

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(2) イヌを用いた慢性毒性試験

(毒性資料No.原体 18)

試験機関：Chesterford Park研究所
[GLP]

報告書作成年：1992年

検体の純度：

試験動物：ビーグル犬、1群雌雄各4匹(対照群及び中間投与群)、
雌雄各6匹(最高投与群)、開始時4～6ヶ月齢、
開始時体重 雄 6.7～8.8kg、雌 7.0～8.4kg

試験期間：投与期間 12ヶ月 (1990年 4月17日～1991年 4月25日)

試験方法：検体を1%メチルセルロース水溶液に 0、4、40及び400mg/kgの用量になるよう懸濁し、12ヶ月にわたり強制経口投与した。

400mg/kgの用量を投与した1日目は重度な一般症状がみられ、2日目から200mg/kgを2回に分けて15日目まで投与した。

16日目から78日目まで再び400mg/kgを1回で投与し、また79日目から85日目まで300mg/kgに減量し1回投与にしたが、400mg/kgあるいは300mg/kgの全量の1回投与は、重度な一般症状を示した。

200mg/kgを2回に分けて投与した時には耐え得ることから、86日目から終了時まで200mg/kgの1日2回投与とした。

対照群には賦形剤を投与した。投与懸濁液は毎日使用直前に調製した。

用量設定根拠；

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；中毒症状及び生死を毎日観察した。

400mg/kg群の雄1匹は試験103日目に瀕死屠殺した。その他に死亡例はなかった。

400mg/kgの1日1回投与では雌雄に振せん、痙攣、速呼吸、唾液分泌亢進、活動性低下、腹臥などの症状がみられた。これらの症状は、投与後3時間以内にみられ、7時間以内に消失した。

300mg/kgの1日1回投与では3匹に同様の症状がみられた。

200mg/kgの1日2回投与では嘔吐及び下痢が散発的にみられた。

また、回転行動、活動性低下、振せんも認められた。

40mg/kg以下の群では投与に起因した毒性症状はみられなかった。

体重変化；毎週体重を測定した。

体重及び体重増加に関して、投与に関連した影響は認められなかった。

摂餌量；毎週測定し、飼料効率を算出した。

400mg/kg群の雄の屠殺した1匹の摂餌量が15週に顕著に減少した。

同週の群平均値も減少した。

その他には投与に関連した影響は認められなかった。

眼科学的検査；投与開始前に全動物、52週に対照群及び高投与群の動物の両眼を検眼鏡で検査した。

投与に関連した影響はみられなかった。

心電図検査；投与開始前に全動物、52週に対照群及び高投与群の動物について投与前及び各投与後に心電図を記録した。

以下のパラメータを計算した。

PR間隔、QRS棘波、QT間隔、P波、R波、T波及び心拍数。

投与に関連した影響はみられなかった。

血液学的検査；投与開始2週間前、投与前、投与15、27及び52週に全動物から採血し、以下の項目を検査した。

ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球数、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板、赤血球沈降速度、白血球数、網状赤血球数、トロンボテスト、活性化部分トロンボプラスチン時間。

対照群と比較し、有意差のみられた項目を下表に示す。

性	雄									雌								
	4			40			400			4			40			400		
投与群 (mg/kg)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
検査時期(月)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
赤血球							↓		↓↓								↓↓	↓
							92		89								88	86
ヘマトクリット							↓			↓			↓				↓↓	
							93		89	92			92				90	
ヘモグロビン									↓								↓↓	
									90								91	
血小板					↑													
					128													
トロンボテスト									↓									
									91									
活性化部分トロンボプラスチン時間													↑			↑↑	↑↑	↑
													108			105	110	107
好中球	↓				↓					↑↑			↑	↑		↑	↑	↑
	85				86					114			113	114		109	114	
リンパ球	↑↑									↓↓			↓					
	136									74			77					
単球	↑																	
	186																	
好酸球																↓		
																57		
MCV										↓								↑
										95								103
MCHC										↑								
										103								
MCH											↓							
											98							

検査時期1：15週 ↑ ↓ : P<0.05, ↑↑ ↓↓ : P<0.01
 検査時期2：27週 (Bartlettの検定、Kruskal-Wallis検定)
 検査時期3：52週 数値は対照群に対するパーセント

400mg/kg群において雌の27又は52週、雄の52週に赤血球、ヘモグロビン及びヘマトクリットの減少がみられた。

その他にみられた統計学的有意差には用量あるいは経時的な相関性がなく、毒性学的有意性はないと考えられた。

血液学的検査；投与開始2週間前、投与前、投与15、27及び52週に全動物から採血し、以下の項目を検査した。

総蛋白、アルブミン、総グロブリン、A/G比、カルシウム、リン酸塩、ナトリウム、カリウム、尿素、クレアチニン、ブドウ糖、総コレステロール、総ビリルビン、塩化物、二酸化炭素、アニオンギャップ*、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリ性フォスファターゼ(AP)、γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ、クレアチンキナーゼ。

*アニオンギャップ=(ナトリウムイオン+カリウムイオン) (クロールイオン+重炭酸イオン)

対照群と比較し、有意差の認められた項目を下表に示す。

性	雄									雌								
	4			40			400			4			40			400		
投与群 (mg/kg)	4			40			400			4			40			400		
検査時期(月)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
リン酸塩	↓ 88										↓↓ 79		↓↓↓ 68				↓↓ 78	↓ 83
A S T				↓ 69			↓ 71	↓↓ 56										
総ビリルビン								↑ 126			↑ 130			↑ 123			↓ 69	
二酸化炭素					↓ 113													
総蛋白																	↓ 95	
グルコース																	↑ 107	↑ 114
A P													↓ 66					
アニオンギャップ*													↓↓ 78				↓ 89	
γ-GT																		↓ 95

検査時期1：15週 ↑ ↓ : P<0.05, ↑↑ ↓ ↓ : P<0.01, ↑↑↑ ↓ ↓ ↓ : P<0.001

検査時期2：27週 (Bartlettの検定、Kruskal-Wallis検定)

検査時期3：52週 数値は対照群に対するパーセント

散見された有意差は用量との関連性がない、あるいは生理学的変動の範囲内であったことから偶発的なものと考えられた。

尿 検 査；16、27及び52週に全動物から採尿し、以下の項目を検査した。

pH、蛋白、ブドウ糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、血液、比重及び沈査。

投与に関連した影響はみられなかった。

臓 器 重 量；投与終了時に全動物を屠殺し、以下の臓器重量を測定した。

肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、脳、下垂体、甲状腺、副腎、卵巣、精巣及び精巣上体。

投与に関連した影響はみられなかった。

肉眼的病理検査；投与終了時に全動物を剖検し、肉眼的病理検査を行った。

400mg/kg群の雄の瀕死屠殺した1匹の腎臓で腎乳頭の変色及び損傷が認められた。その他の変化は自然発生病変と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

病理組織学的検査；剖検時に以下の臓器及び組織を摘出し、病理組織標本を作製して組織学的検査を行った。

副腎、大動脈、脳、盲腸、結腸、十二指腸、精巣上体、眼、大腿骨と関節、胆嚢、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺、肝臓、肺、リンパ節、乳腺、筋、神経、食道、卵巣、膵臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、肉眼的異常組織、皮膚、脊髄、脾臓、骨—胸骨、胃、精巣、舌、胸腺、甲状腺、気管、膀胱、子宮、膣。

病理組織学的データの統計はカイ二乗検定を用いた。

性	雄				雌				
	0	4	40	400	0	4	40	400	
投与群 (mg/kg)	0	4	40	400	0	4	40	400	
検査動物数)	4	4	4	6	4	4	4	6	
腎 臓	乳頭壊死	0	0	0	1	0	0	0	0
	腎盂腎炎	0	0	0	0	0	0	0	1
	好塩基性尿細管	1	0	2	4	0	1	1	5**
肝 臓	炎症細胞巣	2	2	3	3	3	4	2	5
下垂体	のう胞	1	1	1	4	4	1**	2	2

* : $P < 0.05$ 、 ** : $P < 0.01$ (カイ二乗検定)

腎臓で400mg/kg群の雄の1匹に腎乳頭壊死が、雌の1匹に慢性腎盂腎炎が認められた。

好塩基性尿細管が雌雄の各群にみられ、雌の400mg/kg群では有意差がみられた。

その他の臓器にみられた有意差は用量相関はみられず、偶発所見と考えられた。

以上の結果、400mg/kg(78日間)又は300mg/kg(7日間)の1日1回投与は雌雄に振せん、痙攣、速呼吸、唾液分泌亢進、活動性低下、腹臥などの毒性症状がみられ、また、腎臓に病理所見がみられた。200mg/kgの1日2回投与では嘔吐及び下痢などが散発的にみられた。以上のことから、無毒性量は雌雄とも40mg/kg/日であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(3) マウスを用いた混餌投与による発癌性試験

(毒性資料№原体-19)

試験機関：Chesterford Park研究所
[GLP]

報告書作成年：1992年

検体の純度：

試験動物：ICRマウス、1群雌雄各50匹、投与開始時 6週齢
開始時体重 雄16.6～25.3g、雌13.3～20.4g

試験期間：80週間(1989年 9月～1991年 3月)

試験方法：検体を飼料に300、3000、10000ppmの濃度になるよう混合し自由摂取させた。検体混合飼料は毎週調製した。
対照群には検体を含まない飼料を与えた。

用量設定根拠：

試験項目及び結果：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を1日2回観察した。触診を含む詳細な観察を毎週行った。

投与に関連した毒性症状はみられなかった。

雄の10000ppm群の死亡が早期に認められ、死亡率も高かった。

雄の300及び3000ppm群及び雌の全投与群では影響はみられなかった。

以下に投与終了時における死亡率(%)を示す。

投与群 (ppm)	0	300	3000	10000
雄	40	38	32	62
雌	16	24	24	26

体重変化；試験開始後13週までは毎週、その後は隔週に測定した。

下表に示すように雌の3000及び10000ppm群の最終体重が有意に低かった。300ppm群では有意な低値ではなかった。雄では対照群と同等であった。

投与群 (ppm)	0	300	3000	10000
雄 (g)	41.9	42.2	42.6	40.3
(%)	-	(101)	(102)	(96)
雌 (g)	36.6	33.8	32.6*	31.5*
(%)	-	(92)	(89)	(86)

* P<0.05 (Bartlettの検定)

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイオクロップサイエンス株式会社にある。

摂 餌 量；各ケージ摂餌量を毎週測定した。

10000ppm群では対照群と比較して投与期間中、雄は11～16%、雌は20～40%増加した。3000及び300ppm群では影響は認められなかった。しかしながら、雌では飼料を散乱させることが多く、雌雄とも41週目から46週目までは毎週、その後は毎月1回散乱した飼料を収集して計量した。この散乱した分を考慮した場合、摂餌量は10000ppm群の雄で増加したのみであった。

飼 料 効 率；群平均飼料効率以下の式から計算した。

$$\text{飼料効率(\%)} = \frac{\text{体重増加量(g/週)}}{\text{摂餌量(g/日)} \times 7} \times 100$$

10000ppm群の雄では39%、雌は50%減少した。

3000及び300ppm群の雌では、各22%及び12%減少した。

検 体 摂 取 量；摂餌量、飼料中濃度及び体重から算出した

1日当りの平均検体摂取量(mg/kg/H)は下表の通りであった。

投与群 (ppm)	300	3000	10000
雄	45	466	1784
雌	67(64)	719(655)	3181(2194)

(動物が散乱させた飼料分を補正した値)

血液学的検査；投与後12ヶ月及び18ヶ月に各群雌雄各10匹の後眼窩洞から採血し、以下の項目について検査した。

白血球数及び白血球百分率。

対照群と比較し、有意差の認められた項目を下表に示す。

性	雄			雌		
	300	3000	10000	300	3000	10000
投与群 (ppm)	300	3000	10000	300	3000	10000
検査時期(月)	12 : 18	12 : 18	12 : 18	12 : 18	12 : 18	12 : 18
白血球			↓ 71	↓ 69	↓↓ 55	↓↓ 41
好中球			↓ 59		↑ 141	↓ 61
リンパ球						↑ 117
好酸球					↓ 50	↓ 50
単球					↑ 158	↑ 161

↑ ↓ : P<0.05、↓↓, ↓↓ : P<0.01 (Bartlettの検定、Kruskal Wallis検定)

数値は対照群に対するパーセント

統計学的有意差が認められた項目はいずれも経時的あるいは用量に関連性がないか、軽度であり、また関連する所見は認められず、偶発的な変化と考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

臓器重量：最終屠殺動物から以下の臓器を摘出し、重量を測定した。

肝臓、腎臓、脾臓、心臓、脳、副腎、卵巣、精巣及び精巣上部、
対照群と比較し、有意差の認められた項目を下表に示す。

性	雄			雌		
	300	3000	10000	300	3000	10000
投与群 (ppm)	300	3000	10000	300	3000	10000
最終体重	100	100	95	91	86	84
心臓 絶対					↓ 89	↓↓ 84
脾臓 絶対				↓ 60	↓ 65	
相対				↓ 62		
腎臓 絶対						↓ 86
肝臓 絶対				↓↓ 84	↓↓ 84	↓↓ 85
相対				↓ 91		
脳 相対				↑ 109	↑↑ 115	↑↑ 118

↑ ↓ : P < 0.05、↑↑↓↓ : P < 0.01 (Dunnnettの検定)

数値は対照群の値に対するパーセント

雌雄とも投与に関連した影響は認められなかった。

有意差のみられた臓器が雌に散見されたが、用量相関性はない、あるいは最終体重による変化であり毒性学的に有意なものではなかった。

肉眼的病理検査：瀕死動物及び最終屠殺動物の肉眼的検査を実施した。

投与に関連した影響は認められなかった。

みられた肉眼病変は通常認められるもので、正常範囲内であった。

病理組織学的検査：全動物の下記の臓器を摘出し、固定後病理標本を作成し、顕微鏡検査を実施した。

副腎、大動脈(腹部)、脳、盲腸、結腸、十二指腸、精巣上部、眼、大腿骨及び関節、胆嚢、ハーダー腺、頭部、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺、肝臓、肺、リンパ節(頸部、腸間膜)、乳腺(雌)、筋肉(骨格)、神経(眼、座骨)、食道、卵巣、脾臓、下垂体、包皮腺、前立腺、肛門、唾液腺、精嚢、皮膚、脊髄、脾臓、胸骨、胃、精巣、舌、胸腺(存在する場合)、甲状腺(上皮小体を含む)、気管、膀胱、子宮、膈、肉眼的異常のあるその他の組織、骨髓スメア。

病理組織学的データの統計にはFisherの検定法を用いた。
(Petoらによる傾向検定を行った。)

非腫瘍性病変：

主要な非腫瘍性病変発生分布表を頁63～65に示す。

切迫屠殺・死亡 : 63頁
最終屠殺 : 64頁
全動物 : 65頁

腎臓にみられた病変を下表に示す。

(数値は動物数)

性	雄				雌				
	0	300	3000	10000	0	300	3000	10000	
投与群 (ppm)	0	300	3000	10000	0	300	3000	10000	
検査時期(月)	50	50	50	50	50	50	50	50	
腎臓	腎盂単核細胞浸潤	21	23	29	16	26	20	23	19
	乳頭鉍質沈着	4	3	7	3	2	1	0	2
	乳頭壊死	0	0	0	16***	0	0	3	4
	糸球体腎炎	38	26	38	23	18	25	20	16
	血管周囲リンパ球浸潤	28	27	32	23	25	21	29	22
	好塩基性尿細管	3	1	2	1	5	5	8	6
	尿細管拡張	0	0	1	3	0	0	0	0
	皮質鉍質沈着	5	6	9	2	1	0	0	0
	皮質嚢胞	6	11	8	5	4	5	3	4
	間質細胞浸潤	6	1	5	2	4	4	4	3
	腎盂腎炎	4	0	0	7	0	0	1	2
	水腎症	2	2	4	5	0	1	0	0
	アミロイド	0	2	3	0	0	0	1	0

*** : P<0.001 (Fisherの検定)

10000ppm群では雄50匹中16匹、雌50匹中4匹に腎乳頭壊死がみられ、雄では有意であった。腎盂腎炎の増加が雌雄にみられたが、有意差はみられなかった。

3000ppm群では雌に乳頭壊死が3匹及び腎盂腎炎が1匹認められた。

300ppm群では雌雄とも両病変は認められなかった。その他の所見は本系統のマウスに認められる病変で自然発生的なものと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

腫瘍性病変：

腫瘍発生分布表を頁66～68に示す。

中間屠殺 : 66頁
 最終屠殺 : 67頁
 全動物 : 68頁

腫瘍発生の総括を下表に示した。

性	雄				雌				
	0	300	3000	10000	0	300	3000	10000	
投与群 (ppm)	0	300	3000	10000	0	300	3000	10000	
検査動物数	50	50	50	50	50	50	50	50	
腫瘍数	良性	31	30	24	13	13	12	20	12
	悪性	9	7	8	6	11	8	10	10
腫瘍総数	40	37	32	19	24	20	30	22	
腫瘍発生動物数 (%)	28 (56)	26 (52)	19 (38)	12 (24)	22 (44)	15 (30)	24 (24)	19 (38)	

投与に関連した影響は認められなかった。

以上の結果から、ベンフレート原体は10000ppmの極めて高用量でもマウスに発癌性を示さなかった。

10000ppmの投与では雄で生存率の低下、雌で体重増加抑制、雌雄で腎乳頭壊死及び腎盂腎炎を含む顕著な毒性徴候が生じ、また、3000ppm群では雌に腎乳頭壊死及び腎盂腎炎が数例に、また体重増加抑制がみられたことから、無毒性量は雄で3000ppm(466mg/kg/日)、雌では300ppm(64mg/kg/日)であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

主な非腫瘍性病変発生分布表

—マウス—

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	300	3000	10000	0	300	3000	10000
	検査動物数		20	19	16	31	8	12	12	13
死亡・ 切迫屠殺動物	肝臓	小葉中心性単核 細胞浸潤	3	5	6	3	3	5	6	1
		門脈周囲単核細胞浸潤	1	2	3	2		2		
		限局性壊死	1	2	1	3			1	1
	腎臓	腎盂上皮単核細胞浸潤	6	5	7	11	2	5	1	
		乳頭壊死				16***			2	4
		糸球体腎炎	10		7	5*	3	9	8	3
		腎盂腎炎	4			6			1	1
		水腎症	2	2	3	5		1		
	心臓	心筋炎／線維症	5		3	4		2	1	1
	肺	間質性肺炎	10	6	4	15		2		4
	副腎皮質	紡錘形細胞増殖	4	10	4	10	5	11	10	9
	副腎髄質	過形成	6	8	3	5				
眼	網膜萎縮	4	2	3	2	1	3	3	1	

数値は動物数 空欄は病変のみられた動物なし

Fisher の検定

*:P<0.05

** :P<0.01

***:P<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

主な非腫瘍性病変発生分布表

—マウス—

検査時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	300	3000	10000	0	300	3000	10000
	検査動物数		30	31	34	19	42	38	38	37
最終屠殺	肝臓	小葉中心性単核細胞浸潤	11	11	6	6	23	14	20	23
		門脈周囲単核細胞浸潤	13	12	9	6	16	22	16	16
		限局性壊死	2	1			6	7	8	7
	腎臓	腎盂上皮下单核細胞浸潤	15	18	22	5	24	15	22	19
		乳頭壊死							1	
		糸球体腎炎	28	26	31	18	15	16	12	13
		腎盂腎炎				1				1
		水腎症			1					
	心臓	心筋炎/線維症	9	16	12	7	4	4	3	1
	肺	間質性肺炎	4	2	4	2	2	1	2	2
	副腎皮質	紡錘形細胞増殖	13	16	14	8	39	34	37	33
	副腎髄質	過形成	4	8	7	3				
眼	網膜萎縮	12	9	10	5	16	20	16	8	

数値は動物数 空欄は病変のみられた動物なし

Fisher の検定

*:P<0.05

** :P<0.01

***:P<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

主な非腫瘍性病変発生分布表

—マウス—

検査時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	300	3000	10000	0	300	3000	10000
	検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50
全動物	肝臓	小葉中心性単核細胞浸潤	14	16	12	9	26	19	26	24
		門脈周囲単核細胞浸潤	14	14	12	8	16	24	16	16
		限局性壊死	3	3	1	3	6	7	9	8
	腎臓	腎盂上皮下单核細胞浸潤	21	23	29	16	26	20	23	19
		乳頭壊死				16***			3	4
		糸球体腎炎	38	26*	38	23*	18	25	20	16
		腎盂腎炎	4			7			1	2
		水腎症	2	2	4	5		1		
	心臓	心筋炎/線維症	14	16	15	11	4	6	4	2
	肺	間質性肺炎	14	8	8	17	2	3	2	6
	副腎皮質	紡錘形細胞増殖	17	26	18	18	44	45	47	42
副腎髄質	過形成	10	16	10	8					
眼	網膜萎縮	16	11	13	7	17	23	19	9	

数値は動物数 空欄は病変のみられた動物なし

Fisher の検定

*: P<0.05

** : P<0.01

***: P<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

腫瘍発生分布表（時期別／臓器別／腫瘍別）

—マウス—

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	300	3000	10000	0	300	3000	10000
	検査動物数		20	19	16	31	8	12	12	13
死 亡 ・ 切 迫 屠 殺 動 物	副腎皮質	腺腫 B								
	副腎髓質	褐色細胞腫 B								
	精巣上体	線維腫 B								
		繊維肉腫 M								
	前胃	扁平上皮癌 M	1							
	腺胃	腺腫 B								
	ハーダー腺	腺腫 B								1
	関節	血管腫 B								
	肝臓	腺腫 B	1	1	4	1				
		腺癌 M	1			1				
		血管肉腫 M								
	肺	腺腫 B	3		2	2	1			1
		腺癌 M				2	1			
	リンパ・網内系	悪性リンパ腫 M		2	1		2	1	4	6
		リンパ白血病 M						1		
	乳腺	腺棘細胞腫 B							1	
		腺癌 B						1	1	
	卵巢	顆粒膜細胞腫 B								
		黄体腫 B								
		乳頭のう腺腫 B						1		
	脾臓	腺腫 B				1				
	下垂体	腺腫 B								
	脊髄	軟骨腫 B								
	精巣	ライディット細胞腫 B	1							
	甲状腺	濾胞細胞腫 B								
	子宮	平滑筋腫 B								1
		平滑筋肉腫 M								
		子宮内膜肉腫 M					1			
		絨毛膜癌 M								
	腫瘍 1	繊維肉腫 M	2	1	1	1		1		
腫瘍 2	繊維肉腫 M	1	1		1					
腫瘍 3	繊維肉腫 M	1		2						
	のう腺腫 B	1								
腫瘍 4	繊維肉腫 M		1							
皮膚	横紋筋肉腫 M	1								
耳介	扁平上皮癌 M									
骨	軟骨芽腫 B									
Unknown	未分化肉腫 M									

M：悪性腫瘍 B：良性腫瘍 数値は担癌動物数、空欄は担癌動物なし

Fisher の検定

*:P<0.05

** :P<0.01

***:P<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

腫瘍発生分布表 (時期別/臓器別/腫瘍別)

—マウス—

検査 時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	300	3000	10000	0	300	3000	10000
	検査動物数		30	31	34	19	42	38	38	37
最 終 屠 殺	副腎皮質	腺腫 B	1	1		1			1	1
	副腎髓質	褐色細胞腫 B		1						
	精巣上体	線維腫 B	1							
		繊維肉腫 M				1				
	前胃	扁平上皮癌 M								
	腺胃	腺腫 B			1					
	ハタゲ腺	腺腫 B	3	3	1		3	3	3	2
	関節	血管腫 B							1	
	肝臓	腺腫 B	6	12	4	5				
		腺癌 M	2	1	1					1
		血管肉腫 M			1					
	肺	腺腫 B	12	6	6	1*	6	2	10	3
		腺癌 M			1				1	
	リンパ・網内系	悪性リンパ腫 M					7	2	3	2
		リンパ白血病 M								
	乳腺	腺棘細胞腫 B								
		腺癌 M								
	卵巣	顆粒膜細胞腫 B						1		1
		黄体腫 B						1	1	
		乳頭のう腺腫 B					1			1
	脾臓	腺腫 B								
	下垂体	腺腫 B					1	2		
	脊髄	軟骨腫 B						1		
	精巣	ライディヒ細胞腫 B			2					
	甲状腺	濾胞細胞腫 B							1	
	子宮	平滑筋腫 B							1	1
		平滑筋肉腫 M						1		
		子宮内膜肉腫 M						1	1	
		絨毛膜癌 M						1		
	腫瘍 1	繊維肉腫 M		1	1					
腫瘍 2	繊維肉腫 M									
腫瘍 3	繊維肉腫 M									
	のう腺腫 B		1							
腫瘍 4	繊維肉腫 M									
皮膚	横紋筋肉腫 M									
耳介	扁平上皮癌 M								1	
骨	軟骨芽腫 B					1				
Unknown	未分化肉腫 M							1		

M: 悪性腫瘍 B: 良性腫瘍 数値は担癌動物数、空欄は担癌動物なし

Fisher の検定

*: P<0.05

** : P<0.01

***: P<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

腫瘍発生分布表 (時期別/臓器別/腫瘍別)

—マウス—

検査時期	性別		雄				雌			
	投与群 (ppm)		0	300	3000	10000	0	300	3000	10000
	検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50
全動物	副腎皮質	腺腫 B	1	1		1			1	1
	副腎髄質	褐色細胞腫 B		1						
	精巣上体	線維腫 B	1							
		繊維肉腫 M				1				
	前胃	扁平上皮癌 M	1							
	腺胃	腺腫 B			1					
	ハーゲ-腺	腺腫 B	3	3	1		3	3	3	3
	関節	血管腫 B							1	
	肝臓	腺腫 B	7	13	8	6				
		腺癌 M	3	1	1	1				1
		血管肉腫 M			1					
	肺	腺腫 B	15	6*	8	3**	7	2	10	4
		腺癌 M			1	2	1		1	
	リンパ・網内系	悪性リンパ腫 M		2	1		9	3	7	8
		リンパ白血病 M						1		
	乳腺	腺棘細胞腫 B							1	
		腺癌 M						1	1	
	卵巢	顆粒膜細胞腫 B						1		1
		黄体腫 B						1	1	
		乳頭のう腺腫 B					1	1		1
	睪臓	腺腫 B				1				
	下垂体	腺腫 B					1	2		
	脊髄	軟骨腫 B						1		
	精巢	ライディッヒ細胞腫 B	1		2					
	甲状腺	濾胞細胞腫 B							1	
	子宮	平滑筋腫 B							1	2
		平滑筋肉腫 M						1		
		子宮内膜肉腫 M					1	1	1	
		絨毛膜癌 M						1		
	腫瘍 1	繊維肉腫 M	2	2	2	1		1		
腫瘍 2	繊維肉腫 M	1	1		1					
腫瘍 3	繊維肉腫 M	1		2						
	のう腺腫 B	1	1							
腫瘍 4	繊維肉腫 M		1							
皮膚	横紋筋肉腫 M	1								
耳介	扁平上皮癌 M								1	
骨	軟骨芽腫 B					1				
Unknown	未分化肉腫 M							1		

M: 悪性腫瘍 B: 良性腫瘍 数値は担癌動物数、空欄は担癌動物なし

Fisher の検定

*: P<0.05

** : P<0.01

***: P<0.001

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

12. 繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性

(毒性資料No.原体-20)

(1) ラットにおける繁殖試験

試験機関：Chesterford Park研究所
報告書作成年：1992年 [GLP]

検体の純度：

試験動物：SD系ラット、1群雌雄各30匹、開始時5週齢、
開始時体重 雄144～228g、雌114～176g

試験期間：1989年11月2日～1990年8月17日

F0世代：投与開始からF1離乳までの20週間

F1世代：離乳からF2離乳までの21週間

投与方法：検体を0、60、600及び6000ppmの濃度になるように飼料に混入し、自由に摂取させた。対照群には無処理の飼料を与えた。

用量設定根拠：

試験項目：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日2回観察した。

体重変化；成熟期間中は毎週1回測定し、雌は交配後1、4、7、14及び21日、
分娩後1、4、7、10、14、21及び25日に測定した。

摂餌量及び飼料効率；成熟期間中、摂餌量を毎週測定し飼料効率を計算した。

検体摂取量；成熟期間の1日当りの検体摂取量を計算した。

繁殖性に関する指標：

$$\text{交尾率} = \frac{\text{交尾した雌の数}}{\text{交配に用いた雌の数}} \times 100$$

$$\text{妊娠率} = \frac{\text{妊娠した雌の数}}{\text{交配に用いた雌の数}} \times 100$$

$$\text{受胎率} = \frac{\text{妊娠した雌の数}}{\text{交尾した雌の数}} \times 100$$

$$\text{妊娠期間} = \text{交尾から分娩終了時まで}$$

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験の概要を次表に示す。

世代	期間	作業手順	試験項目
F0 雄30 雌30	成熟期(10週間)		一般状態を毎日2回観察し、体重及び摂餌量を毎週測定。
	交配(3週間)	雌雄1:1で交配。 膣垢中の精子の有無を観察し、精子が認められた日を妊娠0日とした。	体重を妊娠 1、4、7、14及び21日に測定した。
	妊娠(3週間)		分娩状況を観察し同腹児数、生存・死産児数性別及び異常を検査した。
	分娩		分娩後 1、4、7、10、14、21及び25日に母動物及び各同腹児の総生存児体重、1及び25日に各生存児体重を測定した。
	哺育(4週間)		残りの離乳児動物は屠殺し、肉眼的検査を行い廃棄した。
	離乳	分娩後25日に各同腹児から雌雄各1匹選択し、1群雌雄各25匹のF1世代を構成。	F0世代のラットはF1世代のラットが離乳するまで維持し、その後、屠殺・剖検し臓器重量を測定し病理組織学的検査を行った。
F1 雄25 雌25	成熟期(11週間)		
	交配(3週間)] ----- F0世代に準ずる	
	妊娠(3週間)		
	分娩		
	哺育(4週間)		
	離乳	分娩後25日まで哺育	全てのF2児動物を屠殺し、肉眼的検査を行った。 F1世代のラットは児動物の離乳まで維持し、その後、屠殺・剖検し、臓器重量を測定し病理組織学的検査を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

同腹児に関する所見；分娩状態を可能な限り観察し、同腹児数、性別、体重、外表検査を行った。各同腹児の総生存児体重を分娩後 1、4、7、10、14、21及び25日に測定した。更に、生存児体重を分娩後 1及び25日に測定した。

肉眼的病理検査；死亡又は瀕死屠殺した動物は可能な限り迅速に剖検した。終了時まで生存したF0及びF1世代の動物はエーテル麻酔後、放血致死させ剖検した。残存した離乳児動物は二酸化炭素により窒息死させ、肉眼的検査を行った後、廃棄した。

臓器重量；F0及びF1世代の親動物の以下の臓器を剖検時に測定した。

肝臓、腎臓、卵巣、精巣及び精巣上部。

病理組織学的検査；F0及びF1世代の親動物は剖検した後、以下の臓器を10%中性緩衝ホルマリンに固定した。

肝臓、腎臓、卵巣、子宮、陰、下垂体、精巣、精巣上部、前立腺、精囊と凝固腺及び異常組織。

対照群及び6000ppm群の固定した臓器について病理組織学的検査を行った。雄の低及び中間投与群の腎臓についても検査した。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験結果：

世代	親：F0		児：F1		親：F1		児：F2		
	投与群 (ppm)	0	600	6000	0	60	600	6000	
動物数	雄	30	30	30	25	25	25	25	
	雌	30	30	30	25	25	25	25	
一般状態		投与による影響は認められなかった							
死亡		投与による死亡はなし							
親	体重変化		投与による影響は認められなかった	雄：16%減少* 雌：成熟期 16%減少* 妊娠期 10%減少***		雄：8%減少**	雄：13%減少* 雌：成熟期 9%減少* 妊娠期 14%減少***		
	臓器重量		雄：↑108	雄：↑↑110、雌：↑↑108				雄：↑↑↑114 雌：↑↑113	
動物	肉眼的病理検査		投与による影響は認められなかった						
	病理組織学的検査		投与による影響は認められなかった	雄の腎臓、尿細管 上皮にヒアリン滴 の蓄積増加		投与による影響は認められなかった			
交尾率 (%)		100	100	97	100	100	100	100	
受胎率 (%)		100	100	97	100	100	96	100	
妊娠率 (%)		100	100	93	100	100	96	100	
妊娠期間 (日)		22.8	22.9	22.8	22.9	22.7	22.7	22.9	

↑ ↓ : P < 0.05, * ↑↑ : P < 0.01 (Dunnettの検定)。 * : P < 0.05, ** : P < 0.01, *** : P < 0.001 (Dunnett及びStudentのt検定)

臓器重量の数値は対照群の値に対するパーセント

F1世代の雄の体重増加抑制は、この世代が哺育されていた時期の体重に影響は認められず、また、生物学的変動の範囲内であると考えられたため、投与による影響とは考えられない。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内 一はパイエルクroppサイエンス株式会社にある。

試験結果:

世代	親:F0			児:F1			親:F1			児:F2		
	投与群 (ppm)	動物数	生存児数 (%)	60	30	30	6000	600	60	6000	600	6000
雄	0	30	92	30	30	30	6000	600	60	6000	600	6000
雌	0	30	73	30	30	30	30	25	25	25	25	25
総新生児数	384	30	70	30	30	30	335	25	25	25	300	283
生存児数 (%)												
分娩後												
1日	92	96	93	96	93	94	94	95	99	100	100	98
4日	73	80	79	80	79	70	70	90	92	82	80	80
25日	70	76	77	76	77	67	67	89	91	81	77	77
平均同腹児数												
1日 A	11.7	11.5	11.6	11.5	11.6	11.3	11.3	11.8	12.5	12.5	12.5	11.0
B	11.4	11.5	12.1	11.5	12.1	11.7	11.7	12.0	12.5	12.5	12.3	10.5*
4日 A	9.3	9.7	9.9	9.7	9.9	8.4	8.4	11.2	11.6	10.3	10.3	9.0*
B	10.3	10.0	11.0	10.0	11.0	10.2	10.2	11.7	11.6	11.1	11.1	10.2*
7日 A	9.2	9.5	9.7	9.5	9.7	8.4	8.4	11.1	11.6	10.3	10.3	9.0*
B	10.2	9.9	10.8	9.9	10.8	10.2	10.2	11.6	11.6	11.1	11.1	10.2*
25日 A	9.0	9.1	9.6	9.1	9.6	8.0	8.0	11.0	11.6	10.1	10.1	8.8**
B	10.0	9.4	10.7	9.4	10.7	9.7	9.7	11.5	11.6	11.0	11.0	10.0*
同腹児損失数	3	1	3	1	3	5	5	1	0	2	2	3
平均体重 (g)												
1日	5.7	5.6	5.6	5.6	5.6	5.7	5.7	5.8	5.8	5.7	5.7	5.7
7日	12.2	11.6	11.5	11.6	11.5	11.5	11.5	12.0	11.8	11.1	11.1	11.3
25日	59.9	58.1	55.1**	58.1	55.1**	51.3***	51.3***	56.0	56.3	52.9	52.9	47.7***
平均同腹児体重 (g)												
1日	66.5	64.5	64.6	64.5	64.6	65.6	65.6	67.9	72.4	70.2	70.2	62.6*
7日	124.4	114.2	123.5	114.2	123.5	115.6	115.6	138.6	136.2	120.5	120.5	114.4***
25日	594.1	546.4	580.3	546.4	580.3	494.2**	494.2**	637.5	642.5	572.9	572.9	469.6***
性比 (%雄)												
1日	45.5	50.6	50.9	50.6	50.9	49.1	49.1	43.9	52.4	45.7	45.7	51.1
25日	45.6	50.7	53.8	50.7	53.8	48.9	48.9	43.5	51.6	44.6	44.6	51.10
肉眼的病理検査												

*: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001 (Studentのt検定 及び Mann Whitney U検定)

平均同腹児数 Aは総同腹児損失を含む妊娠した動物によるデータ

平均同腹児数 Bは離乳時まで生存した児動物を有した動物によるデータ

投与による影響は認められなかった

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験結果：

一般状態及び死亡；F0及びF1世代のいずれにも、行動、症状及び死亡に投与による影響は認められなかった。

F0世代対照群の雌1匹は分娩後21日に、60ppm群の雄1匹は14週目に死亡した。これらの動物の剖検では投与との関連を示す所見はみられなかった。

体重変化：

親動物：6000ppm群の雄のF0及びF1世代とも全体的に体重増加抑制がみられた。雌では両世代とも成熟期、妊娠中に抑制がみられた。

600ppm群のF1世代の雄では哺育後期に平均体重増加抑制が認められている。この体重増加抑制は以降の成熟期にも回復されず、この影響を受けたまま推移した。従って、600ppm群F1世代の雄の体重は投与に関連した影響があったものと考えられた。

60ppm群のF1世代の雄では哺育期の平均体重増加抑制は認められず、この群にみられた体重増加抑制は生物学的変動の範囲内であると考えられた。

兒動物：平均体重が6000ppm群の両同腹児で分娩後25日までに対照群に比べ有意に低下した。600ppm群ではF1兒動物で分娩後25日までにわずかに減少した。平均同腹児体重は6000ppm群でF1同腹児では分娩後21日より、F2同腹児では哺育期を通して低かった。

摂餌量及び飼料効率；成熟期間中の摂餌量は両世代とも全投与群と同様であった。

検体摂取量；両世代の成熟期の平均検体摂取量(mg/kg/日)は下表の通りであった。

世代		投与群 (ppm)		
		60	600	6000
F0	雄	4.2	43	422
	雌	5.1	51	501
F1	雄	4.8	49	492
	雌	5.5	55	558

繁殖性に関する成績；両世代における交配期間、交尾率、受胎率、妊娠率及び妊娠期間に投与による影響は認められなかった。

同腹児に関する成績；各世代で総同腹児損失がみられたが、投与による有意な影響はみられなかった。

同腹児数は6000ppm群のF2兒動物出生時に対照群よりわずかに低く、哺育期間を通して低かった。

新生児数、生存児数及び性比には投与による影響は認められなかった。

肉眼的病理検査；F0及びF1成熟動物及び兒動物にみられた肉眼的変化は、自然発生的なものであり、投与によるものではないと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

臓器重量：F0世代の6000ppm群で腎臓の相対重量が雌雄でそれぞれ8%及び10%増加した。

雄では腎臓の病理組織学的変化がみられたことから、検体投与の影響を否定できないが、雌では関連する病理組織学的所見が認められないことから、雌における本所見は、毒性学的意味はないと考えられた。又、60ppm群雄の腎臓の相対重量が8%増加したが投与に関連した病理組織学的変化が認められなかったことから、毒性学的意味はないと考えられた。

F1世代の6000ppm群で精巣及び卵巣の相対重量が増加したが、絶対重量及び病理組織学的変化は認められず、体重増加抑制によるものと考えられた。

病理組織学的検査：F0及びF1世代のいずれの動物にも投与に関連した精巣及び卵巣の変化は認められなかった。

6000ppm群のF0世代の雄の腎臓に尿細管上皮のヒアリン滴の蓄積が頻繁かつ重度に認められた。

その他投与に関連した変化は、いずれの動物にも認められなかった。

毒性に関しては、ベンフレセート原体6000ppmの混餌投与により、F0及びF1世代の雌雄親動物及び哺育後期の児動物の体重増加抑制が、また、F0世代の雄の腎臓に尿細管上皮のヒアリン滴の蓄積が頻繁かつ重度に認められた。

600ppm群の児動物には僅かな体重増加抑制が、F1世代児動物にのみ分娩後25日までみられた。

繁殖に及ぼす唯一の影響として、6000ppm群のF2世代児動物 同腹児数の極めて僅かな低下が認められた。

以上の結果から無毒性量は以下の通り求められた；

毒性に対し：親世代及び児動物とも 60ppm (雄 4.2mg/kg/日、雌 5.1mg/kg/日)

繁殖性に対し：600ppm (雄 46mg/kg/日、雌 53mg/kg/日)

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(2) ラットを用いた催奇形性試験

(毒性資料No.原体-21)

試験機関：Huntingdon Research Centre Ltd.

[GLP]

報告書作成年：1992年

検体の純度：

試験動物：SD系ラット、1群雌25匹、体重181～248g、供試時8～10週齢

試験期間：10日間投与(妊娠 6日～15日)。交配確認日を妊娠 0日とした。

試験方法：検体を1% メチルセルロース水溶液に懸濁し 0、3、55及び1000mg/kgの投与量で妊娠 6日から15Hまで強制経口投与した。

投与液は毎日調製した。

対照群には1% メチルセルロースを投与した。

用量設定根拠：

試験項目：

親動物：一般状態及び生死を毎日観察した。摂餌量及び摂水量は交配後 3日目から毎日測定した。体重を 2、3、6、8、10、12、14、16、18及び20日目に測定した。妊娠20日目に母動物を屠殺・剖検し、胎児を摘出した。

母動物の腎臓重量を測定した。

卵巣及び子宮を観察し黄体数、生存胎児数、死亡胎児数、胎児重量、異常胎児について検査した。

胎児：体重を測定し性別、外表異常を検査した。各同腹胎児の半数を固定後、内臓検査を行い、残りの半数は骨格検査を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験結果:

投与群 (mg/kg/口)		0	3	55	1000	
1群当りの動物数		25	25	25	25	
親	死亡動物数	0	0	0	0	
	不妊動物数	2	2	2	1	
	胚吸収動物数	0	0	0	0	
	妊娠動物数	23	23	23	24	
	一般状態			唾液分泌亢進	唾液分泌亢進及び被毛の浸潤	
動物	摂餌量	投与による変化なし				
	摂水量				増加 ↑↑141	
	体重変化	投与による変化なし				
	肝臓、腎臓重量	投与による変化なし				
物	剖検所見	投与による変化なし				
	着床	黄体数	14.4	14.9	14.0	13.7
		着床数	13.3	13.8	13.0	12.7
	床腹	着床前死亡率 (%)	6.8	6.5	7.6	7.2
		着床後死亡率 (%)	4.3	6.8	4.3	5.3
	所当見り)	生存胎児数(雄/雌)	12.7(7.2/5.5)	12.9(6.6/6.3)	12.4(6.6/5.8)	12.0(5.3/6.7)
		死亡胎児数	0.6	0.9	0.6	0.7
	胎児	総胎児数	291	296	285	288
平均同腹児重量 (g)		48.02	47.91	46.35	45.06	
平均胎児重量 (g)		3.79	3.73	3.75	3.77	
性比 雄/雌		7.2/5.5	6.6/6.3	6.6/5.8	5.3/6.7	
% 雄/1腹		56.6	51.4	52.7	44.3**	
児	奇形 (%)	0(0)	6(2.0) 扁平頭蓋 下顎短小症 歪曲肩甲骨 歪曲肋骨 肥厚肋骨 前肢歪曲	2(0.7) 心室中隔欠損 2	2(0.7) 水頭症 1 二分脊椎 1	
	内臓異常					
動物	検査動物数	146	147	139	143	
	異常胎児数	6	17	12	7	
	出血 脳		4	3	1	
	眼		1	1	1	
	下大静脈異常		1			
	心室中隔欠損(小)	1	3	2	1	
	横隔膜癒着			1		
	肝分葉異常	4	2	2	4	
	肝分葉出血		1			
	腎盂/尿管拡張	1	4	1		
精巣変異		1	2	1		

(注) 内臓及び骨格異常の各胎児は1つ又は1つ以上の異常を持つ。

↑↑↑: P < 0.01 (Williamsの検定) ** : P < 0.01 (Shirleyの検定)

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

投与群 (mg/kg/日)		0	3	55	1000
胎 児	骨格異常				
	検査胎児数	145	143	144	143
	異常胎児数	29	17	15	14
	頭蓋核骨化減少	13	4	6	7
	仙尾椎弓骨化減少	16	11	9	5
	頸肋骨	1	2		
動 物	骨格変異 (%)				
	13肋骨	124 (84.9)	127 (89.0)	122 (84.0)	125 (87.1)
	14肋骨	21 (15.1)	16 (11.0)	22 (16.0)	18 (12.9)
	胸骨分節 (%)				
	骨化不全	40 (26.5)	53 (36.6)	42 (29.2)	44 (30.2)
	縮小	41 (28.7)	42 (30.3)	61 (40.6)	51 (35.7)
	非対称/分枝	2 (1.2)	4 (2.7)	5 (3.3)	2 (1.5)

(注) 内臓及び骨格異常の各胎児は1つ又は1つ以上の異常を持つ。

親動物

死亡動物はみられなかった。

1000mg/kg群では、投与期間中摂水量の有意な増加がみられた。

摂餌量、体重変化、腎重量、剖検所見には投与に関連した変化は認められなかった。

投与群にみられた主な症状は、投与後約30分間にわたる一過性の唾液分泌亢進が認められた。

高用量群では、この症状は全投与期間を通してほぼ全動物に認められ、また被毛の浸潤もみられた。低用量群では第1回の投与時に4匹のみに唾液分泌亢進が認められた。

すなわち、検体の各群の全投与回数(供試動物数25匹)×10(日)→250(回)に対する唾液分泌亢進の観察された投与回数の比率を求めると、高用量群では247/250(99%)、中間用量群では30/250(12%)、低用量群では4/250(1.6%)であり、低用量群にみられた唾液分泌亢進の極めて僅かな増加は投与に関連するものではないと判断された。

胎児動物

胎児における所見では、いずれの同腹児パラメータにも投与に関連した明らかな変化はみられなかった。1000mg/kg群における平均性比は期待された50%より低く、対照群と比べ統計学的に有意差がみられたが、偶発的なものと考えられた。奇形、異常及び変異を有する動物数に用量相関性はなかった。

ベンフレセート原体の1000mg/kgの投与でも催奇形性は認められず、またいずれの用量でも胚胎児発生に対する作用は認められなかった。

以上の結果から、55mg/kg以上の群に唾液分泌亢進が認められたことから、ベンフレセートの母体に対する無毒性量は3mg/kg/日と判断され、また最高投与量の1000mg/kgにおいても胎児毒性もしくは催奇形性は認められなかったことから、胎児及び催奇形性に対する無毒性量は1000mg/kg/日と判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(3) ウサギを用いた催奇形性試験

(毒性資料No.原体-22)

試験機関：Research & Consulting Company
[GLP]

報告書作成年：1988年

検体の純度：

試験動物：チンチラウサギ、1群雌16匹

交配開始時 4～6ヶ月齢、体重2470～3400g

試験期間：28日間；13日間投与(妊娠 6～18日)。交配日を妊娠 0日とした。

試験方法：検体を1%カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し 0、50、200及び800mg/kgの投与量で交配後、6日から18日まで強制経口投与した。

投与液は投与前に毎日調製した。対照群には1%カルボキシメチルセルロース水溶液を投与した。

用量設定根拠：

試験項目：

親動物：一般状態及び生死を毎日 2回観察し、摂餌量を妊娠 6、11、15、19、24及び28日に測定した。体重を毎日測定した。

妊娠28日に屠殺し胎児を摘出した。剖検を行い子宮、子宮内容物、子宮内胎児の位置及び黄体数を検査した。

胎児：子宮から摘出した胎児は重量を測定し、外表検査後、内臓異常及び性別を調べ、頭部及び骨格検査を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験結果:

投与群 (mg/kg/日)		0	50	200	800	
1群当りの動物数		16	16	16	16	
親	死亡動物数	0	0	2	0	
	不妊動物数	1	3	0	1	
	胚吸取動物数	0	0	1	0	
	妊娠動物数	15(94%)	13(81%)	13(81%)	15(94%)	
	一般状態	投与による変化なし				
動物	摂餌量		やや増加		妊娠 6~15日、 24~28日減少	
	摂水量	投与による変化なし				
	体重変化		投与による変化なし		妊娠 6~11日 軽度の増加抑制	
物	肝臓、腎臓重量	投与による変化なし				
	剖検所見	投与による変化なし				
着床 所見	黄体数	9.1	9.2	7.5*	9.2	
	着床数	8.6	8.8	7.2	8.9	
	着床 死亡数	前期	0.5	0.4	0.3	0.3
		後期	0.8	1.6	0.5	0.4
	生存胎児数	7.8	7.2	6.6*	8.5	
	死亡胎児数	0	0	0	0	
	総胎児数	117	94	86	127	
胎児重量 (g)	33.0	33.6	36.4*	34.1		
性比 (雄/雌)	0.8(52/65)	1.24(52/42)	1.26(48/38)	0.79(56/71)		
胎児	外表異常及び内臓異常	脳ヘルニア 1	欠趾 1			
	骨格奇形/異常 総数(%)	3(3)	5(5)	1(1)	3(2)	
	胸骨骨化異常	1	3			
	胸骨分枝	2		1	1	
	胸骨癒合		2			
	後肢中足骨欠損		1			
	肋骨異常 (ダブル又は癒合)				2	
	骨格変異 (%)					

* P < 0.05 (Wilcoxon検定)

(注) 骨格奇形/異常の各胎児は1つ又は1つ以上の異常を持つ。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

親動物

投与に関連すると考えられる死亡は認められなかった。200mg/kg群にみられた 2例の死亡は誤投与によるものであった。

800mg/kg群では体重の軽度増加抑制及び摂餌量の減少がみられたが、他の投与群は対照群と同様であった。剖検では特記すべき所見は認められなかった。

妊娠率、黄体数、着床数、着床死亡数、生存胎児数に投与に起因する差異は認められなかった。但し、200mg/kg群の生存胎児数、黄体数に僅かながら統計的に有意な減少がみられた。しかし、この減少は最高投与群には認められず、また生存胎児数の減少は偶発的な黄体数の減少によるものであり、従ってこれらの所見は投与に起因するものとは考えられない。

胎児動物

平均胎児重量は何れの投与群も対照群より多かった。

外表及び内臓検査では対照群の 1匹に脳ヘルニア、50mg/kg群の 1匹に右後肢の欠趾がみられたが、これ以外には異常はみられず、投与との関連性は示唆されなかった。

骨格検査では胸骨分枝、骨化異常、胸骨癒合などがみられたが、これら奇形／異常の発生率に投与による影響は認められなかった。また胸骨分節骨化不全及び肋骨短小などの発生率にも投与の影響はみられなかった。

以上の結果、ベンフレート原体をウサギの妊娠雌に6～18日まで投与した場合、800mg/kg群に体重増加の抑制及び摂餌量の低下が認められたことから、母体における無毒性量は、200mg/kg/日であった。また、最高投与量の800mg/kg/日においても胎児毒性もしくは催奇形性は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

13. 変異原性

(2) 細菌を用いた復帰変異試験

(毒性資料No.原体-23)

試験機関：Huntingdon Research Centre
[GLP]

報告書作成年：1991年

検体の純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA1538、TA98及びTA100)及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2)を用い、S-9mixの存在下及び非存在下で検体をDMSOに溶解した。

最高濃度を5000 μ g/プレートとして実施した予備試験で、検体は試験菌株に対して毒性を示さなかった。従って、本試験の最高濃度は5000 μ g/プレートとした。

陽性対照としてS-9mixの非存在下では、

N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG)、2-nitrofluorene (NF)、9-aminoacridine (9AC)及びS-9mixの存在下では2-aminoanthracene (AA)を用いた。

同様な処理による試験を2回行った。

試験結果：次頁に結果の表を示す。

ベンプレセートは、2回の試験とも5000 μ g/プレートの濃度でも、またS-9mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照ではいずれも顕著な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から、ベンプレセートは本試験条件下ではサルモネラ菌及び大腸菌に対し、復帰変異を誘発しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験 1

(平均値;n=3)

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (DMSO)		—	85	14	66	24	14	16
ベンプレセート	5000	—	69	13	34	27	12	13
	1500	—	90	14	52	28	13	13
	500	—	93	15	63	28	11	12
	150	—	73	13	47	24	12	12
	50	—	81	13	49	25	12	15
	0	—	76	17	60	28	13	11
陽性対照 ENNG	2.0	—			853			
	3.0	—	273					
	5.0	—		181				
NF	1.0	—				74		
	2.0	—						42
9AC	80.0	—					843	
溶媒対照 (DMSO)		+	86	15	54	21	13	13
ベンプレセート	5000	+	75	11	38	20	12	15
	1500	+	93	14	48	24	11	13
	500	+	76	16	55	23	10	15
	150	+	76	15	57	23	11	12
	50	+	80	15	51	19	13	14
	0	+	78	16	60	20	13	14
陽性対照 AA	0.5	+				170		112
	1.0	+	327					
	2.0	+		89			83	
	20.0	+			420			

ENNG ; N-ethyl-N' nitro-N-nitrosoguanidine

NF ; 2-2 nitrofluorene

9AC ; 9-aminoacridine

AA ; 2-aminoanthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験 2

(平均値;n=3)

化合物	濃度 (μ g/プレート)	S-9mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2	TA98	TA1537	TA1538
溶媒対照 (DMSO)		-	88	19	69	28	12	10
ベンプレセート	5000	-	81	14	55	22	11	11
	1500	-	83	12	61	28	12	11
	500	-	86	14	62	24	20	12
	150	-	78	13	62	21	14	14
	50	-	104	13	64	21	15	9
	0	-	96	19	64	28	11	11
陽性対照 ENNG	2.0	-			717			
	3.0	-	325					
	5.0			499				
NF	1.0	-				84		
	2.0	-						50
9AC	80.0	-					1645	
溶媒対照 (DMSO)		+	102	19	67	23	17	16
ベンプレセート	5000	+	88	12	57	17	12	16
	1500	+	76	20	56	17	9	12
	500	+	88	19	64	20	19	11
	150	+	88	18	63	18	10	11
	50	+	76	14	68	26	12	15
	0	+	98	18	70	19	9	15
陽性対照 AA	0.5	+				81		60
	1.0	+	332					
	2.0	+		112			60	
	20.0	+			323			

ENNG ; N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

NF ; 2,2 nitrofluorene

9AC ; 9-aminoacridine

AA ; 2-aminoanthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(2) ヒトリンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験 (毒性資料No.原体 24)

試験機関：Huntingdon Research Centre
[GLP]

報告書作成年：1984年

検体の純度：

試験方法：in vitroで S-9mixの存在下及び非存在下におけるヒトリンパ球に対する染色体異常誘発性を検討した。

検体はエタノールに溶解した。

予備試験の結果、溶媒対照と比較した場合；分裂指数を50%、減少せしめる濃度はS-9mix存在下で750 μ g/ml、非存在下で150 μ g/mlと求められた。これに基づき、本試験の濃度をS-9mixの存在下では75、375、750 μ g/ml、非存在下では15、75、150 μ g/mlとした。

ヒト血液よりリンパ球を分離採取し、細胞分裂を誘発し、37°Cで48時間培養した。その後、S-9mixの非存在下では一連の培養に検体を所定濃度になるように加えた。溶媒対照としてエタノール及びDMSOを各50 μ l、陽性対照としてエチルメタンサルホネート500 μ g/mlを添加した。更に22時間培養した。

S-9mixの存在下ではS-9mix及び検体を加えた。

溶媒対照としてエタノール及び蒸留水を各50 μ l、陽性対照としてシクロホスファミドを添加し2時間培養後、細胞を分離し新鮮な培養液中に再懸濁し、更に22時間培養した。

各培養液中にコルヒチンを添加し有糸分裂を停止させた。2時間培養後、低張処理し固定、染色して中期分裂像を各培養につき100個鏡検した。

試験結果：次頁に結果の表を示す。

S-9mixの存在下では、溶媒対照と比較して染色体異常を有する細胞数に統計的に有意な増加は認められなかった。

非存在下では低用量にのみギャップを含む異常を有する細胞数に有意な増加がみられたが、その他の用量では増加は認められなかった。

以上の結果から、ベンフレート原体は in vitro 細胞遺伝学的試験で代謝活性化の存在下及び非存在下のいずれにおいても染色体異常を誘発しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	S-9mix	検査した 細胞数	異常のみられた細胞数		異常のみられた細胞数の割合の平均 (%)	
				ギャップを除く	ギャップを含む	ギャップを除く	ギャップを含む
溶媒対照 (エタノール)	50 μl	-	100	1	1	1	1
			100	0	0		
			100	0	0		
			100	3	3		
溶媒対照 (DMSO)	50 μl		100	0	0	0.25	0.25
			100	0	0		
			100	0	0		
			100	1	1		
ベンゾピレン	15		100	3	4	3	4*
			100	3	4		
	75		100	1	1	2	2.5
			100	3	4		
	150	100	1	1	1	1	
		100	1	1			
陽性対照 (エチルメタンスルホネート)	500	100	14	14	13***	13***	
		100	12	12			
溶媒対照 (エタノール)	50 μl	100	1	1	1.25	1.5	
		100	4	4			
		100	0	1			
		100	0	0			
溶媒対照 (滅菌蒸留水)	50 μl	100	2	3	1	2	
		100	0	1			
ベンゾピレン	75	100	0	0	0	0	
		100	0	0			
	375	100	0	0	0.5	0.5	
		100	1	1			
	750	100	0	1	0.5	0.5	
		100	1	2			
陽性対照 (シクロホスファミド)	20	100	7	7	6.5***	6.5**	
		100	6	6			

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ (Fisher検定)

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(3) ベンフレセートのマウスにおける小核試験

(毒性資料 No. 原体-25)

試験機関： Bayer HealthCare AG 毒性研究所 (ドイツ)

報告書作成年： 2005 年 [GLP 対応]

検体の純度：

試験系： NMRI系マウス、 1群雄各5匹

(試験開始時： 6～12 週齢、体重 38～44g)

試験期間： 3 日間 (24 時間間隔で 2 回投与、最終投与後 24 時間時に屠殺)

試験方法：

検体を 0.5% クレモホア水溶液に懸濁して、1群雄各 5 匹 (死亡例補充用として雄 5 匹の予備動物を含む) のマウスに 150、300 および 600mg/kg を 24 時間間隔で 2 回腹腔内投与し、最終投与の 24 時間後に屠殺して大腿骨の骨髓を摘出した。

陰性対照として 0.5% クレモホア水溶液のみを、陽性対照として生理的食塩水に溶解したシクロホスファミドの 20mg/kg を 1 回腹腔内投与した。24 時間後に屠殺し、大腿骨の骨髓を摘出した。

投与容量は、全投与群ともに 10ml/kg とした。

Schmid の方法を用いて検査用の塗抹標本を作製した。標本を染色後、光学顕微鏡を用いて評価した。1 動物につき 2000 個の多染性赤血球を観察し、同時に正染性赤血球数も観察した。

試験結果：

1) 一般症状

検体投与後屠殺時までには、無気力、粗毛、体重減少、腹臥位、痙攣、跳躍痙攣、ふるえ、回転、呼吸困難が観察された。検体投与で惹起された死亡は認められなかった。対照群の動物には、中毒症状および死亡は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

2) 突然変異誘発性

検体の染色体異常誘発作用の評価を下表に示した。(平均±分散)

投与群	評価した多染性赤血球総数	2000個の多染性赤血球あたりの正染性赤血球数	小核を有する細胞数	
			2000個の正染性赤血球あたり	2000個の多染性赤血球あたり
陰性対照群	10000	1757±524	3.2±2.7	3.4±2.3
検体150mg/kg	10000	1944±435	6.1±2.7	2.2±2.2
検体300mg/kg	10000	1628±209	4.2±1.7	3.6±1.5
検体600mg/kg	10000	3050*+871	3.2±1.0	4.2±3.3
陽性対照群 シクロホスファミド ¹⁾	10000	1561±106	3.6±0.9	13.8*±7.7

*: Wilcoxon の順位和検定で有意差あり (p < 0.05)

小核を有する多染性赤血球数の出現頻度には、陰性対照群と検体投与群との間に統計的な有意性は認められなかった。

陽性対照薬剤のシクロホスファミドは、小核を有する多染性赤血球数の明らかな増加を誘発し、出現頻度は13.8/2000 (1s=7.7)であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示した。

小核を有する正染性赤血球数には投与群と陽性対照群とも有意な増加を認めなかった。多染性赤血球に対する正染性赤血球の比率は、検体投与によって変化した。この理由は検体の全身的な暴露によるものと考えられた。

以上の結果から、本検体には突然変異誘発作用はないものと判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(毒性資料№原体-26)

(4) 枯草菌を用いたDNA修復試験

試験機関：Huntingdon Research Centre Ltd.
[GLP]

報告書作成年：1991年

検体の純度：

試験方法：枯草菌 *Bacillus subtilis* の組換え修復機構保有株(H17)と欠損株(M45)を用い、代謝活性化系の存在下及び非存在下でDNA損傷の誘発性を検討した。生育阻止帯の評価には、10、30、100、300及び1000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ の濃度となるように検体をDMSOに溶解して供試した。

生存率の評価には最終濃度が50、150、500、1500及び5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにDMSOに溶解した。

陰性対照としてカナマイシン及びストレプトマイシン、陽性対照として2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylimide (AF-2)及び2-aminoanthracene (AA)それぞれ代謝活性化系の存在下及び非存在下で用いた。

試験結果：次頁に結果の表を示す。

生育阻止：検体投与群では代謝活性化を含め、最高濃度の1000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ においても両株に生育阻止を認めなかった。

生存率：ベンフレセートは、次表に示す通り2回の試験とも5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の濃度でもまた代謝活性化の存在下及び非存在下においても両試験菌株に対してその生存指標に差を示さなかった。

陽性対照では、両試験菌株において異なった反応を示しており、試験の感受性及び代謝活性化の活性を示唆している。

以上の結果から、DMSOを溶媒として、5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度の試験条件では、ベンフレセート原体は枯草菌に対しDNA損傷を誘発しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

生育阻止試験

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	S-9mix	阻止帯 (nm)	
			H17	M15
ペンフレセート	1000	—	NZ	NZ
	300	—	NZ	NZ
	100	—	NZ	NZ
	30	—	NZ	NZ
	10	—	NZ	NZ
	1000	+	NZ	NZ
	300	+	NZ	NZ
	100	+	NZ	NZ
	30	+	NZ	NZ
	10	+	NZ	NZ
陰性対照	160	—	29	26
カナマイシン	80	—	23	24
	40	—	24	24
ストレプトマイシン	400	+	15	16
	200	+	16	19
	100	+	12	14
陽性対照	0.002	—	NZ	NZ
AF-2	0.001	—	NZ	NZ
	0.0005	—	NZ	NZ
AA	20	+	NZ	20
	10	+	NZ	19
	5	+	NZ	23
溶媒	20 μl	—	NZ	NZ
	20 μl	+	NZ	NZ

NZ ; 生育阻止帯認めず

AF-2 ; 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylimide

AA ; 2-aminoanthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S-9mix	生存率(%)				生存指標	
			H17		M45		試験1	試験2
			試験1	試験2	試験1	試験2		
ベンフレセート	5000	-	73	91	114	83	1.57	0.91
	1500	-	70	87	129	88	1.83	1.01
	500	-	89	88	110	106	1.23	1.21
	150	-	109	89	115	84	1.05	0.94
	50	-	74	92	138	104	1.87	1.13
	5000	+	64	69	98	99	1.54	1.44
	1500	+	58	80	81	97	1.39	1.20
	500	+	71	73	95	116	1.33	1.58
	150	+	85	79	99	84	1.17	1.07
	50	+	87	93	76	111	0.88	1.19
陰性対照 カナマイシン	160	-	0	86	1	56	-	0.65
	80	-	0	69	6	55	-	0.81
	40	-	4	33	40	58	9.77	1.77
	20	-	11	75	66	49	5.89	0.65
	10	-	34	63	76	59	2.27	0.93
ストレプトマイシン	400	+	0	42	5	44		1.05
	200	+	7	66	21	137	2.96	2.07
	100	+	10	71	25	52	2.65	0.73
	50	+	48	85	42	50	0.87	0.60
	25	+	25	106	50	99	1.99	0.93
陽性対照 AF-2	0.002	-	146	70	58	32	0.40	0.45
	0.001	-	124	62	87	38	0.70	0.61
	0.0005	-	91	63	141	189	1.54	2.99
AA	20	+	99	65	44	22	0.45	0.34
	10		112	57	55	32	0.50	0.57
	5	+	101	73	98	93	0.97	1.27
DMSO	100 μL	-	100	100	100	100	1.00	1.00
	100 μL	+	100	100	100	100	1.00	1.00
水	100 μL	-	100	100	100	100	1.00	1.00
	100 μL	+	100	100	100	100	1.00	1.00

$$\text{生存指標} = \frac{\text{M45生存率}}{\text{H17生存率}}$$

AF-2 ; 2-(2-furyl)-3-(5-nitro 2-furyl)acrylimide

AA ; 2-aminoanthracene

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

14. 生体機能に及ぼす影響

(毒性資料No.原休-27)

ペンフレセートにおける一般薬理試験

試験機関：日本シエーリング㈱研究部

報告書作成年：1992年

検体の純度：

1. 一般状態に及ぼす影響(Irwin改変法)

試験動物：ICR系マウス、1群雄 5匹(但し、対照群16匹)、体重24～30g

試験方法：検体0.5%CMC+0.04%Tween80溶液に懸濁し、投与量62.5、125、250、500、1000及び2000mg/kgを強制経口投与した。対照群には、溶媒を投与した。投与後 0.5、1、3、6時間、更に1、2及び3日に、一般行動、運動感覚機能及び自律機能を Irwin改変法に従って観察した。

試験結果：観察された一般症状は、次の通りである。

投 与	主要一般症状
62.5mg/kg以上	軽度の呼吸不規則及び遅延、一過性の運動性増加、軽度の運動性減少
250 mg/kg以上	散瞳
1000 mg/kg以上	振せん
2000 mg/kg以上	伏臥、握力消失、流涎、痙攣性歩行、攣縮耳介反射消失、瞳孔反射消失、疼痛反応遅延、体温低下

運動性増加の症状は、多くの場合投与数分後に発現し、数分間持続した。

その他の症状は、62.5mg/kg群で投与後 1～3時間、125及び250mg/kg群で1～6時間、更に500mg/kg以上の群では、30分～6時間に認められ、1日後には回復した。

また、直腸体温は、1000及び2000mg/kg群で投与後1及び3時間に有意に低下した。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

2. 呼吸及び循環器系に及ぼす影響

試験動物：日本白色ウサギ、1群雄5匹、体重2.8～3.4kg

試験方法：ウレタン麻酔下、ウサギを背位で固定し、血圧を圧トランスデューサを介して、心拍数を血圧脈波からタコメータを介して、大腿動脈血流を電磁血流計を用いて測定し、更に第Ⅱ誘導により心電図を記録し、呼吸ピックアップを介して呼吸数を測定した。これらを投与直後、投与後 2、5、15、30及び60分に測定した。

なお、検体をポリエチレングリコール/エタノール/生理食塩水 (13:2:5; v/v/v) に溶解し、投与量1及び10mg/kgを耳静脈から注入ポンプを用いて注入した。

試験結果：平均血圧、心拍数、大腿動脈血流、呼吸数及び心電図においてペンフレセート1mg/kg静脈内投与では溶媒投与群との間に差異が認められなかったが10mg/kgを投与すると平均血圧及び呼吸数において、それぞれ溶媒投与群と比較して軽度かつ一過性の低下あるいは増加を生じた。

3. 摘出回腸に及ぼす影響

試験動物：Hartley系モルモット、雄5匹、体重300～441g

試験方法：回腸を摘出し、95%O₂ + 5%CO₂ ガス通気下でTyrode液を満たした浴槽中に懸垂し、回腸収縮を張力トランスデューサを介して測定した。

収縮薬としてアセチルコリン(Ach) $3.0 \times 10^{-7} M$ 、ヒスタミン(His) 9.0×10^{-7} あるいは BaCl₂ $2.0 \times 10^{-5} M$ を用いて収縮させ、安定した

収縮が得られた後、溶媒(エタノール)あるいは検体(浴槽内最終濃度 3×10^{-8} 、 $\times 10^{-7}$ 、 $\times 10^{-6}$ 、 $\times 10^{-5}$ g/ml)を適用し、各収縮薬による収縮への影響を検討した。また、検体を直接作用させてその影響を検討した。

試験結果：検体 $3 \times 10^{-8} \sim 3 \times 10^{-6}$ g/mlは摘出回腸の筋緊張度に影響しなかった。 3×10^{-5} g/mlは単独で摘出回腸の収縮を15例中1例に引き起こした(BaCl₂による収縮の約50%)。

ACh、His及びBaCl₂ 収縮に及ぼす検体の作用は 3×10^{-5} g/mlで溶媒(エタノール)と比べて、いずれの収縮薬も有意の収縮抑制を認めた。

標本洗浄後には収縮薬の反応は回復した。

4. 腸管輸送能に及ぼす影響

試験動物：ICR系マウス、1群雄8匹、体重20～24g

試験方法：検体を0.5% CMC+0.04%Tween 80溶液に懸濁し、投与量250、500、1000mg/kgを強制経口投与した。陽性対照としてアトロピン20mg/kgを静脈注射した。検体投与1時間後あるいはアトロピン投与直後に10%アラビアゴムに懸濁した5%炭末液 0.2ml/動物を経口投与した。その20分後に屠殺して胃腸管を取り出し、幽門から結腸末端までの全腸及び炭末移動長を測定し、移動度を算出した。

試験結果：検体250、500、1000mg/kg投与群のいずれもその炭末移動度に影響が認められなかった。陽性対照群では炭末移動度が有意に低下した。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

5. 神経筋接合部に及ぼす作用

試験動物：Wistar系ラット、雄5匹、体重375～501g

試験方法：横隔膜神経筋標本を作成し、95%O₂+5%CO₂ガス通気下でKrebs-Henseleit液を満たした浴槽に懸垂した。約1時間の平衡後、電気刺激装置により、横隔膜神経に刺激を与え、筋収縮を張力トランスデューサを介して測定した。筋収縮が安定してから、溶媒(エタノール)及び検体を 3×10^{-7} 、 $\times 10^{-6}$ 、 $\times 10^{-5}$ g/mlの濃度で作用させ、筋収縮への影響を検討した。また、横隔膜筋に直接刺激を与え、同様に試験を行った。

試験結果：神経刺激による筋収縮に対して、検体 3×10^{-7} 及び $\times 10^{-6}$ g/mlは影響を与えなかった。 3×10^{-5} g/mlでは処理後1分以降において溶媒に比べて有意に収縮増強が認められた。標本洗浄後に収縮はほぼ回復した。筋直接刺激による収縮に対し、検体 3×10^{-5} g/mlは影響を与えなかった。

6. 血液凝固系に及ぼす影響

試験動物：Wistar系ラット、1群 雄5匹、体重175～200g

試験方法：検体を0.5% CMC+0.04%Tween 80に懸濁し、投与量1000及び2000mg/kgを経口投与した。投与後1時間に麻酔下で腹部大静脈より採血し、クエン酸ナトリウムを加え遠心分離後、血漿を分離した。血漿トロンビン時間、プロトロンビン時間及び部分活性トロンボプラスチン時間を測定した。なお、対照群には用いた溶媒を投与し、同様にして測定した。

試験結果：検体投与による血漿トロンビン時間、プロトロンビン時間及び部分活性トロンボプラスチン時間のいずれにおいても、対照群との差は認められなかった。

7. 溶血作用

試験動物：日本白色ウサギ

試験方法：クエン酸添加ウサギ全血に、精製水、溶媒(1%エタノール生理食塩水)あるいは、検体を最終濃度が0.02及び0.2mg/mlになるように溶媒に溶解したものを添加・混合し、37℃で30分間加温後、遠心分離した。その上清液を採取し、その吸光度を測定し溶血率を求めた。

試験結果：ウサギ全血と検体を混合した場合、溶媒と比較して殆ど変化せず、溶血性はないものと判断された。

以上の結果より、ペンフレセートは1000mg/kg以上の高用量の投与で中枢興奮性の症状を発現させたが、症状の回復は速やかであった。また、呼吸・循環器系、運動感覚神経系、自律神経系への影響は弱く、血液凝固系への影響や溶血作用は認められなかった。

次頁に試験の総括表を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

生体に及ぼす影響に関する試験の総括

試験項目	試験動物	1群当り動物数	投与方法、投与量 (mg/kg) 及び溶媒	無作用量 (mg/kg)	作用量 (mg/kg)	結果の概要
一般状態に及ぼす影響 (Irwin 改変法)	マウス	♂ 5	経口 62.5、125、250、500、1000、2000 (0.5%CMC + 0.04%Tween80)	—	62.5	高投与量で中枢興奮性症状を示すが、速やかに回復
呼吸・循環器に及ぼす影響	ウサギ (麻醉下)	♂ 5	静注 1、10 (ホリエレンゲリコール + エタノール + 生食水)	1	10	10mg/kgで血圧、呼吸数の軽度かつ一過性的な変化が認められた
摘出回腸に及ぼす影響	モルモット	♂ 5	(in vitro) 3×10^{-8} 、 3×10^{-7} 、 3×10^{-6} 、 3×10^{-5} (g/ml) (エタノール)	3×10^{-6} (g/ml)	3×10^{-5} (g/ml)	3×10^{-5} g/ml 各収縮作用を有意に抑制
腸管輸送能に及ぼす影響	マウス	♂ 8	経口 250、500、1000 (0.5%CMC + 0.04%Tween80)	1000	—	影響認められず
神経筋接合部に及ぼす作用	ラット	♂ 8	(in vitro) 3×10^{-7} 、 3×10^{-6} 、 3×10^{-5} (g/ml) (エタノール)	3×10^{-6} (g/ml)	3×10^{-5} (g/ml)	神経刺激による収縮を 3×10^{-5} g/mlで増強。筋直接刺激による収縮には影響認められず
血液凝固系に及ぼす影響	ラット	♂ 5	経口 1000、2000 (0.5%CMC + 0.04%Tween80)	2000	—	影響認められず
溶血作用	ウサギ	♂ 5	(in vitro) 0.02、0.2 (g/ml) (1%エタノール生食水)	0.2 (g/ml)	—	影響認められず

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

2 混在物及び代謝物

(1) 混在物及び植物代謝物

のラットを用いた急性経口毒性試験

(毒性資料No. 混代-1)

試験機関：Huntingdon Research Centre Ltd.
[GLP]

報告書作成年：1992年

供試化合物：混在物

検体の純度：

試験動物：SD系ラット、1群雌雄各5匹、4～6週齢
体重 雄117～135g、雌114～134g

試験期間：14日間観察

試験方法：検体をコーンオイルに懸濁・調製し1600、3200、5000及び6400mg/kgの用量を強制経口投与した。なお、投与の前日の夜と投与後4時間は、飼料を与えなかった。

観察項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、投与後 8及び15Hに体重を測定した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	1600、3200、5000、6400
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	♂♀ > 5000
死亡開始時間 及び終了時間	1時間 8日
症状発現及び 消失時間	5分 15日
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ —
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ 1600

3200mg/kg以上の群の雌雄に死亡が認められた。死亡は投与後 1時間から8日の間にみられた。投与後5分以内に全ラットに立毛がみられ、以降に嗜眠、呼吸数の減少、四肢蒼白、唾液分泌亢進及び運動失調などがみられた。

5000mg/kg群の雌雄各1匹は試験の終了時まで症状が持続したが、他の動物では3日～10日の間に回復した。

終了時の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(2) 代謝物 のラットを用いた急性経口毒性試験

(毒性資料No. 混代-2)

試験機関：Huntingdon Research Centre Ltd.
[GLP]

報告書作成年：1992年

供試化合物：代謝物

検体の純度：

試験動物：SD系ラット、1群雌雄各5匹、4～6週齢
体重 雄121～136g、雌117～125g

試験期間：14日間観察

試験方法：検体を蒸溜水を用いて50% w/vの濃度に調製し、5000mg/kgの用量を強制経口投与した。なお、投与の前日の夜と投与後4時間は飼料を与えなかった。

観察項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、投与後 8及び15日に体重を測定した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	♂♀ > 5000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び 消失時間	5分 2日
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ -
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ > 5000

死亡は認められなかった。

投与後 5分以内に立毛がみられ、これは1日中持続した。

2日目には症状は回復した。

3匹の雄の 8日目の体重増加量のみが僅かに低かった。

終了時の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(3) 混在物 のラットを用いた急性経口毒性試験

(毒性資料No. 混代-3)

試験機関：Huntingdon Research Centre Ltd.
[GLP]

報告書作成年：1992年

供試化合物：混在物

検体の純度：

試験動物：SD系ラット、1群雌雄各5匹、4～6週齢
体重 雄121～127g、雌114～127g

試験期間：14日間観察

試験方法：検体を蒸留水を用いて50% w/vの濃度に調製し、5000mg/kgの用量を強制経口投与した。なお、投与前日の夜と投与後4時間は、飼料を与えなかった。

観察項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、投与後 8及び15日に体重を測定した。死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	♂♀ > 5000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び 消失時間	5分 3日
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ -
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ > 5000

死亡は認められなかった。投与後5分以内に立毛がみられ、以降は異常姿勢、異常歩行が全ラットに、また嗜眠、呼吸数の減少が1匹の雄に認められた。3日目には回復した。

体重増加量の軽度の減少が8日目の雄の4匹にのみ認められた。終了時の剖検では異常は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(4) 混在物及び植物代謝物

の細菌を用いた復帰変異性試験

(毒性資料No. 混代-4)

試験機関：Huntingdon Research Centre Ltd.

[GLP]

報告書作成年：1992年

供試化合物：混在物

検体の純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 Salmonella typhimurium (TA1535、TA1537、TA1538、TA98及びTA100) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 Escherichia coli (CM881 WP2, CM891 WP2) を用い、S-9mixの存在下及び非存在下で検体をDMSOに溶解した。

5000 μ g/プレートまでの濃度を用いた予備試験では、CM881及びCM891の菌株に毒性が認められたことから、突然変異試験ではサルモネラ菌株は5000 μ g/プレート、CM881及びCM891には1500 μ g/プレートを最高濃度とした。

他に500、150、50及び15 μ g/プレートの濃度を用いた。

陽性対照としてS-9mixの非存在下ではN-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG)、2 nitrofluorene (NF)、9-aminoacridine (9AC) 及びS-9mixの存在下では2-aminoanthracene (AA) を用いた。

同様な処理による試験を2回行った。

試験結果：次頁に結果の表を示す。

混在物及び植物代謝物NC 27897をジメチルスルホキシドに溶解し、最高5000 μ g/プレートまでの濃度で試験を行ったところ、2回の試験ともS-9mixの有無にかかわらず、いずれの用量で処理した場合にも全ての菌株について復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、混在物及び代謝物NC 27897は本試験条件下ではサルモネラ菌及び大腸菌に対し、復帰変異を誘発しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験 1

(平均値;n=3)

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	CM881	CM891
溶媒対照 (DMSO)		—	22	105	8	13	68	212
混在物 NC 27897	0	—	21	106	7	13	78	218
	15	—					80	214
	50	—	24	96	9	9	81	212
	150	—	22	97	10	14	77	207
	500	—	21	91	8	18	59	174
	1500	—	23	91	6	17	54	176
	5000	—	21	81	5	10		
陽性対照	2.0	—					1198	1261
ENN G	3.0	—		343				
	5.0	—			202			
N F	1.0	—	159					
9 A C	80.0	—				*		
溶媒対照 (DMSO)		+	26	115	14	16	85	194
混在物 NC 27897	0	+	30	118	9	15	73	194
	15	+					75	191
	50	+	29	111	14	12	69	222
	150	+	31	103	8	16	75	183
	500	+	25	98	13	16	62	195
	1500		25	90	9	13	55	133
	5000	+	21	84	9	15		
陽性対照 A A	0.5	+	258					
	1.0	+		843				
	2.0	+			279	190		
	20.0						440	1212

ENN G ; N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

NF ; 2-nitrofluorene

9AC ; 9-aminoacridine

AA ; 2-aminoanthracene

* ; コロニー数多く計数不能

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験 2

(平均値;n=3)

化合物	濃度 (μ g/プレート)	S-9mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	CM881	CM891
溶媒対照 (DMSO)		—	25	97	9	9	50	233
混在物 NC 27897	0	—	25	96	9	13	63	231
	15	—		97			61	252
	50	—	25		10	9	55	224
	150	—	25	100	11	10	51	242
	500	—	22	118	11	7	45	219
	1500	—	18	109	—	14	17	95
	5000	—	—	**	**	**		
陽性対照	2.0	—					*	1115
E N N G	3.0	—		361				
	5.0	—			876			
N F	1.0	—	150					
9 A C	80.0	—				*		
溶媒対照 (DMSO)		+	30	89	10	12	49	268
混在物 NC 27897	0	+	28	111	12	12	70	227
	15	+					77	241
	50	+	21	115	12	6	61	247
	150	+	28	113	8	12	52	204
	500	+	24	113	10	10	62	225
	1500	+	18	104	7	11	17	84
	5000	+	—	—	**	—		
陽性対照 A A	0.5	+	158					
	1.0	+		417				
	2.0	+			81	52		
	20.0	+					150	1113

ENNG ; N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

NF ; 2-2-nitrofluorene

9AC ; 9-aminoacridine

AA ; 2-aminoanthracene

— ; 細菌ローン不完全

* ; コロニー数多く計数不能

** ; 細菌ローンなし

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(5) 代謝物 の細菌を用いた復帰変異性試験

(毒性資料No. 混代-5)

試験機関：Huntingdon Research Centre Ltd.
[GLP]

報告書作成年：1992年

供試化合物：代謝物

検体の純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 Salmonella typhimurium (TA1535、TA1537、TA1538、TA98及びTA100)及びトリプトファン要求性の大腸菌 Escherichia coli (CM881 WP2、CM891 WP2)を用い、S-9mixの存在下及び非存在下で検体をDMSOに溶解した。

5000 μ g/プレートまでの濃度を用いた予備試験で毒性は認められなかったことから、突然変異試験では5000 μ g/プレートを最高濃度とした。

他に1500、500、150及び50 μ g/プレートの濃度を用いた。

陽性対照としてS-9mixの非存在下では、

N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG)、2 nitrofluorene (NF)、9 aminoacridino (9AC) 及びS-9mixの存在下では2-aminoanthracene (AA)を用いた。

同様な処理による試験を2回行った。

試験結果：次頁に結果の表を示す。

代謝物NC 20696をジメチルスルホキシドに溶解し、最高5000 μ g/プレートまでの濃度で試験を行ったところ、2回の試験ともS-9mixの有無にかかわらず、いずれの用量で処理した場合にも全ての菌株について復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、代謝物NC 20696は本試験条件下ではサルモネラ菌及び大腸菌に対し、復帰変異を誘発しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験 1

(平均値;n-3)

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	CM881	CM891
溶媒対照 (DMSO)		—	22	105	8	13	68	212
代謝物 NC 20696	0	—	21	106	7	13	78	218
	50	—	26	102	10	12	66	216
	150	—	22	99	9	14	71	194
	500	—	20	95	7	14	73	197
	1500	—	25	90	7	15	73	201
	5000	—	19	104	8	15	64	204
陽性対照 E N N G	2.0	—					1198	1261
	3.0	—		343				
	5.0	—			202			
N F	1.0	—	159					
9 A C	80.0					*		
溶媒対照 (DMSO)		+	26	115	14	16	85	194
代謝物 NC 20696	0	+	30	118	9	15	73	194
	50	+	34	106	12	13	73	197
	150	+	32	118	9	14	70	191
	500	+	27	111	10	14	79	195
	1500	+	33	111	10	14	77	207
	5000	+	27	103	11	15	70	175
陽性対照 A A	0.5	+	258					
	1.0	+		843				
	2.0	+			279	190		
	20.0	+					440	1212

ENNG ; N-ethyl N' nitro-N-nitrosoguanidine

NF ; 2-nitrofluorene

9AC ; 9-aminoacridine

AA ; 2-aminoanthracene

* ; コロニー数多く計数不能

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験 2

(平均値:n=3)

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	CM881	CM891
溶媒対照 (DMSO)		-	25	97	9	9	50	233
代謝物 NC 20696	0	-	25	96	9	13	63	231
	50	-	22	114	7	11	76	243
	150	-	21	100	13	14	59	237
	500	-	23	101	14	11	55	226
	1500	-	23	87	11	10	61	209
	5000	-	20	113	10	8	51	168
陽性対照	2.0	-					*	1115
ENN G	3.0	-		361				
	5.0	-			876			
N F	1.0	-	150					
9 A C	80.0	-				*		
溶媒対照 (DMSO)		+	30	89	10	12	49	268
代謝物 NC 20696	0	+	28	111	12	12	70	227
	50	+	28	124	13	13	61	238
	150	+	25	106	13	11	71	222
	500	+	26	109	14	9	63	226
	1500	+	24	94	13	11	55	247
	5000	+	19	119	11	9	58	139
陽性対照 A A	0.5	+	158					
	1.0	+		417				
	2.0	+			81	52		
	20.0	+					150	1113

ENN G ; N ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

NF ; 2-nitrofluorene

9AC ; 9-aminoacridine

AA ; 2-aminoanthracene

* ; コロニー数多く計数不能

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(6) 混在物 の細菌を用いた復帰変異性試験

(毒性資料No. 混代 6)

試験機関：Huntingdon Research Centre Ltd.

[GLP]

報告書作成年：1992年

供試化合物：混在物

検体の純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA1538、TA98及びTA100)及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (CM881 WP2, CM891 WP2)を用い、S-9mixの存在下及び非存在下で検体をDMSOに溶解した。

5000 μ g/プレートまでの濃度を用いた予備試験で毒性は認められなかったことから、突然変異試験では5000 μ g/プレートを最高濃度とした。

他に1500、500、150及び50 μ g/プレートの濃度を用いた。

陽性対照として、S-9mixの非存在下ではN-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG)、2 nitrofluorene (NF)、9-aminoacridine (9AC) 及びS-9mixの存在下では2-aminoanthracene (AA)を用いた。

同様な処理による試験を2回行った。

試験結果：次頁に結果の表を示す。

混在物NC 24001をジメチルスルホキシドに溶解し、最高5000 μ g/プレートまでの濃度で試験を行ったところ、2回の試験ともS-9mixの有無にかかわらず、いずれの用量で処理した場合にも全ての菌株について復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、混在物NC 24001は本試験条件下ではサルモネラ菌及び大腸菌に対し、復帰変異を誘発しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験 1

(平均値;n=3)

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/7\text{v-t}$)	S-9mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	CM881	CM891
溶媒対照 (DMSO)			22	105	8	13	68	212
混在物 NC 24001	0	—	21	106	7	13	78	218
	50	—	21	109	11	13	77	207
	150	—	22	100	6	11	73	190
	500	—	22	102	9	15	70	187
	1500	—	23	92	12	11	59	211
	5000	—	20	99	9	10	47	176
陽性対照 E N N G N F 9 A C	2.0	—					1198	1261
	3.0	—		343				
	5.0	—			202			
	1.0	—	159					
9 A C	80.0	—				*		
溶媒対照 (DMSO)		+	26	115	14	16	85	194
混在物 NC 24001	0	+	30	118	9	15	73	194
	50	+	23	119	10	16	74	206
	150	+	30	120	12	14	70	194
	500	+	26	121	8	16	78	203
	1500	+	32	98	11	11	73	224
	5000	+	31	95	14	12	40	156
陽性対照 A A	0.5	+	258					
	1.0	+		843				
	2.0	+			279	190		
	20.0	+					440	1212

ENNG ; N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

NF ; 2-nitrofluorene

9AC ; 9-aminoacridine

AA ; 2-aminoanthracene

* ; コロニー数多く計数不能

本資料に記載された情報に係る権利及び責任の内容はパイエルクロップサイエンス株式会社にある。

試験 2

(平均値;n=3)

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9mix	復帰変異コロニー数/プレート					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	CM881	CM891
溶媒対照 (DMSO)		-	25	97	9	9	50	233
混在物 NC 24001	0	--	25	96	9	13	63	231
	50	--	22	113	9	12	68	249
	150	-	24	104	10	10	64	214
	500	-	26	99	13	11	44	239
	1500	-	25	108	7	14	43	197
	5000	-	18	134	9	12	31	96
陽性対照	2.0	-					*	1115
	E N N G	3.0	-		361			
		5.0	--			876		
	N F	1.0	-	150				
	9 A C	80.0	-				*	
溶媒対照 (DMSO)		+	30	89	10	12	49	268
混在物 NC 24001	0	+	28	111	12	12	70	227
	50	+	24	112	14	12	73	249
	150	+	29	118	13	13	62	257
	500	+	28	113	13	10	55	258
	1500	+	26	116	12	15	36	235
	5000	+	23	117	9	12	30	86
陽性対照	0.5	+	158					
	A A	1.0	+		417			
		2.0	+			81	52	
		20.0	+					150

ENNG ; N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

NF ; 2-nitrofluorene

9AC ; 9-aminoacridine

AA ; 2-aminoanthracene

* ; コロニー数多く計数不能

3 製 剤

(1) ラットを用いた2% 粒剤の急性経口毒性試験

(毒性資料No. 製剤-1)

試 験 機 関 : Huntingdon Research Centre
[G.L.P.]

報告書作成年 : 1992年

検 体 の 純 度 : ベンフレセート 2% 粒剤

ベンフレセート 2%

鉱物質微粉等 98%

試 験 動 物 : SD系ラット、1群雌雄各5匹、4~7週齢

開始時体重 112~136g

試 験 期 間 : 14日間観察

試 験 方 法 : 蒸溜水を用いて50%濃度(w/v)の懸濁液を調製し、5000mg/kgを強制経口投与した。なお、投与の前日の夜と投与後4時間は飼料を与えなかった。

観 察 項 目 : 中毒症状及び生死を14日間観察し、体重を投与直前、8及び15日に測定した。

試験終了後、全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試 験 結 果 :

投 与 方 法	経 口
投 与 量 (mg/kg)	♂♀ 5000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	♂♀ > 5000
死 亡 開 始 時 間 及 び 終 了 時 間	死亡例なし
症 状 発 現 及 び 消 失 時 間	5分以内 1日
毒 性 徴 候 の 認 め ら れ な かつ た 最 高 投 与 量 (mg/kg)	♂♀ -
死 亡 例 の 認 め ら れ な かつ た 最 高 投 与 量 (mg/kg)	♂♀ 5000

全てのラットに立毛がみられた。この症状は 2日以降は回復した。

8日目に雌3匹の体重増加量の抑制がみられたが、その後は順調な増加がみられた。その他のラットに異常は認められなかった。

剖検ではいずれの異常も認められなかった。

(2) マウスを用いた 2% 粒剤の急性経口毒性試験

(毒性資料No. 製剤 2)

試験機関：Huntingdon Research Centre

[GLP]

報告書作成年：1992年

検体の純度：ベンプレセート 2% 粒剤

ベンプレセート 2%

鉱物質微粉等 98%

試験動物：ICRマウス、1群雌雄各5匹、4～7週齢

開始時体重 15～21g

試験期間：14日間観察

試験方法：蒸留水を用いて50%濃度(w/v)の懸濁液を調製し、5000mg/kgを強制経投与した。なお、投与の前日の夜と投与後4時間は飼料を与えなかった。

観察項目：中毒症状及び生死を14日間観察し、体重を投与直前、8及び15日目に測定した。

試験終了後、全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂♀ 5000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	♂♀ > 5000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び 消失時間	5分以内 1日
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ —
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ 5000

全てのマウスに立毛、異常姿勢及び四肢の蒼白がみられた。

これらの症状は 2日以降は回復した。

期間中十分な体重増加を示した。剖検ではいずれの異常も認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(3) ラットを用いた 2% 粒剤の急性経皮毒性試験 (毒性資料No. 製剤-3)

試験機関：Huntingdon Research Centre

[GLP]

報告書作成年：1992年

検体の純度：ベンフレセート 2% 粒剤

ベンフレセート 2%

賦物質微粉等 98%

試験動物：SD系ラット、1群雌雄各5匹、7～10週齢

開始時体重 200～244g

試験期間：14日間観察

試験方法：ラットの背腰部を刈毛し、5cm×5cmの部位に蒸留水で100% w/vの濃度に調製した検体を塗布し、ガーゼ、包帯を用いて固定した。処理24時間後に包帯を外し、残った検体を洗浄除去した。

処理部位の皮膚の観察と共に、中毒症状及び生死を14日間観察した。

処理開始前、8及び15日目に体重を測定した。試験終了後、全生存動物について肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	♂♀ 2000
LD ₅₀ 値 (mg/kg)	♂♀ > 2000
死亡開始時間 及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び 消失時間	認められず
毒性徴候の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ -
死亡例の認められ なかった最高投与量 (mg/kg)	♂♀ 2000

毒性症状は認められず、また処理部位の刺激及び皮膚変化も認められなかった。

軽度な体重減少が1匹の雌の8日目に、また軽度な体重増加抑制が2匹の雄と1匹の雌の8日目及び4匹の雄と2匹の雌の15日目にみられたが、これ以外の動物は通常の体重増加を示した。

剖検による肉眼的異常は認められなかった。

(4) 2%粒剤のラットを用いた急性吸入毒性試験

(毒性資料 No. 製剤-4)

試験成績の提出除外

本薬についての吸入毒性試験成績は、「「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)の運用について」の「第4 試験成績の提出の除外について」(2)③のイの規定により提出除外にあてはまる。

[除外根拠]

本剤はくん蒸剤、くん煙剤等当該農薬の成分物質を気化させて使用する農薬以外の農薬である。

このようなことから、急性吸入毒性試験の提出は不要であると判断した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(5) ウサギを用いた2% 粒剤の皮膚一次刺激性試験

(毒性資料No. 製剤-5)

試験機関：Huntingdon Research Centre
[GLP]

報告書作成年：1992年

検体の純度：ベンフレセート 2% 粒剤

ベンフレセート 2%

鉱物質微粉等 98%

試験動物：New Zealand White系ウサギ、雌6匹

9~12週齢、入荷時体重2.2~2.6kg

試験期間：4日間観察

試験方法：0.5gの検体を刈毛した背部皮膚に処理し、0.5mlの蒸留水で湿らせたガーゼパッド(2.5cm×2.5cm)で覆い、包帯で固定した。

4時間の暴露終了後、包帯を除去し残っている検体を微温湯で洗浄した。

試験項目：検体除去後30分、1、2及び3日目に処理部位の刺激性変化を観察した。

試験結果：観察した刺激性変化の評価は下表の通りである。

(判定基準は農薬の安全性評価に関する基準、皮膚反応の評価によった。

最高評点は紅斑・痂皮 4、浮腫 4)

動物 番号	項目	最高 評点	暴露後時間			
			30~60分	1日	2日	3日
1	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
4	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
5	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
6	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	12	0	0	0	0
	浮腫	12	0	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

いずれの観察時期においても刺激性は認められなかった。

以上の結果から、ベンフレセート原体はウサギの皮膚に対し刺激性を示さないものと考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(6) ウサギを用いた2% 粒剤の眼粘膜一次刺激性試験 (毒性資料No. 製剤-6)

試験機関：Huntingdon Research Centre
[GLP]
報告書作成年：1992年

検体の純度：ベンフレセート 2% 粒剤
ベンフレセート 2%
賦物質微粉等 98%

試験動物：New Zealand White 系ウサギ、雌 6匹
約10～13週齢、体重 2.5～2.8kg

試験期間：7日間観察

試験方法：粒剤を供試前に微粉化し、この検体の約100mgを眼瞼内に処理し、1秒間軽く閉じた。他方の眼を対照とした。
処理後1時間及び1、2、3、4及び7日に角膜、虹彩及び結膜に生じた刺激反応を観察した。

試験結果：刺激性変化の評価は下表の通りである。

(判定基準は農薬の安全性評価に関する基準、眼の反応の評価による。)

項目	最高 評点	処 理 後 時 間					
		1時間	1日	2日	3日	4日	
動物 番号 1	角 膜	4	*	0	0	0	0
	虹 彩	2	0	0	0	0	0
	結 膜 発 赤	3	2	1	1	0	0
	結 膜 浮 腫	4	1	1	1	0	0
動物 番号 2	角 膜	4	*	0	0	0	0
	虹 彩	2	0	0	0	0	0
	結 膜 発 赤	3	2	1	1	0	0
	結 膜 浮 腫	4	1	1	1	0	0
動物 番号 3	角 膜	4	*	0	0	0	0
	虹 彩	2	0	0	0	0	0
	結 膜 発 赤	3	2	1	1	0	0
	結 膜 浮 腫	4	1	1	1	0	0
動物 番号 4	角 膜	4	*	0	0	0	0
	虹 彩	2	0	0	0	0	0
	結 膜 発 赤	3	2	1	1	0	0
	結 膜 浮 腫	4	1	1	1	0	0
動物 番号 5	角 膜	4	*	0	0	0	0
	虹 彩	2	0	0	0	0	0
	結 膜 発 赤	3	2	1	1	0	0
	結 膜 浮 腫	4	1	1	1	0	0
動物 番号 6	角 膜	4	*	0	0	0	0
	虹 彩	2	0	0	0	0	0
	結 膜 発 赤	3	2	1	1	0	0
	結 膜 浮 腫	4	1	0	0	0	0
合 計	角 膜	24	*	0	0	0	0
	虹 彩	16	0	0	0	0	0
	結 膜 発 赤	18	12	6	6	0	0
	結 膜 浮 腫	24	6	5	5	0	0
平 均	角 膜	24	*	0	0	0	0
	虹 彩	16	0	0	0	0	0
	結 膜 発 赤	18	2.0	1.0	1.0	0	0
	結 膜 浮 腫	24	1.0	0.8	0.8	0	0

* 一過性の濁り

結膜発赤の陽性反応が、処理後1時間に全動物に認められたが、全ての反応は処理後3日目には回復した。

以上の結果から、ベンフレセート2% 粒剤はウサギの眼に対して軽度の刺激性を示すものと考えられた。

(7)モルモットを用いた2% 粒剤の皮膚感作性試験

(毒性資料No. 製剤-7)

試験機関：Huntingdon Research Centre
[GLP]

報告書作成年：1992年

検体の純度：ベンフレセート 2% 粒剤
ベンフレセート 2%
鉱物質微粉等 98%

試験動物：Dunkin Hartley系モルモット、1群 雌10匹
約6~7週齢、開始時体重 386~517g

試験期間：72時間観察

試験方法：(Buehler 法)

予備試験を行い、本試験に用いる検体濃度を感作相及び惹起相とも蒸溜水による70%(w/w)調製液とした。陽性対照のホルマリンについては従来の知見にもとづき、感作相は蒸溜水による30%(v/v)濃度、惹起相は蒸溜水による15%(v/v)濃度の溶液とした。

感作：刈毛した左肩の部分に0.5mlの上記70%w/w調製液及び30%ホルマリン溶液を20mm×20mmの3層のガーゼに飽和させて6時間の感作処理を行った。この皮膚反応を24時間後に調べた。この処理を1日、8日及び15日の3回行った。対照群は賦形剤のみを同様に処理した。

惹起：最終感作処理終了の2週間後に70%w/w調製液を用い、惹起処理を行った。刈毛した右腹側部に感作処理と同じ方法で処理を行い、6時間固定した後皮膚反応を評価した。

試験結果：感作、惹起のいずれにおいても対照群、試験群とも皮膚反応は全く認められなかった。一方、陽性対照群は、軽度ないし中等度の皮膚反応がみられた。

(最高評点は紅斑・痂皮4、浮腫4)

群		処理後時間		
		24時間	48時間	72時間
対照群 (10匹)	紅斑	0	0	0
	浮腫	0	0	0
検体 (10匹)	紅斑	0	0	0
	浮腫	0	0	0
陽性対照試験				
対照群 (10匹)	紅斑	0	0	0
	浮腫	0	0	0
陽性対照 (10匹)	紅斑			
	平均評点	2.1	1.8	1.8
	評点1	2/10	2/10	2/10
	評点2	5/10	8/10	8/10
	評点3	3/10	0	0
浮腫				
	平均評点	0.3	0.3	0.2
	評点1	3/10	3/10	2/10

分母は試験動物数、分子は皮膚反応のみられた動物数を示す。

以上の結果、ベンフレセート2% 粒剤はモルモットに対し皮膚感作性はないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。】

IX 動植物及び土壌等における代謝分解

<代謝分解試験一覧表>

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
運命 1	<u>動物体内運命 (排泄・分布)</u>	ラット (雌雄各 5/群)	¹⁴ C エチル標識体 投与量: 10mg/kg 体重 投与方法: ・単回経口投与 ・非標識体 14 日間反復経口投与後に単回経口投与	投与放射能の尿及び糞を介した体外への排泄は速やかであった。 主要排泄経路は、投与量、投与回数及び投与方法を問わず尿であった。	Schering Agrochemicals Ltd. 研究所 (英国) (1988 年)	運命-7
運命 2		ラット (雌雄各 5/群)	¹⁴ C エチル標識体 投与量: 1000mg/kg 体重 単回経口投与			
運命 3		ラット (雌雄各 5/群)	¹⁴ C エチル標識体 投与量: 10mg/kg 体重 単回静脈内投与			
運命 4	<u>動物体内運命 (臓器・組織内分布、血漿中放射能濃度半減期)</u>	ラット (雌雄各 18/群)	¹⁴ C フェニル標識体 投与量: 10mg/kg 体重及び 1000mg/kg 体重 単回経口投与	低投与量群: 消化管を除く臓器・組織では、雌雄とも腎臓及び肝臓に高い放射能濃度が認められた。臓器・組織からの放射能消失は速やかであった。 高投与量群: 消化管を除く臓器・組織では、腎臓 (雄) 及び脂肪 (腎周辺) (雌) に高い放射能濃度が認められた。血漿中放射能濃度半減期は雄 33.79 時間及び雌 27.90 時間であった。	Schering Agrochemicals Ltd. 研究所 (英国) (1991 年)	運命-11
運命 5	<u>動物体内運命 (代謝)</u>	ラット (雌雄各 5/群)	¹⁴ C エチル標識体 投与量: 10mg/kg 体重 (低投与量) 及び 1000mg/kg 体重 (高投与量) 投与方法: ・単回経口投与 (低及び高投与量) ・非標識体 14 日間反復経口投与後に単回経口投与 (低投与量) ・単回静脈内投与 (低投与量)	代謝物として が認められた。 主要代謝物は であった。	Schering Agrochemicals Ltd. 研究所 (英国) (1988 年)	運命-16

注: 下線 部 (二重線) の試験成績は、残留農薬安全性評価委員会及び食品衛生調査会で評価済である。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。!

<代謝分解試験一覧表> (続き)

資料 No.	試験の種類	供試動物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
運命 6	動物体内運命 (薬物動態パラメータ)	ラット (雌雄各 5/群)	¹⁴ C エチル標識体 投与量: 10mg/kg 体重 (低投与量) 及び 1000mg/kg 体重 (高投与量) 投与方法: ・単回経口投与 (低及び高投与量) ・非標識体 14 日間反復経口投与後に単回経口投与 (低投与量) ・単回静脈内投与 (低投与量)	低投与量単回経口投与時の吸収率はほぼ 100% と考えられた。 経口投与後、ペンフレセートは消化管から吸収され、肝初回通過効果を受けた後に全身に循環すると考えられた。 単回経口投与時の血漿中放射能の半減期は、低投与量: 3~4 時間及び高投与量: 5~6 時間であった。 クリアランス (CL) に投与量、投与回数及び投与方法による差は認められなかった。	Schering Agrochemicals Ltd. 研究所 (英国) (1988 年)	運命-20
運命 7	動物体内運命 (排泄・代謝)	マウス (雌雄各 3/群)	¹⁴ C エチル標識体 投与量: 10mg/kg 体重 (低投与量) 及び 1000mg/kg 体重 (高投与量) 単回経口投与	ラットと同様、尿及び糞を介した体外への排泄は速やかであり、主要排泄経路も尿であった。 代謝物として が認められた。 主要代謝物は であった。	Schering Agrochemicals Ltd. 研究所 (英国) (1988 年)	運命-26
運命 8	植物体内運命	稲	¹⁴ C フェニル環標識体 処理量: 1kg 有効成分/ha 湛水処理	稲体内に取り込まれた放射能は上方に移行し、主として茎葉に分布した。 玄米への放射能移行性は小さかった。 玄米及び藁での主要放射性成分は、それぞれペンフレセート [A] 及び であった。	Schering Agrochemicals Ltd. 研究所 (英国) (1992 年)	運命-29

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。!

<代謝分解試験一覧表> (続き)

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
運命 9	土壌中運命	土壌 (砂壤土 及び シルト質 植壤土)	¹⁴ C フェニル環標識体 処理量: 1kg 有効成分/ha ・好氣的湛水土壌中運命 ・好氣的土壌中運命 ・好氣的前培養後の好氣的 湛水土壌中運命 処理量: 1kg 有効成分/ha, 10kg 有効成分/ha (分解 物同定用)	<u>好氣的湛水土壌中運命:</u> ベンフレセートの分解は 緩慢であり、半減期 (DT50) は 300 日であっ た。主要分解物として放射 性二酸化炭素が認められ、 その他に有意な生成量を 示した単一分解物は無か った。また二酸化炭素の発 生を伴う鉱化反応には、お よそ 100 日間の遅滞期が あると考えられた。 <u>好氣的土壌中運命:</u> ベンフレセートの分解は 速やかであり、半減期 (DT50) は 18~20 日であ った。培養初期から土壌結 合型残留の形成及び放射 性二酸化炭素の生成が認 められた。放射性二酸化炭 素以外に有意な生成量を 示した単一分解物は無か った。 <u>好氣的前培養後の好氣的 湛水土壌中運命:</u> ベンフレセートの半減期 (DT50) は 50 日であった。	Schering Agrochemicals Ltd. 研究所 (英国) (1992 年)	運命-37
運命 10	土壌中運命	土壌 (砂壤土)	¹⁴ C フェニル環標識体 処理量: 0.6kg 有効成分/ha ・滅菌土壌及び非滅菌土壌 における好氣的湛水土 壌中運命	滅菌土壌でのベンフレセ ートの分解は極めて緩慢 であり、ベンフレセートの 土壌中分解への微生物の 関与が考えられた。	Schering Agrochemicals Ltd. 研究所 (英国) (1992 年)	運命-45
運命 11	加水分解運命	緩衝液 (pH4, 7, 9)	¹⁴ C フェニル環標識体 OECD ガイドライン No.111 (予備試験) 試験温度: 50℃ 培養期間: 5 日	何れの pH においてもベン フレセートの分解は認め られなかった。	RCC Ltd. (スイス) (2000 年)	運命-50

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。!

<代謝分解試験一覧表> (続き)

資料 No.	試験の種類	供試動植物等	試験項目・試験方法等	試験結果の概要	試験機関 (報告年)	記載頁
運命 12	水中光分解 運命	滅菌緩衝液(pH 7) 及び 滅菌合成自然水 (1%フミン酸溶液)	¹⁴ C フェニル環標識体 光強度: 4.3W/m ² (測定波長域: 290~320nm) 試験濃度: 45mg/L (共存溶媒としてアセ トニトリル 1%含有)	ベンフレゼートは滅菌緩 衝液及び合成自然水中で 光分解を受け、実験条件 での半減期 (D150) はそ れぞれ 7.4 日及び 6.7 日 であった。 分解物として放射性二酸 化炭素が認められ、有意な 生成量を示した単一分解 物は認められなかった。	Schering AG 研究所 (一般 物理化学部) (英国) (1992 年)	運命-53
環 1	土壌吸着性	国内 4 種土壌 (1 種類は火山灰 土壌)	非標識体 試験濃度: 0.0503, 0.181, 0.752 及び 3.66µg/mL 振とう時間: 16 時間	土壌 No. K Koc' I 1.28 190 II 5.97 490 III 2.56 160 IV 5.00 120	財団法人 化学 品 検査協会 (1991 年)	運命-59
環 2	土壌吸着・ 脱着性	土壌 4 種類 (日本土壌 1 種 類、米国土壌 3 種 類)	¹⁴ C フェニル環標識体 試験濃度: 0.01, 0.1, 1.0, 5.0µg/g 振とう時間: 24 時間	吸着性 K : 0.776~9.20 Koc' : 140~259 脱着性 Kdes : 0.29~8.9(日本土 壌)、0.25~4.1 (イリ ノイ土壌)、0.30~11.2 (ミネソタ土壌) 及び 0.03~2.1 (ノースカロ ライナ土壌)	NOR-AM Chemicals 社 研究所 (米国) (1991 年)	運命-61

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。↓

試験実施機関

Schering Agrochemicals Ltd.研究所：	Schering Agrochemicals Ltd. Chesterford Park Research Station Saffron Walden, Essex, CB10 1XL, 英国
NOR-AM Chemicals 社環境化学部：	NOR-AM Chemicals Company Environmental Science Department Route 2, Country Road 1324 Pikeville, NC 27863 米国
RCC Ltd.：	RCC Ltd. Environmental Chemistry & Pharma-analytics Division CH-4452, Itingen スイス
Schering AG 研究所： (一般物理化学部)	Schering AG General Physical Chemistry D-1000 Berlin 65 Muellerstrasse 178 ドイツ
財団法人 化学品検査協会：	財団法人 化学品検査協会 東京事業所 東京都墨田区東向島 4-1-1

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

<代謝分解物一覧表>

記号	由来	略称 (名称)	化学名	構造式
A	親化合物	バンフレセート	2,3-ジヒドロ-3,3-ジメチルベンゾフラン -5-イル-エタンスルホナート 2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran-5-yl ethanesulfonate	

