	評点	発赤	浮腫	分泌物
判定結果*	1 hr	0	0	0	0	0
	24hr	0	0	0	0	0
	48hr	0	0	0	0	0
	72hr	0	0	0	0	0

*：Draize 採点法

10. 遺伝毒性試験 添付資料ハ-16~19

(1) 復帰突然変異試験 添付資料ハ-16

被験物質である2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの遺伝子突然変異誘発性の有無を、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の TA98、TA100、TA1535、TA1537 および TA102 を用いて、代謝活性化系の存在下および非存在下 [以下、代謝活性化系の存在下を S9(+)、非存在下を S9(-)と略して記載] で調べた。

被験物質の溶媒には蒸留水を用いた。陽性対照物質として、代謝活性化系の存在下で2-アンスラミン(すべての菌株)、非存在下で2-ニトロフルオレン(TA98)、アジ化ナトリウム(TA100 および TA1535)、9-アミノアクリジン(TA1537)およびマイトマイシン C(TA102)をそれぞれ用いた。S-9mix には Aroclor 1254 処理ラットの S-9 肝分画を用いた。

本試験の前に、これらの指標菌株に対する被験物質の毒性を評価するために、用量設定試験を2回実施した。1回目の用量設定試験の結果は、すべての菌株において、代謝活性化系の有無にかかわらず、1000 μ g/プレート群で毒性を示したが、100 μ g/プレート群では毒性はみられなかった。2回目の用量設定試験の結果は、TA98、TA100、TA1535 および TA1537 において、S9(-)で500 μ g/プレート群に毒性がみられた。なお、S9(+)では毒性を示さなかった。

この用量設定試験の結果に基づき、本試験は、S9(-)の場合は5、20、50、200 および 500 μ g/プレートの用量で、S9(+)の場合は20、50、200、500 および 1000 μ g/プレートの用量で実施した。本試験の結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、復帰変異コロニーの増加は認められなかった。なお、S9(-)ではTA98、TA100 および TA1535 の500 μ g/プレートで、S9(+)ではすべての指標菌株の1000 μ g/プレートで、それぞれ毒性が認められた。

本試験に引き続いて確認試験を実施した。本試験でみられた指標菌株への毒性を考慮して、確認試験の用量設定を行った。すなわち、S9(-)の場合はTA1537 および TA102 菌株で60、90、160、300 および 600 μ g/プレートを用い、TA98、TA100 および TA1535 菌株で30、60、90、160 および 300 μ g/プレートで実施した。一方、S9(+)の場合は、60、90、160、300 および 600 μ g/プレートの用量でTA98、TA100、TA1535、TA1537 および TA102 の5菌株を用いて試験した。確認試験の結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、復帰変異コロニーの増加は認められなかった。なお、S9(+)のTA100 菌株の600 μ g/プレートで毒性が認められた。

以上の結果から、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンはネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) による試験では遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断される。

試験成績を表ハ-26 (本試験) および表ハ-27 (確認試験) に示した。

表ハ-26 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの細菌を用いる復帰突然変異試験成績
(本試験)

試験方法		プレート法						
代謝活性化の有無	試験物質	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数 ^{a)} /プレート					
			TA100	TA1535	TA1537	TA102	TA98	
無し	溶媒対照	0	221 \pm 29	13 \pm 4	12 \pm 2	257 \pm 28	30 \pm 5	
	2-メチル-4- イソチアゾ リン-3-オン	5	179 \pm 6	17 \pm 2	12 \pm 3	305 \pm 7	28 \pm 5	
		20	238 \pm 9	15 \pm 2	15 \pm 7	291 \pm 12	26 \pm 2	
		50	214 \pm 6	14 \pm 2	10 \pm 5	306 \pm 21	30 \pm 6	
		200	200 \pm 61	12 \pm 3	10 \pm 1	280 \pm 26	33 \pm 4	
		500	-F	-F	7 \pm 3	239 \pm 21	-F	
	陽性 対照	2-NF	3NNNN	775 \pm 134
		NaN ₃	2	740 \pm 46	785 \pm 42NNN
		9-AA	100NN	464 \pm 148NN
		MMC	2NNN	867 \pm 28N
有り	溶媒対照	0	205 \pm 18	14 \pm 2	14 \pm 2	324 \pm 24	31 \pm 3	
	2-メチル-4- イソチアゾ リン-3-オン	20	246 \pm 5	18 \pm 5	16 \pm 5	299 \pm 38	33 \pm 8	
		50	235 \pm 11	15 \pm 3	15 \pm 3	291 \pm 25	37 \pm 3	
		200	230 \pm 32	10 \pm 1	11 \pm 1	330 \pm 11	35 \pm 5	
		500	223 \pm 7	12 \pm 4	14 \pm 1	257 \pm 34	28 \pm 6	
		1000	-F	-F	-F	-F	-F	
	陽性 対照	2-AM	12	1046 \pm 73	172 \pm 28	35 \pm 2	1274 \pm 121	832 \pm 33

N:実施せず、F:細胞毒性発現のため測定不能

a):平均 \pm 標準偏差

プレート数:各3枚(被験物質群)、各6枚(溶媒対照群および陽性対照群)

2-NF:2-ニトロフルオレイン、NaN₃:アジ化ナトリウム、9-AA:9-アミノアクリジン、

MMC:マイトマイシンC

2-AM:2-アンスラミン

表ハ-27 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの細菌を用いる復帰突然変異試験成績
(確認試験)

試験方法		プレート法						
代謝活性化の有無	試験物質	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数 ^{a)} /プレート					
			TA100	TA1535	TA1537	TA102	TA98	
無し	溶媒対照	0	226 \pm 8	18 \pm 6	15 \pm 3	311 \pm 24	28 \pm 6	
	2-メチル-4- イソチアゾ リン-3-オン	30	255 \pm 13	15 \pm 2NN	23 \pm 2	
		60	241 \pm 10	12 \pm 3	18 \pm 2	345 \pm 34	32 \pm 6	
		90	284 \pm 7	14 \pm 5	18 \pm 3	330 \pm 26	27 \pm 2	
		160	276 \pm 11	11 \pm 4	12 \pm 2	287 \pm 21	32 \pm 6	
		300	257 \pm 10	8 \pm 3	18 \pm 4	313 \pm 15	31 \pm 4	
		600NN	5 \pm 1	210 \pm 16N	
	陽性 対照	2-NF	3NNNN	693 \pm 126
		NaN ₃	2	752 \pm 27	918 \pm 35NNN
		9-AA	100NN	432 \pm 150NN
		MMC	2NNN	1048 \pm 43N
有り	溶媒対照	0	263 \pm 22	17 \pm 5	13 \pm 2	350 \pm 11	25 \pm 4	
	2-メチル-4- イソチアゾ リン-3-オン	60	248 \pm 22	11 \pm 6	22 \pm 2	366 \pm 28	33 \pm 4	
		90	251 \pm 33	14 \pm 4	17 \pm 3	320 \pm 52	29 \pm 5	
		160	252 \pm 11	11 \pm 1	13 \pm 1	348 \pm 14	39 \pm 6	
		300	247 \pm 17	13 \pm 1	15 \pm 2	334 \pm 35	29 \pm 2	
		600	-F	10 \pm 1	12 \pm 2	266 \pm 26	29 \pm 2	
	陽性 対照	2-AM	12	601 \pm 26	148 \pm 20	31 \pm 5	1330 \pm 97	301 \pm 53

N : 実施せず、F : 細胞毒性発現のため測定不能

a) : 平均 \pm 標準偏差

プレート数 : 各 3 枚(被験物質群)、各 6 枚(溶媒対照群および陽性対照群)

2-NF : 2-ニトロフルオレイン、NaN₃ : アジ化ナトリウム、9-AA : 9-アミノアクリジン、

MMC : マイトマイシン C

2-AM : 2-アンスラミン

(2) 染色体異常試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-17

被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの染色体異常誘発能の有無を、チャイニーズハムスターCHO 細胞を用いて、代謝活性化系の存在下および非存在下で調べた。

本試験では、代謝活性化系の非存在下で被験物質の 1.25~12.7 $\mu\text{g/ml}$ の濃度、存在下で 2.5~16.9 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、3 時間処理し 20 時間後に細胞を採取した。また、確認試験では、代謝活性化系の非存在下で被験物質の 1.25~7.50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、17.8 時間処理し 20 時間後に細胞を採取した。さらに代謝活性化系存在下で被験物質の 1.25~7.50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、3 時間処理し 20 時間後に細胞を採取した。

被験物質の用量は、本試験に先立って実施した細胞毒性の結果をもとに選択した。すなわち、33.9~5000 $\mu\text{g/ml}$ の合計 15 用量における細胞毒性を確認した。その結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての用量で著しい毒性がみられたため、0.0785、0.157、0.313、0.625、1.25、2.50、5.00、9.53、12.7、16.9、22.5、30.0 および 40.0 $\mu\text{g/ml}$ の用量で再度細胞毒性を確認した。その結果、代謝活性化系の非存在下では、16.9 $\mu\text{g/ml}$ 以上の群で著しい細胞毒性が肉眼的にみられ、5.00、9.53 および 12.7 $\mu\text{g/ml}$ では有糸分裂細胞の軽度な減少が肉眼的に認められた。また、9.53 および 12.7 $\mu\text{g/ml}$ における有糸分裂指数減少率は、それぞれ 8 および 23%であった。なお、1.25、2.50、5.00、9.53、12.7、16.9、22.5、30.0 および 40.0 $\mu\text{g/ml}$ の用量における細胞計数の減少率は、それぞれ 2、1、39、42、57、78、82、93 および 98%であった。

以上の細胞毒性に関する成績から、代謝活性化系の非存在下では 1.25、2.50、5.00、9.53 および 12.7 $\mu\text{g/ml}$ の用量における染色体異常評価を行った。

一方、代謝活性化系の存在下においても、16.9 $\mu\text{g/ml}$ 以上の群で著しい細胞毒性が肉眼的にみられ、12.7 $\mu\text{g/ml}$ で細胞の残骸および有糸分裂細胞の軽度な減少が、5.00 および 9.53 $\mu\text{g/ml}$ で有糸分裂細胞の軽度な減少が肉眼的にそれぞれ認められた。また、1.25、5.00、9.53、12.7 および 16.9 $\mu\text{g/ml}$ における有糸分裂指数の減少率は、それぞれ 10、10、27、56 および 70%であった。なお、2.50、5.00、9.53、12.7、16.9、22.5、30.0 および 40.0 $\mu\text{g/ml}$ の用量における細胞計数の減少率は、それぞれ 15、24、28、27、52、59、77 および 90%であった。

以上の細胞毒性に関する成績から、代謝活性化系の存在下では 2.50、5.00、9.53、12.7 および 16.9 $\mu\text{g/ml}$ の用量における染色体異常評価を行った。

また、本試験に引き続き実施した確認試験では、代謝活性化系の非存在下で 0.157~20.0 $\mu\text{g/ml}$ の計 12 用量で、代謝活性化系の存在下で 1.25~20.0 $\mu\text{g/ml}$ の計 12 用量で、本試験と同様な細胞毒性に関する評価した後、代謝活性化系の非存在下では 1.25、2.50、3.75 および 7.50 $\mu\text{g/ml}$ の用量で、代謝活性化系の存在下では 1.25、2.50、5.00 および 7.50 $\mu\text{g/ml}$ の用量で染色体異常評価を行った。

陰性対照には McCoy's 5a 細胞培養液を、溶媒対照には脱イオン水を用いた。陽性対照に

は、マイトマイシン C (代謝活性化系の非存在下) およびシクロフォスファミド (代謝活性化系の存在下) をそれぞれ用いた。処理液量はいずれも 10.0 μ l/ml とした。

染色体異常の評価では、有糸分裂指数あるいは細胞計数の明らかな減少を指標とする細胞毒性がみられた用量(本試験: 代謝活性化系の非存在下で 9.53 および 12.7 μ g/ml, 存在下で 12.7 および 16.9 μ g/ml, 確認試験: 代謝活性化系の非存在下で 3.75 および 7.50 μ g/ml, 存在下で 7.50 μ g/ml)において、細胞毒性に依存的な染色体異常が生じた。細胞毒性に伴うこれらの染色体異常は Hilliard ら(1998)が *in vitro* 試験で報告しているように疑陽性と判断された。

以上の結果から、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンはチャイニーズハムスターCHO 細胞株に対し細胞毒性を示す濃度では染色体異常を生じたことから疑陽性と判断される。

試験成績を表ハ-28 (本試験) および表ハ-29 (確認試験) に示した。

表ハ-28 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのチャイニーズハムスターCHO細胞を用いる染色体異常試験成績 (本試験)

使用細胞		チャイニーズハムスターCHO細胞								
陽性対照		マイトマイシンC(直接法), シクロフォスファミド(代謝活性化法)								
処理方法		試験物質で3時間処理し, 20時間後に細胞採取								
代謝活性化の有無	試験物質	用量(μg/ml)	細胞毒性				染色体異常			
			有糸分裂指数 (%)	有糸分裂指数減少率 (%) ^{a)}	細胞計数 (×10 ⁶)	細胞計数減少率 (%) ^{a)}	1細胞当たりの異常数	異常をもつ細胞数の出現頻度 (%)	倍数性細胞の出現頻度 (%)	核内倍加細胞の出現頻度 (%)
無し	陰性対照	0	8.7	—	7.17	—	0.02 (0.02, 0.03)	1.5 (0.0, 3.0)	2.0 (2.0, 2.0)	2.0 (2.0, 2.0)
	溶媒対照	0	7.7	0	6.43	0	0.01 (0.01, 0.01)	1.0 (1.0, 1.0)	0.5 (1.0, 0.5)	0.0 (0.0, 0.0)
	2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン	1.25	11.5	0	6.30	2	0.01 (0.01, 0.01)	0.5 (1.0, 0.5)	1.0 (1.0, 1.0)	1.0 (1.0, 1.0)
		2.50	11.8	0	6.39	1	0.01 (0.00, 0.01)	0.5 (0.0, 1.0)	1.5 (1.0, 2.0)	1.5 (1.0, 2.0)
		5.00	10.6	0	3.91	39	0.05 (0.07, 0.02)	3.5 (5.0, 2.0)	3.0 (1.0, 5.0)	1.5 (2.0, 1.0)
		9.53	7.1	8	3.71	42	0.29 (0.27, 0.30)	14.5* (17.0, 12.0)	2.8 (3.0, 2.5)	5.3* (6.0, 4.5)
		12.7	5.9	23	2.74	57	0.54 (0.64, 0.44)	30.0* (32.0, 28.0)	3.0 (3.0, 3.0)	2.5 (2.0, 3.0)
	陽性対照	1.5	—	—	—	—	1.94 (1.48, 2.40)	72.0* (68.0, 76.0)	3.5 (4.0, 3.0)	1.5 (2.0, 1.0)
有り	陰性対照	0	14.5	—	4.09	—	0.00 (0.00, 0.00)	0.0 (0.0, 0.0)	1.0 (1.0, 1.0)	0.0 (0.0, 0.0)
	溶媒対照	0	14.7	0	3.76	0	0.02 (0.00, 0.04)	1.0 (0.0, 2.0)	1.0 (1.0, 1.0)	1.0 (1.0, 1.0)
	2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン	1.25	13.3	10	4.38	0	—	—	—	—
		2.50	16.3	0	3.19	15	0.01 (0.00, 0.01)	0.5 (0.0, 0.5)	2.0 (1.0, 3.0)	1.0 (1.0, 1.0)
		5.00	13.2	10	2.86	24	0.01 (0.01, 0.00)	0.5 (1.0, 0.5)	1.5 (1.0, 2.0)	2.0 (1.0, 3.0)
		9.53	10.8	27	2.72	28	0.05 (0.05, 0.04)	3.0 (3.0, 3.0)	2.0 (3.0, 1.0)	3.5 (2.0, 5.0)
		12.7	6.5	56	2.76	27	0.18 (0.24, 0.12)	11.0* (14.0, 8.0)	3.0 (4.0, 2.0)	2.5 (2.0, 3.0)
	16.9	4.4	70	1.82	52	0.14 (0.10, 0.32)	12.0* (8.0, 28.0)	3.0 (5.0, 1.0)	3.0 (4.0, 2.0)	
陽性対照	5.00	—	—	—	—	0.42 (0.48, 0.36)	32.0* (36.0, 32.0)	2.5 (2.0, 3.0)	1.5 (1.0, 2.0)	

陰性対照: McCoy's 5a 細胞培養液, 溶媒対照: 脱イオン水

使用プレート数: 各群 2 枚

細胞毒性についての測定値: 平均値

染色体異常についての測定値: 平均値、()内は各プレートの個体値

a): vs 溶媒対照群

—: 実施せず

*: P<0.01(vs 溶媒対照群)

統計学的解析方法: Fisher's exact test および Cochran-Armitage trend test

表ハ-29 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのチャイニーズハムスターCHO 細胞
を用いる染色体異常試験成績 (確認試験)

使用細胞		チャイニーズハムスターCHO 細胞								
陽性対照		マイトマイシン C(直接法)、シクロフォスファミド(代謝活性化法)								
処理方法		直接法：試験物質で 17.8 時間処理し、20 時間後に細胞採取 代謝活性化法：試験物質で 3 時間処理し、20 時間後に細胞採取								
代謝活 性化の 有無	試験物質	用量 (μ g/ml)	細胞毒性				染色体異常			
			有糸 分裂 指数 (%)	有糸 分裂 指数 減少 率 (%) ^{a)}	細胞計 数 ($\times 10^6$)	細胞計 数減少 率(%) ^{a)}	構造異常		数的異常	
							1細胞当 たりの 異常数	異常をも つ細胞数 の出現頻 度(%)	倍数性 細胞の 出現頻 度(%)	核内倍加 細胞の出 現頻度 (%)
無し	陰性対照	0	7.7	—	5.13	—	0.01 (0.01, 0.00)	0.5 (1.0, 0.0)	1.5 (0.5, 2.5)	0.0 (0.0, 0.0)
	溶媒対照	0	7.4	0	4.14	0	0.03 (0.02, 0.03)	2.5 (2.0, 3.0)	1.8 (2.5, 1.0)	0.3 (0.0, 0.5)
	2-メチル -4-イソチ アゾリン -3-オン	1.25	13.5	0	4.29	0	0.00 (0.00, 0.00)	0.0 (0.0, 0.0)	1.3 (1.5, 1.0)	0.8 (1.5, 0.0)
		2.50	7.7	0	4.40	0	0.08 (0.08, 0.07)	3.5 (2.0, 5.0)	1.8 (3.0, 0.5)	0.0 (0.0, 0.0)
		3.75	7.8	0	2.92	29	0.66 (0.92, 0.40)	28.0* (28.0, 28.0)	4.0 (3.0, 5.0)	0.5 (0.0, 1.0)
		5.00	4.7	36	2.51	39	—	—	—	—
		7.50	5.0	32	2.42	42	0.72 (0.48, 0.96)	34.0* (32.0, 36.0)	2.5 (3.0, 2.0)	1.0 (1.0, 1.0)
	陽性対照	0.400	—	—	—	—	0.82 (0.88, 0.76)	44.0* (48.0, 40.0)	3.0 (3.0, 3.0)	0.5 (0.0, 1.0)
有り	陰性対照	0	7.4	—	5.20	—	0.02 (0.03, 0.00)	1.0 (2.0, 0.0)	1.5 (1.0, 2.0)	1.0 (1.0, 1.0)
	溶媒対照	0	10.6	0	4.22	0	0.02 (0.03, 0.00)	1.5 (3.0, 0.0)	1.5 (1.0, 2.0)	1.0 (1.0, 1.0)
	2-メチル -4-イソチ アゾリン -3-オン	1.25	11.1	0	4.36	0	0.00 (0.00, 0.00)	0.0 (0.0, 0.0)	1.0 (1.0, 1.0)	0.5 (1.0, 0.0)
		2.50	8.4	21	3.62	14	0.02 (0.01, 0.03)	1.5 (1.0, 2.0)	1.5 (2.0, 1.0)	1.5 (2.0, 1.0)
		5.00	8.0	25	7.02	0	0.03 (0.00, 0.05)	1.5 (0.0, 3.0)	2.5 (4.0, 1.0)	1.0 (1.0, 1.0)
		7.50	5.5	48	4.32	0	0.19 (0.24, 0.14)	9.0* (12.0, 6.0)	2.5 (3.0, 2.0)	1.0 (1.0, 1.0)
		10.0	5.9	44	3.84	9	—	—	—	—
		12.5	6.5	39	3.26	23	—	—	—	—
		15.0	5.5	48	2.43	42	—	—	—	—
		17.5	2.4	77	2.04	52	—	—	—	—
	陽性対照	5.00	—	—	—	—	0.56 (0.76, 0.36)	40.0* (44.0, 36.0)	6.0 (4.0, 8.0)	0.5 (0.0, 1.0)

陰性対照：McCoy's 5a 細胞培養液、溶媒対照：脱イオン水

使用プレート数：各群 2 枚

細胞毒性についての測定値：平均値

染色体異常についての測定値：平均値、()内は各プレートの個体値

a)：vs 溶媒対照群

—：実施せず

*：P<0.01(vs 溶媒対照群)

統計学的解析方法：Fisher's exact test および Cochran-Armitage trend test

(3) 小核試験 添付資料ハ-18

被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを 8 週齢の雄雌 CD-1 マウスに単回経口投与し、骨髓細胞に出現する小核を検索して、その突然変異性の有無を調べた。

被験物質の 10、50 および 100mg/kg を単回経口投与した。また、溶媒対照には蒸留水を経口投与し、陽性対照にはマイトマイシン C (MMC) の 2mg/kg を腹腔内投与した。

本試験の被験物質の用量は、本試験に先立ち実施されたマウスを用いた単回経口投与試験の成績を基に選択した。投与した全ての用量(150、200 および 250mg/kg)の雌雄で、死亡(150mg/kg : ♂♀共 ; 2/6、200mg/kg : ♂ ; 4/6、♀ ; 5/6、250mg/kg : ♂♀共 ; 6/6)と毒性の臨床症状(受動性、運動失調、引きずり歩行、眼瞼下垂並びに少糞或いは欠糞など)が観察され、LD₅₀ は 167mg/kg であった。これらの成績から小核試験では 100mg/kg を高投与量とし、低用量に 1/10 の 10mg/kg を、中用量に 50mg/kg を用いた。

骨髓細胞の検索は、被験物質および溶媒投与群では投与 24 および 48 時間後に、陽性対照群では投与 24 時間後に塗抹標本を作製し、アクリジンオレンジ染色後にそれぞれ実施した。

その結果、被験物質 100mg/kg 投与群において投与後約 24 時間内に雌 2 例の死亡が認められた。しかし、被験物質は、溶媒対照群と比較して小核を持つ多染性赤血球の出現頻度の増加を誘発しなかった。一方、陽性対照群では小核を持つ多染性赤血球の出現頻度の増加が認められた。

以上の結果から、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンはマウス骨髓細胞に対し突然変異性を有しないと判断される。

試験成績を表ハ-30 に示した。

表ハ-30 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのマウス骨髓細胞を用いる小核試験成績

動物種、系統、性、週齢、体重		マウス、CD-1、♂♀：8週齢（23～29g）			
使用動物数		1群雄雌各5匹(溶媒対照群、低および中間用量群、陽性対照群) 1群雄雌各7匹(高用量群)			
投与経路		経口投与(被験物質および溶媒対照群)、腹腔内投与(陽性対照群)			
投与回数		1回			
標本染色方法		アクリジンオレンジ染色法			
標本対照物質		マイトマイシンC (MMC)			
標本作製時期		被験物質および溶媒対照(投与後24および48時間)、 陽性対照(投与後24時間)			
性	標本作製時期 (hr)	試験物質	用量 (mg/kg)	分析結果 ^{a)}	
				PCE/NCE比	MN-PCE(%)
雄	24	溶媒対照	0	1.42±0.08	0.18±0.05
		2-メチル-4- イソチアゾ リン-3-オン	10	1.43±0.24	0.12±0.11
			50	1.33±0.06	0.09±0.07
			100	1.42±0.49	0.09±0.06
		陽性対照	2	1.03±0.29	5.09±0.83 [#]
	48	溶媒対照	0	1.34±0.38	0.10±0.05
		2-メチル-4- イソチアゾ リン-3-オン	10	1.37±0.25	0.14±0.10
			50	1.43±0.47	0.13±0.05
			100	1.26±0.32	0.10±0.08
		雌	24	溶媒対照	0
2-メチル-4- イソチアゾ リン-3-オン	10			1.55±0.47	0.09±0.06
	50			1.29±0.46	0.12±0.08
	100			1.64±0.38	0.13±0.05
陽性対照	2			0.91±0.32	4.54±0.84 [#]
48	溶媒対照		0	1.60±0.36	0.10±0.07
	2-メチル-4- イソチアゾ リン-3-オン		10	1.42±0.33	0.11±0.04
			50	1.59±0.43	0.11±0.07
			100	1.42±0.31	0.11±0.07

溶媒対照：蒸留水

PCE/NCE比：多染性赤血球/正染性赤血球比

MN-PCE%：小核をもった多染性赤血球の出現頻度

a)：平均±標準偏差

#：溶媒対照に対し有意差あり(p<0.05)

統計学的解析方法：Dunnett's t-test

(4) 遺伝子突然変異試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-19

被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの hypoxanthine guanine phosphoribosyl 転位酵素 (HGPRT) 遺伝子座での遺伝子突然変異誘発性の有無について、チャイニーズハムスターCHO細胞を用いて代謝活性化系の存在下および非存在下で調べた。試験は本試験および確認試験の2試験で実施した。

本試験に先立ち、用量設定試験として0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50, 100, 500, 1000 および5000 $\mu\text{g/ml}$ の10濃度で相対コロニー形成率(RCE)を計測して細胞毒性試験を行った。その結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、50 $\mu\text{g/ml}$ 以上では細胞毒性が強くみられ、RCEが0%であったため、本試験では0.5, 1.0, 5.0, 10, 15 および25 $\mu\text{g/ml}$ の6濃度を用いた。本試験において最高濃度の25 $\mu\text{g/ml}$ では代謝活性化系の存在下および非存在下でRCEは各々29 および42%を示した。また、確認試験では5.0, 10, 15, 25 および40 $\mu\text{g/ml}$ の5濃度で試験した。

陽性対照には、ジメチルベンゾアントラセン(DMBA)をアセトンに、エタンスルホン酸メチル(EMS)をジメチルスルホキシド(DMSO)に、それぞれ溶解して用いた。なお、被験物質は脱イオン蒸留水に溶解して用いた。S9 mixにはAroclor誘導のラット肝S9分画を用いた。

HGPRTの欠如による突然変異の選別のため6-thioguanine含有の培養液でコロニー化した。被験物質は本試験および確認試験ともにこれらの濃度では突然変異出現頻度の増加を示さず、用量依存性も認められなかった。一方、陽性対照に用いたDMBAおよびEMSでは有意な突然変異出現頻度の増加が認められた。

以上の結果から、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンはチャイニーズハムスターCHO細胞株に対し、突然変異誘発性を持たない物質と判断される。

試験成績を表ハ-31(本試験)および表ハ-32(確認試験)に示した。

表ハ-31 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのチャイニーズハムスターCHO細胞を用いる遺伝子突然変異試験成績(本試験)

使用細胞		チャイニーズハムスターCHO細胞						
陽性対照物質		直接法：エタンスルホン酸メチル(EMS) 代謝活性化法：ジメチルベンゾアントラセン(DMBA)						
代謝活性化の有無	試験物質	用量 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞毒性		突然変異試験			
			平均コロニー数 (平均 \pm 標準偏差)	相対コロニー形成率(%) ^{a)}	平均コロニー形成数 (平均 \pm 標準偏差)	平均突然変異数	10 ⁶ 生存細胞毎の突然変異数	
無し	溶媒対照	0	142 \pm 0.7	100	155 \pm 6.5	16.5	9.0	
	2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン	0.5	113 \pm 4.9	79	193 \pm 7.8	12.5	6.5	
		1.0	103 \pm 2.1	72	121 \pm 9.5	21.0	15.0	
		5.0	105 \pm 9.9	74	169 \pm 13.8	26.0	12.5	
		10	82 \pm 12.0	57	113 \pm 13.4	16.0	12.5	
		15	83 \pm 3.5	58	122 \pm 9.9	6.0	4.5	
		25	41 \pm 6.4	29	156 \pm 18.8	8.5	5.0	
	陽性対照	溶媒対照(DMSO)	0	132 \pm 0.7	100	159 \pm 4.5	31.5	20.5
		EMS	0.5	72 \pm 3.5	54	97 \pm 11.0	709.5	644.5
	有り	溶媒対照	0	133 \pm 5.7	100	135 \pm 13.8	10.0	6.0
2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン		0.5	106 \pm 1.4	80	144 \pm 11.9	5.5	3.5	
		1.0	93 \pm 7.1	70	116 \pm 5.4	12.5	13.0	
		5.0	90 \pm 13.4	67	125 \pm 26.2	12.5	12.5	
		10	103 \pm 3.5	77	131 \pm 16.6	5.5	5.5	
		15	75 \pm 4.9	56	124 \pm 14.8	7.0	5.0	
		25	56 \pm 1.4	42	133 \pm 9.3	17.5	12.0	
陽性対照		溶媒対照(アセトン)	0	131 \pm 0.0	100	136 \pm 20.1	26.0	17.5
		DMBA	5.0	82 \pm 2.1	62	99 \pm 4.9	465.0	397.0

溶媒対照：滅菌脱イオン水

EMS：ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解, DMBA：アセトンに溶解

a)：試験プレートの平均コロニー数/溶媒対照プレートの平均コロニー数 \times 100

表ハ-32 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのチャイニーズハムスターCHO細胞を用いる遺伝子突然変異試験成績(確認試験)

使用細胞		チャイニーズハムスターCHO細胞						
陽性対照物質		直接法: エタンスルホン酸メチル(EMS) 代謝活性化法: ジメチルベンゾアントラセン(DMBA)						
代謝活性化の有無	試験物質	用量 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞毒性		突然変異試験			
			平均コロニー数 (平均 \pm 標準偏差)	相対コロニー形成率 (%) ^{a)}	平均コロニー形成数 (平均 \pm 標準偏差)	平均突然変異数	10 ⁶ 生存細胞毎の突然変異数	
無し	溶媒対照	0	217 \pm 18.4	100	178 \pm 9.5	4.0	2.0	
	2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン	5.0	198 \pm 33.9	91	177 \pm 12.6	0.5	0.0	
		10	160 \pm 13.4	74	170 \pm 11.8	3.0	1.5	
		15	122 \pm 12.7	56	157 \pm 10.3	5.0	2.5	
		25	11 \pm 8.5	5	139 \pm 7.7	0.0	0.0	
		40	0 \pm 0	0	NA	NA	NA	
	陽性対照	溶媒対照(DMSO)	0	211 \pm 8.5	100	171 \pm 5.7	2.0	1.0
		EMS	0.5	98 \pm 12.0	46	114 \pm 8.4	228.5	167.5
有り	溶媒対照	0	162 \pm 2.1	100	157 \pm 5.4	3.0	2.0	
	2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン	5.0	166 \pm 5.7	102	162 \pm 13.5	2.5	1.5	
		10	169 \pm 7.1	104	155 \pm 4.2	4.5	2.5	
		15	141 \pm 36.8	87	161 \pm 15.0	4.0	2.0	
		25	103 \pm 6.4	63	167 \pm 6.4	4.5	2.0	
		40	33 \pm 0.7	20	171 \pm 14.1	6.0	2.5	
	陽性対照	溶媒対照(アセトン)	0	150 \pm 4.9	100	169 \pm 10.9	5.0	2.5
		DMBA	5.0	114 \pm 33.9	76	104 \pm 12.7	126.5	119.0

溶媒対照: 滅菌脱イオン水

EMS: ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解, DMBA: アセトンに溶解

a): 試験プレートの平均コロニー数/溶媒対照プレートの平均コロニー数 \times 100

NA: 実施せず

11. ヒトパッチ試験・・・・・・・・・・・・・・・・添付資料ハ-20~23

(1) 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのヒトパッチ試験・・・・・・・・添付資料ハ-20

ネオロンTM950 水溶液(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの 100、300 および 600ppm 水溶液)を健常志願者 40 名の背部皮膚に 24 時間閉塞貼付し、除去後 1 および 24 時間に観察して、皮膚刺激性の有無について検討した。なお、対照試料として精製水を用いた。

被験物質濃度は、化粧品製剤中に本化合物を実際に配合する最大濃度である 100ppm を低用量として用い、その 3 及び 6 倍濃度である 300ppm および 600ppm を用いた。

結果は本邦基準¹⁾に従って 6 段階で判定し、本邦基準を基にして考えられた須貝の方法²⁾に従って評価した。

その結果、すべての被験物質貼付群の 1~5 名で軽い紅斑が認められたが、これらの出現頻度は対照群と同等であった。また、これらの結果から皮膚刺激指数を算出した結果、被験物質の 100 および 600ppm 濃度では 6.3、300ppm 濃度では 1.3 であり、対照群では 5.0 であった。

以上の結果から、須貝の方法に従って評価した場合、いずれも「安全品」の範囲であった。

- 1) 川村太郎 他、日皮会誌、80、No. 5、301(1970) (表ハ-34)
- 2) 須貝哲郎、皮膚、27、No. 4、793 - 803(1985) (表ハ-34 および 35)

試験成績を表ハ-33 に示した。

表ハ-33 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンのヒトパッチ試験成績

志願者	健常日本人								
志願者数(性別数)	40名(男性14名、女性26名)								
平均年齢(範囲)	40.6歳(28~57歳)								
投与方法	フィンチャンパー(EPITEST Ltd.、フィンランド)およびスキャンポールテープ(NORGESPLASTER A/S、ノルウエー)を用いて、試料(15 μ L/8mm Φ)を背部皮膚に24時間閉塞貼付								
貼付物質	精製水		2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン						
濃度(ppm)	0		100		300		600		
パッチ除去後の時間(hr)	1	24	1	24	1	24	1	24	
観察結果*1	-	36	40	35	39	39	40	35	40
	±	4	0	5	1	1	0	5	0
皮膚刺激指数*2	5.0		6.3		1.3		6.3		
評価*3	安全品		安全品		安全品		安全品		

*1：表ハ-34を基準に判定

*2：表ハ-34の評点から算出

*3：表ハ-35を基準に判定

表ハ-34 ヒトパッチテスト判定基準と評点

症状	判定	評点
反応なし	-	0
軽い紅斑	±	0.5
明らかな紅斑	+	1.0
浸潤ないし浮腫を伴う紅斑	++	2.0
紅斑+浸潤+丘疹~小水疱	+++	3.0
大水疱	++++	4.0

表ハ-35 評価基準

皮膚刺激指数	評価
15.0以下	安全品
15.0~30.0	許容品
30.0~60.0	要改良品
60.0以上	危険品

皮膚刺激指数：試料除去1時間後と24時間後の夫々の観察から得られた紅斑の判定を表ハ-34に示した基準で評点化した。その評点を比較し、高い評点の総和を被験者数で割った百分率を皮膚刺激指数とした。

(2) ネオロンTM950 を含む試験製剤品を用いたヒトパッチ試験・添付資料ハ-21~23

1) シャンプー(Rinse off タイプ)のヒトパッチ試験・・・・・・・・添付資料ハ-21

試験製剤化粧品であるネオロンTM950 配合(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを最大配合予定濃度である 100ppm 配合) シャンプーを健常志願者 40 名の背部皮膚に 24 時間閉塞貼付し、除去後 1 および 24 時間に観察して、皮膚刺激性の有無について検討した。また、対照試料としてネオロンTM950 無配合シャンプーを用いた。なお、いずれのシャンプー製剤も精製水で希釈した 1%水溶液を用いた。

結果は本邦基準¹⁾に従って 6 段階で判定し、本邦基準を基にして考えられた須貝の方法²⁾に従って評価した。

その結果、被験物質貼付群の 2 名で明らかな紅斑が、13 名で軽い紅斑がそれぞれ認められた。また、対照群の 1 名で明らかな紅斑が、10 名で軽い紅斑がそれぞれ認められた。また、これらの結果から皮膚刺激指数を算出した結果、被験物質群では 21.3 であり、対照群では 15.0 であった。

以上の結果から、須貝の方法に従って評価した場合、ネオロンTM950 配合(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを 100ppm 配合) シャンプーは「許容品」の範囲であった。

1) 川村太郎 他、日皮会誌, 80, No. 5, 301(1970) (表ハ-34)

2) 須貝哲郎、皮膚, 27, No. 4, 793 - 803(1985) (表ハ-34 および 35)

試験成績を表ハ-36 に示した。

表ハ-36 ネオロン™950 を含む試験製剤化粧品(シャンプー)のヒトパッチ試験成績

志願者	健常日本人				
志願者数(性別数)	40名(男性14名,女性26名)				
平均年齢(範囲)	40.6歳(28~57歳)				
投与方法	フィンチャンパー(EPITEST Ltd., フィンランド)およびスキャンポールテープ(NORGESPLASTER A/S, ノルウエー)を用いて, 試料(15µL/8mmΦ)を背部皮膚に24時間閉塞貼付				
貼付物質	ネオロン™950 無配合 シャンプー		ネオロン™950 配合 シャンプー		
試験製剤中の2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの濃度(ppm)	0		100		
パッチ除去後の時間(hr)	1	24	1	24	
観察結果*1	-	34	32	31	28
	±	6	7	8	10
	+	0	1	1	2
皮膚刺激指数*2	15.0		21.3		
評価*3	許容品		許容品		

*1: 表ハ-34 を基準に判定

*2: 表ハ-34 の評点から算出

*3: 表ハ-35 を基準に判定

2) サンスクリーン(Leave on タイプ)のヒトパッチ試験・・・・添付資料ハ-22

試験製剤化粧品であるネオロン TM950 配合(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを最大配合予定濃度である 100ppm 配合) サンスクリーンを健常志願者 40 名の背部皮膚に 24 時間閉塞貼付し、除去後 1 および 24 時間に観察して、皮膚刺激性の有無について検討した。なお、対照試料としてネオロン TM950 無配合サンスクリーンを用いた。

結果は本邦基準¹⁾に従って 6 段階で判定し、本邦基準を基にして考えられた須貝の方法²⁾に従って評価した。

その結果、被験物質貼付群の 1 名で軽い紅斑が認められたが、これらの出現頻度は対照群と同等以下であった。また、これらの結果から皮膚刺激指数を算出した結果、被験物質群では 1.3 であり、対照群では 6.3 であった。

以上の結果から、須貝の方法に従って評価した場合、ネオロン TM950 配合(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを 100ppm 配合) サンスクリーンは「安全品」の範囲であった。

1) 川村太郎 他、日皮会誌、80、No. 5、301(1970) (表ハ-34)

2) 須貝哲郎、皮膚、27、No. 4、793 - 803(1985) (表ハ-34 および 35)

試験成績を表ハ-37 に示した。

表ハ-37 ネオロン™950 を含む試験製剤化粧品(サンスクリーン)のヒトパッチ試験成績

志願者	健常日本人				
志願者数(性別数)	40名(男性14名、女性26名)				
平均年齢(範囲)	40.6歳(28~57歳)				
投与方法	フィンチャンパー(EPITEST Ltd.、フィンランド)およびスキャンポールテープ(NORGESPLASTER A/S、ノルウエー)を用いて、試料(15 μ L/8mm Φ)を背部皮膚に24時間閉塞貼付				
貼付物質	ネオロン™950 無配合 サンスクリーン		ネオロン™950 配合 サンスクリーン		
試験製剤中の2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの濃度(ppm)	0		100		
パッチ除去後の時間(hr)	1	24	1	24	
観察結果*1	-	35	40	39	40
	±	5	0	1	0
皮膚刺激指数*2	6.3		1.3		
評価*3	安全品		安全品		

*1：表ハ-34を基準に判定

*2：表ハ-34の評点から算出

*3：表ハ-35を基準に判定

3) ボディローション(Leave on タイプ)のヒトパッチ試験・・・添付資料ハ-23

試験製剤化粧品であるネオロンTM950 配合(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを最大配合予定濃度である 100ppm 配合) ボディローションを健常志願者 40 名の背部皮膚に 24 時間閉塞貼付し、除去後 1 および 24 時間に観察して、皮膚刺激性の有無について検討した。なお、対照試料として NeoloneTM950 無配合ボディローションを用いた。

結果は本邦基準¹⁾に従って 6 段階で判定し、本邦基準を基にして考えられた須貝の方法²⁾に従って評価した。

その結果、被験物質貼付群の 1 名で軽い紅斑が認められたが、これらの出現頻度は対照群と同等であった。また、これらの結果から皮膚刺激指数を算出した結果、被験物質群では 1.3 であり、対照群でも 1.3 であった。

以上の結果から、須貝の方法に従って評価した場合、ネオロンTM950 配合(2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを 100ppm 配合) ボディローションは「安全品」の範囲であった。

- 1) 川村太郎 他、日皮会誌、80、No. 5、301(1970) (表ハ-34)
- 2) 須貝哲郎、皮膚、27、No. 4、793 - 803(1985) (表ハ-34 および 35)

試験成績を表ハ-38 に示した。

表ハ-38 ネオロン™950 を含む試験製剤化粧品(ボディローション)のヒトパッチ試験
成績

志願者	健常日本人				
志願者数(性別数)	40名(男性14名、女性26名)				
平均年齢(範囲)	40.6歳(28~57歳)				
投与方法	フィンチャンバー(EPITEST Ltd., フィンランド)およびスキャンポールテープ(NORGESPLASTER A/S, ノルウエー)を用いて、試料(15 μ L/8mm Φ)を背部皮膚に24時間閉塞貼付				
貼付物質	ネオロン™950 無配合 ボディローション		ネオロン™950 配合 ボディローション		
試験製剤中の2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの濃度(ppm)	0		100		
パッチ除去後の時間(hr)	1	24	1	24	
観察結果*1	-	39	40	39	40
	±	1	0	1	0
皮膚刺激指数*2	1.3		1.3		
評価*3	安全品		安全品		

*1: 表ハ-34 を基準に判定

*2: 表ハ-34 の評点から算出

*3: 表ハ-35 を基準に判定

1 2. 吸収、分布、代謝および排泄試験 添付資料ハ-26

(1) ラット吸収、分布、代謝および排泄試験 添付資料ハ-26

被験物質である 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン(以下、MI と略)および類似構造を有する 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン(以下、CMI と略)を 1 : 3 の割合に含有する混合物であるケーソン CG(用量設定試験)またはケーソン 886 Biocide(本試験)を用いて、MI または CMI のいずれかに ^{14}C -放射能標識を行い、雄ラットの皮膚へ塗布、経口または静脈内投与をすることにより、吸収、血中濃度および尿、糞中への排泄等を指標とし、 ^{14}C 標識 MI および CMI の動態を調べた。

本試験の投与量の設定は、CMI に ^{14}C -標識したケーソン CG を用い、25($1.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)、250($12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)および 2500ppm($125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)の皮膚塗布投与による用量設定試験の結果から、皮膚塗布投与には 2.5 および 25ppm を、経口および静脈内投与には $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ をそれぞれ設定した。

投与に関しては、用量設定試験では 3 種の濃度液をラットの背部皮膚 $2 \times 2\text{cm}$ の面積に 0.2ml 塗布投与し、投与後直ちに洗浄綿で拭い取る方法、並びに投与部にグラスリングを装着して塗布した状態で 7 日間放置後拭い取る方法を用いた。本試験では同様に皮膚投与では 2.5 および 25ppm 濃度液を用いて投与(塗布)し、投与後直ちに、または 6 時間後に洗浄綿で拭い取る方法で実施した。経口投与および静脈内投与(大腿静脈)の液量はそれぞれ $5\text{ml}/\text{kg}$ および $1\text{ml}/\text{kg}$ とした。 ^{14}C -標識を行ったケーソンは蒸留水に溶解して投与した。尿および糞は、皮膚、経口および静脈内投与したラットから 7 日間採取し、排泄中の ^{14}C -濃度を測定した。血中濃度は、皮膚および経口投与したラットから初日に経時的に 4 回、翌日から 4 日後まで 1 日 1 回、さらに 7 日後に採血した。用量設定試験では全血および血漿を用い、本試験では全血を用いて ^{14}C -濃度を測定した。暴露終了時には、洗浄綿、ケージ洗浄液およびリング洗浄液並びに皮膚塗布投与ラットの塗布部分の皮膚を採取し、これらサンプル中の ^{14}C -濃度を測定した。

その結果、表ハ-39 に示す如く、 ^{14}C -CMI ケーソンおよび ^{14}C -MI ケーソンの 2.5ppm 濃度液を 6 時間皮膚塗布した場合の皮膚からの吸収率は各々 38% および 43% であり、同様に 25ppm 濃度液を 6 時間皮膚塗布投与した場合の吸収率は各々 27 および 26% であった。これらの結果は、ケーソン中の CMI および MI が同等に吸収されることを示している。この 25ppm 濃度液を 6 時間皮膚塗布投与した結果は、 ^{14}C -CMI ケーソン 25 および 250ppm 濃度液の皮膚塗布投与後 7 日間塗布状態での吸収率である 20% および 29% に類似していることから、ケーソンは塗布後、短時間(6 時間以内)に吸収され、また低用量(250ppm 以下)ではほぼ同様に吸収されることを示唆した(表ハ-39)。また、これらのことは、 ^{14}C -CMI ケーソンおよび ^{14}C -MI ケーソン 25ppm 濃度液の 6 時間あるいは 7 日間皮膚塗布投与による塗布皮膚からの回収率もそれぞれ 72、75 および 73% と類似した値を示したことによっても証

明される(表ハ-40)。皮膚投与6時間または7日後に拭き取ることにより回収された¹⁴C-標識体の量は投与量の1から5%とごく少なく(表ハ-41)、また、皮膚塗布投与7日後に塗布部位の皮膚に残留している¹⁴C-標識体の量は、2.5から2500ppm濃度液までの塗布量に比例していた(表ハ-40)ことから¹⁴C-ケーソンは投与部位の皮膚に対し高い親和性を有し、吸収され難いことを示した。

皮膚投与後の血中濃度では表ハ-42に示す如く、全血¹⁴C-濃度は血漿¹⁴C-濃度よりも高く、25および250ppm液投与では7日間ほぼ一定濃度に保たれた。この結果から、ケーソンおよび/またはその代謝物は赤血球に対し強い親和性を有することが示唆された。また、全血¹⁴C-濃度は25および250ppm濃度液の塗布では同等である一方2500ppm濃度液の塗布では著しく高く、投与用量に比例していなかった(表ハ-42)。¹⁴C-CMIケーソンおよび¹⁴C-MIケーソンを経口および皮膚投与した場合、血漿中¹⁴C-濃度は¹⁴C-CMIケーソンに比べ¹⁴C-MIケーソン投与で高い値を示した(表ハ-43)。

¹⁴C-ケーソンの皮膚投与後の¹⁴C-標識体排泄は、25ppm濃度液投与に比べ2.5ppm濃度液投与のほうが早く、2.5ppm濃度の¹⁴C-CMIケーソンおよび¹⁴C-MIケーソン投与の場合共に48時間以内に投与¹⁴C-標識体の各々47および27%が排泄された(表ハ-44)。

低い皮膚投与量(2.5および25ppm)では排泄された¹⁴C-ラベルの大部分は糞中であつた(排泄標識体の58から89%の範囲)が、高い皮膚投与量(2500ppm)では、¹⁴C-排泄は主に尿中であり(排泄¹⁴C-標識体の60%)、経口あるいは静注投与後に見られるパターンに良く類似していた。これら皮膚塗布投与において、2500ppmでは25ppm、250ppmに比べ血中濃度が著しく高かつたこと(表ハ-42)、ならびに排泄パターンが異なつてゐたことから皮膚投与は非線系の動態を示した。¹⁴C-CMIケーソンおよび¹⁴C-MIケーソンは、皮膚からの吸収、塗布投与部位の皮膚に対する吸着並びに静注、経口および皮膚塗布投与後の尿および糞中排泄のパターンに対し、類似の動態を示唆する値を示した。しかし、これら2種の¹⁴C-ケーソンにおいて¹⁴C-MIケーソン由来の¹⁴C-標識体は、¹⁴C-CMIケーソン由来の¹⁴C-標識体に比べ経口投与では高い吸収を示すこと、ならびに経口と皮膚投与によって全血中に高い¹⁴C-濃度を示すことが異なつてゐた。

試験成績を表ハ-39(¹⁴C-放射能標識化合物の吸収濃度率)、表ハ-40(皮膚投与部位の¹⁴C-放射能標識濃度)、表ハ-41(¹⁴C-放射能標識化合物の回収率)、表ハ-42(¹⁴C-CMIのラット皮膚投与時の全血または血漿中の¹⁴C-標識体濃度)、表ハ-43(¹⁴C-ケーソンをラットに投与時の全血中の¹⁴C-標識体濃度)および表ハ-44(¹⁴C-ケーソン投与後の尿および糞中累積排泄率)を示した。

表ハ-39 ラット吸収、分布、代謝および排泄試験成績

¹⁴C-放射能標識化合物の吸収濃度率

動物種・系統・週齢(性)		ラット、Sprague-Dawley(Cr:CD(R))BR、5週齢(♂)				
投与経路(実施試験)		皮膚投与(用量設定および本試験)、経口投与(本試験)、静脈内投与(本試験)				
試験種類	標識化合物	投与経路	投与量(ppm)	洗浄時間 ^{b)}	吸収濃度率(%) ^{a)}	
					絶対 ^{c)}	相対 ^{d)}
用量設定試験	CMI	皮膚	25	7日	24±12	20±11
			250	7日	24±4	29±1
			250	0時間	—	—
			2500 ^{e)}	7日	27	50
本試験	CMI	皮膚	2.5	6時間	74±28	38±10
			25	6時間	46±35	27±14
			25	0時間	—	—
		静脈内	25*	/	—	—
		経口	25*	/	69±2	62±2
	MI	皮膚	2.5	6時間	53±24	43±10
			25	6時間	30±11	26±9
			25	0時間	—	—
		静脈内	25*	/	—	—
		経口	25*	/	88±4	90±3

測定値：平均±SD

*：μg/kg

用量設定試験：n=2、本試験：n=4

a)：皮膚投与の場合；尿および糞中の¹⁴C-排泄(皮膚投与)/尿および糞中の¹⁴C-排泄(静脈内投与)×100%

経口投与の場合；尿中の¹⁴C-排泄(経口投与)/尿中の¹⁴C-排泄(静脈内投与)×100%

b)：投与部位の皮膚が洗浄されたときの投与後の時間

c)：表ハ-41の値をそのまま用いて計算

d)：表ハ-41の合計回収率を100%とした値を用いて計算

e)：4日目に1例死亡

—：実施せず

表ハ-40 ラット吸収、分布、代謝および排泄試験成績

皮膚投与終了時における投与部位の ¹⁴C-放射能標識濃度

動物種・系統・週齢(性)			ラット、Sprague-Dawley{Cr:CD(R)}BR、5週齢(♂)		
投与経路			皮膚投与		
試験分類	混合物の 標識体	動物数	投与量 (ppm)	皮膚投与部位の ¹⁴ C-標識濃度	
				投与量に対する比率(%)	μg 当量
用量設定 試験	CMI	2	25	75±9	3.75
			250	68±1	34.00
		1 ^{a)}	2500	46	230.00
本試験	CMI	4	2.5	59±9	0.30
			25	72±14	3.60
	MI	4	2.5	54±10	0.27
			25	73±9	3.65

^{a)} 4日目に1例死亡

表ハ-41 ラット吸収、分布、代謝および排泄試験成績

¹⁴C-放射能標識化合物の回収率

動物種・系統・週齢(性)		ラット、Sprague-Dawley(Cr:CD(R))BR, 5週齢(♂)									
投与経路(実施試験)		皮膚投与(用量設定および本試験)、経口投与(本試験)、静脈内投与(本試験)									
試験種類	標識化合物	投与経路	投与量(ppm)	洗浄時間 ^{b)}	¹⁴ C-放射能標識化合物の回収率(%)						
					尿中	UFW	糞中	洗浄綿	投与部位	全血中	合計 ^{a)}
用量設定試験	CMI	皮膚	25	7日	3±1	2±1	16±9	2±2	78±20	2±1	104±14
			250	7日	2±0.1	3±0.2	14±3	1±0.1	46±5	0.3±0.2	69±6
			250	0時間	—	—	—	12±8	14±3	—	26±5
			2500 ^{d)}	7日	5	8	9	0.4	21	1	46
本試験	CMI	皮膚	2.5	6時間	6±1	0.4±0.2	54±22	5±1	94±5	—	163±21
			25	6時間	9±9	2±2	25±15	1±0.4	92±3	1±0.3	133±31
			25	0時間	—	—	—	73±8	22±13	—	96±5
		静脈内	25*	/	71±9	6±3	7±5	—	—	—	85±14
		経口	25*	/	48±3	5±2	37±3	—	—	1±0.3	94±6
	MI	皮膚	2.5	6時間	19±2	0.5±1	27±29	0.4±1	63±2	—	118±27
			25	6時間	6±2	0±0	22±9	1±0.2	84±13	3±0.3	115±7
			25 ^{d)}	0時間	—	—	—	94±5	11±3	—	105±5
		静脈内	25*	/	80±6	8±2	10±2	—	—	—	98±6
		経口	25*	/	71±9	7±7	19±4	—	—	5±1	97±6

測定値：平均±SD

*：μg/kg

用量設定試験：n=2、本試験：n=4

a)：ケージ、リングおよび投与部位の洗浄液中の¹⁴C-放射能標識を含めた合計

b)：投与部位の皮膚が洗浄されたときの投与後の時間

c)：4日目に1例死亡

d)：n=3

UFW：尿漏斗の洗浄液

—：実施せず

表ハ-42 ラット吸収、分布、代謝および排泄試験成績

¹⁴C-CMI のラット皮膚投与時の全血または血漿中の ¹⁴C-標識体濃度

投与量 (ppm)	サンプル	ケ-ソン CG (¹⁴ C-CMI) 投与後の時間								
		15分	1時間	3時間	6時間	1日	2日	3日	4日	7日
25	全血中	0.005	0.006	0.005	0.008	0.006	0.021	0.002	0.014	0.007
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.001	0.001	0.001	0.011	0.002	0.030	0.002	0.011	0.006	
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	
250	全血中	0.005	0.007	0.007	0.004	0.007	0.003	0.007	0.003	0.009
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.001	0.010	0.001	0.006	0.001	0.004	0.001	0.004	0.007	
	0.002	0.002	0.003	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	
2500	全血中	0.212	1.445	1.421	1.021	0.603	0.581	0.503	0.386	0.247
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.037	0.205	0.310	0.275	0.221	0.227	0.183	0.130	0.056	
	0.001	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	

測定値：平均±SD

単位：ppm

動物数：25 および 250ppm=2、2500ppm=1(4日目に1例死亡のため)

表ハ-43 ラット吸収、分布、代謝および排泄試験成績

¹⁴C-ケ-ソンをラットに投与時の全血中の ¹⁴C-標識体濃度

標識 化合 体	投与 経路	投与 量 (ppm)	ケ-ソン CG 投与後の時間								
			20分	1時間	3時間	6時間	1日	2日	3日	4日	7日
CMI	皮膚	25	0.043	0.075	0.038	0.048	0.024	0.023	0.036	0.026	0.027
			±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.020	0.062	0.007	0.020	0.007	0.004	0.006	0.021	0.006		
	0.098	0.075	0.068	0.053	0.030	0.032	0.033	0.025	0.025		
MI	皮膚	25	0.102	0.102	0.125	0.116	0.112	0.195	0.107	0.108	0.061
			±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.012	0.028	0.012	0.008	0.022	0.104	0.038	0.037	0.005		
	0.222	0.207	0.166	0.155	0.163	0.168	0.152	0.160	0.115		
MI	経口	25*	0.015	0.014	0.015	0.014	0.011	0.009	0.005	0.008	0.006
			±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.024	0.032	0.038	0.013	0.028	0.061	0.031	0.031	0.032		
	0.024	0.032	0.038	0.013	0.028	0.061	0.031	0.031	0.032		

測定値：平均±SD

単位：ppm

動物数：n=4

*：μg/kg

表ハ-44 ラット吸収、分布、代謝および排泄試験成績
¹⁴C-ケーソン投与後の尿および糞中累積排泄率

用量設定試験						¹⁴ C-ケーソン投与開始後の時間					
標識化 合体	投与 経路	投与 量 (ppm)	洗浄 時間 ^{a)}	サン プル	6時間	1日	2日	3日	4日	7日	
CMI	皮膚	25	7日	尿中	0	0.25	0.55	1.63	2.25	4.41	
					±	±	±	±	±	±	
				糞中	0	0.14	0.22	1.05	1.29	0.04	
					0.29	0.73	1.58	5.70	6.51	15.67	
				合計	±	±	±	±	±	±	
					0.41	0.67	0.80	4.13	3.02	9.32	
		250	7日	尿中	0.29	0.98	2.13	7.32	8.76	20.08	
					±	±	±	±	±	±	
				糞中	0.41	0.52	1.02	5.23	4.31	9.36	
					0.01	1.26	2.26	2.95	3.46	5.15	
				合計	±	±	±	±	±	±	
					0.02	1.08	1.12	0.77	0.57	0.17	
2500	7日	尿中	0.04	3.35	6.75	9.16	9.88	14.05			
			±	±	±	±	±	±			
		糞中	0.05	2.82	3.28	1.76	1.50	2.59			
			0.05	4.62	9.01	12.10	13.35	19.20			
		合計	±	±	±	±	±	±			
			0.03	3.91	4.40	2.52	2.07	2.75			
2500	7日	尿中	0.02	3.25	5.50	7.42	8.49	13.30			
		糞中	0.00	1.05	1.18	1.64	2.17	8.87			
		合計	0.02	4.30	6.69	9.06	10.66	22.16			

単位：%

測定値：平均±SD

動物数：25 および 250ppm=2、2500ppm=1(4日目に1例死亡のため)

^{a)}：投与部位の皮膚が洗浄されたときの投与後の時間

表ハ-44 ラット吸収、分布、代謝および排泄試験成績

¹⁴C-ケーソン投与後の尿および糞中累積排泄率[続き①]

本試験						¹⁴ C-ケーソン投与開始後の時間					
標識化 合体	投与 経路	投与 量 (ppm)	洗浄 時間 ^{a)}	サン プル	6時間	1日	2日	3日	4日	7日	
CMI	皮膚	2.5	6時間	尿中	0.12	0.73	1.28	2.42	3.26	6.65	
					±	±	±	±	±	±	
				0.10	0.22	0.41	0.63	0.91	0.98		
		糞中		2.72	14.15	45.85	48.46	53.53	53.53		
				±	±	±	±	±	±		
		4.89		12.27	22.35	21.69	22.10	22.10			
	合計	2.85	14.87	47.14	50.88	56.79	60.17				
		±	±	±	±	±	±				
	4.90	12.30	22.0	21.15	21.46	22.07					
	皮膚	25	6時間	尿中	0.51	1.37	2.97	5.14	6.49	10.33	
					±	±	±	±	±	±	
				0.49	1.48	3.27	4.35	5.52	10.38		
		糞中		0.13	2.43	7.88	12.13	15.25	25.23		
				±	±	±	±	±	±		
		0.15		2.84	5.00	5.57	6.90	15.19			
	合計	0.64	3.80	10.80	17.27	21.74	35.55				
		±	±	±	±	±	±				
	0.64	4.31	8.24	9.90	12.42	25.40					
静脈内	25*	6時間	尿中	48.93	70.30	73.28	74.98	75.95	77.18		
				±	±	±	±	±	±		
			4.96	7.51	8.67	9.13	9.47	9.72			
			糞中	0.11	4.06	5.16	5.56	5.82	6.84		
				±	±	±	±	±	±		
			0.21	2.30	3.00	3.40	3.71	5.05			
合計	49.04	74.36	78.44	80.53	81.77	84.03					
	±	±	±	±	±	±					
5.09	9.14	10.67	11.63	12.25	13.51						
経口	25*	6時間	尿中	32.94	51.28	52.68	52.89	53.00	53.00		
				±	±	±	±	±	±		
			4.58	1.73	1.74	1.89	1.87	1.87			
			糞中	0.23	33.16	35.58	35.82	36.24	37.11		
				±	±	±	±	±	±		
			0.47	2.03	1.55	1.67	1.82	2.77			
合計	33.18	84.43	88.26	88.70	89.24	90.11					
	±	±	±	±	±	±					
4.45	2.27	2.01	2.29	2.56	3.54						

単位：%

測定値：平均±SD

動物数：n=4

a)：投与部位の皮膚が洗浄されたときの投与後の時間

*：μg/kg

表ハ-44 ラット吸収、分布、代謝および排泄試験成績

¹⁴C-ケーソン投与後の尿および糞中累積排泄率[続き②]

本試験						¹⁴ C-ケーソン投与開始後の時間					
標識化 合体	投与 経路	投与 量 (ppm)	洗浄 時間 ^{a)}	サン プル	6時間	1日	2日	3日	4日	7日	
MI	皮膚	2.5	6時間	尿中	1.58	2.99	4.22	9.57	12.03	19.13	
					±	±	±	±	±	±	
					2.12	1.41	0.93	0.01	0.82	2.57	
				糞中	0.39	23.17	23.17	26.69	26.69	26.69	
					±	±	±	±	±	±	
					0.55	31.66	31.66	28.72	28.72	28.72	
	合計	1.97	26.16	27.39	36.26	38.72	45.81				
		±	±	±	±	±	±				
		1.57	33.08	32.60	28.70	27.90	26.16				
	皮膚	25	6時間	尿中	0.27	1.36	2.36	3.31	4.18	6.32	
					±	±	±	±	±	±	
					0.21	0.53	0.81	1.15	1.44	1.80	
				糞中	0.65	1.29	7.10	14.20	16.60	22.11	
					±	±	±	±	±	±	
					1.14	1.63	2.22	4.20	3.50	8.63	
	合計	0.92	2.65	9.46	17.50	20.78	28.43				
		±	±	±	±	±	±				
		0.97	2.16	2.62	3.75	2.91	9.94				
静脈内	25*	6時間	尿中	70.24	86.87	87.58	87.58	87.60	87.60		
				±	±	±	±	±	±		
				9.36	7.01	6.82	6.72	6.83	6.83		
			糞中	0.89	7.96	8.58	9.23	9.73	9.73		
				±	±	±	±	±	±		
				1.77	0.80	0.79	1.31	1.85	1.85		
合計	71.13	94.82	96.17	96.81	97.33	97.33					
	±	±	±	±	±	±					
	10.72	6.43	6.29	6.03	5.81	5.81					
経口	25*	6時間	尿中	24.76	76.02	77.14	77.36	77.60	77.60		
				±	±	±	±	±	±		
				28.62	4.36	4.23	4.00	3.65	3.65		
			糞中	0.12	16.75	18.00	18.39	18.39	18.75		
				±	±	±	±	±	±		
				0.25	4.20	3.83	3.66	3.66	3.64		
合計	24.88	92.77	95.14	95.75	95.98	96.34					
	±	±	±	±	±	±					
	28.75	7.38	7.12	6.45	6.21	5.89					

単位：%

測定値：平均±SD

動物数：n=4

a)：投与部位の皮膚が洗浄されたときの投与後の時間

*：μg/kg