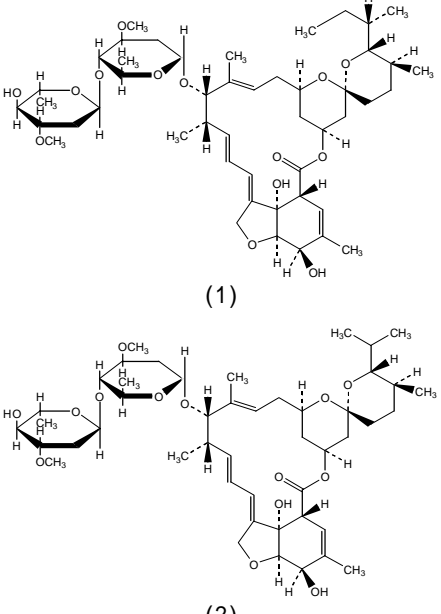
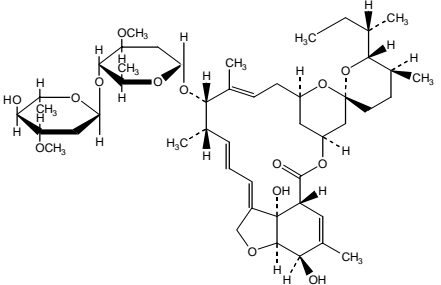
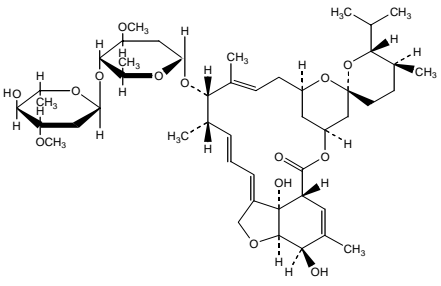


二．毒性

目 次

総括	117
1．単回投与毒性	124
2．反復投与毒性	129
(1) ラットにおける 14 週間経口投与毒性試験	129
(2) イヌにおける 14 週間経口投与毒性試験	131
(3) サルにおける 16 日間経口投与毒性試験	132
3．生殖発生毒性	133
(1) マウスにおける催奇形性試験	133
(2) ラットにおける催奇形性試験	135
(3) ウサギにおける催奇形性試験	136
(4) ラットにおける多世代繁殖試験	138
4．遺伝毒性	143
(1) 細菌を用いた復帰突然変異試験	143
(2) マウスリンパ腫由来細胞株 L5178Y を用いた遺伝子突然変異試験	144
(3) ヒト胎児由来線維芽細胞株 IMR-90 を用いた不定期 DNA 合成試験	144
5．分解物の毒性	145
(1) 長期保存製剤を用いた毒性	145
(2) 酸化体 A の毒性	146
(3) 劣化製剤の毒性	146

二．毒性の項の略号一覧表

略号（略称）	化学名（一般名）	構造式
イベルメクチン	化学名： (1) H ₂ B _{1a} ；5- <i>O</i> -demethyl-22,23-dihydroavermectin A _{1a} (2) H ₂ B _{1b} ；5- <i>O</i> -demethyl-25-de(1-methylpropyl)-22,23-dihydro-25-(1-methylethyl)avermectin A _{1a} 一般名： JAN：イベルメクチン ivermectin r-INN：ivermectin	 <p style="text-align: center;">(1)</p> <p style="text-align: center;">(2)</p>
H ₂ B _{1a} イベルメクチン B _{1a}	化学名： 5- <i>O</i> -demethyl-22,23-dihydroavermectin A _{1a}	
H ₂ B _{1b} イベルメクチン B _{1b}	化学名： 5- <i>O</i> -demethyl-25-de(1-methylpropyl)-22,23-dihydro-25-(1-methylethyl)avermectin A _{1a}	

二．毒性……………添付資料二 - 参1～参6、7、参8～参13、14～16

イベルメクチンはイベルメクチン B_{1a} 及びイベルメクチン B_{1b} からなるが安全性評価は主として、それぞれ約 80% 及び 20% 含有するイベルメクチンについて行った。なお、イベルメクチンに関する毒性試験は一部のサル¹⁾の試験及び追加実施した分解物の試験を除いて において FDA (米国食品医薬品庁) のガイドラインに準拠して実施された。投与量又は処置濃度は遊離酸換算値にて表記した。

総括

表二 - 1 毒性試験一覧表 (1)

試験項目	動物種	投与経路 投与期間	投与量 (mg/kg 又は mg/kg/day)	試験結果 (mg/kg 又は mg/kg/day)	実施施設	資料 番号
単回投 与毒性	マウス (Carworth CF1)	経口	5.0、10.0、20.0、40.0、 80.0、160.0	LD ₅₀ : : 11.6、 : 40.0		二 - 参 1 ~ 参 3
		経口	5.0、10.0、20.0、40.0、 80.0、160.0	LD ₅₀ : : 24.6		
		経口	5.0、10.0、20.0、40.0、 80.0、160.0	LD ₅₀ : : 27.1		
		経口	H ₂ B _{1a} : 2.5、5.0、10.0、 20.0、40.0、80.0、160.0	LD ₅₀ : : 87.2		
		経口	H ₂ B _{1a} : 5.0、10.0、20.0、 40.0、80.0、160.0	LD ₅₀ : : 31.7		
		経口	H ₂ B _{1b} : 5.0、10.0、20.0、 40.0、80.0、160.0	LD ₅₀ : : 56.6		
		経口	H ₂ B _{1b} : 5.0、10.0、20.0、 40.0、80.0、160.0	LD ₅₀ : : 27.6		
		経口 ¹⁾	5.0、10.0、20.0、40.0、 80.0、160.0	LD ₅₀ : : 41.6		
	ラット (Camm-Sprague-Dawley)	経口	2.5、5.0、10.0、20.0、 40.0、80.0	LD ₅₀ : : 52.8、 : 52.8		
	ラット (Sprague-Dawley)	経口	25.0、35.0、49.0、68.6、 96.0	LD ₅₀ : : 42.8、 : 44.3		
	新生児ラット (Sprague-Dawley)	経口	1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、 32.0	LD ₅₀ : : 2.3		
	イヌ(Beagle)	経口	2.5、5.0、10.0	死亡なし		
	イヌ(Beagle)	経口	10、20、40、80	40 mg/kg 以上で 死亡		
	マウス (CF1)	腹腔内	20、30、45、67.5、101.2	LD ₅₀ : : 29.9、 : 33.3		
ラット (Sprague-Dawley)	腹腔内	20、30、45、67.5、101.2	LD ₅₀ : : 59.2、 : 47.4			
反復投 与毒性	ラット	経口、14 週間	0.4、0.8、1.6	無 毒 性 量	雄 0.4、雌 0.8	二 - 参 3、 参 4
	イヌ	経口、14 週間	0.5、1.0、2.0		0.5	二 - 参 6
	幼若サル	経口、16 日間	0.3、0.6、1.2		> 1.2	二 - 7

1) : イベルメクチン B_{1a} とイベルメクチン B_{1b} が約 84 : 16 の割合で含有

表二 - 1 毒性試験一覧表 (2)

試験項目	動物種等	投与(処置)経路、期間	投与量 (mg/kg 又は mg/kg/day) 又は処置濃度	試験結果 (mg/kg 又は mg/kg/day)	実施施設	資料番号	
生殖発生毒性	マウス催奇形性試験	マウス	経口	0.1、0.2、0.4、0.8	無毒性量	母動物：0.1 胎児：0.2	二 - 参 8 ~ 参 11
	ラット催奇形性試験	ラット	経口	2.5、5.0、10.0		母動物：5.0 胎児：5.0	二 - 参 12
	ウサギ催奇形性試験	ウサギ	経口	1.5、3.0、6.0		母動物：3.0 胎児：1.5	二 - 参 13
	多世代繁殖試験	ラット	経口	0.4、1.2、3.6		親世代：0.4 次世代：< 0.4	二 - 14、 16、 参 17
	多世代繁殖追加試験	ラット	経口	0.05、0.1、0.2、0.4		親世代：> 0.4 次世代：0.2	
	交叉乳母交換試験	ラット	経口	2.4		産児毒性：乳汁を介した薬物摂取	二 - 15
	15 日間経口投与毒性試験	新生児サル	経口	0.04、0.1		> 0.1	二 - 18
遺伝毒性	遺伝子突然変異	ネズミチフス菌	直接法	400 ~ 2,000 µg/ブレート	陰性	二 - 参 19	
			代謝活性化法		陰性		
		マウスリンパ腫由来細胞株 L5178Y	直接法	5 ~ 20 µg/mL	陰性		二 - 参 20
			代謝活性化法	20 ~ 60 µg/mL	陰性		
	不定期 DNA 合成	ヒト胎児由来線維芽細胞	直接法	10 ~ 1,000 µg/mL	陰性	二 - 参 21	
代謝活性化法	陰性						
その他の毒性試験	長期保存製剤を用いた毒性試験	ラット	経口、15 日間	0.5(分解物約 10% 含有)	無毒性量	> 0.5	二 - 22
		サル	経鼻胃内投与、15 日間	0.5(分解物約 10% 含有)		> 0.5	二 - 23
	酸化体 A の毒性試験 ³⁾	ラット	経口	46 µg/kg		> 46 µg/kg	二 - 24
	劣化製剤の毒性試験 ³⁾	ラット	経口	酸化体 A : 6.0 µg/kg 酸化体 A ケトン体と酸化体 A 異性体との混合物 : 7.6 µg/kg 酸化体 A ラクトン環開環体 : 10.7 µg/kg		酸化体 A : > 6.0 µg/kg 酸化体 A ケトン体と酸化体 A 異性体との混合物 : > 7.6 µg/kg 酸化体 A ラクトン環開環体 : > 10.7 µg/kg	二 - 25

1) :

2) :

3) : 医薬品毒性試験法ガイドライン(平成元年9月11日薬審1第24号、平成5年8月10日薬新薬第88号一部改定分を含む)及び新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン(平成7年9月25日薬審第877号)に準拠して実施した。

単回投与毒性

単回経口投与毒性試験は 年から 年に、単回腹腔内投与毒性試験は 年に
で FDA のガイドラインに準拠して実施された。用いた動物種はマウス、ラット及びイヌであ
った。また、イベルメクチンはイベルメクチン B_{1a} とイベルメクチン B_{1b} が約 80% : 20% の割合で
含有しているが、それぞれの薬物についても、単回投与毒性試験を実施した。

イベルメクチンのマウスの LD₅₀ 値は雄で 11.6 mg/kg、雌で 40.0 mg/kg と雄の値が雌に比べて
低かった。症状として、活動性減少、呼吸緩徐、振せん、正向反射の消失がみられたが、4 日目
までにほとんどの動物で回復した。雌マウスのイベルメクチン B_{1a} 及びイベルメクチン B_{1b} の単剤
での LD₅₀ 値及び症状はイベルメクチン投与によるものと同様であった。また、両化合物の割合が
約 84% : 16% のイベルメクチンの雌マウスでの LD₅₀ 値及び症状は、割合が約 80% : 20% のものと
同様であった。

ラットの LD₅₀ 値は Camm Sprague-Dawley 系では雌雄ともに 52.8 mg/kg、Sprague-Dawley (CRCD)
系では雄が 42.8 mg/kg、雌が 44.3 mg/kg であり、LD₅₀ 値に雌雄差はなかった。一般状態では、両
系にマウスと同様な症状がみられた。新生児ラットでの LD₅₀ 値は 2.3 mg/kg であった。この LD₅₀
値の成熟動物との差は、新生児ラットにおける血液-脳関門の未熟性に関連するものと考えられる。

イヌでは最高 80 mg/kg まで投与し、40 mg/kg 以上の用量で死亡が認められた。一般状態では、
投与後、散瞳、瞳孔反射の消失、流涎、嘔吐、振せん及び鎮静がみられたが第 2 週には回復した。

イベルメクチンの単回腹腔内投与による LD₅₀ 値は、マウスでは雄で 29.9 mg/kg、雌で 33.3 mg/kg、
ラットでは雄で 59.2 mg/kg、雌で 47.4 mg/kg であった。LD₅₀ 値は経口投与による急性毒性の結果
と同様、マウスで軽度に低い値を示したが、性差はなかった。一般状態はイベルメクチンを経口
投与したマウス又はラットと同様であった。

反復投与毒性

14 週間反復投与毒性試験は 年に で、また 16 日間経口投与毒性試験は
年に で、FDA のガイドラインに準拠して実施された。用い
た動物種は 14 週間反復投与毒性試験でラット及びイヌ、16 日間経口投与毒性試験でサルであっ
た。

ラットを用いた 14 週間経口投与毒性試験では動物は経口投与繁殖能試験での F1 産児を用いて
行った。投与量は 0.4、0.8 及び 1.6 mg/kg/day とした。0.8 mg/kg/day 以上の群の数例に血管内
溶血を示唆すると考えられる脾臓の重量増加を伴う赤脾髄うっ血と髄外造血、骨髄の代償性過形
成、腎尿細管上皮内の鉄反応陽性色素の沈着や肝臓クッパー細胞の色素沈着が認められた。イヌ
の試験は 0.5、1.0 及び 2.0 mg/kg/day の用量で実施した。1.0 mg/kg/day 以上の群で散瞳及び体
重増加量抑制、2.0 mg/kg/day 群で流涎、振せん、運動失調、横臥、餌の摂取量減少から無摂取、
脱水症が認められた。サルを用いた 0.3、0.6 及び 1.2 mg/kg/day の用量での 16 日間経口投与毒
性試験では、雌雄ともに各用量群で、各検査において投与に関連する変化は認められなかった。
反復投与毒性試験における無毒性量は、ラットでは脾重量増加及び組織学的所見を指標として、
雄で 0.4 mg/kg/day、雌で 0.8 mg/kg/day、イヌでは散瞳及び体重増加量の抑制を指標として 0.5

mg/kg/day と考えた。また、サルでは、無毒性量は雌雄ともに 1.2 mg/kg/day 以上であると考えた。

生殖発生毒性

マウス、ラット及びウサギを用いた催奇形性試験、ラットを用いた多世代繁殖試験並びにその追加試験は 年 から 年に、また新生児アカゲザルを用いた 15 日間経口投与毒性試験は 年に、それぞれ あるいは で、FDA のガイドラインに準拠して実施された。

イベルメクチンの 0.1、0.2、0.4 及び 0.8 mg/kg/day をマウスの妊娠 6 日から 15 日まで経口投与し、催奇形性の有無について検討した。0.2 mg/kg/day 以上の用量群で、母動物数例が振せん、昏睡状態又は間代性痙攣を示した後、死亡した。胎児においては、0.4 及び 0.8 mg/kg/day 群の生存胎児数例に口蓋裂が観察された。これらの結果より、母動物に対する無毒性量は 0.1 mg/kg/day、次世代の発生に対する無毒性量は 0.2 mg/kg/day であると判断した。

イベルメクチンの 2.5、5.0 及び 10.0 mg/kg/day をラットの妊娠 6 日から 17 日まで経口投与し、催奇形性の有無について検討した。10.0 mg/kg/day 群の母動物数例を一般状態不良のため中途屠殺した。同群の他の生存母動物に鎮静と限局性の脱毛が散見された。10.0 mg/kg/day 群の生存胎児 4 例に口蓋裂が観察された。これらの結果より、母動物及び次世代の発生に対する無毒性量はともに 5.0 mg/kg/day であると判断した。

イベルメクチンの 1.5、3.0 及び 6.0 mg/kg/day をウサギの妊娠 6 日から 18 日まで経口投与し、催奇形性の有無について検討した。6.0 mg/kg/day 群の母動物で鎮静及び流産が観察された。同群の母動物平均体重が投与期間中に有意に減少した。妊娠末期剖検時、6.0 mg/kg/day 群の死亡胎児数が有意に増加し、3.0 mg/kg/day 以上の用量群の生存胎児の平均体重が軽度ではあるが有意に低下した。3.0 mg/kg/day 以上の用量群において生存胎児の口蓋裂と前肢屈曲の出現頻度が増加した。これらの結果より、母動物及び次世代の発生に対する無毒性量は、それぞれ 3.0 及び 1.5 mg/kg/day であると判断した。

以上、マウス、ラット及びウサギの催奇形性試験において催奇形性が認められたが、奇形は母動物の死亡または著しい体重増加抑制などの母動物毒性が認められた用量付近での発現であった。マウス、ラット及びウサギにおける奇形誘発用量は、臨床推奨用量（0.2 mg/kg）に対して 2、50 及び 15 倍に相当し、mg/m²/日に換算すると 0.2、8.1 及び 4.5 倍に相当した。

イベルメクチンの 0.4、1.2 及び 3.6 mg/kg/day を F0 及び F1 世代の雌雄ラットに経口投与し、多世代繁殖試験を行った。なお、後述の F1 世代に対する産児毒性に関連して、3.6 mg/kg/day 群の F0 親動物については、F1 世代第 1 産児（F1a 産児）を離乳させた時点で屠殺し、その後の多世代試験からは除外した。F0 親動物に薬物投与に起因する死亡あるいは毒性症状は観察されなかった。1.2 mg/kg/day 以上の用量群において、授乳期間中の母動物体重増加が有意に抑制された。各薬物投与群における交尾率あるいは受胎率に薬物投与の影響は認められなかった。3.6 mg/kg/day 群の平均妊娠期間が有意に延長したが、生下時の F1a 産児生存率に薬物投与の影響はなかった。哺育期間中の生後 5 日から 10 日に、3.6 mg/kg/day 群の F1a 産児死亡率が上昇した。

また、同群での生下時及びその後の産児平均体重が有意に低下した。0.4 及び 1.2 mg/kg/day 群の F0 親動物を用いて F1 世代第 2 産児 (F1b 産児) を得た結果、両薬物投与群における産児死亡率の上昇及び体重増加抑制が観察された。F1b 産児の交配試験で、交尾率、受胎率あるいは妊娠期間に薬物投与の影響は認められなかった。両薬物投与群の F2a 産児に死亡率の上昇及び体重増加抑制が観察された。以上のように、低用量である 0.4 mg/kg/day で産児毒性が発現し、次世代に対する無毒性量を求めることができなかったことから、より低用量 (0.05、0.1、0.2 及び 0.4 mg/kg/day) でのラット多世代繁殖試験を追加実施した。その結果、0.4 mg/kg/day 群で F1b 産児での離乳後の体重増加抑制が観察されたが、産児死亡あるいは離乳前の体重低下はみられなかった。したがって、0.4 mg/kg/day の用量は産児毒性発現の閾値であると判断した。無毒性量は 0.2 mg/kg/day であった。

F1 産児毒性発現の投与臨界期について検討するため、イベルメクチンの 2.4 mg/kg/day を交配前及び妊娠期間を通して雌ラットに経口投与し、得られた新生児を対照群と薬物投与群間あるいは同群間で乳母交換した (交叉乳母交換試験)。その後、母動物に対する薬物投与を継続した結果、授乳期間中に薬物投与した母動物に哺育させた産児においてのみ、死亡率の上昇や体重増加抑制等が観察された。薬物投与群の新生児を対照群母動物に哺育させた場合、産児毒性は発現しなかった。したがって、ラット産児毒性は本薬の胎生期曝露に起因するものではなく、新生児期に乳汁を介して曝露された本薬の影響であると考えられた。また、母動物にイベルメクチンを経口投与してラット産児の血液及び脳内薬物濃度を測定した結果、生後 1 週までに母動物の血中濃度の 2~3 倍の濃度の薬物が産児血液中に検出され、同時期に産児脳内の薬物濃度も増加した。ラット新生児の血液-脳関門は形態学的に未完成であり、離乳期になって初めて完成する。従って、イベルメクチンのラット繁殖試験で観察された産児毒性は、ラット新生児の血液-脳関門の未熟性に関連するものと考えられた。なお、授乳中の婦人への投薬成績から、乳汁を介したヒト新生児摂取量は最大でも 4 µg/kg であると推察できる。このヒト新生児曝露量の約 10 倍及び 25 倍に相当する 0.04 及び 0.1 mg/kg/day を新生児期のアカゲザルに 2 週間経口投与した結果、本薬投与に起因する毒性は認められていない。

遺伝毒性

遺伝毒性試験は 年 から 年に で、FDA のガイドラインに準拠して実施された。

微生物及びマウスリンパ腫由来細胞株 L5178Y を用いた遺伝子突然変異試験、ヒト胎児由来線維芽細胞株 IMR-90 を用いた不定期 DNA 合成試験を実施した結果、いずれの試験も陰性であり、本薬の遺伝毒性は認められなかった。

がん原性

イベルメクチンは化学的にがん原性が疑われる構造を示しておらず、毒性試験でがん原性を疑わせる変化がなかったこと、また投与回数としては 2 回もしくは最大でも 1 年に数回の投与のみと投与期間が短いことから、がん原性試験は実施しなかった。

その他の毒性

分解物の毒性

(1) 長期保存製剤を用いた毒性試験

3年間保存劣化製剤のラット及びアカゲザルを用いた15日間経口投与毒性試験は、
年に
で、FDAのガイドラインに準拠して実施された。

イベルメクチンの6mg錠を3年間室温に保存した場合に酸化分解物を中心として5%ないし10%の分解物の生成が認められる。この長期保存製剤中に含まれる分解物の安全性検討のために、約10%の分解物を含む3年間保存劣化製剤、6mg製剤を粉末化し、0.5%

水溶液に懸濁し、イベルメクチンとして0.5mg/kg/dayに相当する量を15日間強制経口投与した。その結果、ラット及びアカゲザルの試験においても雌雄ともに各検査項目に投与に関連する変化は認められなかった。

(2) 酸化体Aの毒性

酸化体Aのラットを用いた単回経口投与毒性試験は、
年に日本のガイドライン
に準拠して実施した。

酸化体Aは長期保存した市販包装製剤で認められる分解物である。この酸化体Aの安全性検討のため、
酸化体Aを0.5%
水溶液に懸濁し、46µg/kgの投与量をラットに単回経口投与した。その結果、投与に関連する所見は認められなかった。

(3) 劣化製剤の毒性

酸化体A、酸化体Aケト体と酸化体A異性体の混合物及び酸化体Aラクトン環開環体を含むイベルメクチンの3mg劣化製剤のラットを用いた単回経口投与毒性試験は、
年に日本のガイドラインに準拠して実施した。

上記分解物は治験包装品に認められた分解物である。これらの分解物の安全性検討のため、包装薬
カ月の治験薬包装品の劣化製剤を粉末化し、0.5%
水溶液に懸濁し、イベルメクチンとして1mg/kgに相当する量をラットに単回経口投与した。酸化体A、酸化体Aケト体と酸化体A異性体の混合物及び酸化体Aラクトン環開環体としての投与量はそれぞれ6.0、7.6及び10.7µg/kgであった。その結果、ラットの雌雄ともに投与に関連する所見は認められなかった。

依存性

マウスを用いた一般薬理試験において、150、30及び6mg/kgの腹腔内投与で動物に運動失調、振戦及び懸垂能の低下がみられたが、これらの投与用量は投与24時間後のLD₅₀値近辺又は、それを大きく超えた致死毒性用量であり、ラットでは1.6mg/kg/dayの用量で14週間経口投与しても特に臨床症状は認められていない。また、本薬は投与回数2回もしくは最大でも1年に数回の経口投与であることから、依存性を誘発する危険性は極めて少ないと判断し、依存性試験は実施しなかった。

抗原性

イベルメクチンは、イベルメクチン B_{1a} 及びイベルメクチン B_{1b} の混合物であるが、その分子量は、それぞれ 875.10 及び 861.07 といずれも単独で抗原となるには低分子化合物であること、並びに投与経路は経口投与であることから、イベルメクチンが抗原となりえる要素は極めて低いと考えられた。更に標準的な臨床用法は 0.2 mg/kg の経口投与が 2 週間隔で合計 2 回であることから、ヒトにおける臨床使用においてアレルギー症状を生じる可能性は極めて低いと考えられることから、抗原性試験は実施しなかった。

1 . 単回投与毒性…………… 添付資料二 - 参1 ~ 参3

イベルメクチン (イベルメクチン B_{1a} とイベルメクチン B_{1b} が約 80% : 20% の割合) の単回経口投与による急性毒性をマウス、ラット及びイヌを用いて検討した。

マウスの LD₅₀ 値は雄では 11.6 mg/kg、雌では 40.0 mg/kg と、LD₅₀ 値は雌の値が雄に比べて低かった。一般状態に関しては、マウスでは 5.0 mg/kg 以上の雌雄で投与後 30 分ないし 90 分から活動性減少、呼吸緩徐、振せん、正向反射の消失がみられた。これらの症状は 4 日目までにほとんどの動物で回復した。また、イベルメクチン B_{1a} 及びイベルメクチン B_{1b} の単剤での単回投与と急性毒性を雌マウスでそれぞれ 2 回検討した。その結果、イベルメクチン B_{1a} の LD₅₀ 値は 31.7 mg/kg 及び 87.2 mg/kg で、イベルメクチン B_{1b} の LD₅₀ 値は 27.6 mg/kg 及び 56.6 mg/kg であり、両化合物の割合が約 80% : 20% のイベルメクチンの LD₅₀ 値と同様であった。一般状態についても、イベルメクチンを経口投与したマウスと同様であった。

イベルメクチン B_{1a} とイベルメクチン B_{1b} が約 84% : 16% の割合の単回経口投与急性毒性を雌マウスで検討した。その結果、LD₅₀ 値は 41.6 mg/kg で、両化合物の割合が約 80% : 20% のイベルメクチンの LD₅₀ 値と同様であり、みられた症状についても同様であった。

ラットの LD₅₀ 値は Camm Sprague-Dawley 系を用いた 1 回目の試験では雌雄ともに 52.8 mg/kg であり、Sprague-Dawley (CRCD) 系を用いた 2 回目の試験では雄が 42.8 mg/kg、雌が 44.3 mg/kg であり、LD₅₀ 値に雌雄差はなかった。一般状態では、マウスとほぼ同様な症状が投与後 2 ないし 4 時間から 40 mg/kg もしくは 35 mg/kg 以上でみられた。生後 24 から 48 時間目の新生児ラットを用いて行った単回経口投与試験では、LD₅₀ 値は 2.3 mg/kg であった。この LD₅₀ 値の成熟動物との差は、ラット新生児における血液-脳関門の未熟性に関連するものと考えられる。

イヌでは最高 80 mg/kg まで投与した。40 mg 及び 80 mg/kg でそれぞれ 4 匹中 1 及び 2 匹の死亡が認められた。一般状態では、投与後 4.5 時間から散瞳、瞳孔反射の消失、流涎、嘔吐、振せん、鎮静がみられた。これらの症状は投与第 2 週には回復した。

イベルメクチンの単回腹腔内投与による急性毒性試験をマウス及びラットを用いて行った。マウスでは LD₅₀ 値は雄で 29.9 mg/kg、雌で 33.3 mg/kg、ラットでは雄で 59.2 mg/kg、雌で 47.4 mg/kg であった。LD₅₀ 値は経口投与による急性毒性の結果と同様、マウスで軽度に低い値を示したが、性差についてはマウス及びラットともに統計学的有意差はなかった。一般状態は、イベルメクチンを経口投与したマウス又はラットと同様であった。

表二 - 2 マウスにおける単回経口投与毒性試験成績*

動物種、系統 週齢、体重	投与量 (mg/kg)	各群の 動物数	LD ₅₀ : mg/kg (95%信頼限界)	特記すべき所見
マウス, Carworth CF ₁ , 7週齢 : 19~24 g	5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0	雌雄とも に各 10 匹	: 11.6 (4.7~29.0) : 40.0 (22.7~70.5)	<u>一般症状</u> : 雌雄ともすべての用量で投与後 30 ~ 90 分から活動性減少、呼吸緩徐、 振せん、正向反射の消失、2 日目に 10 mg/kg 以上の群で前述所見に加え 運動失調、眼瞼下垂、4 日目までにほ とんどの生存動物が回復 <u>死 亡</u> : 雌雄で投与後各 49 分及び 52 分から 4 日目まで
マウス, Carworth CF ₁ , 7週齢 : 19~24 g	5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0	雌各 10 匹	: 24.6 (15.0~40.4)	<u>一般症状</u> : すべての用量で投与後 30~90 分から 活動性減少、呼吸緩徐、振せん、正 向反射の消失、2 日目に 10 mg/kg 以 上の群で前述所見に加え運動失調、 眼瞼下垂、4 日目までにほとんどの生 存動物が回復 <u>死 亡</u> : 投与後 50 分から 2 日目まで
マウス, Carworth CF ₁ , 7週齢 : 19~24 g	5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0	雌各 20 匹	: 27.1 (18.6~39.4)	<u>一般症状</u> : すべての用量で投与後 30~90 分から 活動性減少、呼吸緩徐、振せん、正 向反射の消失、2 日目に 10 mg/kg 以 上の群で前述所見に加え運動失調、 眼瞼下垂、4 日目までにほとんどの生 存動物が回復 <u>死 亡</u> : 投与後 33 分から 4 日目まで

* : イベルメクチンはイベルメクチン B_{1a} が 80% 及びイベルメクチン B_{1b} が 20% の割合。
イベルメクチン投与群の溶媒はいずれも で、薬物濃度は 0.8% として投与。

表二 - 3 イベルメクチン B_{1a} のマウスにおける単回経口投与毒性試験成績

動物種、系統 週齢、体重	投与量 (mg/kg)	各群の 動物数	LD ₅₀ : mg/kg (95%信頼限界)	特記すべき所見
マウス, Carworth CF ₁ , 7週齢 : 19~24 g	2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0	雌各 10 匹	: 87.2 (38.4~198.0)	<u>一般症状</u> : 5.0 mg/kg 以上で投与後 30~90 分 から運動失調、振せん、呼吸緩徐、活 動性減少及び正向反射の喪失、4 日目 までにほとんどの生存動物が回復 <u>死 亡</u> : 投与後 76 分から 5 日目まで
マウス, Carworth CF ₁ , 7週齢 : 19~24 g	5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0	雌各 20 匹	: 31.7 (21.5~46.8)	<u>一般症状</u> : 5.0 mg/kg 以上で投与後 30~90 分 から運動失調、振せん、呼吸緩徐、活 動性減少及び正向反射の喪失、4 日目 までにほとんどの生存動物が回復 <u>死 亡</u> : 投与後 45 分から 7 日目まで

イベルメクチン B_{1a} 投与群の溶媒はいずれも で、薬物濃度は 0.8% として投与。

表二 - 4 イベルメクチン B_{1b} のマウスにおける単回経口投与毒性試験成績

動物種、系統 週齢、体重	投与量 (mg/kg)	各群の 動物数	LD ₅₀ : mg/kg (95%信頼限界)	特記すべき所見
マウス, Carworth CF ₁ 7 週齢 : 19 ~ 24 g	5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0	雌各 10 匹	: 56.6 (36.7 ~ 87.2)	<u>一般症状</u> : すべての用量で投与後 90 分以内から 運動失調、振せん、呼吸緩徐及び正 向反射の喪失、3 日目までにほとん どの生存動物が回復 <u>死 亡</u> : 投与後 90 分から 6 日目まで
マウス, Carworth CF ₁ 7 週齢 : 19 ~ 24 g	5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0	雌各 20 匹	: 27.6 (17.8 ~ 42.8)	<u>一般症状</u> : すべての用量で投与後 90 分以内から 運動失調、振せん、呼吸緩徐及び正 向反射の喪失、3 日目までにほとん どの生存動物が回復 <u>死 亡</u> : 投与後 26 分から 4 日目まで

イベルメクチン B_{1b} 投与群の溶媒はいずれも で、薬物濃度は 0.8% として投与。

表二 - 5 イベルメクチン (イベルメクチン B_{1a} が 84% 及びイベルメクチン B_{1b} が 16% の割合) の
マウスにおける単回経口投与毒性試験成績

動物種、系統 週齢、体重	投与量 (mg/kg)	各群の 動物数	LD ₅₀ : mg/kg (95%信頼限界)	特記すべき所見
マウス, Carworth CF ₁ 7 週齢 : 19 ~ 24 g	5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0	雌各 20 匹	: 41.6 (28.1 ~ 61.5)	<u>一般症状</u> : すべての用量で投与後 90 分以内から 振せん、呼吸緩徐、正向反射の消失、 2 日目に 20 mg/kg 以上の群で運動失 調及び 40 mg/kg 以上で振せん、呼吸 緩徐、80 mg/kg で正向反射の消失、3 ~ 4 日目までにほとんどの生存動物 が回復 <u>死 亡</u> : 雄で投与後 35 分から 6 日目まで

イベルメクチン投与群の溶媒はいずれも で、薬物濃度は 0.8% として投与。

表二 - 6 ラットにおける単回経口投与毒性試験成績*

動物種、系統 週齢、体重	投与量 (mg/kg)	各群の 動物数	LD ₅₀ : mg/kg (95%信頼限界)	特記すべき所見
ラット, Camm- Sprague-Dawley 7~9週齢 : 150~175 g	2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0	雌雄とも に各 10 匹	: 52.8 (39.2~71.0) : 52.8 (39.2~71.0)	一般症状: 雌雄ともに 80 mg/kg で投与後 2~ 4 時間から運動失調、40 mg/kg 以 上で投与後 24 時間以内から活動 性減少、運動失調、呼吸緩徐、流 涎 死 亡: 投与日夜間から 2 日目まで
ラット, Sprague- Dawley(CRCD) 7 週齢 : 125~175 g	25.0, 35.0, 49.0, 68.6, 96.0	雌雄とも に各 10 匹	: 42.8 (37.2~49.2) : 44.3 (36.5~53.7)	一般症状: 雌雄ともに 49 mg/kg 以上の用量で 投与後 2~4 時間から運動失調、35 mg/kg 以上で投与後 24 時間以内か ら活動性減少、運動失調、呼吸緩 徐、流涎 死 亡: 投与日夜間から 2 日目まで
ラット, Sprague- Dawley(CRCD) 24~48 時間齢 (新生児) : 7.3~9.4 g	0(対照群 I, 対照群 II) ¹⁾ , 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0	雌雄合わ せて各 10 匹	2.3(1.6~3.4)	一般症状: 両対照群を含め特記すべき所見 なし 死 亡: 投与後約 2 時間から 6 日目まで

* : イベルメクチンはイベルメクチン B_{1a} が 80%及びイベルメクチン B_{1b} が 20%の割合。

イベルメクチン投与群の溶媒はいずれも で、薬物濃度は 0.8%として投与。

1) : 対照群 I には を投与、対照群 II には を投与。

表二 - 7 イヌにおける単回経口投与毒性試験成績*

動物種、系統 週齢、体重	投与量 (mg/kg)	各群の 動物数	致死量	特記すべき所見
イヌ, Beagle 10~14 カ月齢 : 8.2~ 15.2 kg	0(対照群) ¹⁾ , 2.5, 5.0, 10.0	雌雄とも に各 2 匹	:10.0 mg/kg 以上	一般症状: 雌雄ともにすべての用量で投与後 4.5 時間から散瞳、瞳孔反射の消 失、5.0 mg/kg 以上で投与後 75 分から流涎、嘔吐、6 時間から振 せん、10.0 mg/kg で鎮静、投与第 2 週目には回復 死 亡: なし
イヌ, Beagle 6~9 カ月齢 : 6.3~ 10.1 kg	0(対照群) ¹⁾ , 10, 20, 40, 80	雌雄とも に各 2 匹	:40 mg/kg 以上	一般症状: 雌雄ともにすべての用量で投与後 55 分~4 時間 45 分から散瞳、流 涎、運動失調、振せん又は嘔吐、 投与第 2 週目には回復 死 亡: 80 及び 40 mg/kg の 2 及び 1 匹が 死亡

* : イベルメクチンはイベルメクチン B_{1a} が 80%及びイベルメクチン B_{1b} が 20%の割合。

1) : 対照群には を投与。

表二 - 8 マウス及びラットにおける単回腹腔内投与毒性試験成績*

動物種、系統 週齢、体重	投与量 (mg/kg)	各群の 動物数	LD ₅₀ : mg/kg (95%信頼限界)	特記すべき所見
マウス, CF ₁ 5~7 週齢 : 21~26 g	0(対照群) ¹⁾ , 20, 30, 45, 67.5, 101.2	雌雄各 10 匹	: 29.9 (20.5~38.4) : 33.3 (25.3~41.7)	一般症状: 雌雄ともにすべての用量で投与後 1 時間以内から運動失調、呼吸緩 徐、振せん、2 日目に正向反射の 消失 死 亡: 雄で投与後 88 分から 4 日目まで、 雌で投与後 75 分から 6 日目まで
ラット, Sprague- Dawley CRCD 6~8 週齢 : 140~210 g	0(対照群) ¹⁾ , 20, 30, 45, 67.5, 101.2	雌雄各 10 匹	: 59.2 (42.0~104.3) : 47.4 (38.6~57.9)	一般症状: 雌雄ともに高用量で投与後 4 時間 から運動失調、2 日目にすべての 用量で眼瞼下垂、活動性減少、45 mg/kg 以上で数例の正向反射の消 失を伴った瀕死状態、3 日目に 30 mg/kg 以上で運動失調、活動性減 少 死 亡: 雌雄とも投与日夜間から 2 日目ま で

* : イベルメクチンはイベルメクチン B_{1a} が 80% 及びイベルメクチン B_{1b} が 20% の割合。

イベルメクチン投与群の溶媒はいずれも で、薬物濃度は 0.8% として投与。

1) : 対照群には を投与。

2 . 反復投与毒性……………添付資料二 - 参4 ~ 参6

14 週間反復投与毒性試験は 年に で、また 16 日間経口投与毒性試験は 年に で、FDA のガイドラインに準拠して実施された。ラット及びイヌを用いた 14 週間経口投与毒性試験並びにサルを用いた 16 日間経口投与毒性試験を実施した。

(1) ラットにおける14週間経口投与毒性試験 ……………添付資料二 - 参4、参5

先に実施した新生児ラットを用いた単回経口投与試験で、1.0 mg/kg の用量で 1 例の死亡が認められ、LD₅₀ 値は 2.3 mg/kg であった (添付資料二 - 参 1)。一方、経口投与繁殖試験での高用量である 1.6 mg/kg/day を約 8 週間投与した母動物には薬物投与に基づいた変化は認められなかったが、投与期間が 5 週間から 6 週間延長されることを考慮し、高投与量を 1.6 mg/kg/day とし、中間用量及び低用量を 0.8 及び 0.4 mg/kg/day とした。この用量は繁殖試験で用いた投与量と同じ用量であった (添付資料二 - 参 5)。動物は経口投与繁殖試験の F1 産児を用いて、親の雌動物に投与した用量と同じ用量群に配分した。

雌雄ともに各用量群で、一般状態、体重、血液学的検査、血清生化学的検査、尿検査、眼科学的検査及び剖検において投与に関連する変化は認められなかった。

1.6 及び 0.8 mg/kg/day 群のそれぞれ雄 2 例と雌 1 例及び雄 1 例に脾臓重量の増加が認められた。群平均値では対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。これらの動物の病理組織学的検査で脾臓に赤脾髄のうっ血と髄外造血、骨髄に代償性過形成、腎臓の尿細管上皮うちに鉄反応陽性の色素の沈着や肝臓クッパー細胞の色素沈着が認められた。これらの所見は血管内溶血を示唆するものであると考えられた。その他に薬物投与に関連すると考えられる変化はなかった。

以上の結果より、無毒性量は脾臓重量増加及び組織学的所見を指標として、雄では 0.4 mg/kg/day、雌では 0.8 mg/kg/day であると考えた。

表二 - 9 ラットにおける 14 週間経口投与毒性試験成績 ()

動物種、系統、週齢、 性、体重	ラット、Cri : CD(SD)BR、3~4 週齢 : 49~86 g, : 43~77 g				
投与経路	強制経口投与				
投与量、mg/kg/day	対照 I	対照 II	0.4	0.8	1.6
総投与回数	93~94 回、94~95 回				
動物数	20、20	20、20	20、20	20、20	20、20
死亡数	1 ¹⁾	1 ²⁾	2 ¹⁾¹⁾	2 ¹⁾³⁾ 、2 ¹⁾¹⁾	0
一般状態	-	-	-	-	-
体重増加量 ⁴⁾	-	-	-	-	-
血液学的検査 (4,8,13 週)	-	-	-	-	-
血液生化学的検査 (4,8,13 週)	-	-	-	-	-
眼科学的検査 (4,8,13 週)	-	-	検査せず	検査せず	-
剖検	-	-	-	-	-
臓器重量 脾臓 (Ab.W., %B.W., %BR.W.)	-	-	-	増加* (1 例)	増加* (2 例 1 例)
病理組織学的検査 ⁵⁾ 脾臓： 赤脾髄のうっ血 髄外造血 骨髄： 代償性過形成 肝臓： Kupffer 細胞の色素沈着 腎臓： 尿細管上皮内色素沈着 (鉄陽性)	- - - - - - -	- - - - - - -	- - - - 検査せず -	1 例(++) 1 例(++) 1 例(+) - 1 例(+)	2 例(++) 1 例(±) 2 例(+) 1 例(±) 2 例(各+, ±) 1 例(±) 1 例(±) 2 例(+)
無毒性量	: 0.4 mg/kg/day、 : 0.8 mg/kg/day (脾臓の重量・組織学的変化)				

イベルメクチン投与群の溶媒はいずれも。

- : 特記すべき所見なし。

* : 有意差なし (P>0.05、最小有意差限界法)

病理組織学的検査の判定グレード (± : 極く軽度、+ : 軽度、++ : 中等度)

1) : 麻酔事故による死亡。

2) : 1 例は誤ってイベルメクチンの 1.6 mg/kg 溶液を投与第 7 週に一回投与してしまったために殺処分。

3) : 投与第 1 週に死亡 (死因不明)。

4) : 投与開始前から投与第 14 週までの体重増加量。

5) : 対照 I と高用量群については全組織、その他の 3 群については高用量で変化のみられた臓器・組織並びに全群の肉眼的変化については検査を実施。

(2) イヌにおける14週間経口投与毒性試験 …………… 添付資料二 - 参6

先に実施した単回経口投与毒性試験（添付資料二 - 参2、参3）において、2.5 mg/kgの用量で散瞳、瞳孔反射の消失が認められた。このことより、本試験でのイベルメクチンの用量を、0.5、1.0及び2.0 mg/kg/dayとし、約8ヵ月齢のイヌを用いて14週間経口投与毒性試験を実施した。

2.0 mg/kg/day群の雄3例、雌1例が流涎、振せん、運動失調、横臥、餌の摂取量減少から無摂取、脱水症を呈したため殺処分した。これらの動物では餌の摂取量減少に伴う体重低下が観察された。

2.0及び1.0 mg/kg/day群で散瞳及び体重増加量抑制が認められた。散瞳は2.0 mg/kg/day群では投与第11週、1.0 mg/kg/day群では投与第3週から頻度が減少した。

その他の各検査で投与に関連する変化は認められなかった。

以上の結果から、無毒性量は散瞳及び体重増加量の抑制を指標として0.5 mg/kg/dayと考えた。

表二 - 10 イヌにおける14週間経口投与毒性試験成績 ()

動物種、系統、週齢、性、体重	ビーグル犬、39～43週齢 ：8.2～12.1 kg、：6.2～9.2 kg,				
投与経路	強制経口投与				
投与量、mg/kg/day	対照	対照	0.5	1.0	2.0
総投与回数	95回, 94回				
動物数	4, 4	4, 4	4, 4	4, 4	4, 4
死亡数	0	0	0	0	3, 1 ¹⁾
一般状態	-	-	-	散瞳(時折)	全例に、流涎、散瞳、殺処分した3、1では振せん、運動失調、横臥、脱水症
摂餌量	-	-	-	-	摂取量減少から無摂取
体重増加量	-	-	-	抑制	抑制、殺処分した3、1は体重低下
心電図検査 (5,9,13週)	-	-	-	-	-
眼科学的検査 (3,7,12週)	-	-	-	-	-
血液学的検査 (4,8,12週)	-	-	-	-	-
血清生化学的検査 (4,8,12週)	-	-	-	-	-
尿検査(4,8,12週)	-	-	-	-	-
剖検/臓器重量	-	-	-	-	-
病理組織学的検査 ³⁾	-	-	-	-	.. ²⁾
無毒性量	雌雄とも0.5 mg/kg/day (散瞳及び体重増加量の抑制)				

イベルメクチン投与群の溶媒はいずれも で、薬物濃度は10 mg/mLとして投与。

- : 特記すべき所見なし。

1): 餌の無摂取、脱水症を発現したため、投与第4週から第12週にかけて殺処分した。

2): 殺処分動物についても、投与に関連する変化なし。

3): 全群全動物の全組織について実施。

(3) サルにおける16日間経口投与毒性試験 …………… 添付資料二 - 7
 約 13 から 21 ヲ月齡のアカゲザルを用いて 0.3、0.6 及び 1.2 mg/kg/day の用量で 16 日間経口投与毒性試験を実施した。なお、この試験では動物の解剖までの検査は
 で行われ、病理組織学的検査は で実施された。
 雌雄ともに各用量群で、各検査において投与に関連する変化は認められなかった。
 以上の結果より、無毒用量は雌雄ともに 1.2 mg/kg/day 以上であると考えた。

表二 - 11 アカゲザルにおける 16 日間経口投与毒性試験成績 ()

動物種、系統、週齡、性、体重	アカゲザル、 <i>Macaca mulatta</i> (Hazleton Research Animals)、約 13~21 ヲ月齡 : 2.1~3.2 kg, : 1.9~2.7 kg			
投与経路	強制経鼻胃内投与			
投与量、mg/kg/day	対照	0.3	0.6	1.2
総投与回数	14~15 回、 14~15 回			
動物数	4、 4	4、 4	4、 4	4、 4
死亡数	0	0	0	0
一般状態 ¹⁾	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-
体重 / 体重増加量	-	-	-	-
血液学的検査(2 週)	-	-	-	-
血液生化学的検査(2 週)	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-
臓器重量	-	-	-	-
病理組織学的検査 ²⁾	-	-	-	-
無毒用量	: > 1.2 mg/kg/day、 : > 1.2 mg/kg/day			

イベルメクチン投与群の溶媒はいずれも 。

- : 特記すべき所見なし。

- 1) : 投与第 2 日に対照群動物を含む全群で軟便の頻度が増加した。これは、総量約 3 mL 以上の (投与液中の 1 mL /kg とカテーテル内洗浄用の約 2 mL の) を投与したことによるものであった。
- 2) : 対照群と高用量群については全組織について実施、その他の 2 群については、肝臓、骨髓塗抹及び肉眼的変化は観察したが、その他の組織は高用量で投与に関連する変化がみられなかったため、検査せず。

3 . 生殖発生毒性……………添付資料二 - 参4、参5、参8～参13、14～16、参17、18

イベルメクチンの生殖発生毒性試験として、マウス、ラット及びウサギにおける催奇形性試験並びにラットを用いた多世代繁殖試験を実施した。なお、試験は において、FDAの当時のガイドラインに準拠して実施した。これらの試験は 年代 に実施されたが、現行の生殖発生毒性試験ガイドラインが要求する投与期間及び評価項目を含めたものである。また、ラットにおける多世代繁殖試験で産児毒性がみられたことから一連の追加試験を実施した。

(1) マウスにおける催奇形性試験 ……………添付資料二 - 参8～参11

先に実施したイベルメクチン B_{1a} 及びイベルメクチン B_{1b} の催奇形性試験において、それぞれ 0.4 mg/kg/day 及び 0.8 mg/kg/day 以上の用量で母動物の死亡がみられたことから、本試験におけるイベルメクチンの投与量を 0.1、0.2、0.4 及び 0.8 mg/kg/day とし、妊娠 6 日から 15 日まで経口投与した。

0.2、0.4 及び 0.8 mg/kg/day 群において、それぞれ 1 匹、3 匹及び 3 匹の母動物が初回投与から 8 回投与後までに死亡した（一般状態不良のための中途屠殺を含む）。これら死亡・中途屠殺動物のほとんどに振せん、昏睡状態あるいは間代性痙攣が観察された。0.1 mg/kg/day 群の母動物あるいは高用量群の生存動物においては、毒性症状は認められなかった。母動物の体重増加に薬物投与の影響は認められなかった。生存及び死亡胎児数あるいは生存胎児体重に関し、薬物投与の影響は認められなかった。0.4 及び 0.8 mg/kg/day 群において、それぞれ 4 匹及び 3 匹の生存胎児に口蓋裂が観察された。他の薬物投与に関連した外形異常、内臓異常あるいは骨格異常は認められなかった。

これらの結果より、母動物の一般毒性に対する無毒性量は 0.1 mg/kg/day、母動物の生殖毒性に対する無毒性量は高用量でも変化がみられなかったことから 0.8 mg/kg/day 以上であると判断した。また、次世代の発生に対する無毒性量は 0.2 mg/kg/day であると判断した。

表二 - 12 マウスにおける催奇形性試験成績 ()

動物種、系統、週齢、体重		マウス、CF1、約 13 週齢、25.0 ~ 33.0 g					
投与経路 (投与方法)		強制経口投与 (妊娠 6 日から 15 日まで投与)					
投与量 (mg/kg/day)		対照	0.1	0.2	0.4	0.8	
母動物	動物数 (妊娠動物数)	25 (22)	25 (21)	25 (25)	24 (23)	25 (21)	
	死亡数	死亡	0	0	0	1	0
		中途屠殺	0	0	1	2	3
		流産	0	0	0	1	0
	一般状態	-	-	振せん、昏睡状態、間代性痙攣 (死亡・中途屠殺動物のみ)			
	体重	-	-	-	-	-	
着床数 / 腹	14.2	14.0	13.1	13.9	14.6		
胎児	着床後死亡率 (%)	6	7	7	10*	7	
	生存胎児数 / 腹	13.3	12.6	11.7*	12.2	13.4	
	死亡胎児数	1	1	2	1	0	
	性比 (/)	158/135	138/128	145/137	132/113	128/126	
	体重 (g)	0.91	0.91	0.90	0.88	0.90	
	外形異常	頻度	1/292	0/265	0/280	5/244	7/254
		型 (例数)	口蓋裂 (1)	-	-	口蓋裂 (4) ¹⁾ 合指症 (1) 多指症 (1)	口蓋裂 (3) 外脳症 (4) ²⁾ 眼瞼開存 (1)
	内臓異常	頻度	0/92	0/83	0/84	0/76	0/81
		型 (例数)	-	-	-	-	-
	骨格異常	頻度	7/292	2/265	3/280	5/244	9/254
		型 (例数)	頸椎奇形 (1) 胸骨奇形 (6)	胸椎奇形 (1) 腰椎奇形 (1) 肋間肋骨 (1) 肋骨癒合 (1) 胸骨奇形 (1)	環椎奇形 (1) 胸骨奇形 (2)	環椎奇形 (1) 軸椎奇形 (1) 過剰頸椎 (1) 胸椎奇形 (1) 肋骨癒合 (1) 胸骨奇形 (3)	頸椎奇形 (1) 胸椎奇形 (2) 肋骨癒合 (1) 肋骨欠損 (1) 胸骨奇形 (7)
無毒性量	母動物	一般毒性	0.1 mg/kg/day				
		生殖毒性	> 0.8 mg/kg/day				
	胎児	0.2 mg/kg/day					

- : 特記すべき所見なし。 * : 有意差あり (P = 0.05、最小有意差限界法)

1) : 死亡胎児 1 匹にも口蓋裂が発現。

(2) ラットにおける催奇形性試験 …………… 添付資料二 - 参12

先に実施した用量設定試験において、イベルメクチンの2、4、8及び16 mg/kg/day を妊娠ラットに経口投与した結果、16 mg/kg/day 群において母動物の死亡及び体重増加抑制が認められ、8 mg/kg/day 群の母動物1匹にも鎮静が認められた。従って、本試験におけるイベルメクチンの投与量を2.5、5.0及び10.0 mg/kg/day とし、妊娠6日から17日まで経口投与した。

10.0 mg/kg/day 群において、一般状態不良を呈した3匹の母動物を妊娠13日あるいは14日に中途屠殺した。同群の生存動物においても、鎮静と限局性の脱毛が散見された。2.5及び5.0 mg/kg/day 群では、毒性症状はみられなかった。母動物の体重増加に薬物投与の影響は認められなかった。

生存及び死亡胎児数あるいは生存胎児体重に関し、薬物投与の影響は認められなかった。胎児外形観察の結果、10.0 mg/kg/day 群の4匹の胎児に口蓋裂が観察された。薬物投与に関連した内臓異常あるいは骨格異常は認められなかった。

これらの結果より、母動物の一般毒性及び次世代の発生に対する無毒性量は、ともに5.0 mg/kg/day であると判断した。また、母動物の生殖毒性に関しては、高用量でも変化がみられなかったことから、10.0 mg/kg/day 以上であると判断した。

表二 - 13 ラットにおける催奇形性試験成績 ()

動物種、系統、週齢、体重			ラット、CRCD、約10~14週齢、203~310 g			
投与経路(投与方法)			強制経口投与(妊娠6日から17日まで投与)			
投与量(mg/kg/day)			対照	2.5	5.0	10.0
母動物	動物数(妊娠動物数)		25(25)	25(25)	25(21)	25(23)
	死亡数	死亡	0	0	0	0
		中途屠殺	0	0	0	3
	一般状態		-	-	-	鎮静 限局性の脱毛
	体重		-	-	-	-
着床数/腹		13.6	13.4	13.4	13.8	
胎児	着床前死亡率(%)		2.93	2.70	3.06	3.58
	着床後死亡率(%)		3	4	2	4
	生存胎児数/腹		13.3	12.8	13.1	13.2
	死亡胎児数		0	0	0	0
	性比(/)		147/185	163/158	133/142	129/135
	体重(g)		3.72	3.73	3.66	3.62
	外形異常	頻度	0/332	0/321	0/275	4/264
		型(例数)	-	-	-	口蓋裂(4)
	内臓異常	頻度	0/104	1/99	1/84	0/86
		型(例数)	-	内臓逆位(1)	心室中隔欠損(1)	-
骨格異常	頻度	2/332	0/321	2/275	3/264	
	型(例数)	頸椎奇形(1) 波状肋骨(1)	-	肋骨形成不全(1) 波状肋骨(1)	波状肋骨(3)	
無毒性量	母動物	一般毒性	5.0 mg/kg/day			
		生殖毒性	> 10.0 mg/kg/day			
	胎児	5.0 mg/kg/day				

- : 特記すべき所見なし。

(3) ウサギにおける催奇形性試験 …………… 添付資料二 - 参13

先に実施した用量設定試験において、イベルメクチンの 1.5、3.0、6.0 及び 12.0 mg/kg/day を妊娠ウサギに経口投与した結果、12.0 mg/kg/day 群のすべての母動物が一般状態の悪化を呈したため、同群の母動物を妊娠 11 日に中途屠殺した。6.0 mg/kg/day 群においても、一過性の鎮静及び体重減少が認められた。従って、本試験におけるイベルメクチンの投与量を 1.5、3.0 及び 6.0 mg/kg/day とし、妊娠 6 日から 18 日まで経口投与した。

6.0 mg/kg/day 群において、7 回投与後から鎮静が観察され、母動物 6 匹が流産した。同群では、母動物平均体重が投与期間中に有意に減少した。1.5 及び 3.0 mg/kg/day 群においては、毒性症状あるいは体重増加に及ぼす薬物投与の影響は認められなかった。

妊娠末期剖検時、6.0 mg/kg/day 群における死亡胎児数が有意に増加し、3.0 及び 6.0 mg/kg/day 群での生存胎児の平均体重も軽度ではあるが有意に低下した。胎児外形観察の結果、3.0 及び 6.0 mg/kg/day 群において口蓋裂と前肢屈曲の出現頻度が増加した。他の薬物投与に関連した外形異常、内臓異常あるいは骨格異常は観察されず、1.5 mg/kg/day 群ではいずれの胎児毒性も認められなかった。

これらの結果より、母動物の一般毒性に対する無毒性量は鎮静及び体重減少を指標とし 3.0 mg/kg/day、母動物の生殖毒性に対する無毒性量は流産を指標として同じく 3.0 mg/kg/day、次世代の発生に対する無毒性量は 3.0 mg/kg/day でも胎児体重の減少及び外形異常が観察されたことから 1.5 mg/kg/day であると判断した。

表二 - 14 ウサギにおける催奇形性試験成績 ()

動物種、系統、週齢、体重		ウサギ、New Zealand、約 6~8 ヲ月齡、3.9~5.0 kg				
投与経路(投与方法)		強制経口投与 (妊娠 6 日から 18 日まで投与)				
投与量(mg/kg/day)		対照	1.5	3.0	6.0	
母動物	動物数(妊娠動物数)	16(14)	16(14)	16(16)	16(15)	
	死亡数	死亡	2 ¹⁾	0 ²⁾	0	
		流産	0	0	0	6
	一般状態	-	-	-	鎮静	
	体重増加量 (g: 妊娠 6 日-19 日)	191	185	38 ³⁾	-353*	
	着床数 / 腹	7.2	8.1	8.9	9.1	
胎児	着床前死亡率 (%)	30.71	18.35	9.98*	18.43	
	着床後死亡率 (%)	7	10	3	9	
	生存胎児数 / 腹	6.1	6.5	8.5*	5.6	
	死亡胎児数	1	1	0	18*	
	性比 (/)	39/35	31/55	62/74	24/44	
	体重(g)	40.5	38.7	34.3*	31.3*	
	外形異常	頻度	0/73	0/94	6/136	6/50
		型(例数)	-	-	口蓋裂(1) 前肢屈曲(5)	口蓋裂(1) ⁴⁾ 前肢屈曲(6)
	内臓異常	頻度	0/73	0/94	4/136	1/50
		型(例数)	-	-	鎖骨下動脈起始異常(1) 胆嚢欠損(1) 腎奇形(1) 尿管走行異常(1)	鎖骨下動脈起始異常 (1)
	骨格異常	頻度	0/73	2/94	2/136	1/50
型(例数)		-	胸骨癒合(1) 肋骨癒合(1) 胸椎奇形(1)	胸骨癒合(2)	肋骨低形成(1) 前肢骨格奇形(1) 後肢骨格奇形(1)	
無毒性量	母動物	一般毒性	3.0 mg/kg/day			
		生殖毒性	3.0 mg/kg/day			
	胎児	1.5 mg/kg/day				

- : 特記すべき所見なし。 * : 有意差あり (P = 0.05、最小有意差限界法)

1) : 1 匹は誤投与による死亡。他の 1 匹には胃潰瘍による出血が観察された。

2) : 妊娠 27 日に分娩したため、予定解剖前に屠殺した 1 例を除く。

3) : 個体差が大きく、有意差がなかったことから、薬物投与には関連しない偶発的变化と判断。

4) : 死亡胎児 7 匹にも口蓋裂が発現。

(4) ラットにおける多世代繁殖試験 …………… 添付資料二 - 参4、参5、14~16、参17、18

先に実施した、ラットにおける14週間経口投与毒性試験に用いる動物を供したラット繁殖試験において、イベルメクチンの0.4、0.8及び1.6 mg/kg/dayを交配2週間前から分娩後20日まで雌ラットに経口投与した。その結果、高用量である1.6 mg/kg/dayにおいても母動物に対する明らかな毒性は認められなかった。一方、F1産児において、1.6 mg/kg/day群での哺育期間中の死亡率が軽度ではあるが統計学的に有意に上昇した(添付資料二 - 参5)。これらの成績に基づき、本試験では、イベルメクチンの0.4、1.2及び3.6 mg/kg/dayをF0及びF1世代の雌雄ラットに経口投与した(添付資料二 - 14)。なお、後述のF1世代に対する産児毒性に関連して、3.6 mg/kg/day群のF0親動物については、F1世代第1産児(F1a産児)を離乳させた時点で屠殺し、その後の多世代試験から除外した。

F0親動物において、薬物投与に起因する死亡あるいは毒性症状は観察されなかった。1.2及び3.6 mg/kg/day群において、授乳期間中の母動物体重増加が有意に抑制された。各薬物投与群における交尾率あるいは受胎率に薬物投与の影響は認められなかった。3.6 mg/kg/day群における平均妊娠期間が有意に延長したが、生下時のF1a産児生存率に薬物投与の影響はなかった。哺育期間中、特に生後5日から10日にかけて、3.6 mg/kg/day群における産児死亡率が上昇した。また、同群での生下時及びその後の産児平均体重が有意に低下し、反対に、生後分化指標のひとつである切歯の萌出時期が早まった(表二 - 15)。

0.4及び1.2 mg/kg/day群のF0親動物を用いてF1世代第2産児(F1b産児)を得た結果、両薬物投与群におけるF1b産児死亡率の上昇、体重増加抑制及び聴覚性驚愕反射の発現時期の遅延が観察された。また、1.2 mg/kg/day群では、切歯の萌出時期が早まった。離乳後の産児において、死亡あるいは一般状態の変化はみられなかったが、両薬物投与群での平均体重がやや低値を示し、1.2 mg/kg/day群での膈開口及び精巣下降の時期が遅延した。

F1b産児の交配試験において、交尾率、受胎率あるいは妊娠期間に薬物投与の影響は認められなかった。両薬物投与群のF2産児においても死亡率の上昇及び体重増加抑制が観察された。また、1.2 mg/kg/day群では、正向反射及び聴覚性驚愕反射出現時期の遅延と切歯の萌出時期の早まりが認められた。

無毒性量に関しては、F0雄動物では一般毒性及び生殖毒性とも観察されなかったことから、無毒性量は高用量である3.6 mg/kg/day以上であると判断した。F0雌動物の一般毒性に対する無毒性量は授乳期間中の体重増加抑制を指標にして0.4 mg/kg/day、F0雌動物の生殖毒性に対する無毒性量は妊娠期間の延長を指標として1.2 mg/kg/dayであると判断した。次世代の発生に対する無毒性量は、低用量でも産児死亡率の上昇及び低体重などが観察されたことから0.4 mg/kg/day以下であると判断した。

表二 - 15 ラットにおける多世代繁殖試験成績 ()

動物種、系統、週齢、体重		ラット、CRCD、約 4 週齢 (離乳児)、雌 57~87 g/雄 72~136 g					
投与経路(投与方法)		強制経口投与(F0 動物及び F1 世代第 2 産児に離乳期から交配前 70 日間投与。その後も次世代の離乳期まで投与を継続)					
投与量(mg/kg/day)		対照 I	対照 II	0.4	1.2	3.6	
動物数	F0 雄	10	10	10	10	10	
	F0 雌	20	20	20	20	20	
F0 世代	死亡数 ¹⁾	1	1	1	1	0	
	一般状態	-	-	-	-	-	
	体重	-	-	-	-	-	
	体重増加量(g) ²⁾	35/34	32/38	28/35	42/23 [*]	23 [*] /x	
	交尾率(%) ²⁾	100/95	90/90	100/95	100/100	90/x	
	受胎率(%) ²⁾	85/79	89/100	90/100	95/85	83/x	
妊娠期間スコア ^{-2),3)}		1.9/1.8	1.9/1.8	2.4/2.2	2.2/2.5	3.2 [*] /x	
F1 世代第 1 産児	生存新生児数 / 腹	12.5	12.7	11.8	11.9	13.0	
	死亡産児数	生下時	11	6	4	25	10
		哺育期間中	5	7	12	7	99 [*]
	体重(g)	生下時	6.22	6.22	6.23	6.04	5.89 [*]
		離乳時	39.16	36.32	38.70	37.90	29.88 [*]
	切歯萌出日齢		12.1	11.8	11.8	11.7	11.0 [*]
F1 世代第 2 産児	生存新生児数 / 腹	13.1	12.9	12.3	12.2	x	
	死亡産児数	生下時	4	1	11 [*]	7	x
		哺育期間中	2	5	14 [*]	11 [*]	x
	体重(g)	生下時	6.16	6.16	5.79 [*]	6.70	x
		生後 7 日	11.70	11.70	10.34 [*]	10.57 [*]	x
		生後 14 日	25.15	25.07	22.46 [*]	23.04 [*]	x
		離乳時	39.86	41.33	36.79 [*]	37.91	x
	切歯萌出日齢		11.7	11.8	11.8	11.2 [*]	x
	聴覚性驚愕反射発現日齢		13.4	13.7	14.0 [*]	13.9 [*]	x
	膣開口 / 精巢下降日齢		37.2/32.8	36.0/34.1	37.8/33.8	41.8 [*] /36.4	x
交尾率(%)		85	100	100	100	x	
受胎率(%)		76	90	70	85	x	
妊娠期間スコア ⁻⁴⁾		2.7	2.7	2.1	3.1	x	
F2 世代	生存新生児数 / 腹	12.1	11.6	10.6	10.4	x	
	死亡産児数	生下時	3	7	3	0	x
		哺育期間中	3	3	23 [*]	35 [*]	x
	体重(g)	生下時	6.14	6.14	6.08	6.04	x
		離乳時	38.47	37.25	34.74	30.78 [*]	x
	正向反射発現日齢		4.8	5.1	5.3	5.8 [*]	x
切歯萌出日齢		12.0	12.0	11.7	11.5 [*]	x	
聴覚性驚愕反射発現日齢		13.8	14.3	14.4	14.5 [*]	x	
無毒性量	親動物 (雄)	一般毒性	3.6 mg/kg/day				
		生殖毒性	3.6 mg/kg/day				
	親動物 (雌)	一般毒性	0.4 mg/kg/day				
		生殖毒性	1.2 mg/kg/day				
次世代		< 0.4 mg/kg/day (追加試験の結果、0.2 mg/kg/day)					

- : 特記すべき所見なし。 * : 有意差あり (P = 0.05、最小有意差限界法あるいは Fisher の直接確率法)

x : 産児毒性が著しかったことから、F1 世代第 2 産児の観察を実施する前に試験を終了。

- 1) : すべて投与過誤による事故死 (一般状態不良による中途屠殺を含む)。
- 2) : F1 世代第 1 産児/F1 世代第 2 産児用成績。体重増加量は授乳期間中の体重増加量。
- 3) : 妊娠 22 日の午前 10 時から妊娠 25 日の同時刻までの期間を 8 時間ごとに区分し、1 から 9 までの連続番号を割り当てた。その間に分娩した母動物に該当する番号を与え、各群で平均した。
- 4) : 妊娠 21 日の午前 10 時から妊娠 24 日の同時刻までの期間を 8 時間ごとに区分し、1 から 9 までの連続番号を割り当てた。その間に分娩した母動物に該当する番号を与え、各群で平均した。

以上のように、低用量である 0.4 mg/kg/day においても産児毒性が発現したことから、次世代に対する無毒性量を求めることができなかった。追加試験として、低用量（0.05、0.1、0.2 及び 0.4 mg/kg/day）を用いたラット多世代繁殖試験を実施した結果、0.4 mg/kg/day 群において F1 世代第 2 産児での離乳後の体重増加抑制が観察されたが、薬物投与に関連した産児死亡数の増加あるいは離乳前の体重低下はみられなかった（表二 - 16）。従って、0.4 mg/kg/day の用量は産児毒性発現の閾値であると判断した。明らかな無毒性量は 0.2 mg/kg/day であった。

F1 産児毒性発現の投与臨界期について検討するため、イベルメクチンの 2.4 mg/kg/day を交配前及び妊娠期間を通して雌ラットに経口投与し、得られた新生児を対照群と薬物投与群間あるいは同群間で乳母交換した（添付資料二 - 15）。その後、母動物に対する薬物投与を授乳期間中も継続した結果、薬物投与母動物に哺育させた産児においてのみ、死亡率の上昇、体重増加抑制及び眼瞼開裂時期の遅延が観察された。薬物投与群の新生児を対照群母動物に哺育させた場合、産児毒性は発現しなかった（表二 - 17）。従って、ラット産児毒性は本薬の胎生期曝露に起因する変化ではなく、乳汁を介した新生児期での薬物曝露の影響であることが判明した。また、母動物にイベルメクチンを経口投与した後、ラット産児における血液及び脳内薬物濃度を測定した結果、生後 1 週までに母動物血中濃度の 2-3 倍の薬物が産児の血液中に検出され、同時期に産児脳内の薬物濃度も増加した（添付資料二 - 16）。ヒトでの血液 - 脳関門は胎生期に完成するが、ラット新生児における血液 - 脳関門は形態学的に未完成であり、離乳期になって初めて完成する（添付資料二 - 参 17 : Betz and Goldstein: J. Physiol., 312;365-376, 1981）。従って、イベルメクチンの繁殖試験で観察された産児毒性は、ラット新生児における血液-脳関門の未熟性に関連した影響であると考えられた。なお、授乳中の婦人への投薬成績から、乳汁を介したヒト新生児曝露量は最大でも 4 µg/kg であると推察できる。ちなみに、このヒト新生児曝露量の約 10 倍及び 25 倍に相当する 0.04 及び 0.1 mg/kg/day を新生児期のアカゲザルに 2 週間経口投与した結果（添付資料二 - 18）、本薬投与に起因する毒性は認められていない（表二 - 18）。

表二 - 16 ラットにおける多世代繁殖追加試験成績 ()

動物種、系統、週齢、体重		ラット、CRCD、約 4 週齢 (離乳児)、雌 68 ~ 100 g/雄 70 ~ 94 g					
投与経路 (投与方法)		強制経口投与 (F0 動物及び F1 世代第 2 産児に離乳期から交配前 71 日間投与。その後も次世代の離乳期まで投与を継続)					
投与量 (mg/kg/day)		対照	0.05	0.1	0.2	0.4	
動物数	F0 雄	10	10	10	10	10	
	F0 雌	20	20	20	20	20	
F0 世代	死亡数	0	0	1 ¹⁾	0	1 ¹⁾	
	一般状態	-	-	-	-	-	
	体重	-	-	-	-	-	
	交尾率 (%) ²⁾	85/90	80/90	100/90	100/90	80/90	
	受胎率 (%) ²⁾	100/100	81/83	85/94	95/94	94/67 ^{*1)}	
	妊娠期間スコア ^{-2),3)}	2.1/3.0	2.2/3.1	2.3/2.7	3.2/3.5	2.4/2.8	
F1 世代第 1 産児	生存新生児数 / 腹	14.1	13.1	12.8	12.6	13.1	
	死亡産児数	生下時	0	3	5	9 ¹⁾	6 ^{*1)}
		哺育期間中	6	2	1	9 [*]	3
	体重 (g)	生下時	6.61	6.52	6.66	6.54	6.60
		離乳時	47.28	46.58	47.57	48.88	48.40
	生後分化	-	-	-	-	-	
	F1 世代第 2 産児	生存新生児数 / 腹	14.0	14.2	14.6	14.5	15.4
死亡産児数		生下時	2	3	6	8	3
		哺育期間中	7	8	7	1	3
体重 (g)		生下時	6.44	6.66	6.66	6.73	6.56
		離乳時	45.90	45.19	47.45	47.69	47.81
離乳後体重増加 (g; 雌/雄)		225/601	224/646	216/620	213/599	207 [*] /622	
生後分化		-	-	-	-	-	
交尾率 (%) ²⁾		95/90	100/89	95/100	100/95	95/95	
受胎率 (%) ²⁾	84/94	90/94	84/95	100/95	89/100		
妊娠期間スコア ^{-2),3)}	2.8/3.0	2.8/3.2	3.1/2.3	2.5/3.1	3.6/3.7		
F2 世代第 1 産児	生存新生児数 / 腹	12.0	13.0	12.2	11.4	13.2	
	死亡産児数	生下時	2	7	11	21 [*]	8
		哺育期間中	7	9	4	9	15
	体重 (g)	生下時	6.39	6.40	6.39	6.22	6.42
		離乳時	41.55	39.76	44.00	41.07	42.26
	生後分化	-	-	-	-	-	
F2 世代第 2 産児	生存新生児数 / 腹	13.6	13.6	13.9	12.6	10.6	
	死亡産児数	生下時	7	12	5	23	27
		哺育期間中	2	11	5	11	10
	体重 (g)	生下時	6.35	6.58	6.32	6.19 [*]	6.38
		離乳時	45.96	44.87	46.91	47.28	43.00
	生後分化	-	-	-	-	-	
無毒性量	親世代	一般毒性	> 0.4 mg/kg/day				
		生殖毒性	> 0.4 mg/kg/day				
	次世代	0.2 mg/kg/day					

- : 特記すべき所見なし。 * : 有意差あり (P = 0.05、最小有意差限界法あるいは Fisher の直接確率法)

- 1) : より高用量を用いた先の多世代繁殖試験では認められなかったことから、投与に関連しない変化と判断。
- 2) : F1 世代第 1 産児/F1 世代第 2 産児用あるいは F2 世代第 1 産児/F2 世代第 2 産児用成績。
- 3) : 妊娠 21 日の午前 10 時から妊娠 24 日の同時刻までの期間を 8 時間ごとに区分し、1 から 9 までの連続番号を割り当てた。その間に分娩した母動物に該当する番号を与え、各群で平均した。

表二 - 17 ラットにおける交叉乳母交換試験成績 ()

動物種、系統、週齢、体重		ラット、CRCD、約 8 週齢、169 ~ 256 g				
投与経路(投与方法)		強制経口投与(無処置雄との交配 61 日前から分娩後 20 日まで投与)				
投与量 (mg/kg/day)	交配前・妊娠期間中	対照	2.4	対照	2.4	
	授乳期間中	対照	対照	2.4	2.4	
出生児	生存新生児数 / 腹	13.5	13.2	13.9	14.8	
	死亡産児数	生下時	1	1	0	0
		生後 8 日-14 日	2	0	34*	16*
	性比	99/104	75/85	81/86	83/95	
	体重(g)	生下時	6.48	6.33	6.21	6.17
		離乳時	45.03	43.09	39.61*	36.75*
	正向反射発現日齢	4.3	3.9	4.3	4.6	
眼瞼開裂日齢	15.7	16.0	16.0	17.0*		

- : 特記すべき所見なし。 * : 有意差あり (P = 0.05、最小有意差限界法)

表二 - 18 新生児アカゲザルにおける 15 日間経口投与毒性試験成績 ()

動物種、系統、週齢、体重		アカゲザル、 <i>Macaca mulatta</i> 、約 7 ~ 13 日齢、400 ~ 600 g		
投与経路		強制経鼻胃内投与		
投与量(mg/kg/day)	対照	0.04	0.1	
総投与回数	14 回、 14 回			
動物数	5、 3	5、 3	5、 3	
死亡数	0	0	0	
一般状態	-	-	-	
摂餌量	-	-	-	
体重	-	-	-	
血液学的検査	-	-	-	
血液生化学的検査	-	-	-	
眼科学的検査	-	-	-	
剖検	-	-	-	
臓器重量	-	-	-	
病理組織学的検査 ¹⁾	-	-	-	
無毒性量	> 0.1 mg/kg/day			

- : 特記すべき所見なし。

1) : 対照群と高用量群については全組織について実施、他の 1 群については肉眼的変化は観察したが、高用量群で投与に関連する変化がみられなかったため、検査せず。

で実施。

4 . 遺伝毒性 添付資料二 - 参19 ~ 参21

イベルメクチンの遺伝毒性の有無を確認するため、細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンパ腫由来細胞株 L5178Y を用いた遺伝子突然変異試験（マウスリンフォーマ TK 試験）及びヒト胎児由来線維芽細胞株 IMR-90 を用いた不定期 DNA 合成試験を実施した。結果は、いずれの試験においても陰性であり、本薬には変異原性がないと考えられた。

(1) 細菌を用いた復帰突然変異試験 添付資料二 - 参19

ネズミチフス菌（TA98、TA100、TA1535、TA1537）を用い、代謝活性化系を併用する場合及び併用しない場合についてプレート法により試験を実施した。その結果、いずれの菌株においても代謝活性化系の有無にかかわらず、最高濃度である 2,000 µg/プレートまで対照群に比べて復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

表二 - 19 細菌を用いた復帰突然変異試験成績（ ）

代謝活性化の有無	被験物質濃度 (µg/プレート)	復帰変異コロニー数 (コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型		フレームシフト型		
		TA100	TA1535	TA1537	TA98	
無	陰性対照 (DMSO)	169.1	7.1	4.2	17.5	
	イクベチルンメ	400	-	-	3.0	17.0
		500	181.0	6.7	-	-
		1,000	163.3	9.0	5.7	18.3
		2,000	172.7	6.7	3.0	21.3
有	陰性対照 (DMSO)	254.2	22.9	10.7	36.6	
	イクベチルンメ	400	-	-	10.0	39.7
		500	253.7	17.7	-	-
		1,000	237.0	26.3	11.3	31.3
		2,000	259.3	23.7	6.0	36.7
	陽性対照 (2-AA ¹⁾) 2.0	594.7	57.3	32.7	520.7	

- : 実施せず。

1) : 2-AA = 2-アミノアントラセン

陽性判定基準：溶媒陰性対照に対して復帰変異コロニー数が2倍以上に上昇し、かつ濃度依存性がある場合、陽性と判定した。

(2) マウスリンパ腫由来細胞株L5178Yを用いた遺伝子突然変異試験 ……添付資料二 - 参20
 マウスリンパ腫由来細胞株 L5178Y を用い、遺伝子突然変異誘発性の有無を検討した。処理濃度は細胞毒性試験の結果に基づき、代謝活性化系を併用する場合は 20、40 及び 60 µg/mL、代謝活性化系を併用しない場合は 5、10 及び 20 µg/mL とした。その結果、いずれの濃度においても突然変異頻度の増加は認められなかった。

表二 - 20 マウスリンパ腫由来細胞株 L5178Y を用いた遺伝子突然変異試験成績 ()

使用細胞	マウスリンパ腫由来細胞 (L5178Y)									
試験の構成	陰性対照 (DMSO)		陽性対照 (3-MC ³⁾)		イベルメクチン					
	無	有	無	有	無			有		
最終濃度 (µg/mL)	-		6.5		5	10	20	20	40	60
生存率 (%) ¹⁾	100	100	124	125	92.34	17.93	0.10	139	150	12.0
突然変異頻度 ²⁾	0.052	0.083	0.066	0.523	0.048	0.048	- ⁴⁾	0.078	0.073	0.063

1) : 生存率 = (薬物処置群生存細胞数 / 陰性対照群生存細胞数) × 100

2) : 突然変異頻度 = 選択培地でのプレート当たりの生育コロニー数 / 非選択培地でのプレート当たりの生育コロニー数

3) : 3-MC = 3-methylcholanthrene

4) : 細胞毒性により実施せず。

(3) ヒト胎児由来線維芽細胞株 IMR-90を用いた不定期DNA合成試験 ……添付資料二 - 参21
 ヒト胎児由来線維芽細胞株 IMR-90 を用い、不定期 DNA 合成を指標として遺伝毒性を検討した。処理濃度は代謝活性化系を併用する場合及び代謝活性化系を併用しない場合ともに 10、30、100、300 及び 1,000 µg/mL とした。その結果、いずれの濃度においても不定期 DNA 合成の統計学的に有意な増加は認められなかった。

表二 - 21 ヒト胎児由来線維芽細胞株 IMR-90 を用いた不定期 DNA 合成試験成績 ()

使用細胞	正常ヒト胎児由来線維芽細胞 (IMR-90)													
試験の構成	陰性対照 (DMSO)		陽性対照		イベルメクチン									
			MMS ²⁾	アフラトキシンB ₁	無					有				
代謝活性化の有無	無	有	無	有	無					有				
最終濃度 (µg/mL)	-		3 mM	0.3 mM	10	30	100	300	1,000	10	30	100	300	1,000
平均DPM ¹⁾ / 細胞10 ⁶ 個	509	433	7,552**	973**	294*	514	142*	154*	201*	556	307	504	371	347

* : 統計学的に有意 (t 検定、p = 0.05) に減少 (生物学的意義不明)。

** : 統計学的に有意 (t 検定、p = 0.05) に増加。

1) : DPM = (Disintegrations per minute) 放射性壊変数

2) : MMS = メルファランホド

5 . 分解物の毒性……………添付資料二 - 22 ~ 25

(1) 長期保存製剤を用いた毒性

イベルメクチンの6 mg 錠を3年間室温に保存した場合に酸化分解物を中心として5%ないし10%の分解物の生成が認められる。この長期保存製剤中に含まれる分解物の安全性検討のために、約10%の分解物を含む3年間保存劣化製剤を用いて以下のラット及びアカゲザルを用いた15日間経口投与毒性試験を実施した。

いずれの試験も上記6 mg 製剤を粉末化し、0.5% 水溶液に懸濁し、イベルメクチンとして0.5 mg/kg/dayに相当する量を強制経口投与した。その結果、ラット（添付資料二 - 22）及びアカゲザル（添付資料二 - 23）の試験においても雌雄ともに各検査項目に投与に関連する変化は認められなかった。

表二 - 22 ラットにおける15日間経口投与毒性試験成績（ ）

動物種、系統、週齢、性、体重	ラット、Cri : CD(SD)BR、約8週齢 : 238 ~ 289 g, : 167 ~ 206 g	
投与経路	強制経口投与	
投与量、mg/kg/day	対照 (0.5%)	0.5
総投与回数	14回、	14回
動物数	15、 15	15、 15
死亡数	0	0
一般状態	-	-
体重増加量	-	-
摂餌量	-	-
血液学的検査(2週)	-	-
血液生化学的検査(2週)	-	-
尿検査(2週)	-	-
眼科学的検査(2週)	-	-
剖検	-	-
臓器重量	-	-
病理組織学的検査	-	-
無毒性量	: > 0.5 mg/kg/day、 : > 0.5 mg/kg/day	

イベルメクチンの6 mg 錠は粉末化し、0.5% 水溶液に懸濁して投与。

- : 特記すべき所見なし。

餌は雄には24 g/day、雌には17 g/dayを与えた。

表二 - 23 アカゲザルにおける 15 日間経口投与毒性試験 ()

動物種、系統、週齢、性、体重	アカゲザル、 <i>Macaca mulatta</i> ()、約 2 年 性、体重 : 2.5 ~ 3.4 kg, : 2.4 ~ 3.2 kg	
投与経路	強制経鼻胃内投与	
投与量、mg/kg/day	対照 (0.5%)	0.5
総投与回数	14 回、	14 回
動物数	4、 4	4、 4
死亡数	0	0
一般状態	-	-
摂餌量	-	-
体重 / 体重増加量	-	-
血液学的検査 (2 週)	-	-
血液生化学的検査 (2 週)	-	-
尿検査 (2 週)	-	-
眼科学的検査 (2 週)	-	-
剖検	-	-
臓器重量	-	-
病理組織学的検査	-	-
無毒性量	: > 0.5 mg/kg/day、 : > 0.5 mg/kg/day	

イベルメクチンの 6 mg 錠は粉末化し、0.5% 水溶液に懸濁して投与。

- : 特記すべき所見なし。

(2) 酸化体 A の毒性

酸化体 A についてラットにおける単回経口投与毒性試験を実施し、酸化体 A の安全性について検討した。

酸化体 A を 0.5% 水溶液に懸濁し、ラットに強制経口投与した。酸化体 A の投与量は 50 µg/kg に調製したが、投与液の分析結果から 46 µg/kg 相当量であった。その結果、ラットの雌雄ともに 2 週間の観察期間及びその後の病理解剖を含めて投与に関連する所見は認められなかった (添付資料二 - 24)。従って、無毒性量は 46 µg/kg 以上であった。

(3) 劣化製剤の毒性

包装約 カ月の治験薬包装品についてラットにおける単回経口投与毒性試験を実施し、酸化体 A、酸化体 A ケト体と酸化体 A 異性体との混合物及び酸化体 A ラクトン環開環体を含むイベルメクチン 3 mg 劣化製剤の安全性を検討した。

治験薬包装品を粉末化し、0.5% 水溶液に懸濁し、イベルメクチンとして 1 mg/kg に相当する量をラットに強制経口投与した。投与した懸濁液の濃度分析結果から、酸化体 A、酸化体 A ケト体と酸化体 A 異性体との混合物及び酸化体 A ラクトン環開環体としての投与量はそれぞれ、6.0、7.6 及び 10.7 µg/kg であった。その結果、ラットの雌雄ともに 2 週間の観察期間及びその後の病理解剖を含めて投与に関連する所見は認められなかった (添付資料二 - 25)。従って、無毒性量は、酸化体 A、酸化体 A ケト体と酸化体 A 異性体との混合物及び酸化体 A ラクトン環開環体でそれぞれ、6.0、7.6 及び 10.7 µg/kg 以上であった。