

2) イヌを用いた1年間反復経口投与毒性試験

(毒性資料 No. 原体-19)

試験機関：バイエル コーポレーション 毒性研究所 (米国)

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年4月5日

検体純度：

試験動物：ビーグル犬、試験開始時4～6ヶ月齢、1群雌雄各4匹

投与期間：1年間 (1992年11月～1993年11月)

試験方法：検体を0、50、200、800ppmとなるよう飼料に混餌した。

5

週目から最高用量を600ppmに変更した。飼料は毎日一定量を与え1年間飼育した。試験開始前及び試験期間中定期的に各検査を実施した。

用量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；動物の健康状態を毎日一回観察した。

死亡例はみられなかった。全投与群において投与による影響は認められなかった。

体重変化；体重を週に1回測定した。

体重増加量はいずれの投与群とも対照群と統計学的に有意な差を示さなかった。

*：

摂餌量；摂餌量を毎日記録した。

いずれの投与群も対照群と同等であった。

検体摂取量；1日当たりの検体摂取量(mg/kg/日)は以下の通りであった。

投与量(ppm)	雄	雌
0	-	-
50	1.48	1.43
200	5.90	8.65
600	20.96	20.19

眼科学検査；試験開始前及び試験終了直前に実施した。

全投与群において投与による影響は認められなかった。

心電図検査及び血圧測定；試験開始前、試験開始後3、6、9ヶ月及び試験終了直前に実施した。

全投与群において投与による影響は認められなかった。

臨床神経学的検査；試験開始前及び試験終了直前に実施した。

全投与群において投与による所見は認められなかった。

血液学的検査；試験開始前、投与後3、6、9ヶ月及び試験終了直前(12ヶ月後)に頸静脈から採血し、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、白血球数、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、血小板数、網状赤血球数、ハインツ小体、活性化部分トロンボプラスチン時間、血液沈降速度、メトヘモグロビン、白血球分画、赤血球形態

いずれの投与群にも投与に起因したと考えられる変動は認められなかった。

対照群と比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

性別	雄											
	3ヶ月			6ヶ月			9ヶ月			12ヶ月		
検査月	ppm			ppm			ppm			ppm		
項目	50	200	600	50	200	600	50	200	600	50	200	600
白血球数	↓86		↓78	↓82		↓76						
MCHC		↓99	↓99									

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの
↓: p<0.05 (ANOVAとt-検定による)

血液生化学的検査；全動物は採血前に一晩絶食させた。試験開始前、投与後3、6、9ヶ月及び試験終了直前(12ヶ月)に頸静脈から採血し、血清を用いて以下の項目を検査した。

血糖、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アルカリホスファターゼ (AP)、乳酸脱水素酵素、クレアチンキナーゼ、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP)、トリヨードサイロニン (T_3)、サイロキシニン (T_4)、トリヨードサイロニンの取り込み、ビリルビン、コレステロール、トリグリセリド、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、塩素 (Cl)、無機リン (P)、マグネシウム (Mg) 更に赤血球中のプロトポルフィリンIX及び血漿コリンエステラーゼを測定した。

600ppm 群雄で 6、9、12 ヶ月目に有意な増加がみられた ALAT は投与の影響と考えられた。

その他の項目では、用量および測定時期に関連した増加が認められなかったため、散見された統計学的に有意な数値は投与の影響とは考えられなかった。

対照群と比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

性別	雄														
	検査月			3ヶ月			6ヶ月			9ヶ月			12ヶ月		
項目	ppm			50	200	600	50	200	600	50	200	600	50	200	600
K							↓ 89								
Cl							↓ 97 ↓ 98								
血糖							↓ 85								
コレステロール				↑ 123 ↑ 134											
クレアチンキナーゼ													↑ 153		
ALAT							↑ 170			↑ 178			↑ 174		
γ -GTP				↓ 50											
総ビリルビン													↑ 200		
T_3 取り込み				↓ 93			↓ 93 ↓ 93								
性別	雌														
Na				↑ 102											
クレアチニン				↑ 111 ↑ 111											
γ -GTP													↑ 140		
Mg				↓ 80											
T_3 取り込み				↓ 96 ↓ 92											

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑ ↓ : $p < 0.05$ (ANOVA と t-検定による)

検体の影響と考えられた数値を下線で示した

特殊生化学的検査；試験終了時に摘出した肝臓でチトクロム P-450、N-デメチラーゼ、O-デメチラーゼ、7-エトキシマリンデエチラーゼ (ECOD)、7-エトキシレゾルフィンデエチラーゼ (EROD)、アルドリンエポキシダーゼ (ALD)、エポキシドヒドロラーゼ (EH)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GS-T)、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UDP-GT)、プロトポルフィリンIX、トリグリセリドについて測定した。更に、胆汁中のプロトポルフィリンIXも測定した。

600ppm 群雌雄、200ppm 群雌で薬物代謝酵素活性の有意な増加が認められ、また、600ppm 群雄でプロトポルフィリンIXの増加が認められたが、いずれも背景データの範囲内であった。従って、これらの変化は生物学的に有意なものとは考えられなかった。

対照群と比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

項目	性別 ppm	雄			雌		
		50	200	600	50	200	600
ECOD				↑ 347 ⁺	↑ 200 ⁺	↑ 228 ⁺	
ALD		↑ 191 ⁺		↑ 150 ⁺			
EH		↑ 149 ⁺		↑ 171 ⁺			↑ 155 ⁺
GS-T				↑ 120 ⁺			
肝臓内のプロトポルフィリンIX				↑ 263 ⁺			

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑ : p<0.05 (ANOVA と t-検定による) + : 背景データ範囲内の数値 (+/- 2SD)

尿検査；試験開始前、投与後 3、6、9 ヶ月及び試験終了直前（12 ヶ月）に 6 時間の蓄尿を用いて以下の項目を検査した。

尿量、比重、蛋白、糖、潜血、ビリルビン、ケトン体、ウロビリノーゲン、pH、亜硝酸塩、白血球及び沈渣

投与に起因する影響は認められなかった。

剖検；投与終了時に全動物について剖検を行った。

600ppm 群雌で胆のう粘膜の黒色化がみられた。

その他投与に起因した所見は認められなかった。

臓器重量；投与終了時に全動物について剖検を行い、以下の臓器重量を測定した。対体重比も算定した。

脳、心臓、肝臓、肺、脾臓、副腎、腎臓、甲状腺、精巣及び卵巣
雌の肝臓重量の変動を下表に示す。

項目	性別 ppm	雌		
		50	200	600
肝臓	実重量			
	対体重比		↑ 120	↑ 132

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑ : p<0.05 (ANOVA と t-検定による)

200 及び 600ppm 群雌の肝臓対体重比が有意に増加した。これらの変動は、実重量は有意でなかったこと、背景データの範囲内（ ）にあったこと、肝障害時逸脱酵素に生物学的に意味のある変動を認めなかったこと、病理組織形態学的な変化を示さなかったことから、投与によるものではないと考えられた。雄の臓器重量はいずれの投与群ともに対照群と有意な差を示さなかった。

[申請者注]

残留農薬安全性評価委員会において、200ppm 群以上の雌でみられたこの肝対

体重比の影響は、他の試験で肝臓に影響がみられていることから検体の毒性影響と評価された。

病理組織学的検査；投与終了時に各群の全動物について以下の臓器を病理組織学的に検査した。

副腎、大動脈、骨髄、骨（大腿骨、肋骨、胸骨）、精巢上体、食道、眼、胆のう、脳、心臓、腸（十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸）、腎臓、肝臓、肺、乳腺部、リンパ節（腸間膜、咽頭後方）、視神経、卵巣、膵臓、上皮小体、下垂体、前立腺、坐骨神経、骨格筋、皮膚、脾臓、胃、精巢、胸腺、甲状腺、気管、膀胱、子宮、関節（大腿脛骨）、脳（大脳、小脳、脳幹）、脊髄（頸部、胸部、腰部）、喉頭、鼻咽頭、唾液腺及びその他の異常組織。

600ppm 群雌の胆のうに粘膜拡張、分泌物の増加がみられた。これらの所見の生物学的な意味は不明であるが、胆汁の自然流動の変化に対する代償性反応であるとも考えられる。

50ppm 群雄の1例では皮膚の腫瘍が認められ、組織球腫と診断されたが、若齢犬で散発的にみられる腫瘍であった。

その他の所見は偶発的なものと考えられた。

以上の結果、600ppm 群雄におけるアラニンアミノトランスフェラーゼ活性の増加、200ppm 及び 600ppm 群雌における肝臓対体重比の増加から、無毒性量 (NOAEL) は、雄では 200ppm (5.90mg/kg/日)、雌では 50ppm (1.43mg/kg/日) と結論した。

[申請者注]

無毒性量の設定は残留農薬安全性評価委員会の評価に従ったものである。

主要な病理組織学的所見

臓器 所見	性別 ppm	雄				雌			
		0	50	200	600	0	50	200	600
【検査動物数】		4	4	4	4	4	4	4	4
副腎									
・空胞化		1	1	1	1	2	3	1	3
精巣上体									
・リンパ球浸潤		0	0	0	2	-	-	-	-
食道									
・リンパ球浸潤		0	0	0	0	1	0	0	1
胆のう									
・粘膜腺拡張		0	0	0	0	0	0	0	3
・リンパ球浸潤		1	1	3	2	2	2	2	3
・分泌物の増加		0	1	0	0	0	0	0	4
腎臓									
・慢性炎症		0	0	0	1	0	0	0	0
・リンパ球浸潤		2	4	4	4	4	4	3	4
肝臓									
・リンパ球浸潤		1	2	1	1	2	0	2	1
肺									
・慢性炎症		1	2	0	3	3	2	2	2
・リンパ球浸潤		0	0	0	0	0	1	0	0
上皮小体									
・のう胞		0	0	1	0	0	0	1	2
下垂体									
・のう胞		2	1	1	1	2	0	0	1
皮膚									
・組織球種		0	1	0	0	0	0	0	0
脾臓									
・色素沈着		0	0	1	0	0	1	1	1
・プラーク		1	0	0	0	1	0	0	0
精巣									
・萎縮		2	1	0	1	-	-	-	-
胸腺									
・のう胞		0	1	0	1	0	2	1	1
・萎縮		0	0	0	0	0	0	0	0
甲状腺									
・C-細胞過形成		2	3	0	1	2	2	0	0
・のう胞性ろ胞細胞過形成		1	0	0	0	0	0	0	0
子宮									
・うっ血		-	-	-	-	1	0	0	0
・過形成		-	-	-	-	0	0	0	1

χ^2 検定

(3) イヌを用いた1年間反復経口投与毒性試験

(毒性資料 No. 原体-20)

試験機関：バイエル コーポレーション 毒性研究所 (米国)
コロラドパソロジーサービス (米国) [病理]
[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年6月26日

検体純度：

試験動物：ビーグル犬、試験開始時4～6ヶ月齢、1群雌雄各4匹

投与期間：1年間 (1994年3月～1995年3月)

目的：別のイヌの1年間反復経口投与毒性試験(毒性資料 No. 原体-19)に加え、本検体による明らかな影響の情報を得るために行った。

試験方法：検体を0、1000、3000ppmの濃度で飼料に混餌した。飼料は毎日一定量を与え1年間飼育した。試験開始前及び試験期間中定期的に各検査を実施した。

用量設定根拠；

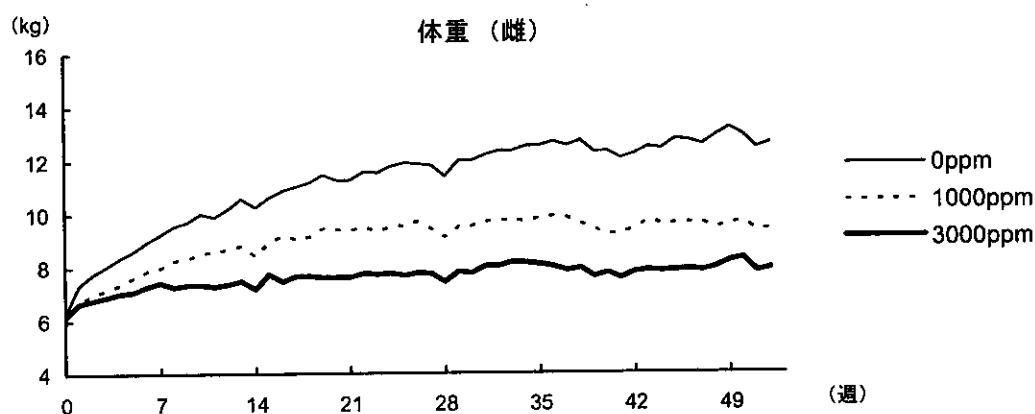
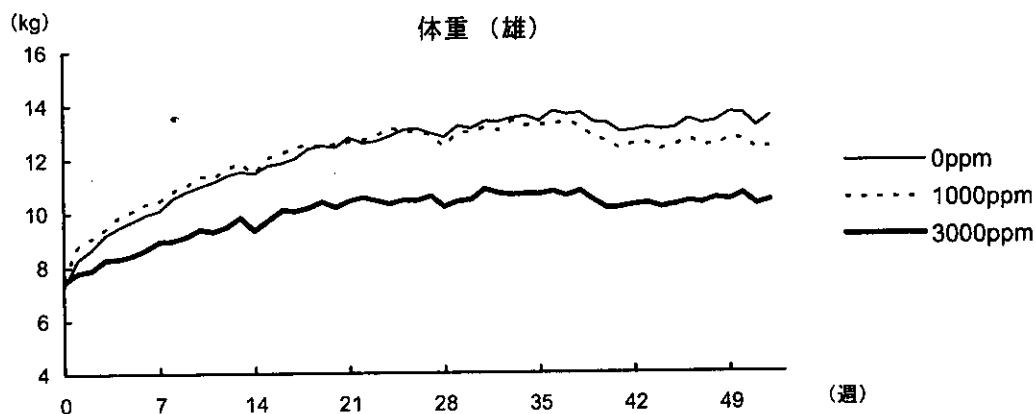
観察・検査項目及び結果：

一般状態及び死亡率；動物の健康状態を毎日一回観察した。

死亡は見られなかった。全投与群において投与による影響は認められなかった。

体重変化；体重を週に1回測定した。

1000及び3000ppm群雌で有意な低下(最高38%低下)、3000ppm群雄(最高24%低下)でも有意差は認められないが明らかな低下を認めた。



摂餌量；摂餌量を毎日記録した。

いずれの投与群雌雄とも対照群に比較して減少傾向にあった。

検体摂取量；1日当たりの検体摂取量(mg/kg/日)は以下の通りであった。

投与量(ppm)	雄	雌
0	-	-
1000	28.57	40.34
3000	97.83	79.64

眼科学検査；試験開始前及び試験終了直前に実施した。

全投与群において投与による影響は認められなかった。

心電図検査及び血圧測定；試験開始前、試験開始後6ヶ月及び試験終了直前に実施した。

1000及び3000ppm群雄でRAMPの増加が継続的にみられた。3000ppm群雄ではさらに試験終了時にQ-T間隔の延長も認められた。しかし、これらの変化は摂餌量の低下による筋肉組織での栄養学的な変化に関連するものと考えられた。

臨床神経学的検査；試験開始前及び試験終了直前に実施した。

全投与群において投与による影響は認められなかった。

血液学的検査；試験開始前、投与後 3、6、9 ヶ月及び試験終了直前（12 ヶ月後）に定期的に頸静脈から採血し、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、白血球数、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数、赤血球密度幅 (erythrocyte density width)、血色素濃度分布幅# (hemoglobin distribution width)、網状赤血球数、ハインツ小体、活性化部分トロンボプラスチン時間、血液沈降速度、白血球分画、赤血球形態

1000 及び 3000ppm 群雌雄で血小板数の有意な増加が認められた。同群雄の全測定時で有意差が認められないもののヘモグロビン量とヘマトクリット値の減少が認められ、貧血を示唆する所見であった。雌では貧血を示唆する変動は認められなかった。1000 及び 3000ppm 群雌雄に血色素濃度分布幅の増加がみられた。

対照群と比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

性別	雄								雌										
	検査月		3ヶ月		6ヶ月		9ヶ月		12ヶ月		3ヶ月		6ヶ月		9ヶ月		12ヶ月		
項目	ppm		1000	3000	1000	3000	1000	3000	1000	3000	1000	3000	1000	3000	1000	3000	1000	3000	
血小板数			↑142	↑141	↑151	↑157	↑141	↑144	↑139	↑136			↑128			↑140	↑158	↑128	↑156
赤血球数					↓91	↓86				↓87	↑108	↑110	↑113						
ヘモグロビン量						↓87							↑109						
ヘマトクリット量						↓88				↓89			↑111	↑110					
MCHC							↓96		↓96										
血色素濃度分布幅			↑133	↑124	↑130	↑117	↑135	↑125	↑130	↑115	↑130	↑136		↑126	↑124	↑128	↑128	↑156	
網状赤血球 (%)			↑200																
低色素性赤血球 (個) ^A									↑1										
単球 (%)											↑134				↑150		↓62		
好塩基球 (%)											↑150								

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑ ↓ : p < 0.05 (ANOVA と t-検定による)

A : 対照群が '0' のため実数で示している
検体の影響と考えられた数値を下線で示した

#血色素濃度分布幅：

血色素濃度からみた赤血球が分布する血色素濃度範囲の幅

血液生化学的検査；全動物を採血前に絶食させた。試験開始前、投与後 3、6、9 ヶ月及び試験終了直前（12 ヶ月）に頸静脈から採血し、血清を用いて以下の項目を検査した。

血糖、尿素、クレアチニン、尿酸、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アルカリホスファターゼ (AP)、乳酸脱水素酵素、クレアチンキナーゼ、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP)、コリンエステラーゼ、トリヨードサイロニン (T_3)、サイロキシシン (T_4)、トリヨードサイロニンの取り込み、総ビリルビン、直接ビリルビン、コレステロール、トリグリセリド、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、塩素 (Cl)、無機リン (P)、マグネシウム (Mg)、胆汁酸、血漿中のコリンエステラーゼ

1000、3000ppm 群雌雄で ALAT、ASAT、AP、 γ -GTP の肝臓由来の酵素活性が増加した。3000ppm 群雌雄でアルブミンの有意な低下がみられ、雄では総蛋白が有意に低下していた。3000ppm 群雌雄（雄では 1000ppm を含む）で総ビリルビンに統計的に有意でない増加が認められ、投与に起因した変化と考えられた。これらの変化から検体の肝臓に対する影響が示唆された。コリンエステラーゼ活性の有意な増加が 1000ppm 群雄、3000ppm 群雌雄で認められ、内因性肝臓酵素の非特異的誘導によるものと考えられた。甲状腺ホルモンについて、1000ppm と 3000ppm 群の雌雄で T_3 と T_4 の減少がみられた。この甲状腺ホルモンの変化は、イヌの 4 週間の反復経口投与毒性試験（毒性資料 No. 原体-12）において UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼの誘導がみられなないことが実証されたため、ラットの様に下垂体-甲状腺ホルモンの制御によるものではないものと考えられた。従って、イヌでみられた甲状腺ホルモンの変化は肝臓の UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼの誘導を介したものとは考えられず、体重増加抑制、低栄養状態、肝機能異常などの一般状態の悪化によるものと考えられた。

その他に投与に起因した変化は認められなかった。

対照群と比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

性別	雄								雌									
	検査月		3ヶ月		6ヶ月		9ヶ月		12ヶ月		3ヶ月		6ヶ月		9ヶ月		12ヶ月	
項目	ppm		1000	3000	1000	3000	1000	3000	1000	3000	1000	3000	1000	3000	1000	3000	1000	3000
クレアチニン							↓90	↓90										
尿酸																		
トリグリセリド																		
クレアチンキナーゼ																		
ASAT																		
ALAT																		
γ-GTP																		
AP																		
総ビリルビン																		
コリンエステラーゼ																		
総蛋白質																		
アルブミン																		
Ca																		
P																		
グロブリン																		
T ₄																		
T ₃																		

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑ ↓ : p < 0.05 (ANOVA と t-検定による) ↑ のない表中の数値は、統計学的に有意差なし
 検体の影響と考えられた数値を下線で示した

特殊生化学的検査；試験終了時に摘出した肝臓でチトクロム P-450、N-デメチラーゼ、O-デメチラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、プロトポルフィリンIX、トリグリセリドを測定した。

1000、3000ppm 群雌雄で N-デメチラーゼに増加傾向が認められ、投与の影響と考えられた。プロトポルフィリンIXは 1000、3000ppm 群雌雄で増加傾向を示し、3000ppm 群雌では統計的に有意に増加した。肝臓のトリグリセリドは 3000ppm 群雌で有意に増加した。

対照群と比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

性別	雄			雌		
	0	1000	3000	0	1000	3000
項目	ppm			ppm		
N-デメチラーゼ						
O-デメチラーゼ						
プロトポルフィリンIX (nmol/g)*						
トリグリセリド						

実測値を記載したプロトポルフィリンIXを除き、表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑ : p < 0.05 (ANOVA と t-検定による) ↑ のない表中の数値は、統計学的に有意差なし
 検体の影響と考えられた数値を下線で示した

尿検査；試験開始前、投与後 3、6、9 ヶ月及び試験終了直前（12 ヶ月）に 6 時間の蓄尿を用いて以下の項目を検査した。

尿の透明度と色調、比重、蛋白、糖、潜血、ビリルビン、ケトン体、ウロビリノーゲン、pH、亜硝酸塩、白血球及び沈渣

投与に起因する影響は認められなかった。

剖検；投与終了時に全動物について剖検を行った。

試験終了時の剖検で 1000 及び 3000ppm 群雌雄の肝臓の退色、雄の胆のうの暗色化、雌の臍部リンパ節の退縮がみられ、3000ppm 群の雄で脾臓の赤色化が観察された。

臓器重量；投与終了時に全動物について剖検を行い、以下の臓器重量を測定した。対体重比も算定した。

脳、心臓、肝臓、肺、脾臓、副腎、腎臓、下垂体、甲状腺、精巣及び卵巣

1000、3000ppm 群雌雄で肝臓の対体重比の有意な増加がみられた。これらの肝臓重量の増加は肝臓の生化学的所見や組織学的な所見と関連しているものと考えられた。3000ppm 群雌の卵巣の実重量の有意な低下が認められたが、摂餌量の低下による低栄養状態による生殖器官の性成熟の遅れによる二次的な作用と考えられた。

その他には投与の影響による変化は認められなかった。

対照群と比べ有意差の認められた臓器を下表に示す。

性別		雄		雌	
		1000	3000	1000	3000
項目	ppm				
最終体重	実重量	↓ 92	↓ 77	↓ 74	↓ 62
副腎	実重量				
	対体重比			↑ 130	↑ 150
心臓	実重量				
	対体重比				↑ 128
腎臓	実重量				
	対体重比			↑ 135	↑ 134
肝臓	実重量	↑ 117	↑ 120		
	対体重比	↑ 128	↑ 158	↑ 117	↑ 142
肺	実重量				
	対体重比			↑ 121	↑ 132
卵巣	実重量				↓ 32
	対体重比				
胸腺	実重量				
	対体重比				↑ 153
甲状腺	実重量			↓ 67	
	対体重比				

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑ ↓ : p < 0.05 (ANOVA と t-検定による)、検体の影響と考えられた数値を下線で示した。

病理組織学的検査；投与終了時に各群の全動物について以下の臓器を病理組織学的に検査した。

副腎、大動脈、骨髄（大腿骨）、骨（大腿骨、肋骨、胸骨）、精巣上体、食道、眼瞼、眼、涙腺、ファローピアン管、胆のう、心臓、腸（十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸）、腎臓、肝臓、肺、乳腺部、リンパ節（腸間膜、咽頭後方）、視神経、卵巣、膵臓、上皮小体、下垂体、前立腺、坐骨神経、骨格筋、皮膚、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、膀胱、子宮、脳（大脳、小脳、延髄）、関節、鼻咽頭、脊髄（頸部、胸部、腰部）、喉頭、唾液腺及びその他の異常組織

1000 及び 3000ppm 群の肝臓で肝障害（一部に細胞質好酸性封入体を伴った小葉中心性の肝細胞肥大を特徴とする）、胆管過形成、Kupffer 細胞の集合、単細胞壊死、褐色色素沈着（プロトポルフィリンIX）が認められた。1000、3000ppm 群雌雄の胆のうにおいて粘液腺ののう胞性拡張、慢性炎症、濃縮胆汁が認められた。3000ppm 群雄で脾臓のうっ血の増加が認められたが、対照群でも認められていることから、生物学的な意義は疑わしい。1000、3000ppm 群雌で膵部リンパ節での色素沈着は肝臓でみられたものと類似していた。

以上の結果、3000ppm 群で体重減少及びプロトポルフィリンIXの蓄積など明らかな肝障害を示唆する所見が認められたことから、3000ppm（雄：97.8mg/kg/日、雌：79.6mg/kg/日）は1年間投与での最大耐量と考えられた。

主要な病理組織学的所見

臓器 所見	性別 ppm	雄			雌		
		0	1000	3000	0	1000	3000
【検査動物数】		4	4	4	4	4	4
副腎							
・空胞化		0	0	0	0	1	0
大動脈							
・鉍質沈着		0	0	0	0	1	0
精巣上部							
・萎縮		0	1	0	0	0	0
胆のう							
・粘膜腺のう胞性拡張		0	1	3	0	2	0
・慢性炎症		0	0	1	0	1	1
・濃縮胆汁		0	2	3	0	2	0
腎臓							
・鉍質沈着		2	1	2	1	3	0
肝臓							
・肝障害*		0	2	2	0	1	2
・胆管過形成		0	0	0	0	0	2
・Kupffer 細胞集合		0	2	2	0	1	3
・単細胞壊死		0	2	2	0	1	3
・褐色色素沈着		0	2	4	0	1	3
・空胞変化		0	0	1	0	0	0
肺							
・うっ血		1	0	0	0	0	0
・線維化		0	1	0	0	0	0
・慢性間質性肺炎		0	2	0	2	0	0
腸間膜リンパ節							
・うっ血		0	0	0	1	0	1
膵部リンパ節							
・褐色色素沈着		0	0	0	0	1	2
乳腺							
・腺腔内分泌亢進		0	0	0	1	0	3
坐骨神経							
・軸索変性		1	0	1	0	0	0
下垂体							
・のう胞		2	1	1	1	1	0
脾臓							
・うっ血		1	2	4	1	2	1
・鉍質沈着		0	1	0	0	2	0
精巣							
・萎縮		0	1	0	0	0	0
・壊死		0	1	0	0	0	0
甲状腺							
・慢性炎症		1	2	0	0	0	0

χ^2 検定

*: 一部に細胞質好酸性封入体を伴った小葉中心性の肝細胞肥大

(4) マウスを用いた発がん性毒性試験

(毒性資料 No. 原体-21)

試験機関：バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)

ライフサイエンスリサーチ (英国) (病理)

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年4月19日

検体純度：

試験動物：B6C3F1系マウス、試験開始時5～6週齢、平均体重 雄21g、雌18g、
1群雌雄各50匹、中間屠殺用動物；1群雌雄各10匹(12ヵ月後に計画殺)

投与期間：24ヶ月(1991年1月～1993年2月)

試験方法：検体を0、400、1600及び6400ppmとなるように粉末飼料(1%のピーナツ
オイル添加)に混ぜ、24ヶ月間マウスに投与した。

用量設定根拠；

本試験では最高投与群の6400ppm群で体重が対照群に比べ雄で最高19%、
雌で最高16%低下し、最大耐量を超えていると判断されたため、84週目
に6400ppm群雌雄とも全例屠殺した。84週目までのこれらのデータは評
価の対象とした。しかし、病理組織学的検査を実施しなかった。

観察・検査項目及び結果：

一般症状及び死亡率；動物を少なくとも1日2回(週末と休日は1回)観察し、一
般症状及び異常を記録した。各個体の詳細な検査は週1回実施した。

6400ppm群では体重増加抑制がみられたが、その他の群では検体投与に関連し
た所見は認められなかった。

死亡率に投与の影響は認められなかった。

投与終了時(106週)の死亡数(%)を下表に示す。

投与群(ppm)		0	400	1600	6400*
死亡数	雄	5	18	11	6
	(%)	(10)	(36)	(22)	(12)
雌	13	14	9	8	
	(%)	(26)	(28)	(18)	(16)

*：84週目で全動物屠殺

体重変化；投与開始前から13週まで毎週、その後は2週間毎に体重を測定した。

6400ppm群雌雄で投与後2週目から増加抑制(最高差；雄19%,雌16%)がみられ、有意差が認められた。1600及び400ppm群雌雄では有意差が散見された週がみられたが、1600ppmと対照群との差は10%以内であり、また400ppmと対照群との差はわずかであり、最終体重では有意差は認められず、検体の影響とはみなさなかつた。

摂餌量；13週まで毎週1回、その後は4週間に1回測定した。

6400ppm群雌雄、1600ppm群雄で摂餌量の増加がみられた。
その他変化は認められなかつた。

検体摂取量；1日当たりの平均検体摂取量(mg/kg/日)は以下のとおりであった。

投与量(ppm)	雄	雌
400	98.8	147.9
1600	414.2	595.0
6400*	1955.3	2887.6

*：86週の屠殺までの期間

飲水量；飲水量を14週まで毎週1回、その後4週間に1回測定した。

投与の影響は認められなかつた。

血液学的検査；投与後12、18、24ヶ月目に各群10匹の動物について、エーテル麻酔下で眼窩静脈叢から採血し、以下の項目を検査した。

白血球百分率、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、平均赤血球容積(MCV)、血小板数及びトロンボプラスチン時間

1600、6400ppm群雄で血小板数の軽度増加(18ヶ月のみ有意差)が認められた。また1600、6400ppm群雄及び6400ppm群の雌で赤血球数及びヘマトクリットの軽度減少が認められた。6400ppm群雄でヘモグロビンの減少とトロンボプラスチン時間の延長が認められた。これらは検体の直接的な血液毒を示唆するものではなく、むしろ肝機能障害の二次的影響を示唆するものと考えられた。しかしながら一方で別に実施した2年間の発がん性試験(毒性資料No.原体-22)では1600ppm群で赤血球とヘマトクリットの軽度な増加、またトロンボプラスチン時間の軽度な短縮がみられていることから、1600ppmの雄でみられたこれらの変化は毒性学的に意味のある変化であるかは疑わしいものと考えられた。

400ppm群雌雄及び1600ppm群雌では、毒性学的に意味のある変化は認められなかつた。

対照群と比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

性別	雄							
	12ヶ月			18ヶ月			24ヶ月	
検査月								
項目	ppm			ppm			ppm	
	400	1600	6400	400	1600	6400	400	1600
白血球数			↓81	↑148	↑196	↑174		
赤血球数		↓97	↓95	↓96				
ヘモグロビン	↓99		↓96	↓96				
ヘマトクリット	↓97	↓96	↓96	↓96				
MCV					↑102	↑102		↑102
MCH					↑103			↑102
MCHC		↑102				↓97		
血小板数					↑113	↑117		
トロンボプラスチン時間						↑122		
単球(%)				↑250				
リンパ球(%)				↓92				
性別	雌							
白血球数		↑171						↓60
赤血球数	↓98		↓94			↓92		
ヘモグロビン		↑103						
ヘマトクリット			↓96					
MCV			↑104					
MCH		↑104	↑106	↑103		↑106		
MCHC		↑103	↑103		↑102	↑104	↓99	
血小板数					↑131			
トロンボプラスチン時間					↓96			
単球(%)		↑190						

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの

↑↓ : p<0.05, ↑↓ : p<0.01 (U検定による)、検体の影響と考えられた数値を下線で示した

血液生化学的検査；投与後12、18、24ヶ月目に各群10匹の動物について、エーテル麻酔下で眼窩静脈叢から採血し、以下の項目を検査した。尚、グルコース測定には無麻酔な条件で尾静脈から採血した。

アルカリホスファターゼ (AP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、総ビリルビン、総蛋白、尿素、クレアチニン、コレステロール、グルコース、トリグリセリド、アルブミン、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、塩素 (Cl) 及び無機リン (P)

6400ppm 群雌雄でアルブミン、総ビリルビン、尿素的減少、クレアチニンの軽度増加が認められた。1600ppm 群雌雄に ALAT、ASAT (雌)、AP、コレステロールの有意な増加また、総ビリルビン (雌)、尿素的減少 (雄) が認められた。これらの変化は、肝臓の蛋白合成障害を示唆しうるものであり、後述の肝臓重量の増加や肉眼及び病理組織学的検査 (小葉中心性肝細胞肥大、クッパー細胞色素沈着など) と関連していた。更に、6400ppm 群で電解質にいくつかの

有意差が見られ (P の増加 : 雄、Cl の減少 : 雌雄、Ca の減少 : 雄、K の減少 : 雌)、これは腎臓重量及び病理組織学的検査 (腎皮質尿細管空胞消退) などと関連していた。その他に認められた統計学的な有意差は、個体別結果が正常変動範囲内にあるか[

], 用量依存性が認められていないか、あるいは対照群の値が比較的低値 (雄 18 ヶ月) を示したことなどの理由により、投与による影響とは考えられなかった。

対照群と比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

性別	雄							
	12 ヶ月			18 ヶ月			24 ヶ月	
検査月	400	1600	6400	400	1600	6400	400	1600
項目 ppm								
ALAT		↑147	↑154					
AP					↑127	↑124		↑136
血糖	↑108	↑115	↑118					
コレステロール			↑138		↑146	↑160		
トリグリセリド			↓45					
クレアチニン			↑133			↑108		↑112
尿素		↓85	↓80					
総ビリルビン			↓79					
総蛋白	↓94	↓96						
アルブミン	↓94	↓93	↓92					
Ca						↓96		
Cl						↓98		
P			↑125					
性別	雌							
ASAT	↑131				↑155	↑148		
ALAT					↑190	↑190		↑149
AP								↑168
血糖							↓92	
コレステロール		↑123	↑196		↑109	↑166		↑120
クレアチニン				↑114		↑118		
尿素			↓83					
総ビリルビン		↓86	↓79		↓78	↓78		
総蛋白			↑105					
アルブミン			↓96			↓90		
Na	↑101		↑101			↑101		
K				↓91		↓84		
Ca					↑103		↓98	
Cl			↓97					↑102
P							↓86	

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの
 ↑ ↓ : p < 0.05, ↑ ↓ : p < 0.01 (U 検定による)、検体の影響と考えられた数値を 下線 で示した

剖検；途中死亡動物、中間屠殺動物及び最終屠殺動物の全動物を剖検した。

6400ppm 群は、最大耐量 (MTD) を超えることがわかったので 84 週で剖検した。これらの例では投与に起因した変化は認められなかった。

中間屠殺動物では、6400ppm 群雄の 5/10 例に肝肥大が認められた。その他の群では投与に起因する変化は認められなかった。また、切迫屠殺あるいは途中死亡動物についても投与に起因した異常所見は認められなかった。最終屠殺の剖検では、投与による肉眼的異常所見は認められなかった。

臓器重量；52、84 (6400ppm) 及び 106 週後の剖検時に以下の臓器重量を測定した。対体重比も算定した。

脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、副腎、脾臓及び精巣

1600 及び 6400ppm 群雌雄で肝臓重量及び対体重比の有意な増加が認められ、血液生化学及び組織学的変化を伴っていることから検体に起因した毒性影響と考えられた。

中間屠殺時に 6400ppm 群雌雄に腎臓重量の有意な低下がみられ、生化学的検査（電解質）及び病理組織学的変化と関連しており、投与の影響によるものと推察された。1600ppm 群にみられた腎臓重量の有意な低下は、血液生化学及び病理組織学的検査で明らかな影響が認められていないことから、毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。またその他の臓器で見られた有意な変化は、用量依存性が認められず、軽度であることなどの理由により毒性学的に意味のある所見とは考えられなかった。

[申請者注]

400ppm の雌でみられた肝重量の増加は、関連する病理組織学的所見を伴っていなかったが、本検体がラット、マウス、イヌに共通して肝に影響を及ぼすことから、安全性サイドに立ち毒性作用とみなした。

対照群と比べ有意差の認められた臓器を下表に示す。

性別		雄						雌					
検査週		中間屠殺 (52 週)			最終屠殺 (106 週)			中間屠殺 (52 週)			最終屠殺 (106 週)		
項目	ppm	400	1600	6400	400	1600	6400*	400	1600	6400	400	1600	6400*
脳	A												
	R												↓ 96
肺	A							↓ 87	↓ 87				
	R							↓ 86					
肝臓	A		↑ 116	↑ 179			↑ 153			↑ 167	↑ 109	↑ 122	↑ 166
	R		↑ 119	↑ 205			↑ 165			↑ 169	↑ 108	↑ 120	↑ 174
腎臓	A			↓ 79			↓ 91	↓ 92	↓ 92	↓ 88			
	R						↓ 93			↓ 91	↓ 90		↓ 95

臓器実重量 (A) および対体重比 (R) * : 84 週で屠殺、統計処理を実施していない。

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

検体の影響と考えられた数値を下線で示した。↑ ↓ : p < 0.05 (ANOVA 検定による)

病理組織学的検査；ライフサイエンスリサーチで以下の臓器について病理組織学的検査を行った。

副腎、大動脈、骨髄、脳、腸管（十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸）、眼球、精巣上部、大腿骨及び骨髄、胆のう、ハーダー氏腺、心臓、腎臓、涙腺、肝臓、肺、リンパ節（腸間膜及び顎下）、食道、卵巣、脾臓、下垂体、前立腺、唾液腺、坐骨神経、精のう、骨格筋、皮膚（乳腺）、脊髄（3部位）、脾臓、胸骨、胃、精巣、胸腺、甲状腺、上皮小体、舌、気管、膀胱、子宮、膣、肉眼的異常部位。

非腫瘍性病変

中間屠殺用動物

6400ppm 群雌雄で肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、多核肝細胞、クッパー細胞色素沈着、6400ppm 群雄の腎臓に尿細管上皮の空胞消退が認められた。その他の群では毒性学的に意味のある異常所見は認められず、自然発生性変化と考えられた。

認められた主な非腫瘍性病変を下表に示す。

項目	性別 投与量 (ppm)	雄				雌			
		0	400	1600	6400	0	400	1600	6400
検査動物数		10	9	10	10	10	10	10	10
肝臓									
小葉中心性肝細胞肥大		0c	0	0	7b	0	0	0	2
多核肝細胞		0c	0	0	9c	0c	0	0	10c
クッパー細胞色素沈着		0c	0	0	10c	0c	0	0	10c
肝細胞変性を伴う限局性炎症		0	0	0	1	2	0	0	1
炎症性浸潤を伴う限局性壊死		0	0	0	2	0	2	0	0
腎臓									
皮質尿細管上皮空胞消退		3B	3	6	10b	0	0	0	0

b : p < 0.01、 c : p < 0.001 (Fisher の直接確率検定)、

傾向検定 : B : p < 0.01、 C : p < 0.001 (Cochran-Armitage 法)

最終屠殺群用動物

1600ppm 群雄に多核肝細胞が認められた。認められた多核肝細胞はマウスを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験（毒性資料 No. 原体-13）でみられたものと同様に肝細胞壊死、核分裂像、肝細胞小増殖巣など他の病変を伴わない極めて保たれた肝実質内に特に好発部位も認められず散見された。核は円形または卵円形を呈し、一定の大きさで正常肝細胞の核との差は認められなかった。その他の所見については自然発生性変化と考えられた。

肝臓に認められた非腫瘍性病変を下表に示す。

項目	性別 投与量 (ppm)	雄			雌		
		0	400	1600	0	400	1600
検査動物数		49	48	50	49	49	49
限局性肝細胞過形成		1	0	0	0	0	0
多核肝細胞		0	0	3	0	0	0
限局性肝細胞好塩基性化		1	2	1	0	0	0
限局性肝細胞好酸性化		0	1	0	0	0	0
肝細胞の色素沈着		0	0	0	1	0	0
肝細胞変性を伴う限局性炎症		0	0	0	1	1	1
炎症性浸潤を伴う限局性壊死		1	2	1	2	1	3

Fisher の直接確率法、傾向性検定

腫瘍性病変

中間屠殺用動物

腫瘍性病変は認められなかった。

最終屠殺用動物

担腫瘍動物数、腫瘍総数、良性及び悪性腫瘍の発生頻度に投与の影響は認められなかった。また、腫瘍動物の経時的死亡時期にも用量に依存した影響はみられなかった。

最終屠殺群における良性及び悪性腫瘍を有する動物数

項目	性別 投与量 (ppm)	雄			雌		
		0	400	1600	0	400	1600
	動物数	50	50	50	50	50	50
死亡あるいは切迫屠殺動物							
検査動物数		5	18	11	13	14	9
腫瘍を有する動物数		1	3	9	10	12	4
良性腫瘍のみ有する動物数		0	1	0	0	0	0
悪性腫瘍のみ有する動物数		1	2	9	9	12	3
良性と悪性腫瘍を有する動物数		0	0	0	1	0	1
最終屠殺動物							
検査動物数		45	32	39	37	36	41
腫瘍を有する動物数		18	15	13	20	13	19
良性腫瘍のみ有する動物数		9	8	9	8	6	10
悪性腫瘍のみ有する動物数		6	5	4	12	5	6
良性と悪性腫瘍を有する動物数		3	2	0	0	2	3
全動物							
検査動物数		50	50	50	50	50	50
腫瘍を有する動物数		19	18	22	30	25	23
良性腫瘍のみ有する動物数		9	9	9	8	6	10
悪性腫瘍のみ有する動物数		7	7	13	21	17	9
良性と悪性腫瘍を有する動物数		3	2	0	1	2	4

腫瘍数

項目	性別	雄			雌		
	投与量 (ppm)	0	400	1600	0	400	1600
	動物数	50	50	50	50	50	50
良性		13	13	11	13	8	19
悪性		10	9	14	23	20	15
総数		23	24	25	36	28	34

以上の結果、1600ppm 群雌雄で肝臓関連酵素の有意な増加、肝臓重量の増加及び病理組織学的検査などに示される様に肝臓への影響が認められた。400ppm 群雌において肝臓重量の増加が認められたが、血液生化学検査及び病理組織学的検査結果と関連性が認められなかったため、投与の影響とは判断しなかった。

従って、本試験における無毒性量 (NOEL) は、雌雄共 400ppm (98.8mg/kg/日) と結論された。*

また、本検体は発がん性を有さないことが示唆された。

* [申請者注]

本検体の安全性評価では、ラット、マウス、イヌに共通して肝臓が標的臓器であることから、400ppm 群雌でみられた肝臓重量の増加を毒性的変化と判断し、本試験における無毒性量 (NOEL) を雄では 400ppm (98.8mg/kg/日)、雌では 2 回目の発がん性試験 (毒性資料 No. 原体-22) に基づき 50ppm (20.8mg/kg/日) とした。

また、6400ppm 群は最大耐量をはるかに超えていると判断され、84 週で屠殺したことにより、ガイドラインで要求されている用量反応相関が 3 投与量で評価できなかったことから、0、50、1600ppm での追加の発がん性試験を実施した (毒性資料 No. 原体-22)。

表 1 非腫瘍性病変:中間屠殺群 (死亡・切迫屠殺/中間屠殺動物) (マウス 1-1)

性別		雄				雌			
投与群 (ppm)		0	400	1600	6400	0	400	1600	6400
所見/動物数		4	2	1	4	3	2	1	3
死亡・切迫屠殺動物	肝臓								
	小葉中心性肝細胞肥大	0B	0	0	4a	0	0	0	0
	多核肝細胞	0A	0	0	3	0A	0	0	3
	クッパー細胞色素沈着	0B	0	0	4a	0A	0	0	3
	肝細胞変性を伴う限局性炎症	0	0	0	0	0	0	0	1
	炎症性浸潤を伴う限局性壊死	0	0	0	1	0	1	0	0
	腎臓								
	皮質尿細管上皮空胞消退	1	0	0	4	-	-	-	-
	皮質尿細管好塩基性化	0	0	0	1	1	0	0	0
	ハーダー氏腺								
	慢性炎症を伴う腺房変性/萎縮	0	0	0	2	0	0	0	0
	リンパ球浸潤	0	0	0	1	1	1	0	0
	脾臓								
	リンパ球集簇	1	0	0	1	1	1	0	0
動物	だ液腺								
リンパ球集簇	1	0	0	0	0	1	0	1	
盲腸									
リンパろ胞形成	2	0	0	0	0	0	0	0	
子宮									
内膜腺拡張	-	-	-	-	0	1	0	1	
所見/動物数		6	8	9	6	7	8	9	7
中間屠殺動物	肝臓								
	小葉中心性肝細胞肥大	0A	0	0	3	0	0	0	2
	多核肝細胞	0C	0	0	6b	0C	0	0	7c
	クッパー細胞色素沈着	0C	0	0	6b	0C	0	0	7c
	肝細胞変性を伴う限局性炎症	0	0	0	1	2	0	0	0
	炎症性浸潤を伴う限局性壊死	0	0	0	1	0	1	0	0
	小葉中心性脂肪空胞	2	0	1	0	0	1	0	0
	腎臓								
	皮質尿細管上皮空胞消退	2A	3	6	6	-	-	-	-
	皮質尿細管好塩基性化	0	3	2	0	0	1	0	0
動物	ハーダー氏腺								
慢性炎症を伴う腺房変性/萎縮	1	6	4	2	3	5	3	5	
リンパ球浸潤	1	0	1	2	1	1	1	1	

表1 非腫瘍性病変：中間屠殺群（中間屠殺動物/全動物） (マウス 1-2)

性別		雄				雌			
用量 (ppm)		0	400	1600	6400	0	400	1600	6400
所見/動物数		6	8	9	6	7	8	9	7
中間屠殺動物	だ液腺								
	リンパ球集簇	1	2	4	0	3	1	3	1
	盲腸								
	リンパろ胞形成	0	1	1	0	2	1	1	1
	十二指腸								
	リンパろ胞形成	0	2	1	0	-	-	-	-
	子宮								
内膜腺拡張	-	-	-	-	2	1	3	2	
所見/動物数		10	10	10	10	10	10	10	10
全動物	肝臓								
	小葉中心性肝細胞肥大	0C	0	0	7b	0	0	0	2
	多核肝細胞	0C	0	0	9c	0C	0	0	10c
	クッパー細胞色素沈着	0C	0	0	10c	0C	0	0	10c
	肝細胞変性を伴う限局性炎症	0	0	0	1	2	0	0	1
	炎症性浸潤を伴う限局性壊死	0	0	0	2	0	2	0	0
	小葉中心性脂肪空胞	2	0	1	0	0	1	0	0
	腎臓								
	皮質尿細管上皮空胞消退	3B	3	6	10b	-	-	-	-
	皮質尿細管好塩基性化	0	3	2	1	1	1	0	0
	ハーダー氏腺								
	慢性炎症を伴う腺房変性/萎縮	1	6a	4	4	3	5	3	5
	リンパ球浸潤	1	0	1	3	2	2	1	1
	脾臓								
	リンパ球集簇	1	0	1	1	1	1	0	0
	だ液腺								
	リンパ球集簇	2	2	4	0	3	2	3	2
	盲腸								
	リンパろ胞形成	2	1	1	0	2	1	1	1
	十二指腸								
	リンパろ胞形成	0	2	1	0	-	-	-	-
子宮									
内膜腺拡張	-	-	-	-	2	2	3	3	

有意差/ a: p<0.05、 b: p<0.01、 c: p<0.001 (Fisher 法)、
 有意な傾向/ A: p<0.05、 B: p<0.01、 C: p<0.001 (Cochran-Armitage 法)

表 1 非腫瘍性病変：最終屠殺群（死亡・切迫屠殺動物） (マウス 1-3)

性別		雄			雌		
		用量 (ppm)	0	400	1600	0	400
所見/動物数		5	18	11	13	14	9
死 亡 ・ 切 迫 屠 殺 動 物	副腎						
	限局性皮質肥大	1	1	1	0	0	0
	精巢上体						
	精子数減少	0	0	2	-	-	-
	ハーダー氏腺						
	慢性炎症を伴う腺房変性/萎縮	0	1	1	0	0	0
	腎臓						
	皮質尿細管上皮色素沈着	0	0	0	1	0	0
	皮質尿細管上皮蛋白滴	0	0	0	2	3	1
	肝臓						
	多核肝細胞	0	0	2	0	0	0
	炎症性浸潤を伴う限局性壊死	1	0	1	1	1	0
	小葉中心性脂肪空胞	0	1	0	1	0	0
	小葉中心性凝固壊死	0	0	0	1	1	0
	下垂体						
	限局性過形成	0	0	0	0	1	0
	前立腺						
	急性炎症	0	0	3	-	-	-
	脾臓						
	白脾髄過形成	1	2	0	0	0	0
髓外造血	0	0	2	2	3	1	
胸骨/骨髄							
骨線維症	0	0	0	6	4	1	
膀胱							
リンパ様過形成	0	0	0	1	1	0	
精巢							
精細管変性	0	0	2	-	-	-	
子宮							
内膜腺拡張	-	-	-	1	0	0	
卵巣							
のう胞	-	-	-	0	2	0	

有意差/ a: p<0.05 (Fisher 法)

有意な傾向/ A: p<0.05 (Cochran-Armitage 法)

表 1 非腫瘍性病変：最終屠殺群（最終屠殺動物） (マウス 1-4)

性別		雄			雌		
用量(ppm)		0	400	1600	0	400	1600
所見/動物数		45	32	39	37	36	41
最 終 屠 殺 動 物	副腎						
	限局性髄質過形成	0	0	1	2	0	1
	限局性皮質肥大	5	6	8	2	1	1
	精巢上体						
	精子数減少	1	2	3	-	-	-
	慢性炎症	1	1	2	-	-	-
	ハーダー氏腺						
	慢性炎症を伴う腺房変性/萎縮	3	5	4	1	1	3
	腎臓						
	皮質のう胞	1	2	2	0	0	0
	皮質尿細管上皮色素沈着	0	0	0	3	0	0
	皮質尿細管上皮変性	0	0	0	2	2	0
	リンパ球浸潤	0	0	0	0	1	2
	肝臓						
	限局性肝細胞過形成	1	0	0	0	0	0
	多核肝細胞	0	0	1	0	0	0
	限局性好塩基性化	1	2	1	0	0	0
	限局性好酸性化	0	1	0	0	0	0
	色素沈着	0	0	0	1	0	0
	肝細胞変性を伴う限局性炎症	0	0	0	1	1	1
	炎症性浸潤を伴う限局性壊死	0	2	0	1	0	3
	中心静脈周辺脂肪性空胞	1	1	0	4A	1	0
	下垂体						
	限局性過形成	0	1	0	7	7	7
	前立腺						
	急性炎症	0	0	0	-	-	-
	リンパ球浸潤	0	2	0	-	-	-
	脾臓						
白脾髄過形成	3A	5	9	3	6	7	
髄外造血	3	3	4	3	2	1	
胸骨/骨髄							
骨線維症	0	0	0	34	35	40	
膀胱							
リンパ様過形成	1	0	0	7A	1a	2	
精巢							
精細管変性	1	3	3	-	-	-	
子宮							
内膜腺過形成	-	-	-	6	4	2	
内膜腺拡張	-	-	-	11	12	15	
卵巣							
のう胞	-	-	-	16	11	12	

有意差/ a : p<0.05 (Fisher 法)

有意な傾向/ A : p<0.05 (Cochran-Armitage 法)

表1 非腫瘍性病変：最終屠殺群（全動物） (マウス 1-5)

性別		雄			雌		
用量 (ppm)		0	400	1600	0	400	1600
所見/動物数		45	32	39	37	36	41
全 動 物	副腎						
	限局性髄質過形成	0	0	1	2	0	1
	限局性皮質肥大	6	7	9	2	1	1
	精巣上体						
	精子数減少	1	2	5	-	-	-
	慢性炎症	1	1	2	-	-	-
	ハーダー氏腺						
	慢性炎症を伴う腺房変性/萎縮	3	6	5	1	1	3
	腎臓						
	皮質のう胞	1	2	2	0	0	0
	皮質尿細管上皮色素沈着	0	0	0	4A	0	0
	皮質尿細管上皮蛋白滴	0	0	0	2	3	1
	皮質尿細管上皮変性	0	0	0	2	2	0
	リンパ球浸潤	0	0	0	0	1	2
	肝臓						
	限局性肝細胞過形成	1	0	0	0	0	0
	多核肝細胞	0	0	3	0	0	0
	限局性好塩基性化	1	2	1	0	0	0
	限局性好酸性化	0	1	0	0	0	0
	色素沈着	0	0	0	1	0	0
	肝細胞変性を伴う限局性炎症	0	0	0	1	1	1
	炎症性浸潤を伴う限局性壊死	1	2	1	2	1	3
	小葉中心性脂肪空胞	1	2	0	5A	1	0
	小葉中心性凝固壊死	0	0	0	1	1	0
	下垂体						
	限局性過形成	0	1	0	7	8	7
	前立腺						
	リンパ球浸潤	0	2	0	-	-	-
	脾臓						
	白脾髄過形成	4	7	9	3	6	7
	髄外造血	3	3	6	5	6	2
	胸骨/骨髄						
骨線維症	0	0	0	40	39	41	
膀胱							
リンパ様過形成	1	0	0	8A	2a	2	
精巣							
精細管変性	1	3	5	-	-	-	
子宮							
内膜腺過形成	-	-	-	6	4	2	
内膜腺拡張	-	-	-	12	12	15	
卵巣							
のう胞	-	-	-	16	13	12	

有意差/ a: p<0.05 (Fisher 法)、有意な傾向/ A: p<0.05 (Cochran-Armitage 法)

表 2 腫瘍性病変：最終屠殺群（死亡・切迫屠殺動物） (マウス 2-1)

性別		雄			雌		
用量 (ppm)		0	400	1600	0	400	1600
所見/検査数		5	18	11	13	14	9
死 亡 ・ 切 迫 屠 殺 動 物	大腿骨・骨髄						
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	1	0	0
	ハートマン氏腺						
	腺腫 (良)	0	1	0	0	0	0
	肝臓						
	肝細胞癌 (悪)	0	1	3	0	0	0
	血管肉腫 (悪)	1	0	0	0	0	0
	胆管癌 (悪)	0	0	1	0	0	0
	肺・気管支						
	肺癌 (悪)	0	1	1	0	0	0
	卵巣						
	のう胞腺腫 (良)	-	-	-	1	0	0
	下垂体						
	腺腫 (良)	0	0	0	0	0	1
	骨格筋						
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	1	0	0
	脾臓						
	血管肉腫 (悪)	0	0	1	1	2	0
	子宮						
	平滑筋肉腫 (悪)	-	-	-	0	0	1
腺癌 (悪)	-	-	-	1	0	0	
造血器							
悪性リンパ腫 (悪)	0A	0	4	4	4	3	
組織球肉腫	0	0	0	2	5	0	
皮膚、他							
肉腫 (悪)	0	0	0	0	1	0	

有意な傾向/ A : p<0.05 (Cochran-Armitage 法)

表 2 腫瘍性病変：最終屠殺群（最終屠殺動物） (マウス 2-2)

	性別	雄			雌		
		用量 (ppm)	0	400	1600	0	400
所見/検査数		45	32	39	37	36	41
最 終 屠 殺 動 物	大腿骨・骨髄						
	血管腫 (良)	0	0	0	0	0	1
	ハーダー氏腺						
	腺腫 (良)	2	2	1	3	0	3
	癌 (悪)	0	1	0	1	0	0
	肝臓						
	肝細胞癌 (悪)	2	2	3	0	0	2
	血管肉腫 (悪)	0	1	0	0	0	0
	肝細胞腺腫 (良)	8	7	6	2	2	1
	血管腫 (良)	0	1	0	0	0	0
	肺・気管支						
	肺癌 (悪)	3	1	0	0	0	0
	肺腺腫 (良)	1	0	1	0	0	1
	卵巣						
	のう胞腺腫 (良)	-	-	-	0	0	2
	血管腫 (良)	-	-	-	0	1	0
	下垂体						
	腺腫 (良)	0	0	0	6	3	6
	脾臓						
	血管肉腫 (悪)	1	0	0	2	1	0
	血管腫 (良)	0	0	1	0	0	0
	子宮						
	平滑筋肉腫 (悪)	-	-	-	1	0	0
	腺癌 (悪)	-	-	-	1	1	0
	平滑筋腫 (良)	-	-	-	0	0	1
	造血器						
	悪性リンパ腫 (悪)	3	2	1	8	5	7
	組織球肉腫 (悪)	0	0	0	0	1	1
	副腎						
	褐色細胞腫 (良)	2	0	0	0	2	1
盲腸							
平滑筋腫 (良)	0	0	0	0	0	1	
胃							
扁平上皮乳頭腫 (良)	0	0	1	0	0	0	
精巣							
間細胞腫 (良)	0	2	0	-	-	-	
甲状腺							
ろ胞細胞腺腫 (良)	0	0	0	1	0	0	
傍ろ胞細胞腺腫 (良)	0	0	1	0	0	0	
傍ろ胞細胞腺癌 (悪)	0	0	0	0	0	1	
陰							
基底細胞腫 (良)	-	-	-	0	0	1	

有意な傾向/ A : p < 0.05 (Cochran-Armitage 法)

表 2 腫瘍性病変：最終屠殺群（全動物） (マウス 2-3)

性別		雄			雌		
		0	400	1600	0	400	1600
用量 (ppm)		0	400	1600	0	400	1600
所見/検査数		50	50	50	50	50	50
全動物	大腿骨・骨髓						
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	1	0	0
	血管腫 (良)	0	0	0	0	0	1
	ハーダー氏腺						
	腺腫 (良)	2	3	1	3	0	3
	癌 (悪)	0	1	0	1	0	0
	肝臓						
	肝細胞癌 (悪)	2	3	6	0	0	2
	血管肉腫 (悪)	1	1	0	0	0	0
	胆管癌 (悪)	0	0	1	0	0	0
	肝細胞腺腫 (良)	8	7	6	2	2	1
	血管腫 (良)	0	1	0	0	0	0
	肺・気管支						
	肺癌 (悪)	3	2	1	0	0	0
	肺腺腫 (良)	1	0	1	0	0	1
	卵巣						
	のう胞腺腫 (良)	-	-	-	1	0	2
	血管腫 (良)	-	-	-	0	1	0
	下垂体						
	腺腫 (良)	0	0	0	6	3	7
	骨格筋						
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	1	0	0
	脾臓						
	血管肉腫 (悪)	1	0	1	3	3	0
	血管腫 (良)	1	0	1	0	0	0
	子宮						
	平滑筋肉腫 (悪)	-	-	-	1	0	1
	腺癌 (悪)	-	-	-	2	1	0
	平滑筋腫 (良)	-	-	-	0	0	1
	造血器						
	悪性リンパ腫 (悪)	3	2	5	12	9	10
	組織球肉腫 (悪)	0	0	0	2	6	1
	皮膚、他						
	肉腫 (悪)	0	0	0	0	1	0
	副腎						
	褐色細胞腫 (良)	2	0	0	0	2	1
	盲腸						
	平滑筋腫 (良)	0	0	0	0	0	1
	胃						
	扁平上皮乳頭腫 (良)	0	0	1	0	0	0
精巣							
間細胞腫 (良)	0	2	0	-	-	-	
甲状腺							
ろ胞細胞腺腫 (良)	0	0	0	1	0	0	
傍ろ胞細胞腺腫 (良)	0	0	1	0	0	0	
傍ろ胞細胞腺癌 (悪)	0	0	0	0	0	1	
腫							
基底細胞腫 (良)	-	-	-	0	0	1	

有意な傾向/ A : p<0.05 (Cochran-Armitage 法)

(5) マウスを用いた発がん性毒性試験(低用量追加試験)

(毒性資料 No. 原体-22)

試験機関：バイエル社 毒性研究所(ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年6月29日

検体純度：

試験動物：B6C3F1系マウス、試験開始時5～6週齢、平均体重 雄22g、雌19g

1群雌雄各50匹(1600ppm群については10匹)

中間屠殺群；1群雌雄各10匹(12ヶ月に計画屠殺)

投与期間：24ヶ月(1992年9月～1994年9月)

試験方法：検体を0、50及び1600ppmとなるように粉末飼料(1%のピーナツオイル
添加)に混ぜ、24ヶ月間投与した。

用量設定根拠；

観察・検査項目及び結果：

一般症状及び死亡率；動物を少なくとも1日2回(週末と休日は1回)観察し、一般症状及び異常を記録した。各個体の詳細な検査は週1回実施した。

全投与群において、体表、開口部、一般行動、姿勢、呼吸及び排泄物に投与に関連した異常所見は認められなかった。

死亡率；全投与群の雌雄共に死亡率に影響は認められなかった。

体重変化；投与開始前から13週間週1回の間隔で、その後は2週間に1回全生存動物の体重を測定した。臓器の体重比重量の計算のため12及び24ヶ月目の計画屠殺直前に体重を測定した。

体重及び増体重については試験期間中、有意差が数回の測定時に認められたが、その変動はきわめて軽度であり全投与群雌雄共に対照群と同等であった。

摂餌量；摂餌量を各群 20 匹について個体毎に 13 週まで週 1 回の間隔で、その後は 4 週間に 1 回の間隔で測定した。

全用量群雌雄共毒性学的に関連性のある差は認められなかった。

検体摂取量；1 日当たりの検体摂取量 (mg/kg/日) を以下に示す。

投与量 (ppm)	雄	雌
0	-	-
50	13.6	20.8
1600	482.0	719.3

飲水量；14 週まで週 1 回、その後 106 週間まで 4 週間に 1 回の間隔で測定した。

全投与量群雌雄共に対照群と比較して差は認められなかった。

血液学的検査；各群ランダムに選抜した 10 例の動物について血液学的検査を 12、18、24 ヶ月で行った。エーテル麻酔下で、眼窩静脈叢から採取し以下の項目を検査した。

白血球百分率、赤血球形態、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、平均赤血球容積 (MCV)、血小板数及びトロンボプラスチン時間

1600ppm 群雄でみられた血小板の軽微な増加は、前述の別の発がん性試験 (毒性資料 No. 原体-22) の結果と一致しており検体の影響が示唆された。一方、同群雌雄で認められた赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリットの軽度増加及びトロンボプラスチン時間の短縮は、前述の試験において、1600ppm 以上の群と反対の傾向を示していることから、毒性的重要性はないと考えられた。白血球数の変動については、用量相関性がない (雌 18 ヶ月及び 24 ヶ月)、個体別結果が背景データ内[]にある (雄 24 ヶ月) または、白血球分画に対照群との差がないなどから、毒性学的に有意な影響とみなされなかった。

50ppm 群雌雄では投与に起因した影響は認められなかった。

対照群と比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

性別	雄						雌							
	検査月		12ヶ月		18ヶ月		24ヶ月		12ヶ月		18ヶ月		24ヶ月	
項目	ppm		50	1600	50	1600	50	1600	50	1600	50	1600	50	1600
白血球数														
赤血球数														
ヘモグロビン														
ヘマトクリット														
MCH														
MCHC														
血小板数														
トロンボプラスチン時間														
好酸球														

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したもの

↑ ↓ : p < 0.05, ▲ ▼ : p < 0.01 (U 検定による)

検体の影響と考えられた数値を下線で示した

血液生化学的検査；各群ランダムに選抜した 10 例の動物について血液生化学的検査を 12、18、24 ヶ月で行った。エーテル麻酔下で、眼窩静脈叢から採取し以下の項目を検査した。グルコース測定用には無麻酔下の非絶食動物の尾静脈より採血し除蛋白処理した。

アルカリホスファターゼ (AP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、総ビリルビン、総蛋白、尿素、クレアチニン、コレステロール、グルコース、トリグリセリド、アルブミン、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、クロリド (Cl) 及び無機リン (P)

1600ppm 群において認められたコレステロールの有意な増加は、後述の肝臓重量の増加とも関連し、検体による影響と考えられ、肝機能障害が示唆された。50ppm 群の雌においてもコレステロールに有意な増加が認められたが、個別別測定値が変動範囲内にあったことから () 毒性学的に有意な変化とは考えられなかった。

その他の項目で散見された統計学的有意差は、用量相関性や経時的関連性がないか、個別別測定値が変動範囲内[

]にあるか、または 1 例の異常な高値 (ALAT、24 ヶ月) によるものであり投与の影響とは考えられなかった。

対照群に比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

性別	雄						雌					
	12ヶ月		18ヶ月		24ヶ月		12ヶ月		18ヶ月		24ヶ月	
検査月	50	1600	50	1600	50	1600	50	1600	50	1600	50	1600
項目 ppm												
ASAT			↑130									
ALAT		↑141				↑201						↓78
血糖							↑124	↑119				
コレステロール		↑119		↑113		↑140	↓87				↑121	↑144
クレアチニン				↑118			↓71	↓62				↑161
尿素	↑112											↑118
総ビリルビン		↓79						↓80				
アルブミン										↓9		
総蛋白	↓94											
Na								↓99				
Cl		↓99										
P		↓85								↓6		

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの

↑↓ : p<0.05, ▲▼ : p<0.01 (U検定による)

検体の影響と考えられた数値を下線で示した

肝臓中の酵素活性の測定；各投与群、雌雄各5匹の投与後1年及び2年目の試験終了時に肝臓中のチトクロム P-450 依存モノオキシゲナーゼ[7-エトキシクマリンデエチラーゼ (ECOD)、7-エトキシレゾルフィンデエチラーゼ (EROD)、アルドリンエポキシダーゼ (ALD)]、エポキシドヒドロラーゼ (EH) 及び第II相酵素[グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GS-T)、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UDP-GT)]を測定した。

投与1年後の酵素活性；

1600ppm 群雌雄にモノオキシゲナーゼ (ECOD) の増加、雄で EH の増加が認められた。

50ppm 群雄ではモノオキシゲナーゼ活性の低下がみられたが、病理組織学的関連性は認められなかった。同群雌では EH 活性の有意な低下が見られたが標準偏差が小さいためであった。また UDP-GT の有意な増加が認められたが用量相関性が認められなかった。従って、これらの変化は、毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。

投与2年後の酵素活性；

1600ppm 群雄で ECOD の増加、同群雌で全てのモノオキシゲナーゼ活性に増加が見られた。第II相酵素も対照群に比較して、有意な増加が認められた。50ppm 群の雌で EH の有意な増加が認められたが、用量相関性及び時間的関性はみられず投与の影響とは考えられなかった。

対照群に比べ有意差の認められた項目を下表に示す。

項目 ppm	雄				雌			
	1年		2年		1年		2年	
	50	1600	50	1600	50	1600	50	1600
ECOD	↓57	↑247		↑307		↑189		↑291
EROD	↓↓76							↑304
ALD	↓56	↑180		↑157		↑177		↑220
EH		↑152			↓80		↑135	
GS-T	/			↑123	/			↑198
UDP-GT				↑↑166				↑134

表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの
 ↑↓: p<0.05, ↑↑↓↓: p<0.01, ↑: p<0.005, ↑↓: p<0.001 (t検定による)
 検体の影響と考えられた数値を下線で示した。 /: 肝臓の試料不足のため測定不可能

剖検; 途中死亡動物、中間及び最終屠殺の全動物を剖検した。

切迫屠殺または途中死亡動物、中間及び最終屠殺動物の剖検において投与に起因した異常所見は認められなかった。

臓器重量; 52及び105週後の剖検時に以下の臓器重量を測定した。対体重比も算定した。

脳、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓及び精巣

1600ppm 群雌雄で肝臓実重量及び対体重比の有意な増加が認められ、投与に起因した変化と考えられた。最終屠殺時における腎臓及び心臓重量の減少は、血液生化学及び組織学的検査結果と何ら関連が認められなかったの
 で、投与に起因した変化とは考えられなかった。

対照群と比べ有意差の認められた臓器を下表に示す。

項目 ppm	性別	雄				雌			
		12ヶ月		24ヶ月		12ヶ月		24ヶ月	
		50	1600	50	1600	50	1600	50	1600
心臓	A				↓87				↓90
	R								↓92
肝臓	A		↑124				↑113		
	R		↑124		↑126		↑119		↑116
腎臓	A				↓86				
	R				↓90				

臓器実重量(A)および対体重比(R) ↑↓: p<0.05, ↑: p<0.01 (ANOVA 検定による)
 表中の数値は変動の目安として対照群を100とした場合の値を表したもの
 検体の影響と考えられた数値を下線で示した。

病理組織学的検査；以下の臓器について病理組織学的検査を行った。

副腎、大動脈、骨髄、脳、腸管（十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸）、眼、精巣上体、大腿骨及び骨髄、胆のう、ハーダー氏腺、心臓、腎臓、涙腺、肝臓、肺、リンパ節（腸間膜及び顎下）、食道、卵巣、膵臓、脳下垂体、前立腺、唾液腺、坐骨神経、精のう、骨格筋、皮膚（乳腺域）、脊髄（3部位）、脾臓、胸骨、胃、精巣、胸腺、甲状腺、上皮小体、舌、気管、膀胱、子宮、膺、膝関節、異常部位。

12ヶ月後の中間屠殺動物の非腫瘍性病変；

1600ppm 群までの雌及び 50ppm 群雄は対照群と比較して、毒性学的に有意な所見は認められなかった。1600ppm 群の雄 3/10 例で見られた多核肝細胞は投与に起因した変化と考えられた。

その他に認められた所見は、自然発生的変化と考えられた。

中間屠殺群の肝臓の主な非腫瘍性病変

項目	性別			性別		
	雄			雌		
投与量 (ppm)	0	50	1600	0	50	1600
【検査動物数】	10	10	10	10	10	10
多核肝細胞	0	1	3	0	0	0
肝細胞肥大	2	0	0	0	0	0
単細胞壊死	1	0	2	2	0	2
円形細胞浸潤	1	0	0	2	2	1
うっ血	1	1	1	0	0	0
髓外造血	0	0	0	0	0	1
空胞	0	0	0	0	1	0
小葉中心性脂肪化	1	0	1	5	5	6

2年後の最終計画屠殺用動物の非腫瘍性病変；

1600ppm 群までの雌及び 50ppm 群雄は対照群と比較して毒性学的に有意な所見は認められなかった。1600ppm 群の雄 4/10 例で見られた多核肝細胞は投与に起因すると考えられた。

その他に認められ所見は自然発生的変化と考えられた。

最終屠殺群の肝臓の主な非腫瘍性病変

性別	雄			雌		
	項目	投与量 (ppm)			投与量 (ppm)	
	0	50	1600	0	50	1600
検査動物数	50	50	10	47	50	10
多核肝細胞	1	0	4	0	0	0
細胞小増殖巣(好塩基性細胞)	0	0	0	2	1	2
髄外造血	8	6	0	12	9	2
び慢性クッパー細胞増生	2	2	0	14	14	0
壊死	2	1	0	4	3	0
空胞化	1	1	1	1	1	0
限局性脂肪化(脂肪染色)	0	1	0	4	8	1
円形細胞浸潤	3	0	1	10	10	2

12ヶ月後の中間屠殺用動物の腫瘍性病変；

投与に起因した腫瘍性病変は認められなかった。

中間屠殺群の腫瘍性病変

性別	雄			雌		
	項目	投与量 (ppm)			投与量 (ppm)	
	0	50	1600	0	50	1600
【検査動物数】	10	10	10	10	10	10
肝臓：肝細胞腺腫（良）	1	0	0	0	0	0
ハーダー氏腺：腺腫（良）	0	0	0	1	0	0

2年後の最終屠殺用動物の腫瘍性病変；

腫瘍を有する動物数に用量依存性が見られず、また、計画屠殺動物と比較して腫瘍を有する切迫屠殺動物数にも用量依存性は認められなかった。良性及び悪性腫瘍の発生頻度に差は認められなかった。また、腫瘍動物の発生における経時的変化に用量依存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。

最終屠殺群の良性及び悪性腫瘍を有する動物数

項目	性別		雄			雌		
	投与量 (ppm)		0	50	1600	0	50	1600
	動物数		50	50	10	47	50	10
死亡あるいは切迫屠殺動物								
検査動物数			7	4	3	17	14	3
腫瘍を有する動物数			4	0	2	13	9	3
良性腫瘍のみ有する動物数			1	0	2	2	0	0
悪性腫瘍のみ有する動物数			2	0	0	9	8	3
良性と悪性腫瘍を有する動物数			1	0	0	2	1	0
計画屠殺動物								
検査動物数			43	46	7	30	36	7
腫瘍を有する動物数			17	21	3	21	21	2
良性腫瘍のみ有する動物数			8	11	2	10	11	0
悪性腫瘍のみ有する動物数			7	8	1	7	4	2
良性と悪性腫瘍を有する動物数			2	2	0	4	6	0
全動物								
検査動物数			50	50	10	47	50	10
腫瘍を有する動物数			21	21	5	34	30	5
良性腫瘍のみ有する動物数			9	11	4	12	11	0
悪性腫瘍のみ有する動物数			9	8	1	16	12	5
良性と悪性腫瘍を有する動物数			3	2	0	6	7	0

最終屠殺群の腫瘍数

項目	性別		雄			雌		
	投与量 (ppm)		0	50	1600	0	50	1600
	検体数		50	50	10	47	50	10
腫瘍								
良性			13	13	4	18	24	0
悪性			14	10	1	25	23	5
総数			27	23	5	43	47	5

腫瘍を有する動物の経時的死亡時期（最終屠殺動物数）

項目	性別	雄			雌		
	投与量 (ppm)	0	50	1600	0	50	1600
	検体数	50	50	10	50	50	10
週							
	0 - 13	0	0	0	0	0	0
	14 - 26	0	0	0	0	0	0
	27 - 39	0	0	0	0	0	0
	40 - 52	0	0	0	0	0	0
	53 - 64	1	0	0	1	0	0
	65 - 77	0	0	0	0	1	1
	78 - 90	0	0	1	3	1	0
	91 - 103	3	0	0	8	5	2
	104 - 106	17	21	4	22	23	2
	0 - 106	21	21	5	34	30	5

前述の様に先に実施した発がん性試験（毒性資料 No. 原体-21）において、1600ppm 群雌雄に肝臓重量の増加、更に雄に特徴的な所見である多核肝細胞が認められたことから、本試験が先に実施した発がん性試験とほぼ同じ条件で実施された事が示された。50ppm 群雌雄では、投与に起因する変化は認められなかった。従って、本試験における無毒性量は雌雄共に 50ppm（雄：13.6mg/kg/日、雌：20.8mg/kg/日）であった。また、本検体は発がん性を有さないことが示唆された。

[申請者注]

先に実施した発がん性試験（毒性資料 No. 原体-21）の結果、雄の無毒性量 (NOAEL) は 400ppm (98.8mg/kg/日) であったのに対し、雌の無毒性量 (NOAEL) は肝臓重量の増加の点から求められていない。

これらの結果を統合すると、本検体の無影響量 (NOEL) 及び無毒性量 (NOAEL) は、雄では 1 回目の発がん性試験（毒性資料 No. 原体-21）から 400ppm (98.8mg/kg/日)、雌では 50ppm (20.8mg/kg/日) と判断される。

非腫瘍性病変：最終屠殺群

(1/4)

性別		雄			雌		
用量(ppm)		0	50	1600	0	50	1600
所見/検査数		7	4	3	17	14	3
死 亡 ・ 切 迫 屠 殺 動 物	副腎						
	被膜下過形成	7	2	2	16	14	2
	線維症	0	0	0	11	6	0
	皮質肥大	0	0	0	0	2	0
	精巢上体						
	鉍質化	1	0	0	-	-	-
	涙腺						
	リンパ球浸潤	3	1	2	11	8	1
	色素沈着	0	0	0	8	3	0
	腺拡張	0	0	0	3	2	0
	ハーダー氏腺						
	リンパ球浸潤	5	1	2	7	6	1
	炎症	1	3	3	3	1	1
	回腸						
	リンパろ胞形成	0	1	0	0	0	0
	腎臓						
	尿細管のう胞	5	3	3	11	5	0
	鉍質化	1	2	1	-	-	-
	石灰化	-	-	-	0	1	0
	リンパ球浸潤	7	4	2	13	11	1
	色素沈着	1	1	0	0	2	0
	肝臓						
	多核肝細胞	0	0	2	0	0	0
	好塩基性細胞巢	0	0	0	1	0	0
	髓外造血	0	0	0	6	4	0
	クッパー細胞増生	1	0	0	2	0	0
	壊死	2	0	0	1	0	0
	空胞化	1	1	0	0	1	0
	限局性脂肪化	0	1	0	1	5	0
	円形細胞浸潤	0	0	0	0	1	0
	肺						
	うっ血	5	1	3	5	6	0
乳腺							
リンパ球浸潤	0	0	0	3	4	0	
卵巣							
のう胞	-	-	-	9	5	1	
下垂体							
過形成	0	0	0	1	0	0	
脾臓							
リンパ様過形成	1	0	0	3	2	1	

* : $p < 0.05$ (χ^2 検定)

非腫瘍性病変：最終屠殺群

(2/4)

性別		雄			雌		
		0	50	1600	0	50	1600
用量(ppm)		0	50	1600	0	50	1600
所見/検査数		7	4	3	17	14	3
死亡・ 切迫屠殺動物	胃						
	腺胃；腺管拡張	2	1	1	7	4	0
	腺胃；過形成	0	0	1	1	1	1
	膀胱						
	単核細胞浸潤	3	1	0	12	7	0
屠殺動物	前立腺						
	リンパ球浸潤	2	2	1	-	-	-
屠殺動物	子宮						
	のう胞性過形成	-	-	-	16	12	1
所見/検査数		43	46	7	30	36	7
最終屠殺動物	副腎						
	被膜下過形成	40	38	0	30	36	0
	線維症	0	0	0	25	33	0
	皮質肥大	0	0	0	1	2	0
	精巢上体						
	鉍質化	2	8	0	-	-	-
	涙腺						
	リンパ球浸潤	25	22	0	24	31	0
	色素沈着	12	14	0	13	26*	0
	腺拡張	2	2	0	12	15	0
	ハーダー氏腺						
	リンパ球浸潤	30	28	0	17	24	0
	炎症	5	8	0	5	6	0
	回腸						
	リンパろ胞形成	0	1	0	1	1	0
	腎臓						
	尿細管のう胞	24	39	0	25	30	0
	鉍質化	37	35	0	-	-	-
	石灰化	-	-	-	3	1	0
	リンパ球浸潤	38	45	0	24	31	0
色素沈着	2	5	0	6	7	0	
肝臓							
多核肝細胞	1	0	2	0	0	0	
好塩基性細胞巢	0	0	0	1	1	2	
髓外造血	8	6	0	6	5	2	
クッパー細胞増生	1	2	0	12	14	0	
壊死	0	1	0	3	3	0	
空胞化	0	0	1	1	0	0	
限局性脂肪化	0	0	0	3	3	1	
円形細胞浸潤	3	0	1	10	9	2	

* : p < 0.05 (χ²検定)

非腫瘍性病変：最終屠殺群

(3/4)

性別		雄			雌		
用量(ppm)		0	50	1600	0	50	1600
所見/検査数		43	46	7	30	36	7
最終屠殺動物	肺						
	うっ血	3	7	0	6	0*	0
	乳腺						
	リンパ球浸潤	1	2	0	6	16*	0
	卵巢						
	のう胞	-	-	-	9	17	0
	下垂体						
	過形成	1	1	0	7	14	0
	脾臓						
	リンパ様過形成	2	6	0	12	16	2
	胃						
	腺胃；腺管拡張	18	16	0	17	17	0
	腺胃；過形成	0	2	0	6	2	0
膀胱							
単核細胞浸潤	23	25	0	25	26	0	
リンパ様過形成	0	0	0	1	0	0	
前立腺							
リンパ球浸潤	28	39	0	-	-	-	
子宮							
のう胞性過形成	-	-	-	29	36	1	
所見/検査数		50	50	10	47	50	10
全屠殺動物	副腎						
	被膜下過形成	47	40	2	46	50	2
	線維症	0	0	0	36	39	0
	皮質肥大	0	0	0	1	4	0
	精巣上体						
	鉍質化	3	8	0	-	-	-
	涙腺						
	リンパ球浸潤	28	23	2	35	39	1
	色素沈着	12	14	0	21	29	0
	腺拡張	2	2	0	15	17	0
	ハーダー氏腺						
	リンパ球浸潤	35	29	2	24	30	1
	炎症	6	11	3	8	7	1
	回腸						
	リンパろ胞形成	0	2	0	1	1	0
腎臓							
尿細管のう胞	39	42	3	36	35	0	
鉍質化	38	37	1	-	-	-	
石灰化	-	-	-	3	2	0	
リンパ球浸潤	45	49	2	37	42	1	
色素沈着	3	6	0	6	9	0	

* : p < 0.05 (χ²検定)

非腫瘍性病変：最終屠殺群

(4/4)

性別		雄			雌		
用量 (ppm)		0	50	1600	0	50	1600
所見/検査数		50	50	10	47	50	10
全 動 物	肝臓						
	多核肝細胞	1	0	4	0	0	0
	好塩基性細胞巢	0	0	0	2	1	2
	髓外造血	8	6	0	12	9	2
	クッパー細胞増生	2	2	0	14	14	0
	壊死	2	1	0	4	3	0
	空胞化	1	1	1	1	1	0
	限局性脂肪化	0	1	0	4	8	1
	円形細胞浸潤	3	0	1	10	10	2
	肺						
	うっ血	8	8	3	11	6	0
	乳腺						
	リンパ球浸潤	1	2	0	9	20*	0
	卵巣						
	のう胞	-	-	-	18	22	1
	下垂体						
	過形成	1	1	0	8	14	0
	脾臓						
	リンパ様過形成	3	6	0	15	18	3
	胃						
	腺胃；腺管拡張	20	17	1	24	21	0
	腺胃；過形成	0	2	1	7	3	1
	膀胱						
	単核細胞浸潤	26	26	0	37	33	0
	リンパ様過形成	0	0	0	1	0	0
	前立腺						
リンパ球浸潤	30	41	1	-	-	-	
子宮							
のう胞性過形成	-	-	-	45	48	2	

* : $p < 0.05$ (χ^2 検定)

腫瘍性病変：最終屠殺群

(1/5)

性別		雄			雌		
		0	50	1600	0	50	1600
用量(ppm)		0	50	1600	0	50	1600
所見/検査数		7	4	3	17	14	3
死 亡 ・ 切 迫 屠 殺 動 物	副腎						
	腺腫 (良)	0	0	0	0	0	0
	腺癌 (悪)	0	0	0	0	0	0
	体腔						
	血管腫 (良)	0	0	0	0	0	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	0	0
	血管外皮腫 (悪)	0	0	0	1	0	0
	大腿骨						
	血管腫 (良)	0	0	0	0	0	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	1	1	0
	胸骨						
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	0	0
	骨系 (その他)						
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	0	0
	ハーダー氏腺						
	腺腫 (良)	0	0	0	3	0	0
	血液リンパ系						
	悪性リンパ腫 (悪)	1	0	0	4	5	1
	組織球肉腫 (悪)	0	0	0	2	2	2
	肝臓						
	肝細胞腺腫 (良)	1	0	1	0	0	0
	肝細胞癌 (悪)	2	0	0	0	1	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	0	0
	肺						
	肺腺腫 (良)	0	0	1	0	0	0
	肺癌 (悪)	0	0	0	0	0	0
	乳腺						
	腺癌 (悪)	0	0	0	0	1	0
	腸間膜リンパ節						
血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	0	0	
卵巣							
のう胞腺腫 (良)	-	-	-	0	0	0	
黄体腫 (良)	-	-	-	0	0	0	
血管腫 (良)	-	-	-	0	1	0	
脾臓							
ラ氏島細胞腺腫 (良)	0	0	0	1	0	0	
下垂体							
腺腫 (良)	1	0	0	0	0	0	
前立腺							
腺腫 (良)	0	0	0	-	-	-	

χ^2 検定

腫瘍性病変：最終屠殺群

(2/5)

性別		雄			雌		
		0	50	1600	0	50	1600
用量 (ppm)		0	50	1600	0	50	1600
所見/検査数		7	4	3	17	14	3
切迫屠殺動物	皮膚						
	線維肉腫 (悪)	0	0	0	2	0	0
	血管腫 (良)	0	0	0	0	0	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	2	0	0
	脾臓						
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	1	0	0
	胃						
	扁平上皮乳頭腫 (良)	0	0	0	0	0	0
	甲状腺						
	C-細胞腺腫 (良)	0	0	0	0	0	0
	子宮						
	間質ポリープ (良)	-	-	-	0	0	0
	平滑筋肉腫 (悪)	-	-	-	0	0	0
	腺癌 (悪)	-	-	-	0	1	0
	平滑筋腫 (良)	-	-	-	0	0	0
	血管腫 (良)	-	-	-	0	0	0
	間質細胞肉腫 (悪)	-	-	-	0	1	0
腔							
扁平上皮癌 (悪)	-	-	-	0	0	0	
最終屠殺動物	副腎						
	腺腫 (良)	3	1	0	0	0	0
	腺癌 (悪)	1	0	0	0	0	0
	体腔						
	血管腫 (良)	0	1	0	0	0	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	1	0
	血管外皮腫 (悪)	0	0	0	0	0	0
	大腿骨						
	血管腫 (良)	0	0	0	0	2	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	1	0	0
	胸骨						
	血管肉腫 (悪)	1	0	0	0	0	0
	骨系 (その他)						
	血管肉腫 (悪)	1	0	0	0	0	0
	ハーダー氏腺						
	腺腫 (良)	2	1	0	1	5	0
	血液リンパ系						
悪性リンパ腫 (悪)	3	5	0	6	8	1	
組織球肉腫 (悪)	0	0	0	1	0	0	

χ^2 検定

腫瘍性病変：最終屠殺群

(3/5)

性別		雄			雌		
		0	50	1600	0	50	1600
用量(ppm)		0	50	1600	0	50	1600
所見/検査数		7	4	3	17	14	3
最終屠殺動物	肝臓						
	肝細胞腺腫 (良)	1	3	2	1	0	0
	肝細胞癌 (悪)	2	4	1	0	0	0
	血管肉腫 (悪)	1	0	0	0	0	0
	肺						
	肺腺腫 (良)	3	7	0	0	1	0
	肺癌 (悪)	1	0	0	0	0	0
	乳腺						
	腺癌 (悪)	0	0	0	0	0	0
	腸間膜リンパ節						
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	1	0	0
	卵巣						
	のう胞腺腫 (良)	-	-	-	3	2	0
	黄体腫 (良)	-	-	-	1	0	0
	血管腫 (良)	-	-	-	0	0	0
	膵臓						
	ラ氏島細胞腺腫 (良)	0	0	0	0	0	0
	下垂体						
	腺腫 (良)	0	0	0	6	2	0
	前立腺						
	腺腫 (良)	1	0	0	-	-	-
	皮膚						
	線維肉腫 (悪)	0	0	0	0	0	1
	血管腫 (良)	0	0	0	0	2	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	0	0
	脾臓						
	血管肉腫 (悪)	1	1	0	1	0	0
	胃						
	扁平上皮乳頭腫 (良)	0	0	0	0	1	0
	甲状腺						
C-細胞腺腫 (良)	1	0	0	0	0	0	
子宮							
間質ポリープ (良)	-	-	-	2	4	0	
平滑筋肉腫 (悪)	-	-	-	0	1	0	
腺癌 (悪)	-	-	-	0	0	0	
平滑筋腫 (良)	-	-	-	1	0	0	
血管腫 (良)	-	-	-	0	3	0	
間質細胞肉腫 (悪)	-	-	-	0	2	0	
陰							
扁平上皮癌 (悪)	-	-	-	1	0	0	

χ^2 検定

腫瘍性病変：最終屠殺群

(4/5)

性別		雄			雌		
		0	50	1600	0	50	1600
用量 (ppm)							
所見/検査数		50	50	10	47	50	10
全動物	副腎						
	腺腫 (良)	3	1	0	0	0	0
	腺癌 (悪)	1	0	0	0	0	0
	体腔						
	血管腫 (良)	0	1	0	0	0	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	0	1	0
	血管外皮腫 (悪)	0	0	0	1	0	0
	大腿骨						
	血管腫 (良)	0	0	0	0	2	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	2	1	0
	胸骨						
	血管肉腫 (悪)	1	0	0	0	0	0
	骨系 (その他)						
	血管肉腫 (悪)	1	0	0	0	0	0
	ハーダー氏腺						
	腺腫 (良)	2	1	0	4	5	0
	血液リンパ系						
	悪性リンパ腫 (悪)	4	5	0	10	13	2
	組織球肉腫 (悪)	0	0	0	3	2	2
	肝臓						
	肝細胞腺腫 (良)	2	3	3	1	0	0
	肝細胞癌 (悪)	4	4	1	0	1	0
	血管肉腫 (悪)	1	0	0	0	0	0
	肺						
	肺腺腫 (良)	3	7	1	0	1	0
	肺癌 (悪)	1	0	0	0	0	0
	乳腺						
	腺癌 (悪)	0	0	0	0	1	0
	腸間膜リンパ節						
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	1	0	0
卵巣							
のう胞腺腫 (良)	-	-	-	3	2	0	
黄体腫 (良)	-	-	-	1	0	0	
血管腫 (良)	-	-	-	0	1	0	
脾臓							
ラ氏島細胞腺腫 (良)	0	0	0	1	0	0	
下垂体							
腺腫 (良)	1	0	0	6	2	0	
前立腺							
腺腫 (良)	1	0	0	-	-	-	

χ^2 検定

腫瘍性病変：最終屠殺群

(5/5)

性別		雄			雌		
用量 (ppm)		0	50	1600	0	50	1600
所見/検査数		50	50	10	47	50	10
全 動 物	皮膚						
	線維肉腫 (悪)	0	0	0	2	0	1
	血管腫 (良)	0	0	0	0	2	0
	血管肉腫 (悪)	0	0	0	2	0	0
	脾臓						
	血管肉腫 (悪)	1	1	0	2	0	0
	胃						
	扁平上皮乳頭腫 (良)	0	0	0	0	1	0
	甲状腺						
	C-細胞腺腫 (良)	1	0	0	0	0	0
	子宮						
	間質ポリープ (良)	-	-	-	2	4	0
	平滑筋肉腫 (悪)	-	-	-	0	1	0
	腺癌 (悪)	-	-	-	0	1	0
	平滑筋腫 (良)	-	-	-	1	0	0
	血管腫 (良)	-	-	-	0	3	0
	間質細胞肉腫 (悪)	-	-	-	0	3	0
膣							
扁平上皮癌 (悪)	-	-	-	1	0	0	

χ^2 検定

12 繁殖毒性及び催奇形性

(1) ラットを用いた二世代繁殖性試験

(毒性資料 No. 原体-23)

試験機関：マイルス社毒性研究所（米国）

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年1月30日

検体の純度：

供試動物：SD系ラット、1群雌雄各30匹、試験開始時7週齢

試験期間：1992年10月～1993年8月

投与期間

P世代；投与開始からF1児離乳時までの約19週間（交配前10週間）

F1世代；離乳時からF2児離乳時までの約19週間（交配前10週間）

投与方法：検体をラット用標準飼料に0、400、2000及び10000ppmの濃度で混餌し与えた。

投与量の設定根拠；

試験項目：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日観察した。

体重変化；P、F1世代雄は週1回測定した。PおよびF1世代雌は交配まで雄と同日程で測定し、交配後0、6、13及び20日、分娩後の哺育期間中1、4、7、14及び21日に測定した。

摂餌量；10週間の交配前期間及び妊娠期間は毎週測定した。哺育期間は1週目には週2回、2及び3週目には週1回測定した。雌は交配後6、13、20日、哺育4、7、14、21日に測定した。

検体摂取量；10週間の交配前期間の1日当りの検体摂取量を計算した。雌は妊娠および哺育期間中の検体摂取量も計算した。

交配及び妊娠の確認；雌雄1対1で同居させ、毎日膣スメアーを検査し発情周期を記録した。交尾は膣スメア中の精子を認めることにより確認した。交尾を確認した日を妊娠0日とした。

発情周期；交配前2週間P、F1世代雌の各群10匹の膣塗沫標本を作成し発情周期を検査した。

繁殖性に関する指標：

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{精子が確認された雌動物数}^*}{\text{雄と同居させた雌動物数}} \times 100$$

$$\text{受胎率 (\%)} = \frac{\text{妊娠した雌動物数}^{\#}}{\text{精子が確認された雌動物数}^*} \times 100$$

$$\text{出産率 (\%)} = \frac{\text{生存児を有する雌動物数}}{\text{妊娠した雌動物数}} \times 100$$

$$\text{出生率 (\%)}^{\S} = \frac{\text{一腹あたりの産児数}}{\text{一腹あたりの着床痕数}} \times 100$$

$$\text{4日生存率 (\%)}^{\S} = \frac{\text{4日目の調整前の一腹あたりの生存児数}}{\text{一腹あたりの出生時生存児数}} \times 100$$

$$\text{4日後生存率 (\%)}^{\S} = \frac{\text{一腹あたりの7, 14, 21日後における生存児数}}{\text{一腹あたりの4日目の生存児数(調整後)}} \times 100$$

- * 精子が確認されなかった妊娠雌を含む。
- # 着床痕のあるが出産しなかった雌を含む
- § 各群の指標の算出は母動物平均に基づく。

肉眼的病理検査；P及びF1世代の全雄親動物は、各F1及びF2世代新生児が得られ、出産しなかった雌が交尾後24日を過ぎた後に屠殺した。P及びF1世代の全雌親動物は、新生児が離乳あるいは死亡、あるいは交尾後24日を経過してから屠殺した。死亡または切迫屠殺した動物は、可能な限り迅速に剖検した。

臓器重量；PおよびF1世代親動物の以下の臓器重量を測定した。

肝臓、精巣、卵巣

病理組織学的検査；P及びF1親動物は剖検した後、凝固腺、子宮、精巣上体、肝、下垂体、前立腺、精のう、膾ならびに異常組織を10%中性緩衝ホルマリンに固定し、病理組織学的検査を行った。

同腹児に関する所見；分娩状態を観察し、同腹児数、生存・死産児数、性別を検査し、児動物体重を出産後0、4、7、14、21日に測定した。出産後4日目に同腹児から8匹（雌雄各4匹）を選択し、残りは淘汰した。

試験の概要を下表に示す。

世代	期 間	作業手順	試験項目
P 雄 30 雌 30	生育期(10 週間)		一般状態を毎日観察し、体重及び摂餌量を毎週測定。
	交 配(3 週間)	雌雄 1:1 で同居、交配。 膣垢中の精子の有無を観察し、交尾を確認した日を妊娠 0 日とした。	交配状況の観察
	妊 娠(3 週間)		体重を妊娠 0、6、13 及び 20 日に測定。
	出 産	出産後 4 日目に同腹児から 8 匹 (雌雄各 4 匹) を選択し、残りは淘汰した。	出産した雌は交配日、出産日、妊娠期間、出産状況を観察した。 児動物は出産後 0、4、7、14、21 日に同腹児数、生存・死産児数、性別及び異常を検査した。4 日目に淘汰した児動物を剖検した。
	哺 育(3 週間)	出産後、28 日に各群雌雄各 30 匹を選択し、F1 世代を構成。	児動物体重を 0、4、7、21 日に測定した。 離乳児動物は屠殺し、剖検した。 F0 親動物は F1 児動物の離乳まで維持し、その後屠殺し剖検し、臓器重量を測定した。 病理組織学的検査を全群について行った。
	離 乳		
F1 雄 30 雌 30	生 育(10 週間)		F0 世代に準ずる。
	交 配(3 週間)		
	妊 娠	F0 世代に準ずる。	
	出 産		
	哺 育		F1 親動物は F2 児動物の離乳まで維持し、その後屠殺し剖検し、臓器重量を測定した。 病理組織学的検査を全群について行った。
	離 乳		F2 児動物は全て 21 日齢で屠殺し、剖検した。

試験結果：結果の概要を毒-140 頁に示した。

親動物

一般状態及び死亡；P 及び F1 世代のいずれにも投与に起因した中毒症状は認められず、死亡例も認められなかった。P 世代の対照群雌 1 例が死亡、雄 3 例、雌 1 例及び 10000ppm 群雌 1 例は切迫屠殺、F1 世代の 400ppm 群雌 1 例が死亡、雄 1 例及び 2000ppm 群雌 1 例は切迫屠殺したが、検体投与に起因するものではなかった。

体重変化；交配前の P 世代 10000ppm 群雄(14 週以降；対照群に比して 6%減少)及び F1 世代 10000ppm 群雌(7 週以降；対照群に比して 7~9%減少)で有意な減少が認められ、検体投与に起因した変化と考えられた。この他に認められた統計学的に有意な増加は偶発的な変化であり、投与に起因した影響とはみなされなかった。また妊娠期間及び哺育期間では、影響はみられなかった。

摂餌量；交配前では、P 及び F1 世代雄 400ppm 群(増加)、10000ppm 群(増加)、P 及び F1 世代雌 10000ppm 群(減少)、F1 世代雌 2000ppm 群(減少)で、統計学的有意差が認められた。妊娠期間及び哺育期間では 10000ppm 群で有意な増加(P 世代-哺育期間及び F1 世代-妊娠期間それぞれ第 1 週)がみられたが、いずれもこれらの有意差は散発的であり偶発的なものと考えられ、投与の影響とは考えられなかった。

繁殖能；P 及び F1 世代において性周期、交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間に対照群と全投与群間に有意差は認められず、これらの指標に投与の影響は認められなかった。1 回目の交配で出産しなかった P 及び F1 世代の 0ppm 群各 2 匹及び F1 世代 2000ppm 群 1 匹は、生殖能力の確認されている雄と再度交配させた結果、F1 世代の 2000ppm 群 1 匹が出産した。

剖検及び臓器重量；P 及び F1 世代親動物に投与に起因した肉眼的異常所見は認められなかった。

臓器重量では P 世代 2000ppm 群以上の雄の肝臓対体重比が、400ppm 群以上の雌の実重量及び対体重比が統計学的に有意に増加した。

F1 世代では 400ppm 群以上の雄及び 2000ppm 群以上の雌の実重量及び対体重比に増加がみられ投与に起因したものと考えられた。

その他、P 世代 10000ppm 群の雄の精巣実重量が増加したが、これは最終体重が統計学的に有意に減少した結果、計算上増加となったことや精巣実重量に有意な増加がみられていないこと、F1 世代雄 10000ppm 群に同様の所見が認められていないこと等から、投与に関連したものとは考えられなかった。

対照群と比べ有意差の認められた臓器重量を下表に示す。

性別	雄			雌		
	項目 ppm	400	2000	10000	400	2000
[P 世代]						
肝臓 実重量				↑(114)	↑(134)	↑(138)
対体重比		↑(113)	↑(114)	↑(113)	↑(132)	↑(136)
精巣 実重量				-	-	-
対体重比			↑(114)	-	-	-
[F1 世代]						
肝臓 実重量	↑(122)	↑(113)	↑(122)		↑(124)	↑(146)
対体重比	↑(117)	↑(117)	↑(129)		↑(124)	↑(148)

↑ : p<0.05 (ANOVA+Dunnett の多重比較検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を表したものの検体の影響と考えられた数値を下線で示した。

病理組織学的検査 ; 2000 及び 10000ppm 群雌雄に肝臓重量の増加に伴った門脈周辺肝細胞肥大、雄に小葉中心性肝細胞空胞化の減少が認められた。門脈周辺肝細胞肥大は投与に関連すると考えられた。しかしながら空胞の減少に関する毒性学的意味は知られていない。

検体に関連すると示唆される病理組織所見の発生数

所見	用量 (ppm)	P 世代		F1 世代	
		雄	雌	雄	雌
肝細胞肥大	0	0	0	0	1
	400	1	0	0	3
	2000	8*	28*	16*	21*
	10000	30*	25*	30*	29*
肝小葉中心性の空胞化	0	18	0	17	0
	400	16	0	20	2
	2000	9*	0	2*	0
	10000	0*	1	1*	0

* : p<0.05 (χ^2 +Fisher 検定)

児動物

出生時における児動物数及び死亡児数、同腹児数、性比及び新生児生存率について対照群と比べ有意な変化がみられず、投与の影響は認められなかった。

哺育児体重については、哺育期間 2 週以後の F1 及び F2 世代の 10000ppm 群で統計学的に有意な減少(14 日-F1 世代;9%、F2 世代;7%、21 日-F1 世代;12%、F2 世代;10%)が認められ、投与の影響と考えられた。

4 日後淘汰児動物及び 21 日離乳児の剖検では投与に起因した異常所見は認められなかった。

以上の結果、2世代にわたり本剤を飼料中に混入して投与した場合、親動物雌雄で最低投与量の400ppm群で肝臓重量が増加し、児動物に対しては10000ppm群で体重減少が認められた。繁殖能に対しては影響は認められなかった。

従って、無毒性量は親動物では求められなかった。児動物に対しては2000ppm(雄;121mg/kg/日、雌;142mg/kg/日)と判断された。

繁殖については最高投与量の10000ppm(雄;710mg/kg/日、雌;767mg/kg/日)でも影響がなかった。

申請者注：本試験で親動物に対する無毒性量が確認できなかったことから、別に追加試験を0、50、400ppmで実施（毒性資料 No. 原体-24）した。

結果の概要

世代		親 : P 児 : F1				親 : F1 児 : F2				
投与量 (ppm)		0	400	2000	10000	0	400	2000	10000	
親動物	動物数 雄	30	30	30	30	30	30	30	30	
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	
	死亡 (瀕死屠殺数) 雄	1 (3)					(1)			
	雌	(1)			(1)		1	(1)		
	一般状態		投与による影響は認められなかった				投与による影響は認められなかった			
	摂餌量 (交配期間) 雄		↑		↑		↑		↑	
	雌				↓			↓	↓	
	検体摂取量 mg/kg/日 ¹⁾ 雄	—	28	136	710	—	24	121	631	
	雌	—	30	147	767	—	28	142	725	
	体重 雄				93↓					
	雌								96↓	
	性周期		投与による影響は認められなかった				投与による影響は認められなかった			
	交尾率 (%)	93 (27/29)	100 (30/30)	100 (30/30)	100 (29/29)	90 (27/30)	100 (30/30)	97 (28/29)	100 (30/30)	
	受胎率 (%)	93 (25/27)	83 (25/30)	100 (30/30)	86 (25/29)	93 (25/27)	77 (23/30)	86 (25/29)	93 (28/30)	
	出産率 (%)	96 (24/25)	100 (25/25)	100 (30/30)	100 (25/25)	100 (25/25)	100 (23/23)	100 (25/25)	100 (28/28)	
	妊娠期間 (日)	21.6	21.8	21.8	21.8	22.0	22.0	22.0	21.8	
	剖検		投与による影響は認められなかった				投与による影響は認められなかった			
	臓器重量						122↑	113↑	122↑	
	肝臓	雄 実重量						117↑	117↑	129↑
		対体重比			113↑	114↑				
雌	実重量		114↑	134↑	138↑			124↑	146↑	
	対体重比		113↑	132↑	136↑			124↑	148↑	
精巣 雄 対体重比				114↑						
病理組織所見		投与による影響は認められなかった	肝細胞肥大の増加(雌雄)、空胞化減少(雄)			投与による影響は認められなかった	肝細胞肥大の増加(雌雄)、空胞化減少(雄)			

1) 生育期における P 及び F1 世代の平均検体摂取量

↑ ↓ : $p < 0.05$ (ANOVA + Dunnett の多重比較検定、但し親動物の剖検及び鏡検結果; χ^2 + Fisher の直接確率法)

↑ ↓ : 散発的にみられた。

検体の影響と考えられた数値を下線で示した。

世 代		親 : P 児 : F1				親 : F1 児 : F2				
投与量 (ppm)		0	400	2000	10000	0	400	2000	10000	
児 動 物	動物数 雄	30	30	30	30	30	30	30	30	
	雌	30	30	30	30	30	30	30	30	
	児動物数(出生時)	343	351	414	348	357	319	362	406	
	死亡児数(出生時)	2	2	8	0	6	6	8	4	
	平均同腹児数 (出生時)	14	14	14	14	14	15	14	15	
	4日目生存率	99	93	98	100	94	96	97	99	
	21日目生存率	98	98	99	100	99	98	100	99	
	性比 雄(%)	51	44	50	48	52	53	50	49	
	児動物体重(g)									
	0日目	7.0	7.0	7.1	6.9	7.1	6.7	6.8	6.9	
	4日目	10.9	10.8	11.0	10.5	10.4	10.3	10.2	9.9	
	7日目	17.6	17.4	17.7	16.9	17.1	16.6	16.6	16.1	
	14日目	34.7	33.9	34.1	<u>31.6</u> ↓	34.3	33.4	33.4	<u>31.8</u> ↓	
	21日目	53.7	51.8	51.8	<u>47.5</u> ↓	55.3	53.7	52.4	<u>49.7</u> ↓	
	剖検		投与による影響は認められ なかった					投与による影響は認められ なかった		

1) 生育期におけるP及びF1世代の平均検体摂取量

↑ ↓ : $p < 0.05$ (ANOVA+Dunnettの多重比較検定、但し親動物の剖検及び鏡検結果; χ^2 +Fisherの直接確率法)

↑↓ : 散発的にみられた。

検体の影響と考えられた数値を下線で示した。

(2) ラットを用いた二世世代繁殖性試験（追加試験）

（毒性資料 No. 原体-24）

試験機関：バイエルコーポレーション毒性研究所（米国）

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年7月19日

検体の純度：

供試動物：SD系ラット、1群雌雄各30匹、試験開始時7週齢

試験期間：1994年1月～1994年10月

投与期間

P世代；投与開始からF1児離乳時までの約19週間（交配前10週間）

F1世代；離乳時からF2児離乳時までの約19週間（交配前10週間）

投与方法：検体をラット用標準飼料に0、50及び400ppmの濃度で混餌し与えた。

投与量設定根拠；

試験項目：

一般状態及び死亡率；一般状態及び生死を毎日観察した。

体重変化；P、F1世代雄は週1回測定した。PおよびF1世代雌は交配まで雄と同日程で測定し、交配後0、6、13及び20日、分娩後の哺育期間中1、4、7、14及び21日に測定した。

摂餌量；10週間の交配前期間及び妊娠期間は毎週測定した。哺育期間は1週目には週2回、2及び3週目には週1回測定した。雌は交配後6、13、20日、哺育4、7、14、21日に測定した。

検体摂取量；10週間の交配前期間の1日当りの検体摂取量を計算した。雌は妊娠および哺育期間中の検体摂取量も計算した。

交配及び妊娠の確認；雌雄1対1で同居させ、毎日膣スメアーを検査し発情周期を記録した。交尾は膣スメア中の精子を認めることにより確認した。交尾を確認した日を妊娠0日とした。

発情周期；交配前2週間P、F1世代雌の各群10匹の膣塗沫標本を作成し発情周期を検査した。

繁殖性に関する指標：

$$\text{交尾率 (\%)} = \frac{\text{精子が確認された雌動物数}^*}{\text{雄と同居させた雌動物数}} \times 100$$

$$\text{受胎率 (\%)} = \frac{\text{妊娠した雌動物数}^{\#}}{\text{精子が確認された雌動物数}^*} \times 100$$

$$\text{出産率 (\%)} = \frac{\text{生存児を有する雌動物数}}{\text{妊娠した雌動物数}} \times 100$$

$$\text{出生率 (\%)}^{\S} = \frac{\text{一腹あたりの産児数}}{\text{一腹あたりの着床痕数}} \times 100$$

$$\text{4日生存率 (\%)}^{\S} = \frac{\text{4日目の調整前の一腹あたりの生存児数}}{\text{一腹あたりの出生時生存児数}} \times 100$$

$$\text{4日後生存率 (\%)}^{\S} = \frac{\text{一腹あたりの7, 14, 21日後における生存児数}}{\text{一腹あたりの4日目の生存児数(調整後)}} \times 100$$

- * 精子が確認されなかった妊娠雌を含む。
- # 着床痕のあるが産しなかった雌を含む
- § 各群の指標の算出は母動物平均に基づく。

肉眼的病理検査；P及びF1世代の全雄親動物は、各F1及びF2世代新生児が得られ、出産しなかった雌が交尾後24日を過ぎた後に屠殺した。P及びF1世代の全雌親動物は、新生児が離乳あるいは死亡、あるいは交尾後24日を経過してから屠殺した。切迫屠殺した動物は、可能な限り迅速に剖検した。

臓器重量；PおよびF1世代親動物の以下の臓器重量を測定した。

肝臓、精巣、卵巣

病理組織学的検査；P及びF1親動物は剖検した後、凝固腺、子宮、精巣上体、肝、下垂体、前立腺、精のう、膣ならびに異常組織を10%中性緩衝ホルマリンに固定し、病理組織学的検査を行った。

同腹児に関する所見；分娩状態を観察し、同腹児数、生存・死産児数、性別を検査し、児動物体重を出産後0、4、7、14、21日に測定した。出産後4日目に同腹児から8匹（雌雄各4匹）を選択し、残りは淘汰した。

試験の概要を下表に示す。

世代	期 間	作業手順	試験項目
P 雄 30 雌 30	生育期(10 週間)		一般状態を毎日観察し、体重及び摂餌量を毎週測定。
	交 配(3 週間)	雌雄 1:1 で同居、交配。 膣垢中の精子の有無を観察し、交尾を確認した日を妊娠 0 日とした。	交配状況の観察
	妊 娠(3 週間)		体重を妊娠 0、6、13 及び 20 日に測定。
	出 産	出産後 4 日目に同腹児から 8 匹 (雌雄各 4 匹) を選択し、残りは淘汰した。	出産した雌は交配日、出産日、妊娠期間、出産状況を観察した。 児動物は出産後 0、4、7、14、21 日に同腹児数、生存・死産児数、性別及び異常を検査した。4 日目に淘汰した児動物を剖検した。
	哺 育(3 週間)	出産後、28 日に各群雌雄各 30 匹を選択し、F1 世代を構成。	児動物体重を 0、4、7、21 日に測定した。 F0 親動物は F1 児動物の離乳まで維持し、その後屠殺し剖検し、臓器重量を測定した。 病理組織学的検査を全群について行った。
	離 乳		
F1 雄 30 雌 30	生 育(10 週間)		F0 世代に準ずる。
	交 配(3 週間)		
	妊 娠	F0 世代に準ずる。	
	出 産		
	哺 育		F1 親動物は F2 児動物の離乳まで維持し、その後屠殺し剖検し、臓器重量を測定した。 病理組織学的検査を全群について行った。
	離 乳		F2 児動物は全て 21 日齢で屠殺した。

試験結果：結果の概要を毒-146 頁に示した。

親動物

一般状態及び死亡；P 及び F1 世代のいずれにも投与に起因した中毒症状は認められなかった。P 世代の対照群雌 1 例は切迫屠殺したが、投与に起因するものではなかった。

体重変化；交配前の P 及び F1 世代雌雄いずれも投与に関連した影響は認められなかった。また妊娠期間及び哺育期間では、影響はみられなかった。

摂餌量；P 及び F1 世代雌雄いずれも投与に関連した影響は認められなかった。

繁殖能；P 及び F1 世代において性周期、交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間に対照群と全投与群間に有意差は認められず、これらの指標に投与の影響は認められなかった。

剖検及び臓器重量；P 及び F1 世代親動物に投与に起因した肉眼的異常所見は認められなかった。切迫屠殺した P 世代の対照群雌 1 例は悪性リンパ腫と判断された。

臓器重量では F1 世代では 400ppm 群雌雄に肝臓実重量及び体重比重量の増加がみられたが、同群 P 世代では増加が認められなかった。

病理組織学的検査；投与に関連すると考えられる異常所見は認められなかった。

児動物

出生時における児動物数及び死亡児数、同腹児数、性比及び新生児生存率について対照群と比べ有意な変化がみられず、投与の影響は認められなかった。

児動物体重、一般状態及び外表について投与に関連した異常所見は認められなかった。

児動物の剖検は実施しなかった。

以上の結果、先に実施した繁殖毒性試験（毒性資料 No. 原体-23）の 400ppm 群雌雄でみられた肝臓重量の増加が、本試験の雌雄においても認められた。従って、親動物に対する無毒性量は、50ppm（雄；3.4mg/kg/日、雌；3.9mg/kg/日）と判断した。

結果の概要

世代		親 : P 児 : F1			親 : F1 児 : F2			
投与量 (ppm)		0	50	400	0	50	400	
親動物	動物数 雄	30	30	30	30	30	30	
	雌	30	30	30	30	30	30	
	死亡 (切迫屠殺数)	(1)						
	一般観察		投与による影響は認められなかった			投与による影響は認められなかった		
	摂餌量		投与による影響は認められなかった			投与による影響は認められなかった		
	検体摂取量 mg/kg/日 ¹⁾ 雄	-	3.4	27	-	3.4	26	
	雌	-	3.9	30	-	4.1	31	
	体重 雄		投与による影響は認められなかった			投与による影響は認められなかった		
	雌		投与による影響は認められなかった			投与による影響は認められなかった		
	性周期		投与による影響は認められなかった			投与による影響は認められなかった		
	交尾率 (%)	96.7 (29/30)	100.0 (30/30)	96.7 (29/30)	93.3 (28/30)	90.0 (27/30)	100.0 (30/30)	
	妊娠率 (%)	93.1 (27/29)	93.3 (28/30)	82.8 (24/29)	82.1 (23/28)	81.5 (22/27)	80.0 (24/30)	
	出産率 (%)	100.0 (27/27)	100.0 (28/28)	100.0 (24/24)	100.0 (23/23)	100.0 (22/22)	100.0 (24/24)	
	妊娠期間 (日)	22.3	22.4	22.3	22.0	22.0	22.2	
	剖検		投与による影響は認められなかった			投与による影響は認められなかった		
	臓器重量							
	肝臓 雄 実重量 対体重比						111 ↑ 108 ↑	
	雌 実重量 対体重比						116 ↑ 114 ↑	
	病理組織所見		投与による影響は認められなかった			投与による影響は認められなかった		
	児動物	新生児数 (出生時)	369	409	387	347	337	334
死亡児数 (出生時)		0	5	6	13	7	15	
平均同腹児数 (出生時)		13.7	14.6	16.1	15.1	15.3	13.9	
4日目生存率		91.2	97.8	97.8	98.6	94.4	98.9	
21日目生存率		99.5	97.3	100.0	100.0	98.3	100.0	
性比 雄 (%)		46.6	50.9	49.1	54.5	51.9	56.0	
哺育児体重 (g)								
0日目 ♂		6.9	6.7	6.8	6.8	6.5	6.9	
♀		6.5	6.4	6.4	6.3	6.1	6.5	
4日目 ♂		10.4	10.2	10.5	10.6	10.0	11.0	
♀		10.1	9.8	9.9	10.0	9.4	10.8	
7日目 ♂		17.0	16.6	17.1	16.9	15.9	17.6	
♀		16.3	16.0	16.2	16.0	14.9	17.1	
14日目 ♂	34.2	33.8	34.3	33.7	32.6	34.4		
♀	33.3	32.5	33.0	32.4	31.3	33.7		
21日目 ♂	53.6	53.0	53.3	51.8	51.2	52.9		
♀	51.8	50.8	51.1	49.9	48.9	51.4		

1) 生育期におけるP及びF1世代の平均検体摂取量
 ↑ ↓ : p < 0.05 (ANOVA + Dunnett の多重比較検定, 但し親・児動物の剖検及び親動物の鏡検結果; χ^2 + Fisher) 検体の影響と考えられた数値を下線で示した。

(3) ラットを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-25)

試験機関：Centre International de Toxicologie (フランス)
[GLP 対応]

報告書作成年月日：1992年11月27日

検体純度：

供試動物：SD系 (Cr1 CD(SD)BR.) ラット、1群交尾雌25匹、試験開始時雌10週齢

試験期間：10日間 (妊娠6～16日) (1991年8月～9月)

試験方法：検体を0.5%クレモホアEL水溶液に懸濁し10mL/kgの容量で0、100、300、1000mg/kgの投与量を、妊娠6日目から15日目までの10日間、毎日1回経口投与した。交尾を確認した日を妊娠0日とし、妊娠20日目に動物を屠殺した。

投与量設定根拠；

観察・検査項目

親動物；一般状態及び生死を毎日観察し、体重を妊娠2日、6～15日までの毎日及び妊娠20日に測定した。摂餌量を妊娠2、6、9、12、15及び20日に測定した。

妊娠21日目に動物を屠殺し、帝王切開により胎児を取り出した。全動物の肉眼的検査を実施した。子宮重量を測定し、黄体数、着床数、吸収胚数・死亡及び生存胎児数、胎盤について検査した。

生存胎児；摘出時に生存胎児について性別、体重、外表異常を観察した。その後各腹あたり各々約半数の胎児をブアン液固定しWILSON法により内臓検査を実施し、残り半数を70%エタノール液に固定しアリザリンレッドSで染色後骨格検査に供した。

試験結果；試験結果の概要を次頁の表に示した。

親動物；

死 亡；死亡例は認められなかった。

一般状態；流産はみられなかった。妊娠 15 日において 300 及び 1000mg/kg 群数例の外陰部に出血がみられたが、この変化は一過性で随伴症状もなく、また子宮摘出時においても何の所見も認められなかったことから、毒性学的に重要な所見とは考えられなかった。その他に検体に起因する症状は認められなかった。

体重及び摂餌量；妊娠動物の体重増加及び摂餌量についても対照群と投与群との間に有意な差は認められなかった。

剖 検；剖検では投与に関連した異常所見は認められなかった。平均黄体数及び着床数についても対照群と投与群の間に有意な差は認められなかった。

生存胎児；

生存胎児数、平均胎児体重、性比及び平均吸収胚数は対照群と投与群で同等であり、胎盤においても特記すべき所見は認められなかった。また、死亡胎児も認められなかった。

外表奇形、骨格異常、骨格奇形及び内臓異常は散発的にみられたが、検体に起因するものではなかった。また、内臓奇形は何ら認められなかった。骨格変異のうち、第 4 中手骨の未骨化率のみが対照群に比してわずかに高かった (1000mg/kg 群：14.2%、対照群：5.2%、 $p < 0.05$) が、これは試験施設の背景データの範囲 (平均：26.5%、平均の範囲：0.0~54.5%) にあり、検体に起因する変化とは考えられなかった。

以上の結果、いずれの投与群においても親動物及び胎児動物に対する毒性は認められず、親動物及び胎児動物における無毒性量は、1000mg/kg/日と判断された。また、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。

投与群 (mg/kg/日)		0	100	300	1000
動物数		25	25	25	25
受胎動物数		21	25	20	23
妊娠動物数		21	25	20	23
親動物	一般状態/外陰部出血	0	0	3	1
	死亡数	0	0	0	0
親動物	流産	0	0	0	0
	体重	投与による影響は認められなかった			
親動物	摂餌量	投与による影響は認められなかった			
	剖検所見	投与による影響は認められなかった			
物	着床所見	15.8	15.6	15.9	16.4
	1 黄体数	12.9	12.7	12.9	13.5
	床 腹 着床数	0.5	0.4	0.4	0.4
	所 当 吸収胚数	0	0	0	0
	見 り 死亡胎児	12.4	12.3	12.5	13.1
	生存胎児数	3.87	4.04	3.95	3.98
生存胎児体重(g)		117/143	138/169	115/135	150/151
性比(雌/雄)		260	307	250	301
外表異常: 検査胎児数		0	0	0	1
奇形	二重体	1	0	0	0
	セロソミー	0	0	1	0
	無尾	134	162	131	156
骨格異常: 検査胎児数		0	1	1	0
胎児動物	化 腰椎骨化遅延	0	1	0	0
	骨 仙椎骨化遅延	0	0	0	1
	遅 仙椎未骨化	1	1	0	1
	延 尾椎未骨化	0	0	1	0
	尾椎骨化遅延	6	7	12	4
	第1~第4胸骨骨化遅延	1	1	2	3
	第1~第4胸骨未骨化	1	1	0	0
	肋骨未骨化	1	1	0	1
	肋骨骨化遅延	0	0	0	4
	第1~第3中手骨未骨化	0	0	0	1
	第1~第3中足骨未骨化	0	1	0	0
	第1~第3中足骨骨化遅延	0	0	0	1
	恥骨未骨化	1	0	2	0
	恥骨骨化遅延	32	31	41	39
変異	第5胸骨未骨化	31	25	22	26
	第6胸骨骨化遅延	19	21	24	15
	第6胸骨未骨化	72	91	65	81
	第5胸骨骨化遅延	1	0	0	0
	第14肋骨顕在化	7	2	11	23*
	第4中手骨未骨化	0	1	0	0
奇形	肋骨癒着	0	0	0	3
	波状肋骨	126	145	119	145
内臓異常: 検査胎児数		1	1	0	0
腎盂拡張		0	1	0	1
尿管拡張					

*: p<0.05 (Fisher 検定)

(4) ウサギを用いた催奇形性試験

(毒性資料 No. 原体-26)

試験機関：マイルス社 毒性研究部 (米国)

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1993年3月10日

検体純度：

供試動物：ウサギ・ニュージーランドホワイト系 SPF 雌(人工授精)

1群 20匹、試験開始時 28週齢以上

投与期間：13日間 (妊娠 6～18日) (1992年2月～3月)

試験方法：検体を CMC[蒸留水中 0.5% carboxymethylcellulose sodium]と Tween 80NF[蒸留水中 0.4% polyoxyethylenesorbitan mono oleate]の混合水溶液に懸濁し、動物に 10mL/kg の容量で 0、100、300、1000mg/kg の投与量を、妊娠 6日目から 18日目までの 13日間、毎日 1回経口投与した。交配は人工授精を行い、あらかじめヒト絨毛膜ゴナドトロピン(HCG)の静注により発情させた雌に精液を経膈的に注入した。精液注入と同時に 2回目の HCG を静注した。人工授精日を妊娠 0日とし妊娠 29日目に動物を屠殺し、検査した。

投与量設定根拠；

観察・検査項目

親動物；一般症状、生死及び妊娠状態を毎日観察した。体重を妊娠 0日、6～19日、21及び 29日に、摂餌量を妊娠 1、6、7、12、15、19、23及び 29日に測定した。妊娠 29日目に屠殺し剖検した。子宮を摘出し重量を測定し黄体数、着床数、死亡胚・死亡胎児数、生存胎児数について検査した。

生存胎児；摘出時に生存胎児について性別、体重、外表異常を観察した。その後バルビタール頭蓋内注射で屠殺し内臓検査を行った後、アリザリンレッド S で染色し、骨格検査に供した。胎盤重量を測定した。

試験結果；試験結果の概要を次頁の表に示した。

親動物；死亡例は認められなかった。

一般状態；いくつかの所見が認められたが、これらの頻度は対照群と統計学的な有意差を示さず、投与に起因するような一般状態の変化は認められなかった。

体重及び摂餌量；体重増加及び摂餌量は対照群と投与群との間に有意差は認められなかった。

剖検；投与に関連した異常所見は認められなかった。

流産した対照群の1例では食道下の右腋窩部の膿瘍がみられた。左前肢の運動制限のみられた1000mg/kgの1例では右腋窩部及び頸部に皮下膿瘍形成が認められた。これらを含み自然発生病変が散見されたが、いずれの所見も低頻度であり、投与に起因した所見とは考えられなかった。

妊娠率、黄体数、着床数、一腹胎児数、着床前及び着床後死胚数に変化は認められなかった。

生存胎児；生存胎児数、胎児体重、性比及び胎盤重量は全投与群で対照群と有意差は認められなかった。死亡胎児は対照群及び100mg/kg群で各2例に認められた。外表、内臓及び骨格検査において認められた所見は散発的であり、投与に起因した変化ではなかった。

以上の結果、いずれの投与群においても母動物及び胎児動物に対する毒性は認められず、母動物及び胎児動物に対する無毒性量は、いずれも1000mg/kg/日と判断された。また、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。

投与量 (mg/kg)		0	100	300	1000
動物数		20	20	20	20
母動物	妊娠動物数	14	13	14	14
	不妊動物数	5	7	6	5
	流産/早産	1/0	0	0	0/1
	死亡率	0	0	0	0
	一般症状	投与の影響は認められなかった			
	体重	投与の影響は認められなかった			
	摂餌量	投与の影響は認められなかった			
	剖検所見				
	頸部、食道/腋下部位膿瘍形成	1	0	0	1
	着床所見	黄体数	6.8	6.3	5.8
着床数		6.4	5.6	5.6	5.6
吸収胚数		1.5	0.4	0.8	0.7
生存胎児数		4.9	5.2	4.8	4.9
生存胎児総数		66	66	67	68
死亡胎児総数		2	2	0	0
胎児		平均生存胎児体重(g)	47.7	47.1	45.9
	性比(雄胎児の割合)	50.0	60.0	20.0	60.6
	胎盤重量(g)	6.4	5.9	5.7	6.1
	外表異常：検査胎児数	66	66	67	68
	奇形；水頭症	1	0	0	0
	骨格異常：検査胎児数	66	66	67	68
化骨遅延	頭蓋骨骨化不全	31	22	36	26
	頸椎弓骨化不全	0	0	3	1
	胸椎体骨化不全	1	2	6	9*
	尾椎体骨化不全	0	2	1	0
	恥骨骨化不全	2	3	6	6
	胸骨分節骨化不全	65	61	74	64
	中手骨未骨化	1	0	3	4
	中手骨骨不全	3	1	6	7
変異	泉門拡大	30	22	35	25
	過剰肋骨	46	53	47	47
	過剰腰椎弓	20	15	18	22
奇形	波状肋骨	0	1	0	0
	胸骨分節癒着	1	3	1	3
	胸骨分節軟骨分枝	0	0	0	1
	胸椎弓欠如	0	0	1	1
	胸椎体二分裂	0	0	1	0
	胸椎体欠如	0	0	0	1
	尾椎体癒着	1	0	0	0
	内臓異常：検査胎児数	66	66	67	68
	変異；眼球変色	0	0	0	1
奇形	主要動脈幹残存/狭窄/拡張	1	0	0	0
	右心室萎縮/左心室肥大	2	1	0	0
	右肺副葉欠如	0	0	0	1
	左腎位置異常	0	0	0	1

* : p<0.05 (Fisher の直接確率検定)

(13) 変異原性

(1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(毒性資料 No. 原体-27)

試験機関：日本バイエルアグロケム株式会社
安全性評価研究部

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1992年1月29日

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、TA98及びTA100) 及びトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2uvrA) を用い、S-9mixの存在下及び非存在下で Amesらの方法により変異原性を検定した。
検体をDMSOに溶解し、312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲の5濃度で実施した。各濃度とも3プレートを用いた。試験は再現性を見るために2回行った。

各菌株及び各濃度の平均復帰変異コロニー数が、溶媒対照の平均復帰変異コロニー数の2倍以上で用量相関性のある増加を示した場合を変異原性陽性と判定した。

用量設定根拠；

陽性対照としてS-9mixの非存在下では、
(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)
アジ化ナトリウム (NaN₃)、9-aminoacridine (9-AA)、
S-9mixの存在下では、2-aminoanthracene (2-AA) を用いた。

試験結果：次頁に結果の表を示す。

2回の試験とも代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても溶媒対照の復帰変異コロニー数の2倍以上で、かつ用量相関性のある増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたAF-2、NaN₃、9-AA、2AAでは溶媒対照と比較して著明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、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰突然変異誘発性は有しないものと判断された。

復帰変異試験成績 (1回目)

(平均値 ; n=3)

薬物	µg/プレート	S-9Mix 有無	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	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	0	-	137	7	12	27	8
検体	312.5	-	139	7	12	31	8
	625	-	142	6	11	27	9
	1250	-	131	5	14	25	9
	2500	-	113	6	10	28	7
	5000	-	128	5	9	24	7
対照 (DMSO)	0	+	125	7	16	38	8
検体	312.5	+	127	8	17	33	9
	625	+	126	7	15	35	10
	1250	+	122	8	13	31	10
	2500	+	128	8	12	32	11
	5000	+	127	10	12	37	11
陽性対照							
AF-2	0.01	-	448	111	356	493	2147
NaN ₃	0.5	-					
AF-2	0.04	-					
AF-2	0.1	-					
9-AA	80.0	-					
2-AA	1.0	+	569	186	459	220	112
2-AA	2.0	+					
2-AA	20.0	+					
2-AA	0.5	+					

AF-2 : (2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ : アジ化ナトリウム、

9-AA : 9-aminoacridine、

2-AA : 2-aminoanthracene

復帰変異試験成績 (2回目)

(平均値; n=3)

薬物	µg/プレート	S-9Mix 有無	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	WP2uvrA	TA98	TA1537
対照 (DMSO)	0	-	130	8	14	30	5
検体	312.5	-	129	9	12	32	6
	625	-	138	8	12	29	6
	1250	-	120	7	14	30	5
	2500	-	115	9	11	27	4
	5000	-	109	7	10	26	5
対照 (DMSO)	0	+	121	8	15	36	9
検体	312.5	+	121	7	13	41	7
	625	+	126	8	15	45	8
	1250	+	135	8	15	41	9
	2500	+	128	10	12	35	8
	5000	+	120	9	11	28	6
陽性対照							
AF-2	0.01	-	492				
NaN ₃	0.5	-		118			
AF-2	0.04	-			407		
AF-2	0.1	-				490	
9-AA	80.0	-					2131
2-AA	1.0	+	617				
2-AA	2.0	+		157			91
2-AA	20.0	+			497		
2-AA	0.5	+				220	

AF-2 : (2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ : アジ化ナトリウム、

9-AA : 9-aminoacridine、

2-AA : 2-aminoanthracene

(2) チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(毒性資料 No. 原体-28)

試験機関：バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年月日：1995年7月3日

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チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) に対する染色体異常誘発性を検定した。

検体は DMSO に溶解した。

用量設定根拠：

標本の作成：フラスコに牛胎児血清を含む培地を 20mL 入れ、そこに 1×10^6 個の CHO 細胞を播種した。これを一定時間炭酸ガス恒温器内で培養した。その後培養液を捨て、S-9 Mix 非存在下では 20mL の新鮮な培地と 0.2mL の検体液を、S-9 Mix 存在下では 19mL の新鮮な培地、1mL の S-9 Mix、0.2mL の検体液を加えて 4 時間炭酸ガス恒温器内で処理した。その後新鮮な培地と交換し一定時間培養した。培養終了 2 時間前にコルセミドを添加した。8 時間、24 時間、30 時間の各標本作成時点で細胞を低張液 (0.56%KCl 液) で低張処理した後に、細胞を無水エタノール/氷酢酸混液 (3:1) で固定し、ギムザ液で染色した。1 培養当たり 2 枚のスライド標本作製した。

陽性対照では 24 時間後にのみ標本を同様に作製した。

S-9 Mix 非存在下ではマイトマイシン C (2 μ g/mL)、S-9 Mix 存在下ではシクロホスファミド (15 μ g/mL) を用いた。

中期分裂細胞の検査：各培養につき 200 個の中期分裂細胞を鏡検し、染色体及び染色分体についてギャップ、切断、断片、欠失、交換、重複異常などの構造異常を検査した。

試験結果：結果を次表に示す。

検体は S-9 Mix の存在下及び非存在下で、いずれの用量においても溶媒対照と比較して染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。なお、S-9 Mix 存在下 24 時間培養の 5 μ g/mL で、ギャップを含む異常細胞の割合が対照群に対して有意に増加 (4.5%) したが、ギャップを含まない時には有意でなく用量相関性もなかったことから、生物学的意味はないものと考えられた。

陽性対照では染色体異常を示す細胞が有意に増加した。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性は有しないものと判断された。

実験群 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 Mix	回収 時間	観察 細胞数	ギャップ		異常の分類									異常中期細胞 (%)			
						染色分体型			染色体型			その他			含ギャップ	除ギャップ	交換	
				g	ig	b	f	d	ib	if	id	ex	ma	cd				
溶媒対照	-	8	200	2	0	0	0	1	2	1	4	0	0	0	4.5	4.0	0.0	
検体 125	-		200	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	2.0	2.0	0.0	
溶媒対照	+		200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0	
検体 125			200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	0.0	
溶媒対照	-	24	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1.0	1.0	0.0	
陰性対照			200	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	0.0	
検体 5			200	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.0	
検体 25			200	1	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	3.0	2.5	0.0	
検体 125			200	1	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	2.5	2.5	0.0	
陽性対照 ^A			200	6	0	42	2	0	14	14	6	81	30	0	62.5**	62.5**	45.0**	
溶媒対照			+	200	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1.0	1.0	0.0
陰性対照				200	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	0	2.5	2.5	0.5
検体 5	200	2		0	1	0	0	1	1	5	0	0	0	4.5*	3.5	0.0		
検体 25	200	0		0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	1.5	1.5	1.0		
検体 125	200	1		0	1	0	0	1	1	2	0	1	0	2.5	2.5	0.5		
陽性対照 ^B	200	1		0	10	0	0	22	5	7	15	1	0	24.5**	24.5**	7.5**		
溶媒対照	-	30	200	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	1.5	1.5	0.0	
検体 125			200	0	0	1	0	0	0	1	3	1	0	0	2.5	2.5	0.5	
溶媒対照			+	200	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	2.0	2.0	0.0
検体 125				200	1	0	0	0	0	2	1	2	1	0	0	3.0	2.5	0.5

* : $p \leq 0.05$, * : $p \leq 0.01$, A : マイトマイシン C (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), B : シクロホスファミド (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

- g; 染色分体型ギャップ
- ig; 染色体型ギャップ
- b; 染色分体型切断
- ib; 染色体型切断
- f; 染色分体型断片
- if; 染色体型断片
- d; 染色分体型欠失
- id; 染色体型欠失
- ex; 交換
- ma; 重複異常
- cd; 染色体破損